Lilian Walsh Keller

**Epidemiologia e Caracterização Molecular do Erythrovirus
Humano em populações da América do Sul**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2010

Lilian Walsh Keller

**Epidemiologia e Caracterização Molecular do Erythrovirus
Humano em populações da América do Sul**

Tese apresentada ao Programa de Pos-Graduacao em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Area de concentracao: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Keller, Lilian Walsh.

Epidemiologia e caracterização molecular do *Erythrovirus* humano em populações da América do Sul / Lilian Walsh Keller. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Edison Luiz Durigon.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Caracterização molecular de vírus.

Versão do título para o inglês: Epidemiology and molecular characterization of human *Erythrovirus* in South American populations.

Descritores: 1. Sequenciamento genético 2. *Parvovirus* 3. Biologia Molecular 4. Genótipos 5. Epidemiologia 6. I. Durigon, Edison Luiz II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. III. Título.

ICB/SBIB083/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lilian Walsh Keller.

Título da Tese: Epidemiologia e caracterização molecular do *Erythrovirus* humano em populações da América do Sul.

Orientador(a): Edison Luiz Durigon.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Aos meus pais, José Pedro e Elisa por toda a dedicação e esforço na minha formação. Pelo amor dedicado ao longo destes anos, traduzidos em carinho e muito incentivo para que eu chegasse onde cheguei.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus que nada poderia fazer-me amar mais e por razão nenhuma Ele me amaria menos.

Ao Prof. Edison Luiz Durigon, amigo e orientador, que me acolheu em seu laboratório desde o primeiro minuto. Pela confiança e orientação e por ter me proporcionado muitas oportunidades.

‘A Dra. e grande amiga Maria Luisa Barbosa pela ajuda imprescindível na elaboração deste trabalho, pelas discussões e momentos de reflexão e principalmente pelo carinho e amizade.

Aos amigos do Laboratório do Departamento de Virologia Clínica e Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas do ICB-USP, que me acolheram com muito carinho, me ajudaram nos momentos difíceis e de dúvidas e que também me proporcionaram momentos inesquecíveis.

RESUMO

KELLER, L.W. **Epidemiologia e caracterização molecular do Erythrovirus Humano em populações da América do Sul**. 2010. 122 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O parvovírus humano B19 é um vírus não envelopado, que contém uma fita simples de DNA com duas estruturas de leitura aberta (ORFs), as quais codificam uma proteína não estrutural (NS1) e duas proteínas estruturais (VP1 e VP2). Seu genoma é altamente conservado, com 98 a 99% de similaridade entre os isolados e esta associado a infecções que podem variar de assintomáticas a quadros clínicos severos como, anemia crônica em pacientes imunocomprometidos e hidropsia ou morte fetal após infecção transplacentária. Durante a última década, variantes do parvovírus B19, gênero *Erythrovirus*, foram descritas apresentando variabilidade genética de 11 a 14 %, quando comparadas aos isolados do B19. Após a descoberta destas variantes, uma nova classificação foi proposta, dividindo o gênero em 3 diferentes genótipos (1, 2, 3a e 3b). Para avaliar a diversidade genética e o papel epidemiológico dos eritrovírus, 892 amostras brasileiras e chilenas, de soro e medula, de pacientes com suspeita clínica de patologias associadas ao B19, foram investigadas para a presença de DNA viral, por meio da técnica de *Semi-Nested* PCR, utilizando *primers* que amplificam a região NS1. As amostras positivas foram sequenciadas e genotipadas através da análise da região VP1/VP2. Os resultados mostraram predominância do genótipo 1 (89 amostras), seguido do genótipo 3 (1 amostra), nas amostras brasileiras, enquanto que nas amostras chilenas, apenas o genótipo 1 foi observado (24 amostras). A única variante detectada, a amostra BR543, apresentou variabilidade de aproximadamente 13%, quando comparada ao B19, sendo classificada como genótipo 3, subtipo 3b.

Palavras-chave: Eritrovirus B19. Sequenciamento. Variantes de eritrovirus.

ABSTRACT

KELLER, L. W. **Epidemiology and molecular characterization of Human Erythrovirus in South American populations**. 2010. 122 p. Ph. D thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Human Parvovirus B19 is a non-enveloped, ssDNA virus, with two open reading frames (ORFs), that encodes for a single nonstructural protein (NS1) and two capsid proteins (Vp1 and VP2). The genome is highly conserved, showing 98 to 99% of nucleotide similarity between the isolates and is associated with a variety of diseases that range from asymptomatic to severe manifestations as, persistent anemia in immunocompromised patients and hydrops fetalis after transplacental infection. During the last decade, parvovirus B19 variants, genus *Erythrovirus*, were described showing 11 to 14 % diversity when compared to B19 isolates. Recently, a new classification was suggested, dividing the genus in three different genotypes (1, 2, 3a and 3b). To evaluate the epidemiology and genetic diversity, 892 Brazilians and Chileans clinical samples, from serum and bone marrow, from patients with clinical manifestation associated with B19 infection were investigated for the virus DNA presence by Semi-Nested PCR for the NS1 region. The positive samples were sequenced and genotyped (VP1/VP2). The results showed the prevalence of genotype 1 (89 samples), followed by genotype 3 (1 sample), in the Brazilians samples, and in the Chilean samples only genotype 1 was observed (24 samples). The variant detected, BR543, showed 13% of divergence when compared to B19, classified as genotype 3, subtype 3b.

Key-words: Erythrovirus B19. Sequence. Parvovirus variants.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Histórico	13
2.2 Classificação do vírus	14
2.3 Genoma do vírus	15
2.4 Multiplicação viral	18
2.5 Genótipos variantes do parvovírus B19	19
2.6 Epidemiologia e patogênese	21
2.7 Manifestações clínicas	24
2.8 Tratamento	26
2.9 Diagnóstico laboratorial	27
3 OBJETIVOS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Casuística	29
4.2 Extração do DNA viral das amostras de soro e medula óssea	29
4.3 Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>)	30
4.4 Amplificação do DNA extraído	31
4.4.1 Reação de Semi-Nested PCR	31
4.4.2 PCR e Nested-PCR para genotipagem	32
4.4.3 Amplificação do genoma completo	32
4.4.4 Detecção do produto amplificado	33
4.5 Purificação e seqüenciamento dos produtos amplificados	33
4.6 Análise e alinhamento das sequências	34
4.7 Análise filogenética	34
4.8 Reação de PCR em tempo real (<i>Real-Time PCR</i>)	35

<i>4.8.1 Seleção dos oligonucleotídeos iniciadores (primers)</i>	35
<i>4.8.2 Amostras controle</i>	35
<i>4.8.3 Amostras testadas</i>	35
5 RESULTADOS	36
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXOS	70

1 INTRODUCAO

O Parvovirus Humano B19 foi detectado pela primeira vez no soro de doadores assintomáticos, no ano de 1974 (COSSART et al., 1975). Após esta descoberta, a infecção pelo vírus foi associada a diversas manifestações clínicas como, eritema infeccioso, crise aplásica transitória e artropatias (ANDERSON; JONES; MIMSON, 1985a; SERJEANT et al., 1981; MOORE, 2000), variando de acordo com o estado hematológico e imunológico do paciente.

A circulação do vírus ocorre em todo o mundo (COHEN; BUCKEY, 1988; KELLY et al., 2000; TSUJIMURA et al., 1995; VAN RIJCKEVORSEL et al., 2009), mostrando alta frequência de anticorpos da classe IgG em populações de adultos saudáveis, 44% de positividade em Santiago-Chile (ABARCA; COHEN; VIAL, 2002), 44,12% na República Checa (SODJA et al., 1995), 50% na Índia, Estados Unidos e Japão (ABRAHAM et al., 2002; ANDERSON et al., 1986; NUNOUE et al., 1985), 51,18% em Madri (GUERRI et al., 2000) e 60-70% na Inglaterra e País de Gales (COHEN; BUCKEY, 1988; GAY et al., 1994). No Brasil, a frequência de anticorpos é bastante alta, 72% em adultos entre a faixa etária de 31- 40 anos e 87% em recém nascidos com menos de um mês de vida, com os níveis de anticorpos de origem materna decrescendo até os 19 meses (HUATUCO et al., 2008).

Durante a última década algumas variantes de B19 foram identificadas. A primeira, denominada V9, foi detectada em uma amostra proveniente da França, apresentando 11% de divergência com o B19 (NGUYEN et al., 1999). Posteriormente, diferentes variantes foram detectadas em países da Europa e África, mostrando que a circulação destas variantes não se restringe a uma região específica (NGUYEN et al., 2002; SERVANT et al., 2002; HOKYNAR et al., 2002; CANDOTTI et al., 2004; PARSYAN et al., 2007). Após estas identificações, uma nova classificação foi proposta, dividindo o gênero *Erythrovirus* em três subtipos, 1 (B19), 2 (A6 e LaLi) e 3 (V9 e D91.1) (SERVANT et al., 2002). No Brasil, variantes dos genótipos 2 e 3 foram identificadas em amostras de pacientes com sintomas clínicos característicos de infecção pelo B19, levantando muitas questões sobre a epidemiologia, sintomatologia e classificação destas variantes (SANABANI et al., 2006 ; FREITAS et al., 2008).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

A família *Parvoviridae* abrange uma ampla faixa de vírus de vertebrados e invertebrados, caracterizada por vírus muito pequenos (*parvo* significa pequeno em latim) contendo ácido desoxirribonucléico (DNA) de fita simples.

Estes vírus estiveram associados somente a patologias animais até o ano de 1974, quando durante uma pesquisa para a presença de vírus da Hepatite B, em amostras de doadores de sangue assintomáticos, Yvonne Cossart et al. (1975), observaram a presença de resultados falso positivos por contraímunoelctroforese (CIE) e radioimunoensaio. A microscopia eletrônica revelou a presença de partículas muito pequenas (23 nm) semelhante ao parvovírus animal (Figura 1). O novo vírus recebeu o nome de B19, por ter sido detectado na amostra 19 do painel B e inicialmente denominado como, “partícula semelhante à parvovírus no soro” (*serum parvovirus-like particule* – SPLV), sendo conhecido oficialmente como membro da família *Parvoviridae* e nomeado *B19*, pelo comitê internacional de taxonomia dos vírus, em 1985 (SIEGL et al., 1985).

A primeira associação do vírus com sintomas clínicos foi feita em 1980 por Shneerson e colaboradores, ao demonstrarem a presença da SPLV no soro de dois soldados com doença febril. Porém, ainda não havia nenhuma doença distinta, característica da infecção pelo B19, antes de ser associado à crise aplástica transitória (TAC) em 1981 (PATTISON et al., 1981). Dois anos depois, por meio de um estudo soropidemiológico com crianças, o B19 foi associado ao eritema infeccioso (ANDERSON et al., 1983) e hoje este é aceito como o agente etiológico desta doença. Outras síndromes relacionados a infecção pelo B19 foram descritas posteriormente, como a hidropisia fetal e a artrite (BROWN et al., 1984; WHITE et al., 1985).

Figura 1- Microscopia eletrônica do Parvovírus Humano B19. Diâmetro da partícula viral 22 nm (Fonte: WADSWORTH CENTER)

2.2 Classificação do vírus

O Parvovirus B19 pertence a família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae*, gênero *Erythrovirus*, assim denominado por possuir tropismo pelas células precursoras de eritrócitos (COMITÊ INTERNACIONAL DE TAXONOMIA DOS VÍRUS 2009).

A família *Parvoviridae* é subdividida em duas sub-famílias: *Parvovirinae* que infecta vertebrados e *Densovirinae* que infecta invertebrados. A subfamília *Parvovirinae* possui, atualmente, cinco gêneros: *Parvovirus* (vírus patogênicos de animais), *Erythrovirus* (vírus B19), *Dependovirus* (vírus adeno-associados), *Amdovirus* e *Bocavirus*. A subfamília *Densovirinae* é dividida em quatro gêneros: *Brevidensovirus*, *Densovirus*, *Iteravirus* e *Pefudensovirus* (COMITÊ INTERNACIONAL DE TAXONOMIA DOS VÍRUS 2009).

O gênero do vírus B19, por três décadas, foi descrito como o único membro da família a contaminar e causar doença nos seres humanos (MORTIMER; HUMPHRIES; MOORE, 1983; OSAWA; KURTZMAN; YOUNG, 1986; PRINGLE, 1993, HEEGAAR; BROWN., 2002). Porém em 2005, uma segunda espécie de

parvovírus pertencente ao gênero *Bocavirus* foi descrita causando patologias no trato respiratório dos seres humanos (ALLANDER et al., 2005).

2.3 Genoma do vírus B19

O virion do B19 possui uma estrutura relativamente simples com diâmetro entre 18 e 26 nm, capsídeo de simetria icosaédrica e destituídos de envoltório lipídico. O peso molecular da partícula viral completa está entre $5,5$ e $6,2 \times 10^6$ Dalton sendo composto de proteínas (80%) e DNA (20%) (BERNS et al., 1996).

O B19 possui um DNA de fita simples (ssDNA) contendo $\cong 5.596$ nucleotídeos (nt), o qual pode ser de polaridade positiva ou negativa, composto por uma sequência codificadora interna de 4.830 nt flanqueada por uma sequência terminal repetida de 383 nt cada (DEISS et al., 1990; GALINELLA et al., 2003; BERNS, 1996). Estas sequências finais são palindrômicas e capazes de assumir a configuração de grampo (*hairpin duplex*), sendo utilizadas como *primers* para a síntese de fitas complementares, durante a duplicação do genoma. O vírus apresenta um único promotor (p6), responsável pela transcrição dos mRNAs, todos com início na extremidade 3' do genoma (BLUNDELL; BEARD; ASTELL, 1987; OZAWA; YOUNG, 1987). O único mRNA que não sofre processamento pós-transcricional, traduz a proteína NS1, os outros transcritos, traduzem as proteínas estruturais (VP1 e VP2) e outras duas proteínas adicionais menores com funções ainda desconhecidas (COTMORE et al., 1986; OZAWA et al., 1987; ST AMAND et al., 1991; MOMOEDA et al., 1994; ZHI et al., 2006). Todas essas estruturas possuem funções específicas para a replicação e infectividade do vírus (Tabela 1).

Tabela 1- Funções das proteínas do B19.

	Nome da proteína	Função imunomodulatória
Proteínas do capsídeo	VP1	Contem epítomos de neutralização
	VP1u	Induz resposta auto-imune Alvo de respostas celulares CD4/CD8 Atividade da phospholipase A2
	VP2	Alvo da resposta humoral
Proteína não estrutural	NS1	Controlar o ciclo celular Indução da apoptose Trans-ativador do promotor p6 (replicação) Trans-ativação dos genes do hospedeiro: IL-6, TNF e NF-kB ATPase, helicase e endonuclease Alvo de respostas CD8

A proteína NS1 é conhecida como uma proteína multifuncional. Atua como trans-ativadora na regulação de promotores, tanto do vírus como da célula hospedeira (GAREUS et al., 1998), sendo o promotor viral (p6) crucial na replicação do vírus (GAREUS et al., 1998).

Evidências tem demonstrado o envolvimento da NS1 na indução da apoptose em linhagens de células eritróides durante a infecção pelo B19, através da ativação da caspase 3 (HSU et al., 2004) que por sua vez pode alterar e degradar proteínas celulares vitais, como enzimas de reparo de DNA, induzindo a morte celular (MOFFATT et al., 1998).

As duas proteínas estruturais VP1 (84 kDa) e VP2 (58 kDa) são codificadas pela mesma ORF, sendo que a proteína VP1 possui 227 aminoácidos a mais na posição amino terminal, denominada de VP1-única (VP1u). A principal proteína que compõem o capsídeo viral é a VP2, compreendendo 96%, a qual se liga diretamente ao antígeno P, receptor celular do B19 (OZAWA et al., 1987; BROWN; ANDERSON; YOUNG, 1993). Estudos tem demonstrado que as proteínas VP1 e VP2 podem ser expressadas em bactérias, células de inseto e mamíferos. A

expressão da proteína VP2 em células de mamífero e inseto, sem a presença do DNA viral, resulta na formação de partículas virais vazias (vírus-like particles) que são física, antigênica e imunogenicamente semelhantes aos vírus selvagens (KAJIGAYA et al., 1991).

A proteína VP1, apresenta na região VP1u, epítomos de neutralização de grande importância para o potencial imunogênico e patogênico do B19 (KAJIGAYA et al., 1991; ZUFFI et al., 2001). Em adição a esta função, a VP1u possui uma atividade similar a fosfolipase A2, iniciando ou acelerando a resposta inflamatória (ZADORI et al., 2001).

2.4 Multiplicação viral

A multiplicação do vírus ocorre no núcleo de células pertencentes à linhagem dos eritrócitos, as quais possuem em sua superfície um globosídeo, o antígeno P, receptor do vírus na célula (BROWN; ANDERSON; YOUNG, 1993). Este antígeno está também presente nos eritroblastos, megacarioblastos e células endoteliais, trofoblastos e tecidos intersticiais da placenta, e nas células hematopoiéticas e células miocárdicas fetais (BROWN, 1994). Evidências mostram que este não é o único receptor para o vírus, sugerindo que o tropismo do vírus, pode ser mediado pela presença de um segundo receptor, ainda, não identificado (WONG et al., 2008). O nível de expressão do antígeno P não se correlaciona com a eficiência da ligação viral fornecendo maior evidência da existência de um co-receptor celular alternativo para a entrada eficiente do B19 nas células humanas (BROWN, 1994; WEIGEL-KELLY; YODER; SRIVASTAVA, 2001).

Após a adsorção e o desnudamento ocorre o transporte do ácido nucléico viral para o núcleo da célula hospedeira, sendo necessário que a célula entre na fase S da mitose para que a replicação viral ocorra (WALTER; RICHARDS; ARMENTROUT, 1980; BERNS, 1996). Durante sua replicação, as sequências palindrômicas terminais, contendo aproximadamente 330 nt, dobram sobre si mesmas, formando uma estrutura semelhante a um grampo (*hairpin*). Os *hairpins* da extremidade 3' funcionam como iniciadores (*primers*) para a DNA polimerase. Nestas regiões, de DNA de fita dupla, tem início a replicação com a formação de

uma fita complementar. A replicação continua através da formação de intermediários de fita dupla que, posteriormente, são enzimaticamente clivados gerando DNA de simples fita. A fita infecciosa, negativa por convenção, da origem a duas fitas positivas e duas fitas negativas de DNA (YOUNG, 1988 YOUNG, 1996).

O promotor viral (p6), localizado na extremidade 3' do genoma, é responsável pela transcrição dos mRNAs. O único que não sofre processamento pós-transcrição, traduz a proteína NS1, importante para a replicação do DNA viral. A proteína VP1 é caracterizada por um domínio adicional de 227 aminoácidos, na região terminal, denominada região única da VP1 (VP1u). Desta forma, as proteínas VP1 e VP2 são codificadas por sequências de leitura aberta que se sobrepõem (OZAWA et al., 1987).

Young et al. (1984) observaram que 95% do DNA viral produzido, após a replicação do vírus em cultura de células de medula óssea humana, permanecem no núcleo e as proteínas estruturais do vírus são produzidas no citoplasma. Por microscopia eletrônica observou-se a presença de partículas virais formando arranjos cristalinos no núcleo e citoplasma da célula infectada, sugerindo que a montagem destas novas partículas virais ocorra no núcleo e a liberação seja por lise da célula.

2.5 Genótipos variantes do parvovírus B19

O genoma viral do eritrovírus B19 é muito conservado, com 98-99 % de similaridade entre os isolados (HICKS et al., 1996; ERDMAN et al., 1996). Porém, Nguyen et al.(1999) identificaram na França, no ano de 1998, a presença de uma variante, no soro de uma criança apresentando crise aplástica transitória (TAC). Ao analisar um fragmento de 346 nt da região VP1u, observou-se uma significativa diferença, 11%, com sequências de B19, e uma clara distância com sequências de parvovirus animais. Esta variante, denominada V9, foi clonada e seu genoma completo analisado, confirmando que as divergências não estavam restritas a região VP1u, mas se estendiam por todo o genoma. Este achado levantou a

hipótese de que outras variantes de B19 poderiam estar presentes na população humana.

Posteriormente, Nguyen et al. (2002), padronizaram a técnica da PCR para detectar e diferenciar o B19 de variantes. Ao analisar uma amostragem contendo mais de 2.000 soros, uma nova variante (A6), mostrando 12,2% de diferença com o B19 e 8% com o V9 foi identificada. Esta amostra era proveniente da Itália, de um paciente apresentando anemia crônica.

No mesmo ano, Hokynar et al. (2002) detectaram duas novas variantes, denominadas LaLi e HaAM, em amostras de pele, com uma diferença de apenas 0,3% entre elas, porém, muito divergentes do B19. A diferença se mostrou maior na região promotora, 26,5%, quando comparada com o B19. Estes achados demonstraram pela primeira vez, uma correlação entre um genótipo de eritrovírus com o tropismo por um tecido específico.

Um amplo trabalho na identificação de variantes, no estudo das manifestações clínicas e classificação taxonômica de variantes, foi conduzido por Servant et al. (2002). Mais de 1000 amostras de soros e plasmas foram analisadas e divididas em grupos de acordo com a epidemiologia e manifestações clínicas. Apesar da heterogeneidade genética entre os eritrovírus detectados, não foi possível observar diferença nas manifestações clínicas entre as infecções causadas pelos diferentes genótipos. As amostras similares ao V9 foram encontradas em amostras de pacientes com sintomas clínicos de: anemia crônica, AIDs, crise aplástica transitória (TAC), pancitopenia, além de dois pacientes imunocomprometidos e uma gestante, quadros clínicos observados pela infecção pelo B19. Uma amostra, similares ao V9, denominada D91.1, teve seu genoma completo sequenciado. A comparação desta sequência com 12 isolados de B19 e variantes mostrou que a sequência D91.1 e o V9 são similares entre si e distantes do B19 ($\cong 14\%$). Enquanto que a sequência LaLi se apresentou distante de ambos os grupos ($\cong 12\%$ com o B19 e $\cong 9\%$ com o V9) (SERVANT et al., 2002).

A identificação de variantes, de eritrovírus, levou a divisão do gênero em três diferentes genótipos. Servant et al. (2002) sugeriram que o grupo dos eritrovírus fosse classificado como: B19 como genótipo 1, A6 e K71 como genótipo 2 e o V9 e D91.1 como genótipo 3, sendo este, posteriormente subdividido em dois subtipos

B19/3a e B19/3b (PARSYAN et al., 2007). Estes estudos mostraram a importância de se avaliar a diversidade genética e a relação filogenética do gênero *Erythrovirus*.

No Brasil, em estudo realizado com 69 amostras de medula óssea, com quadro clínico característico de infecção pelo B19, foram detectadas 12 amostras positivas para eritrovírus, sendo cinco do genótipo 1, uma do genótipo 2 e seis do genótipo 3. A diversidade entre os genótipo 1 e 2 e 1 e 3 foi de 14,7 e 13,2% respectivamente (SANABANI et al., 2006).

Um dado interessante é que os diferentes genótipos parecem ter uma distribuição geográfica característica. O genótipo 2 foi encontrado quase que exclusivamente no continente Europeu (HOKYNAR et al., 2001, 2002; NGUYEN et al., 2002), com poucos relatos no Brasil (SANABANI et al., 2006; FREITAS et al., 2008) e o genótipo 3 demonstra ser endêmico na África (PARSYAN et al., 2007), com raras aparições no Brasil (SANABANI et al., 2006; FREITAS et al., 2008; KELLER et al., 2009) e França (NGUYEN et al., 1999; SERVANT et al., 2002).

2.6 Epidemiologia e patogênese

O B19 possui distribuição mundial, podendo ocorrer em qualquer faixa etária, porém, apresenta nítida prevalência da doença em crianças (GILLESPIE et al., 1990; PILLAY et al., 1992; ADLER et al., 1993), 10% dos casos de eritema infeccioso (EI) ou TAC ocorrem em crianças menores de 5 anos, 70% em pacientes com idade variando de 5 a 15 anos e 20% em pacientes com mais de 15 anos (ANDERSON, 1987). O pico de incidência do vírus, nos países de clima temperado, ocorre principalmente no final do inverno e início da primavera (CHORBA et al., 1986).

A soroprevalência de anticorpos IgG contra o B19 aumenta com a idade, de 2 a 15% em crianças pré-escolares, 50% em adultos jovens e aproximadamente 80% na população adulta (COHEN; BUCKEY, 1988; TSUJIMURA et al., 1995; KELLY et al., 2000).

Em adultos saudáveis a frequência de anticorpos da classe IgG contra o B19, em diferentes populações pode ser variável. Estudos realizados em diferentes

países mostram, 44% de positividade em Santiago-Chile (ABARCA; COHEN; VIAL, 2002), 44,12% na Republica Checa (SODJA et al., 1995), 50% na Índia, Estados Unidos e Japão (ABRAHAM et al., 2002; ANDERSON et al., 1986; NUNOUE et al., 1985), 51,18% em Madri (GUERRI et al., 2000) e 60-70% na Inglaterra e País de Gales (COHEN et al., 1988; GAY et al., 1994). No Brasil, a frequência de anticorpos é bastante alta, 72% em adultos entre a faixa etária de 31 a 40 anos de idade e 87% em recém nascidos com menos de um mês de vida, entretanto, os níveis de anticorpos de origem materna decrescem até os 19 meses (HUATUCO et al., 2008). Por outro lado, em populações indígenas, no estado do Pará, a ocorrência apresenta-se baixa, 10,7% (FREITAS et al., 1990).

A transmissão do B19 pode ocorrer por inalação de aerossóis contaminados e disseminados no ambiente, bem como pelo contato com o sangue, seus derivados, fatores de coagulação e concentrado de hemácias de pacientes durante a fase aguda da doença. Durante este período de viremia (fase aguda), o vírus está presente no sangue, saliva e secreções de nasofaringe do paciente portador do vírus (SCHMIDT et al., 2001; BROWN; YOUNG, 1997). As vias respiratórias representam a principal forma de transmissão e a mais eficaz na propagação do B19 (SETUBAL et al., 2004; WOOLF et al., 1989). A chance de infecção pelas transfusões sanguíneas é de 1:100 a 1:35.000 (YOTO et al., 1995; KLEINMAN et al., 2007, LISBOA, 1997). A infecção pelo B19 também ocorre em pacientes que receberam transplante de diferentes órgãos como, rim, coração e fígado de doadores infectados. Estudo realizado por Choi et al. (2002) identificaram a infecção pelo B19 em 22 pacientes que receberam transplante renal, sendo 19 de doadores falecidos.

A transmissão do B19 é particularmente eficaz em comunidades fechadas como creches, escolas e mesmo entre pessoas de uma mesma família. Alguns estudos demonstraram que as taxas de infecção entre os contatos no âmbito familiar oscilam em torno de 50% (PLUMMER, 1985; BROLIDER et al., 2006).

Devido ao tropismo do B19 por células precursoras de eritrócitos, ocorre uma interrupção do fornecimento de hemácias para a circulação, consequência da lise celular provocada pelo vírus em pacientes infectados. No caso de hospedeiros imunocompetentes, capazes de produzir anticorpos de neutralização, restabelece-

se a eritropoiese em poucos dias, sem maiores consequências. Em contrapartida, nos portadores de anemia hemolítica crônica ou de quadro hemorrágico agudo ou crônico de diversas etiologias, o bloqueio medular leva a anemia aguda grave, eventualmente fatal. Tal condição se caracteriza pela crise aplástica transitória (TAC) (SERJEANT et al., 1981). Pacientes imunodeficientes, estão particularmente em risco como os portadores de HIV, pacientes com câncer recebendo quimioterapia e pacientes transplantados recebendo drogas imunossupressoras (YOUNG, 1996). Muitos são incapazes de produzir anticorpos neutralizantes contra o B19 e apresentam um quadro de aplasia eritróide medular prolongada, com anemia crônica grave (YOUNG, 1996).

A fase de viremia causada pelo B19 ocorre 1 semana após a exposição ao vírus e geralmente dura 5 dias, com pico de replicação viral nos primeiros 2 dias. As imunoglobulinas da classe IgG são detectadas no final da fase viremica (aproximadamente entre 10 e 12 dias) e podem persistir por 5 meses (ANDERSON et al., 1985a; SCHWARZ et al., 1988), porém em alguns pacientes podem durar ainda mais (MUSIANI et al., 1995). As imunoglobulinas da classe IgG permanecem com altos títulos por alguns meses e persistindo por toda a vida (Figura 2) (BELL, 1989; ANDERSON, 1990; PETERLANA et al., 2006).

Figura 2- Eventos clínico-laboratoriais observados no curso da infecção pelo parvovírus B19 (Fonte: COLMEGNA et al., 2009).

2.7 Manifestações clínicas

Embora muitas infecções sejam assintomáticas, os sinais clínicos e os sintomas causados pela infecção por parvovírus B19 variam de acordo com o estado hematológico e imunológico do paciente. As manifestações clínicas mais comuns são:

a) Eritema infeccioso (EI)

Conhecido, também, como 5º doença é o quadro clínico típico de infecção pelo B19, durante a infância (ANDERSON et al., 1984). Sintomas como, febre baixa, mal-estar, dores músculo-esqueléticas, cefaléia e/ou náuseas, podem ocorrer. O primeiro estágio do exantema, apresenta-se como eritema nas bochechas (*slapped-cheek*). Após 1 a 4 dias, o segundo estágio apresenta-se como exantema maculopapular nas extremidades e tronco, podendo durar de 1 a 6 semanas. A persistência do exantema depende da exposição ao sol e calor do paciente e desaparece espontaneamente sem deixar sequelas (ANDERSON et al., 1984; HEEGAARD; BROWN, 2002).

b) Artropatias

A artrite pode ocorrer devido a uma complicação do eritema infeccioso ou como uma primeira apresentação da infecção pelo B19. A artrite aguda ou persistente é o quadro clínico característico em adolescentes e adultos, afeta 60% desta população, sendo as mulheres 50% mais afetadas (NESHER; MOORE, 1997). Trata-se de uma poliartropatia simétrica que atinge as articulações interfalângicas próximas das mãos, punhos, joelhos, tornozelos e/ou pés, expressando-se por simples artralguas ou por edema articular com rubor, calor e rigidez, podendo as dores atingir grande intensidade. Os sintomas geralmente regredem em três semanas mas, podem durar por meses ou anos, principalmente em mulheres (JESSICA; BRIAN; JOSHUA, 2007).

c) Crise aplástica transitória (TAC)

A crise aplástica transitória foi a primeira doença associada ao B19. Caracteriza-se por uma abrupta cessão na produção de células vermelhas, provocando um quadro de anemia severa (PATTISON et al., 1981; YOUNG et al., 1984). Em indivíduos hematologicamente normais, a infecção regride espontaneamente, após o aparecimento de anticorpos específicos. Em pacientes portadores de alterações sanguíneas, como, anemia hemolítica crônica, talassemia, esferocitose hereditária e anemia falciforme, o quadro caracteriza-se pelo aparecimento de palidez, astenia e letargia, com eminente risco de vida, face ao bloqueio medular *versus* a elevada demanda por hemácias (PATTISON et al., 1981).

d) Infecção crônica em imunodeficientes

A infecção pelo parvovírus B19 pode ser persistente em pacientes imunocomprometidos por não produzirem anticorpos neutralizantes. Eritema e artropatia não se apresentam por serem uma consequência da deposição de imunocomplexos na pele e juntas (POSFAY-BARBE; MICHAELS, 2003). Os pacientes apresentam fadiga e palidez devido a anemia, a qual pode ser severa, prolongada e recorrente. Se a anemia se mantiver severa por um tempo prolongado, pode ser necessário o tratamento com imunoglobulina intravenosa (KURTZMAN et al., 1989).

e) Hidropsia fetal

O primeiro relato de infecção fetal durante a gestação foi comprovado quando se detectou a presença de IgM anti-B19 no sangue de um natimorto e de sua mãe em 1984 por Knott; Welply; Anderson. Em uma segunda situação, Brown et al. (1984) detectaram a presença de DNA viral em tecido fetal utilizando a técnica de hibridização.

O vírus infecta o fígado do feto, sítio de produção dos eritrócitos durante as primeiras fases do desenvolvimento (ANDERSON; HURWITZ, 1988; BROWN et al., 1984). A maioria dos casos de hidropsia fetal não-imune, associadas ao B19, ocorrem no segundo trimestre da gestação, 4 a 5 semanas após se instalar a infecção materna (REDDY et al., 2005; CHISAKA et al., 2006). O aborto espontâneo e a morte intrauterina são mais frequentes no primeiro e terceiro trimestres da gestação, respectivamente (NYMAN et al., 2002). Entretanto, a infecção do feto pode ser resolvida espontaneamente, resultando em uma criança normal e sem complicações posteriores (MOREY et al., 1991; XU et al., 2003).

2.8 Tratamento

Alguns quadros clínicos como o eritema infeccioso desaparecem sozinhos, não sendo necessário nenhum tipo de tratamento. Pacientes com artralgias podem requerer tratamento com drogas anti-inflamatórias (HEEGAARD; JENSEN; CHRISTENSEN, 2002). Transfusões de eritrócitos podem ser necessárias em pacientes com crise aplásica transitória, enquanto a medula óssea se recupera (POSFAY-BARBE; MICHAELS, 2003). Aplasia crônica de série vermelha, se severa, pode necessitar de terapia com imunoglobulinas intravenosas (KURTZMAN et al., 1989). Este tratamento pode melhorar os sintomas de anemia, porém pode causar o desenvolvimento de exantemas e artropatias. A terapia com imunoglobulina intravenosa, também, vem sendo empregada em diversos casos de doença severa (KURTZMAN et al., 1989).

Uma vacina recombinante, contendo as proteínas estruturais (VP1 e VP2), demonstrou promover uma resposta de anticorpos neutralizantes em adultos, porém, mais estudos são necessários para se verificar a eficácia desta vacina na prevenção da infecção pelo B19 (BALLOU et al., 2003).

2.9 Diagnóstico Laboratorial

A infecção por B19 pode ser diagnosticada pela observação dos sintomas da doença, presença de anticorpos no soro, detecção de partículas virais na medula e

sangue e mudanças histológicas típicas dos precursores de células vermelhas. Diferentes métodos de identificação têm sido utilizados e otimizados para espécimes clínicos de indivíduos infectados, tais como: detecção da partícula viral por microscopia eletrônica (COSSART et al., 1975); contra-imunoelektroforese (COHEN; HEWISH; MORTIMER, 1981) ou radio-imunoensaio de antígenos virais (COHEN; MORTIMER; PEREIRA, 1983); ensaios de hibridização de ácido nucléico (ANDERSON et al., 1985; CLEWLEY, 1985; CUNNINGHAN et al., 1988; MORI et al., 1989; ERDMAN et al., 1994), amplificação de sequências do genoma do B19 pela reação da polimerase em cadeia (PCR) (SALIMANS et al., 1989; CLEWLEY, 1989; KOCH; ADLER, 1990; KOVACS et al., 1992; CARRIERE; BOULANGER; DELSERT, 1993; DURIGON et al., 1993, 1994; ERDMAN et al., 1994, 1996; LISBOA, 1997; DORSCH, 2002), sequenciamento parcial ou total do genoma (SHADE et al., 1986; HICKS et al., 1996; GALLINELLA et al., 1993) e atualmente detecção e quantificação do genoma por PCR em Tempo Real (SCHALASTA et al., 2004).

Em mulheres grávidas e indivíduos imunocomprometidos, as respostas imunológicas devem ser interpretadas com cautela, pois estes pacientes nem sempre conseguem produzir uma resposta imunológica clara e eficiente contra o patógeno (ENDERS; SCHALASTA; BAISCH, 2006).

As novas variantes do erythrovírus B19, por serem possíveis vírus humano emergentes, merecem destaque no desenvolvimento de novas pesquisas laboratoriais que possa facilitar o diagnóstico etiológico deste vírus, bem como no entendimento das patologias que possivelmente possam estar associadas a este novo agente.. No Brasil a escassez de dados sobre a variabilidade genética destes vírus justifica a importância de estudos do genoma completo vírus.

3 OBJETIVOS

- Detectar o gênero *Erythrovirus* em amostras de pacientes com suspeita clínica de Parvovírus B19;
- Identificar por sequenciamento as variantes de *Erythrovirus*;
- Avaliar a frequência dos diferentes genótipos nas amostras analisadas, tentando correlacionar com as manifestações clínicas;
- Comparar amostras da população brasileira e chilena, a partir da caracterização molecular.
- Testar a técnica de Real-Time PCR para detecção do gênero Erythrovírus.
- Comparar sequência de *Erythrovirus* isolados de pacientes com diferentes quadros clínicos com sequência de pacientes assintomáticos, visando relacionar possíveis mutações com a patologia.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Casuística

Neste estudo foram selecionadas 852 amostras de soro e/ou medula de pacientes de ambos os sexos, com suspeita clínica de infecção pelo Parvovirus Humano B19, procedentes da coleção de amostras clínicas do Laboratório de Virologia Clínica e Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, durante o período de 1995 a setembro de 2009. O banco de amostras recebe espécimes provenientes de hospitais do Estado de São Paulo em sua maioria, e amostras do Rio Grande do Sul, Santa Catarina esporadicamente. Foram também estudadas, 40 amostras provenientes do Chile da Faculdade de Medicina da Universidade do Chile, em um trabalho conjunto com o Prof. Dr. Aldo Gaggero.

Amostras de 23 doadores de sangue assintomáticos, provenientes da cidade de São Paulo, foram incluídas neste estudo.

4.2 Extração do DNA viral das amostras de soro e medula óssea

Soluções contendo 150 µl de TNE (10 mM de Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM NaCl e 1 mM EDTA), 10 µl de proteinase K (pK), 20 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e 20 µl da amostra foram incubadas a 56 °C/30 min. para que ocorresse a digestão das proteínas, permitindo a liberação do DNA viral do interior da célula.

Posteriormente, o DNA foi extraído sequencialmente com igual volume de fenol, fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1) e clorofórmio:álcool isoamílico. Adicionou-se 200 µl de fenol saturado, agitando-se vigorosamente por 1 minuto em agitador tipo *Vortex* e centrifugando-se a 12.000 g por 3 min. A seguir, foram transferidos 150 µl do sobrenadante para um microtubo contendo 150 µl de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. Após agitação e centrifugação, foram transferidos 100 µl do sobrenadante para um novo microtubo contendo 100 µl de clorofórmio. Finalmente, seguida a última etapa de agitação e centrifugação, foram

retirados 40 µl do sobrenadante, evitando-se a camada de clorofórmio e armazenando-se em congelador (freezer) a – 20 °C, até o momento do uso. Durante todo o procedimento foram utilizados controles positivos e negativos.

4.3 Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Foram empregados *primers*, desenhados a partir de regiões conservadas do genoma, que codificam as proteínas não estrutural (NS1) e estruturais (VP1 e VP2), obtidos após a análise do alinhamento de sequências de eritrovírus presentes no GenBank. *Primers* já descritos na literatura, utilizados neste trabalho, foram avaliados quanto a especificidade na detecção de eritrovirus (Tabela 2).

Tabela 2- Descrição dos *primers* utilizados para a reação de PCR e *Semi-Nested* PCR com suas localizações na sequência de DNA.

NS1

Nome do Primer	Localização (nt)*	Sequencia dos nucleotídeos (5' – 3')	Referencia
P26f	102 - 123	5' GACGTCACAGGAAATGACGTAA 3'	Desenhado
P40f	528 - 548	5' TTCTGACTGGGAACCACTAAC 3'	Desenhado
P30f	828 - 850	5' TAGAGATGGAGAGCAGTTTATAG 3'	Desenhado
P27r	896 - 874	5' ACACACCACACA ACATTTAAAGG 3'	Desenhado
E1	1395 -1422	5'GAAAAATACAATGTGGTTTTATGGGCCCG 3'	Desenhado
I5	1599 - 1579	5' TAAAATGGCTTTTGCAGCTTC 3'	Desenhado
E6	1684 - 1657	5' CACCATTGCTGGTTATAACCACAGGTAC 3'	Desenhado
P31r	1691 - 1670	5' GTAATGTCACCATTGCTGGTTA 3'	Desenhado
P36f	2097 - 2117	5' TGT CGG AAG CCC AGT TTC CTC 3'	Desenhado
P20f	2403 - 2424	5' AAAATGTGCTTACCTGTCTGGA 3'	Durigon et al 1993 Erdman et al 1996

VP1

Pf	2699 - 2721	5' CAGTTATCTGACCACCCCATGC 3'	Desenhado
P21r	2719 - 2699	5' GCATGGGGGTGGTCAGATAACTG 3'	Durigon et al 1993 Erdman et al 1996

Continua

VP1/VP2

P7f	3142 - 3163	5'TGCAGAAGCCAGCACTGGTGCA 3'	Durigon et al 1993 Erdman et al 1996
P8f	3260 - 3280	5' ATTCCATATGACCCAGAGCAC 3'	Durigon et al 1993 Erdman et al 1996
P9r	3280 - 3260	5' GTGCTCTGGGTCATATGGAAT 3'	Durigon et al 1993 Erdman et al 1996
P11r	3589 - 3567	5' ATGGTCTACTAACATGCATAGGC 3'	Durigon et al 1993 Erdman et al 1996
P19r	3868 - 3845	5' GTGTTGACTGCAGCCCTCTAAATT 3'	Durigon et al 1993 Erdman et al 1996
P12f	4127 - 4148	5' CAGCCATACCACCACTGGGACA 3'	Durigon et al 1993 Erdman et al 1996
P13F	4214 - 4237	5' GACAAAGAGTATCAGCAAGGAGTG 3'	Durigon et al 1993 Erdman et al 1996
P14r	4237 - 4214	5' CACTCCTTGCTGATACTCTTTGTC 3'	Durigon et al 1993 Erdman et al 1996
P15f	4665 - 4689	5' CAGCAGGTCATTTACCATATGTACT 3'	Durigon et al 1993 Erdman et al 1996
P16r	4689 - 4665	5' AGTACATATGGTAAATGACCTGCTG 3'	Durigon et al 1993 Erdman et al 1996
P17r	4824 - 4803	5' TTACGCATCCTGGCTGAGGGCA 3'	Durigon et al 1993 Erdman et al 1996

* localização da sequência de nucleotídeos baseada no isolado B19-Au (Shade et al., 1986)

4.4 Amplificação do DNA extraído

4.4.1 Reação de Semi-Nested PCR

A solução para a *Semi-Nested* PCR foi constituída de: 5 µl de amostra, 5 µl de tampão de reação, 8 µl de dNTP (desoxiribonucleotídeo trifosfato) a 1,25 mM, 1,5 µl de MgCl₂ a 50 mM, 2,5 µl do *primer* E1 a 10 ng/µl, 2,5 µl do *primer* I5 a 10 ng/µl, 0,25 µl do *primer* E6 a 10 ng/µl, 1 U de Platinum Taq DNA Polymerase (5 U/µl, Invitrogen™®, Carlsbad, Califórnia, EUA) e água MiliQ para completar um volume de 50 µl. A amplificação foi realizada em termociclador automático (*Applied Biosystems*, 2.400 ou 9.700) com os seguintes ciclos: 94 °C por 5 min., seguido de 20 ciclos de 94 °C por 30 seg., 65 °C por 30 seg., e 72 °C por 30 seg., terminado esta primeira etapa com 72 °C por 1 min. e 4 °C por 2min. A Segunda etapa inicia com um aumento da temperatura a 94 °C por 2 min., seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 seg., 50 °C por 30 seg. e 72 °C por 30 seg. para finalizar 72 °C por 7 min. as amostras foram estocadas a 4 °C até a análise por eletroforese em gel de agarose.

4.4.2 PCR e Nested-PCR para genotipagem

A solução para a PCR foi constituída de: 5 µl de amostra, 5 µl de tampão de reação, 8 µl de dNTP (desoxiribonucleotídeo trifosfato) a 1,25 mM, 1,5 µl de MgCl₂ a uma concentração de 50 mM, 2,5 µl do *primer sense* (P12) a 10 ng/µl, 2,5 µl do *primer anti-sense* (P17) a 10 ng/µl, 1 U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen™®) e água MiliQ para completar um volume de 50 µl. A amplificação foi realizada em termociclador automático (Applied Biosystems, 2.400 ou 9.700) nos seguintes ciclos: 94 °C por 5 min., seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 seg., 55 °C por 30 seg. e 72 °C por 45 min. e um alongamento final a 72 °C por 7 min. As amostras foram estocadas a temperatura de 4 °C até a análise por eletroforese em gel de agarose.

A *Nested-PCR* foi realizada seguindo os mesmos padrões da PCR, mudando apenas os *primers sense* (P13) e *anti sense* (P16).

4.4.3 Amplificação do genoma completo

O genoma completo foi amplificado seguindo as mesmas condições da PCR, utilizando diferentes combinações de *primers* como mostra a figura 3.

Figura 3- Estratégia de amplificação do genoma completo de eritrovírus. Primers sense estão localizados na parte superior e anti-sense na parte inferior. Os números de base estão baseados na sequência B19-Au (Shade et al., 1986).

4.4.4 Detecção do produto amplificado

Os produtos amplificados foram submetidos a uma corrida eletroforética de 80 volts, em gel de agarose a 1,5% com tampão TBE 1X (45 mM de Tris-Borato e 1 mM de EDTA pH 8,0). A visualização foi realizada pela coloração com brometo de etídio a uma concentração final de 0,5 µg/ml em transluminador UV.

4.5 Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados

A purificação foi realizada pelo método de Acetato de Sódio [3M], pH 5,25 e isopropanol a 100%. Para o volume de produto amplificado foram adicionados 10 % do volume total de Acetato de Sódio a 3M pH 5,25 e 2X o volume de Etanol 100% gelado ((MERK PA), a mistura foi vigorosamente agitada. Após um período de incubação de 3 horas, em freezer -70 °C, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4 °C/30min. (*Centrifuge 5804R Eppendorf – rotor F45-36-8*). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 150 µl de Isopropanol 75% e centrifugado a 14.000 rpm, a 4 °C/10min. O sobrenadante foi descartado e após secagem em *speed vacuum* a 60 °C/5 min. as amostras foram resusspendidas em 30 µl de água ultra pura.

O sequenciamento dos fragmentos de DNA foi realizado com o Kit “*ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Big Dye – Applied Biosystems, Inc., EUA)*” seguindo as orientações do fabricante. Foram utilizados 1 µl de *primer* a 10 pmol, 1 µl de amostra, 2 µl de *Save Money*, 2 µl de *Big Dye* e água miliQ para completar um volume final de 10 µl. As amostras foram processadas em duplicata, com os *primers sense* e *anti-sense*. A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador automático (*Applied Biosystems, Inc., EUA 2.400 e 9.700*) por 96 °C/1 min. Seguido de 25 ciclos de 96 °C/15 seg., 50 °C/15 seg. e 60 °C/4 min. O produto obtido foi purificado por precipitação com isopropanol a 100%, seguido de duas lavagens com isopropanol a 75% e seco em *speed vacuum*.

As amostras purificadas foram ressuspendidas em 10 µl de formamida HiDi (*Applied Biosystems, Inc., EUA*) e submetida à eletroforese em polímero POP6, utilizando sequenciador automático ABI modelo 3100 (*Applied Biosystems, Inc., EUA*).

4.6 Análise e alinhamento das sequências

As sequências de nucleotídeo foram analisadas com o programa *Sequence Navigator* versão 1.0 (*Applied Biosystems, Inc., EUA*) para *Power Macintosh*, alinhadas utilizando o programa *Clustal W*, versão 1.4. Também foi realizado o alinhamento manual, empregando o editor de sequências *BioEdit*, versão 7.0.5. Para o alinhamento foram utilizadas sequências de eritrovírus obtidas no GenBank.

O programa *Shannon Entropy* (www.hiv.lanl.gov/content/sequence/entropy) foi utilizado para estimar a variabilidade da sequência de nucleotídeo entre os diferentes genótipo e entre os isolados de cada genótipo de eritrovírus.

4.7 Análise filogenética

Para a escolha do melhor modelo evolutivo foi utilizado o programa *Modeltest v.3* (POSADA; CRANDALL, 1998). Este programa é usado para comparar de forma hierárquica diferentes modelos de substituição de nucleotídeos, testando um conjunto de 56 modelos evolucionários, onde matrizes de distância filogenética são construídas utilizando-se os modelos possíveis.

Uma vez determinado como melhor modelo o HKY, as reconstruções foram realizadas pelo programa *PAUP** (SWOFFORD, 2003) empregando o método de distância. Foram calculados os valores de *bootstrap*, com 1000 réplicas, para a verificação da sustentação de ramos nas topologias das árvores obtidas. A visualização das reconstruções foi feita usando-se o programa *Tree View*, versão 1.4.

4.8 Reação de PCR em tempo real (Real-Time PCR)

4.8.1 Seleção dos oligonucleotídeos iniciadores primers

Para a reação de amplificação foram empregados os *primers* I2 e I5 (Vicari, 2002) derivados da sequência que codifica para a proteína não estrutural (NS1) (Tabela 2).

Os *primers* foram selecionados a partir de regiões 100% homólogas, observadas após o alinhamento de sequências completas de eritrovírus,

contemplando representantes dos três genótipos, obtidas no GenBank, pelo programa BioEdit.

4.8.2 Amostras controle

Para testar a técnica de PCR em tempo real, utilizando *Sybr Green* como corante, foram utilizadas 10 amostras sabidamente positivas, nove do genótipo 1 e uma do genótipo 3. A reação foi realizada utilizando o *Kit SYBR QPCR SUPERMIX W/ROX* (Invitrogen™®) seguindo as orientações do fabricante. Para otimizar a reação foram feitos testes com concentrações de 10, 20 e 30 mM de *primers* (sense e anti-sense). A reação foi realizada no equipamento *7300 Real-Time PCR System* e os dados foram observados utilizando o programa *7300 System SDS Software* (Applied Biosystems Inc., EUA).

4.8.3. Amostras testadas

Foram testadas pela técnica de PCR em tempo real, 106 *pools*, totalizando 716 amostras, provenientes da coleção de amostras do laboratório de Virologia Clínica e Molecular, com suspeita de infecção pelo B19, sabidamente negativas pela técnica *Semi-Nested PCR*. Os *pools* foram compostos por 100 µl de 6 amostras, totalizando 600 µl. A extração foi conduzida conforme o item 4.2 e a reação de PCR em tempo real realizada utilizando o *Kit SYBR QPCR SUPERMIX W/ROX* (Invitrogen™®) seguindo as orientações do fabricante.

5 RESULTADOS

A amplificação das 892 amostras, por meio da técnica de *Semi-Neste* PCR, utilizando os *primers* E1, E6 e I5, gerou um produto amplificado de 204 pb. Dentre as amostras brasileiras (852), recebidas entre os anos de 1995 a 2009, 131 apresentaram resultado positivo para a presença de DNA de eritrovírus. Entre as amostras chilenas sabidamente positivas para B19, somente 24/40 apresentaram resultado positivo pela técnica de *Semi-Nested* PCR. Uma justificativa para esta baixa amplificação e a degradação do material genético (DNA extraído) durante o transporte, devido ao descongelamento do material.

Com o intuito de estudar a variabilidade genética dos eritrovírus, amostras de pacientes do Estado de São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Chile foram sequenciadas e genotipadas.

Primeiramente foi realizado o sequenciamento de um fragmento de 475 pb obtidos a partir dos produtos amplificados por PCR utilizando os *primers* P13f e P16r (VP1/VP2). Dentre as 131 amostras brasileiras positivas, 90 foram sequenciadas em duplicata, 41 amostras não puderam ser sequenciadas por não possuírem material clínico suficiente. Entre as amostras Chilenas, as 24 positivas foram sequenciadas com o mesmo conjunto de *primers*. Após o sequenciamento, procedeu-se o alinhamento dos segmentos consenso das amostras, resultando em uma sequência de 306 pb, possibilitando o estudo da variabilidade genética destas amostras. Das 90 amostras Brasileiras, 89 foram similares entre si e entre as sequências padrões de eritrovírus B19 disponíveis no GenBank, enquanto em uma, a amostra BR543, a variabilidade foi maior do que se esperava ($\cong 13\%$). Entre as 24 amostras chilenas, todas foram similares entre si e entre as amostras de eritrovírus B19.

A análise do fragmento amplificado (306 pb) da variante BR543 mostrou polimorfismos em 35 nucleotídeos quando comparada com a sequência padrão B19 (GALLINELLA et al., 1999). A figura 4 representa o alinhamento da sequência de nucleotídeos da variante BR543 e a sequência padrão B19-Au depositada no GenBank.

Figura 4. Representação do alinhamento da sequência de nucleotídeos da região VP1/VP2 da amostra BR543 e da sequência padrão depositado no banco de dados GenBank de B19 NC_000883 (GALLINELLA et al., 1999). Somente os nucleotídeos diferentes da sequência padrão estão demonstrados na linha da sequência da BR543.

A topologia da árvore proposta pelo método de Distância, utilizando o algoritmo TBR, posicionou todas as amostras chilenas sequenciadas e 89 amostras brasileiras no mesmo clado, juntamente com as sequências de B19, genótipo 1, já a amostra BR543 se posicionou no clado das sequências do genótipo 3, subtipo 3b (Figura 5). Foram identificados 14 conjuntos de sequência idênticas, entre as 120 amostras sequenciadas e um representante de cada grupo foi utilizado na análise (Quadro 1).

Quadro 1. Conjunto de amostras obtidas pelo alinhamento de nucleotídeos das sequências brasileiras e chilenas utilizadas na análise filogenética.

Representantes	Conjunto de sequências idênticas representadas
M13178	NC_000883, BR394, BR414, BR478, BR480, BR486, BR497, BR516, BR632
BR28	BR311, BR312, BR314, BR315, BR316, BR326, BR366
BR330	BR123, BR302, BR331, BR339, BR347, BR349, BR350, BR360, BR363, BR412, BR424, BR478
BR369	BR211, BR212, BR242, BR248, BR253, BR255, BR256, BR257, BR258, BR259, BR263, BR264, BR267, BR268, BR313, BR317, BR337, BR353, BR367, BR415, BR428, BR439, BR517, BR550, BR610, BR895
BR572	BR558, BR567, BR568, BR586, BR588, BR616, BR617, BR618, BR619
BR323	BR322, BR325
BR619	BR233, BR609
BR643	BR641
CI428	BR394, BR691
BR823	BR906, BR912, BR915
CI45	CI01, CI45B, CI46, CI72, CI154, CI159, CI191, CI215, CI302, CI355, CI356, CI395
CI301	CI368, CI270, CI310
CI443	CI449

Boot strap

Figura.5- Análise filogenética dos *Erthrovirus*. Sequências parciais do gene da proteína VP1/VP2 obtidas no Brasil (iniciadas por BR seguida por numero e AY647977-BR543) e Chile (iniciadas por Cl e seguida por numero), comparadas com sequências padrões disponíveis no GeneBank (M13178- B19-Au ,AY044266- LaLi , AY064475-A6, AY083234-D91.1, AY582124- Gh2768, AY582125- Gh3051 e NC_004295- V9), foram utilizadas para a construir a arvore. O valor de *Bootstrap* obtidos por Distancia, esta demonstrado sobre os ramos.

Após a observação da ocorrência de diversos polimorfismos na sequência da amostra BR543, o sequenciamento do genoma completo desta variante foi realizado, resultando em um total de 4.964 pb, disponibilizado no GenBank com número de acesso AY647977. A variabilidade genética dos 4.964 pb, quando comparados com sequências do B19-Au, V9 e A6, utilizando o programa Meg Align™ 4,05 – *Expert Analyses Software* – DNASTAR para PC, mostrou 13,9%, 5,7% e 9,9% de divergência respectivamente (Figura 6).

		Percent Identity										
Divergence		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
	1		98.1	91.3	89.0	91.2	89.2	89.1	91.4	59.9	1	AY044266
	2	1.9		91.0	88.8	90.8	89.0	88.8	91.2	60.0	2	AY064475
	3	9.3	9.7		87.4	98.4	87.6	87.3	95.0	59.4	3	AY083234
	4	12.0	12.3	14.0		87.3	99.3	98.9	87.2	59.9	4	AY386330
	5	9.5	9.9	1.6	14.1		87.5	87.2	94.6	59.5	5	AY647977
	6	11.8	12.1	13.7	0.7	13.9		99.1	87.4	59.9	6	M13178
	7	11.9	12.3	14.1	1.1	14.2	0.9		87.2	59.7	7	NC_000883
	8	9.3	9.5	5.2	14.2	5.6	14.0	14.2		59.3	8	NC_004595
	9	57.0	56.7	58.7	56.9	58.5	56.8	56.8	58.9		9	U26342
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		

Figura 6- Diagrama representativo do grau de similaridade e divergência entre o genoma completo da amostra BR543 e amostras dos 3 genótipos de eritrovírus disponíveis no GenBank. Números de acesso: genótipo 1, M13178 (B19-Au), NC_000883 (B19-HV), genótipo 2, AY044266 (Lali), AY064475 (A6) e genótipo 3, AY083234 (D91.1), AY647977 (Br543), NC_004295 (V9), AY582124 (Gh2768) e AY582125 (Gh3051).

A variante foi detectada no soro de uma adolescente de 16 anos, moradora da cidade de São Paulo, apresentando anemia aguda após transplante renal realizado no Hospital das Clínicas no ano de 2003. Análises do sangue da adolescente mostraram após o transplante, uma queda nos níveis de hemoglobina (Hb) 5,7 mg/dL (Ht16,5%), não respondendo ao tratamento com ferro I.V., vitamina B, ácido fólico e eritropoetina (EPO), requerendo transfusão de sangue. Após o diagnóstico positivo para eritrovírus, iniciou-se o tratamento com imunoglobulina (IVIG) e após alguns meses os níveis de hemoglobina voltaram ao normal 12,9 (Ht 39,5%).

Os sintomas apresentados por esta paciente foram comparados com os apresentados pelos pacientes portadores de variantes de eritrovírus detectadas até

o presente momento e observou-se que todos os hospedeiros apresentaram sintomas característicos de infecção pelo B19, genótipo 1 (Quadro 2).

Quadro 2- Sumário das manifestações clínicas, ano e localidade das sequências dos genótipos 2 e 3.

Amostra	Nº GenBank	Genotipo	Pais de origem	Ano	Sintomas clínicos
V9	NC_004295	3	Franca	1995	Crise aplástica transitória
A6	AY064475	2	Itália	1991	Anemia crônica, HIV-positivo
D91.1	AY083234	3	Franca	1991	Crise aplástica transitória
LaLi	AY044266	2	Finlândia	-	Doença de pele não relacionada ao B19
Gh2768	AY582124	3B	Gana	2002	Assintomático (doador de sangue)
Gh3051	AY582125	3A	Gana	2002	Assintomático (doador de sangue)
BR044003	DQ229350	3	SP-Brasil	2003	Pancitopenia febril, síndrome hemofagocítica
03BR0570	DQ229351	3	SP-Brasil	2003	Pancitopenia, transplante de fígado
04BR0057	DQ229352	3	SP-Brasil	2004	Anemia, transplante hepático
BR008104	DQ229353	2	SP-Brasil	2004	Pancitopenia, HHV6 positivo, transplante renal
04BR0290	DQ229354	3	SP-Brasil	2004	Pancitopenia, transplante de fígado
04BR0445	DQ229356	3	SP-Brasil	2004	Anemia, neutropênia, leucemia
04BR0448	DQ229357	3	SP-Brasil	2004	Pancitopenia febril, diabetes, síndrome hemofagocítica
	62.068	3	PA-Brasil	1997	Eritema infeccioso
	63.416	3	PA-Brasil	1997	Eritema infeccioso
	68.514	3	PA-Brasil	1998	Artropatia aguda
	72.882	3	PA-Brasil	1999	Febre, lúpus eritematoso sistêmico
	74.675	3	PA-Brasil	2000	Eritema infeccioso
	74.870	3	PA-Brasil	2000	Eritema infeccioso
	75.229	3	PA-Brasil	2000	Artropatia aguda
	75.230	3	PA-Brasil	2000	Eritema infeccioso
	75.559	3	PA-Brasil	2000	Eritema infeccioso
	82.046	3	PA-Brasil	2002	Febre, anemia hemolítica crônica
	83.780	3	PA-Brasil	2003	Febre, anemia
BR543	AY647977	3B	SP-Brasil	2004	Pós-transplantada renal, anemia aguda

Para avaliar a variabilidade nucleotídica das regiões codificadoras para as principais proteínas virais NS1, VP1 e VP2, foram calculadas as similaridades utilizando o programa Meg Align™ 4,05 – *Expert Analyses Software* – DNASTAR para PC, entre a BR543 e sequências dos diferentes genótipos de eritrovírus. Os genes que codificam para as proteínas apresentaram uma variabilidade muito semelhante (Tabela 3).

Tabela 3- Comparação de similaridade (%) entre as regiões codificadoras da amostra BR543 e sequências dos três genótipos disponíveis no GenBank utilizando o programa Meg AlignTM 4,05 – Expert Analyses Software – DNASTAR para PC.

BR543 x Erythrovirus	Nº acesso GenBank	NS1, VP1/VP2 %	NS1 %	VP1u %	VP1/VP2 %	Referência
BR543 vs. B19Au	M13178	87,1	87	90,6	87,3	Shade et al., 1986
BR543 vs. B19HV	AF162273	86,9	86,9	90,6	87	Gallinilla & Venturoli, Unpub*. 1999
BR543 vs. A6	AY064475	90,5	92,3	91,6	89	Nguyen, Q.T. <i>et al.</i> 2002
BR543 vs. LaLi	AY044266	90,8	92,4	91,9	89,5	Hokynar, K. <i>et al.</i> 2002
BR543 vs. V9	NC004295	94,2	95	96	93,5	Nguyen et al., Unpub*. 2002
BR543 vs. D91.1	AY083234	98,0	98,3	98,7	97,8	Servant, A. <i>et al.</i> 2002
BR543 vs. Gh2768	AY582124	98,0	98,4	99,1	97,8	Parsyan et al., 2007
BR543 vs. Gh3051	AY582125	94,1	94,4	96,3	93,8	Parsyan et al., 2007

A construção da árvore filogenética utilizando o sequenciamento completo das regiões codificadoras para as proteínas NS1 e VP1/VP2 da amostra BR543 e outros vinte genomas completos de eritrovírus disponíveis no GenBank, confirmou a presença de uma variante nas amostras estudadas, agrupando a amostra no clado do genótipo 3, subtipo 3b (Figura 7).

Para verificar a distribuição das trocas nucleotídicas, entre as sequências dos isolados de cada genótipo e entre as sequências dos diferentes genótipos, foi utilizado o cálculo da entropia. A análise das figuras geradas pelo programa, mostrou que o genótipo 3 possui um maior número de variações entre seus isolados (Figura 8). Quando comparados os diferentes genótipos (G1xG2, G1xG3 e G2xG3), foi possível observar que o genótipo 3 apresentou uma maior variabilidade (Figura 9). As trocas nucleotídicas se apresentaram homogêneas em todo o genoma das três variantes.

Figura 8- Análise da variabilidade da sequência de nucleotídeo da região codificadora (NS1, VP1u e VP1/VP2), entre os isolados de cada genótipo. A extensão da linha de entropia representa o grau de heterogeneidade entre as sequências.

Figura 9- Análise da variabilidade da sequência de nucleotídeo da região codificadora (NS1, VP1u e VP1-VP2) entre os diferentes genótipos. A extensão da linha de entropia representa o grau de heterogeneidade entre as sequências.

A região VP1u foi descrita como a região mais variável do genoma viral e muito importante por possuir dois dos principais epítomos de neutralização. Ao analisar os epítomos localizados na extremidade 5', observou-se a presença de aminoácidos característicos para cada genótipo. No epítopo 1 (EP1) observa-se as substituições A18D e Q21K entre o genótipo 1 e os genótipos 2 e 3, por outro lado as substituições K17D e E25Q só foram observadas no genótipo 3. No EP2, foi observada a substituição N68S entre os genótipos 1 e genótipos 2 e 3 e a substituição N72D entre o genótipo 2 e os genótipos 1 e 3 (Figura 10). Além destas trocas observadas, outras substituições foram observadas entre os diferentes genótipos na região codificadora para a proteína VP1u .

Foram comparadas sequências obtidas com os *primers* P13f e P16r de amostras de pacientes sintomáticos, representantes de cada grupo de sequências idênticas (Quadro 1) com um grupo de assintomáticos composto por amostras positivas para B19, de doadores de sangue e de sequenciadas obtidas no GenBank, todas provenientes do Estado de São Paulo. A comparação do fragmento gerado de 306 pb, revelou mutações heterogenias entre os grupos, não sendo possível observar diferenças significativas entre o grupo de pacientes com sintomáticos e assintomáticas (Figura 11).

Continua

Continuação

	100	110	120	130	140	150	160	170	180
AF162273 (B19-HV)	AGCCAGCTGTGGAGTAAATTTCCAAATTTAGATGACAGTTTTTAAACTCAGTTTGCAGCCTTAGGGAGGATGGGGTTTGCATCAGCCACCT								
M13178 (B19-Au)									
BR28									
BR123	.T.								
BR211									
BR227									
BR322								A.	
BR572	.T.				A.				
BR609									
BR641	.T.			T.	A.				
BR691								A.	
BR823	.T.								
BR926	.T.								
BR73036									
BR101851									
BR36902									
BR38762									
BR40351									
BR42897									
BR429021									
BR482021									
BR63550								C.	
BR65756									
SP-A468									
SP-A15									
SP-A16									
SP-A24									
SP-A127									
SP-A147	.T.								
SP-A152									
SP-A167									
SP-A169									
SP-A336									
SP-A406	.A.							A.	
SP-A414									
SP-A427	.T.								
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
AF162273 (B19-HV)	CCTCAAAATATTTTTAAAAATATTACCCCAAGTGGGCCAATTGGAGGTATTAAATCAATGGGAATTACTACCTTAGTTTCAGTATGCCGTG								
M13178 (B19-Au)									
BR28									T.
BR123									T.
BR211									T.
BR227									T.
BR322									T.
BR572									T.
BR609									T.
BR641				G.					T.
BR691									
BR823							G.		T.
BR926									T.
BR73036									T.
BR101851			G.						T.
BR36902				C.					T.
BR38762									T.
BR40351									T.
BR42897									T.
BR429021									T.
BR482021									T.
BR63550		C.							T.
BR65756									T.
SP-A468									T.
SP-A15									T.
SP-A16									T.
SP-A24									T.
SP-A127									T.
SP-A147				C.					T.
SP-A152			C.						T.
SP-A167									T.
SP-A169							C.		T.
SP-A336					C.		C.		T.
SP-A406									T.
SP-A414									T.
SP-A427									T.

Continua

Conclusão

Figura 11. Alinhamento da sequência de nucleotídeo da região VP1/VP2 de amostras sintomáticas e assintomáticas. As amostras BR211, BR227, BR242, BR302, BR339, BR439, BR517, BR619 pertencem ao grupo das sintomáticas, as demais ao grupo das assintomáticas e as sequência AF162273 e M13178 de B19 depositadas no GenBank.

Ao analisarmos a sazonalidade do eritrovírus nas amostras estudadas no período de 1998 a 2009, observou-se que os casos de infecção pelo B19 se distribuem por todas as estações do ano (dados não mostrados). No ano de 1999 a incidência se mostrou elevada quando comparada com os outros anos (Figura 12).

Figura 12. Quadro representativo do numero total de amostras recebidas com sintomas característicos pela infecção pelo B19 (vermelho) e numero de amostras positivas para eritrovírus (azul), no período de 1998 a maio de 2009.

A técnica de PCR em tempo real, utilizando o corante Sybr Green, testada neste trabalho, amplificam um fragmento de 204 pb. Na figura 13 pode-se observar as curvas de temperatura de *melting* para cada diluição de *primer* testadas, verificando que a concentração de 20 mM resulta em melhor amplificação, reduzindo a formação de *primer-dimer*.

Figura 13. Curvas de temperatura de *melting* referentes as concentrações de 10 mM (curva vermelha), 20 mM (curva verde) e 30 mM (curva azul).

Analisando as temperaturas de *melting* de 3 amostras positivas para Erythrovirus, observou-se uma diferença de aproximadamente 1° C entre a amostra Br543 e as amostras BR619 e BR572 (Figura14).

A análise das amostras negativas, pela técnica de *Semi-Nested* PCR, utilizando *pools* de amostras e testadas pela técnica de PCR em Tempo Real, foram negativos não se observando diferenças entre os dois ensaios.

Figura 14. Curva de temperatura de *melting* das amostras BR543 (curva vermelha), Br619 (curva verde), Br572 (curva azul) e controle negativo (curva roxa).

6 DISCUSSÃO

Desde a descoberta do B19 por COSSART et al., (1975), um grande número de sequências vem sendo disponibilizadas parcialmente e/ou por completo no banco de dados GenBank. A análise da variabilidade genética das sequências evidência a pouca diversidade genética (<2%) entre estes vírus (ERDMAN et al., 1996). Sendo a maior parte localizada na região VP1/VP2 responsável pela formação do capsídeo (ANDERSON et al., 1985).

Durante a última década, variantes de eritrovírus foram detectadas em amostras com suspeita clínica de infecções pelo B19. Estudos filogenéticos sugeriram a diferenciação do gênero em três genótipos; B19 como genótipo 1, A6 e LaLi como genótipo 2 e o V9 e D91.1 como genótipo 3 (SERVANT et al., 2002), este último foi posteriormente subdividido em dois subtipos B19/3a e B19/3b (PARSYAN et al., 2007).

Neste estudo, dentre as 842 amostras brasileiras e 40 chilenas, com suspeita clínica de B19, analisadas pela técnica de *Semi-Nested* PCR, 131 e 24, respectivamente, foram positivas para parvovírus humano pela técnica de *Semi-Nested* PCR. Destas, 90 amostras brasileiras e 24 chilenas foram genotipadas. Após o sequenciamento de 306 pb, da região VP1/VP2, a análise filogenética revelou que todas as sequenciadas, exceto a BR543, são pertencentes ao genótipo 1, demonstrando uma dominância deste genótipo no Estado de São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, no período de 1995 até 2009 e nas amostras Chilenas estudadas. O estudo das sequências de nucleotídeo destas amostras (306 pb) demonstrou uma alta taxa de substituições sinônimas, não resultando em trocas de aminoácidos. Estes dados também foram observados por Ekman e colaboradores (2007) ao estudar as relações biológicas e imunológicas entre as variantes.

A análise comparativa do fragmento de 4.964 pb da variante (Br543) com sequências do GenBank, demonstrou divergências superiores a 12,9% com o genótipo 1, 9,2% com o genótipo 2 e 2% com o genótipo 3. A construção da árvore filogenética classificou esta variante como genótipo 3, subtipo 3b, juntamente com amostras de Gana (África), descritas por Parsyan et al., (2007). Estes dados demonstram que uma variante, do gênero *Erythrovirus*, foi detectada pela primeira

vez no Brasil no ano de 2004, em uma amostra de soro de uma adolescente após transplante renal, apresentando sintomas de anemia aguda. A presença desta variante, no Brasil, foi confirmada por Sarabani et al, (2006) e Freitas et al. (2007) anos mais tarde.

Os dados conhecidos, até o presente momento, não são suficientes para correlacionar os diferentes genótipos com manifestações clínicas específicas, visto que os sinais clínicos provocados pela variante BR543 foram semelhantes aos já descritos na literatura após infecção pelo parvovírus B19 (genótipo 1) (SERVANT et al., 2002; GALLINELLA et al., 2003; BLUMEL et al., 2005; CANDOTTI et al., 2006; PARSYAN et al., 2006a,b). A paciente portadora da variante Br543 apresentou anemia aguda após transplante renal e amostras dos genótipos 2 e 3, identificadas até o presente momento, foram em sua grande maioria detectadas em pacientes apresentando imunodeficiências e/ou sofrendo de infecções persistentes (NGUYEN et al., 2002; SERVANT et al., 2002; SANABANI et al., 2006).

O genótipo 2 não foi detectado entre as amostras pesquisadas, entretanto, já foi relatado na cidade de São Paulo por Sanabani et al. (2006). Uma possível explicação para esta ausência é a baixa idade dos pacientes amostrados neste trabalho, visto que, até o presente momento o genótipo 2 foi detectado com mais frequência em amostras de pacientes acima dos 35 anos de idade (SCHNEIDER et al., 2004; NORJA et al., 2006). Norja et al. (2006) detectaram a presença do genótipo 2 somente em pacientes nascidos até o ano de 1965, sugerindo que esta variante tenha circulado na Europa até a década de 70.

A incidência da infecção pelo B19 se mostrou presente em todas as estações do ano, concordando com Corcoran e Doyle (2004), diferentemente do que é relatado em países de clima temperado onde, a incidência mostra ser mais comum no período do inverno e início da primavera, quando as pessoas tendem a se aglomerar em espaços fechados (ANDERSON; COHEN, 1987).

A análise das regiões NS1, VP1u e VP1/VP2 entre a amostra Br543 e os diferentes genótipos demonstrou que o grau de substituições se apresenta homogêneo em todo o genoma, não sendo observado uma maior troca de nucleotídeos no gene VP1/VP2 como era de se esperar (Tabela 2, Figuras 6 e 7), concordando com o sugerido por Shackelton e Holmes (2006), que a evolução dos

eritrovírus não é resultante de uma resposta a pressão imune, uma vez que, o gene que codifica para a proteína não estrutural (NS1) apresenta o mesmo grau de substituições que os genes que codificam para as proteínas estruturais (VP1/VP2).

A taxa de variabilidade apresentada pelo gênero é considerada alta para os vírus de DNA (SHACKELTON; HOLMES, 2006), porém, os diferentes genótipos de B19 parecem não ter sofrido alterações funcionais e conformacionais decorrentes do grande número de mutações observadas.

Analisando a região VP1u, descrita como sendo a região responsável pelo potencial imunogênico e patogênico do B19 (KAJIGAYA et al., 1991; ZUFFI et al., 2001), observou-se que a maior parte das trocas de aminoácidos entre os diferentes genótipos se encontram no final 5' desta região (Figura 9), onde se localizam dois importantes epítomos de neutralização (SAIKAWA et al., 1993). A comparação dos epítomos (EP1 e EP2), entre os três genótipos, sugere a presença de marcadores genéticos para cada genótipo. O genótipo 1 contém marcadores nas posições 18, 21 e 68, o genótipo 2 na posição 72 e o genótipo 3 nas posições 17 e 25, estes marcadores podem ser utilizados na identificação e discriminação dos diferentes genótipos. Estudo realizado por Dorsch et al. (2002), mostrou que a conformação de epítomos de neutralização, localizados na região VP1u, não sofreram alterações, devido a mutações observadas nesta região.

A incidência de apenas uma variante em 90 amostras brasileiras positivas para B19 pode parecer baixa. Contudo, esses dados são consistentes quando comparados com achados de Cohen, Gandhi e Clewley (2006) em UK, onde apenas uma variante, detectada na amostra de uma paciente do sexo feminino com 51 anos e diagnosticada com anemia e falência renal crônica, foi encontrada em um total de 228 amostras positivas para B19.

A detecção de novas variantes em diferentes países levantou a hipótese da correlação destas com fatores temporais e geográficos. Servant e colaboradores (2002), analisando amostras da França e dos E.U.A., detectaram os genótipos 2 e 3 somente em amostras francesas. Estes achados indicavam que a ocorrência destes genótipos estava restrita àquela região. O genótipo 3 foi pela primeira vez detectado fora da França em uma paciente brasileira (Br543), proveniente da cidade de São Paulo que relatou não ter viajado para o continente europeu e não

ter entrado em contato com a população européia. Após a detecção da BR543, novas variantes dos genótipos 2 e 3 foram descritas, indicando que a distribuição destes genótipos é mais ampla e não se restringem a uma determinada posição geográfica (SERVANT et al., 2002; NGUYEN et al., 2002; SANABANI et al., 2006; PARSYAN et al., 2007).

Pouco se conhece sobre a ação da pressão seletiva na evolução dos eritrovírus e sobre o perfil epidemiológico nas diferentes localidades. Estudo realizado no Brasil, com amostras de Belém e São Paulo, mostrou elevada razão na troca de aminoácidos entre as amostras circulantes na cidade de Belém, dirigidas por uma possível seleção positiva, gerando uma série de reinfecções, provavelmente resultante do confinamento do vírus ("*pressure pan*") (DE FREITAS et al., 2007). Esta alta taxa de trocas não sinônimas de aminoácidos não foi observada nas amostras da cidade de São Paulo e do Chile.

O diagnóstico do B19 pode estar gerando resultados falso negativos por *Semi-Nested* PCR e sorologia, devido a alta variabilidade genética observada entre as variantes de eritrovírus e/ou baixa carga de vírus. Na tentativa de aumentar a sensibilidade na detecção dos eritrovírus, foi testada a técnica de PCR em tempo real utilizados *Sybr Green* como corante e *primers desenhados a partir* de regiões do genoma viral de alta homologia entre os eritrovirus, sendo por isso adequados para o desenvolvimento de um método de detecção. O real time PCR possibilitou observar uma variação de aproximadamente 1° C entre as variantes do genótipo 1 e 3, sugerindo uma possível diferenciação de genótipos pela técnica.

O diagnóstico dos eritrovírus só é realizado em casos de suspeita de infecção, quando o paciente apresenta sintomas clínicos. Casos de pacientes imunocomprometidos que recebem bolsa de sangue contaminadas com o eritrovírus e receptores de órgãos, também contaminados, são de extrema importância para demonstrar que testes de rotina em banco de sangues e em doadores de órgão para se verificar a presença de vírus são fundamentais, uma vez que os pacientes receptores estão com seu sistema imunológico comprometido, não respondendo a infecção viral.

A origem e a relevância epidemiológica dos genótipos 2 e 3, ainda, são obscuras, considerando os limitados estudos, até o presente momento na

determinação da prevalência destas novas variantes. A ocorrência da co-circulação dos três genótipos observada na cidade de São Paulo (SANABANI et al., 2006) e por serem possíveis vírus humano emergentes, merecem destaque no desenvolvimento de novas pesquisas laboratoriais que possam facilitar o diagnóstico etiológico deste vírus, bem como no entendimento das patologias que possam estar associadas a estes novos agentes.

7 CONCLUSÃO

O gênero *Erythrovirus* foi detectado em amostras provenientes do Estado de São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, procedentes da coleção de amostras clínicas do Laboratório de Virologia Clínica e Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e amostras provenientes do Chile. O genótipo 1 foi prevalente nas amostras estudadas.

Uma variante do genótipo 3, subtipo 3b foi identificada e seu genoma completo sequenciado. A análise dos 4.964 pb mostrou um elevado grau de divergência nucleotídica que se distribuem de forma homogênea pelo genoma. Apesar da alta variabilidade as trocas nucleotídicas em sua maioria resultaram em substituições sinônimas de nucleotídeo.

A técnica de Real-Time PCR se mostrou sensível na detecção dos eritrovírus e os resultados foram concordantes com a técnica de *Semi-Nested* PCR.

Em nosso estudo, não foi possível correlacionar os diferentes genótipos de eritrovírus com quadros clínicos específicos, sugerindo ser uma patologia mais associada ao estado do hospedeiro do que relacionada as diferentes variantes encontradas.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, K.; COHEN, B. J.; VIAL, P. A. Seroprevalence of Parvovirus B19 in urban Chilean children and Young adults, 1990 and 1996. **Epidemiol. Infect.**, v. 128, n. 1, p. 59-62, 2002.
- ABRAHAM, M.; RUDRARAJU, R.; KANNANGAI, R.; GEORGE, K.; CHERIAN, T.; DANIEL, D.; RAMALINGAM, R.; SRIDHARAN, G. A pilot study on the seroprevalence of parvovirus B19 infection. **Indian. J. Med. Res.**, v.115, p. 139-143, 2001.
- ADLER, S. P.; MANGANELLO, A. M.; KOCH, W. C.; HEMPFLING, S.H.; BEST, A.M. Risk of human parvovirus B19 infections among school and hospital employees during endemic periods. **J. Infect. Dis.**, v.168, n. 2, p.361-8, 1993.
- ALLANDER, T.; TAMMI, M. T.; ERIKSSON, M.; BJERKENER, A.; TIVELJUNG-LINDELL, A.; ANDERSON, B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.102, n. 36, p. 12891-12896, 2005.
- ANDERSON, L. J. Human Parvovirus. **J. Infect. Dis.**, v. 161, n. 4, p. 603-608, 1990.
- ANDERSON, L. J.; HURWITZ, E. S. Human parvovirus B19 and pregnancy. **Clin. Perinatol.**, v. 15, n. 2, p. 273-86, 1988.
- ANDERSON, L. J.; TSOU, C.; PARKER, R. A.; CHORBA, T. L.; WULFF, H.; TATERSALL, O.; MORTIMER, P. Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 24, p. 522-526, 1986.
- ANDERSON, M. J.; JONES, S. E.; FISHER-HOCH, S. P.; LEWIS, E.; HALL, S. M.; BARLETT, C. R. L.; COHEN, B. J.; MORTIMER, P. P.; PEREIRA, M. S. The human parvovirus, cause of erythema infectiosum. **Lancet**, v.1, p.1378, 1983.
- ANDERSON, M. J. Parvoviruses as Agents of Human Disease. **Prog. Med. Virol.**, v. 34, p. 55-69, 1987.
- ANDERSON, M. J.; JONES, S. E.; MINSON, A. C. Diagnosis of human parvovirus infection by dot-blot hybridization using cloned viral DNA. **J. Med. Virol.**, v.15, p.163-172, 1985a.
- ANDERSON, M. J.; HIGGINS, P. G.; DAVIS, I. R.; WILLMAN, J. S.; JONES, J. S. E.; KIDD, I. M.; PATISSON, R. J.; TYRRELL, D. A. J. Experimental parvovirus infection in human. **J. Infect. Dis.**, v. 152, p. 257-264, 1985b.

¹ **De acordo com:** ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ANDERSON, M. J.; LEWIS, E.; KIDD, I. M.; HALL, S. M.; COHEN, B. J. An outbreak of erythema infectiosum associated with human parvovirus infection. **J. Hyg.**, v. 93, p. 85-93, 1984.

BALLOW, W. R.; REED, J. L.; NOBLE, W.; YOUNG, N. S.; KOENIG, S. Safety and immunogenicity of a recombinant parvovirus B19 vaccine formulated with MF59c.1. **J. Infect. Dis.**, v. 187, n. 4, p. 675-8, 2003.

BELL, L. M. Human Parvovirus B19 infection among hospital staff members after contact with infected patients. **New Engl. J. Med.**, v. 321, n. 8, p. 485-491, 1989.

BERNS, K. I. Parvoviridae: The Viruses and Their Replication. In: FIELDS, D. M. KNIPE, P. M. HOWLEY B. N. (Ed. 3) **Fundamental Virology**. Raven, Philadelphia, 1996. p. 1017-41.

BLUMEL, J.; EIS-HUBINGER, A. M.; STUHLER, A.; BONSCHE, C.; GESSNER, M.; LOWER, J. Characterization of parvovirus B19 genotype 2 in KU812Ep6 cells. **J Virol.**, v. 79, p. 14197-14206, 2005.

BLUNDELL, M. C.; BEARD, C.; ASTELL, C. R. In vitro identification of a B19 parvovirus promoter. **Virology**, v. 157, p. 534-538, 1987.

BROLIDEN, K.; TOLFVENSTAM, T.; NORBECK, O. Clinical aspects of parvovirus B19 infection. **J. Intern. Med.**, v. 269, p. 285-304, 2006.

BROWN, C. S.; VAN LENT, J. W.; VLAK, J. M.; SPAAN, W. J. Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins. **J. Virol.**, v. 65, n.5, p.2702-6, 1991.

BROWN, K. E.; ANDERSON, S.M.; YOUNG, N.S. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. **Science**, v. 262, p.114-117, 1993.

BROWN, K. E.; HIBBS, J. R.; GALLINELLA, G.; ANDERSON, S. M.; LEHMAN, E. D.; MCCARTHY, P.; YOUNG, N. S. Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). **N. Engl. J. Med.**, v. 330, p. 1192-1196, 1994.

BROWN, K. E. AND YOUNG, N. S. Human Parvovirus B19. **Cl. Microbiology Review**, v. 15, n. 3, p. 485-505, 2002.

BROWN, K. E.; YOUNG, N. S. Parvovirus B19 in human disease. **Ann. Rev. Med.**, v. 48, p. 59-67, 1997.

BROWN, T.; ANAND, A; RITCHIE, L. D.; CLEWLEY, J. P.; REID. T. M. S. Intrauterine parvovirus infection associated with hydrops fetalis **Lancet**, v. 2, p. 1033-1034, 1984.

CANDOTTI, D.; DANSO, K.; PARSYAN, A.; DOMPREH, A.; ALLAIN, J.P. Maternal-fetal transmission of human parvovirus B19 genotype 3. **J. Infect. Dis.**, v. 194, p. 608-611, 2004.

CARRIERE, C.; BOULANGER, P.; DELSERT, C. Rapid and sensitive method for the detection of B19 virus DNA using the polymerase chain reaction with nested primers. **J. Virol. Met.**, v. 44, n. 2-3, p. 221-34, 1993.

CHISAKA, H.; ITO, K.; NIIKURA, H.; SUGAWARA, J.; TAKANO, T.; MURAKAMI, Y.; TERADA, Y.; OKAMORA, K.; SHIROISHI, H.; SUGAMURA, K.; YAEGASHI, N. Clinical manifestations and outcomes of parvovirus B19 infection during pregnancy in Japan. **Tohoku J. Exp. Med.**, v. 209, n. 4, p. 277-283, 2006.

CHOI, S. H.; CHANG, S. P.; WON, J. C.; LEE, J. S.; CHI, H. S.; YANG, W.S. A case of persistent anemia in a renal transplant recipient: association with parvovirus B19 infection. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 34, p.71-5, 2002.

CHORBA, T.; COCCIA, P.; HOLMAN, R. C.; TATTERSALL, P.; ANDERSON, L. J.; SUDAMAN, J.; YOUNG, N.S.; KURCZYNSKI, E.; SAARINEN, U. M.; MOIR, R.; LAWRENCE, D. N.; JASON, J. M.; EWATT, B. The role of parvovirus B19 in aplastic crisis and erythema infectiosum (Fifth disease). **J. Infect. Dis.**, v. 154, p. 383-393, 1986.

CLEWLEY, J. P. Detection of human parvovirus using a molecularly cloned probe. **J. Med. Virol.**, v. 15, n. 2, p. 173-81, 1985.

COHEN, B. J.; GANDHI, J.; CLEWLEY, J. P. Genetic variants of parvovirus B19 identified in the United Kingdom : implications for diagnostic testing. **J. Clin. Virology**, v. 36, n. 2, p. 152-5, 2006.

COHEN, B. J.; BUCKEY, M. M. The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in England and Wales. **J. Med. Microbiol.**, v. 25, n. 2, p. 151-153, 1988.

COHEN, B. J.; HEWISH, R. A.; MORTIMER, P. P. Comparison of radioimmunoassay and counter-immunoelectrophoresis for the detection of antibody to hepatitis B core antigen. **J Virol Met.**, v. 2, n. 3, p. 181-192, 1981.

COHEN, B. J.; MORTIMER, P. P. ; PEREIRA, M. S. Diagnostic assays with monoclonal antibodies for the human serum parvovirus-like virus (SPLV). **J. Hyg.**, v. 91, p. 113-130, 1983.

COSSART, Y. E.; CANT, B.; FIELD, A. M.; WIDDOWS, D. Parvovirus-like particles in human sera. **Lancet**, v. 1, n. 7898, p. 72-73, 1975.

COTMORE, S. F., TATTERSALL, P. Characterization and molecular cloning of a human parvovirus genome. **Science**, v. 226, n. 4679, p. 1161-1165, 1984.

COTIMORE, S. F.; MCKIE, V. C.; ANDERSON, L. J.; ASTELL, C. R.; TATTERSALL. Identification of the major structural and nonstructural proteins encoded by human parvovirus B19 and mapping of their genes by prokaryotic expression of isolated genomic fragments. **J. Virol.**, v. 60, p. 548-557, 1986.

CUNNINGHAM, D. A ; PATTISON, J. R.; CRAIG, R. K. Detection of parvovirus DNA in human serum using biotinylated RNA hybridisation probes. **J. Virol. Met.**, v. 19, n. 3-4, p. 279-88, 1988.

DE FREITAS, R. B.; DURIGON, E.L.; OLIVEIRA, D. D.; ROMANO, C. M.; DE FREITAS, M. R.; LINHARES, A. D.; MELO, F. L.; WALSHKELLER, L.; BARBOSA, M. L.; HUATUCO, E. M.; HOLMES, E. C.; ZANOTTO, P. M. The "pressure pan" evolution of human erythrovirus B19 in the Amazon, Brazil. **Virology**, v.13, p. 2007.

DEISS, V.; TRATSCHIN, J. D.; WEITZ, M.; SIEGL, G. Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini. **Virology**, v.175, p. 247-254, 1990.

DORSCH, S.; LIEBICH, G.; KAUFMAN, B.; VON LANDENBERG, P.; HOFFMAN, J.H.; DROBNIK, W.; MODROW, S. The VP1 unique region of parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2-like activity. **J. Virol.**, v. 76, n. 4, p. 2014-2018, 2002.

DURIGON, E. L.; ERDMAN, D. D.; GARY, G. W.; PALLANSCH, M. A.; TOROK, T. T.; ANDERSON, L. J. Multiple primer pairs for polymerase chain reaction (PCR) amplification of human parvovirus B19 DNA. **J. Virol. Met.**, v. 44, p. 155-165, 1993.

EKMAN, A.; HOKYNAR, K.; KAKKOLA, L.; KANTOLA, K.; HEDMAN, L.; BONDÉN, H.; GESSNER, M.; ABERHAM, C.; NORJA, P.; MIETTINEN, S.; HEDMAN, K.; VENERMO, M. S. Biological and immunological relations among Human Parvovirus B19 genotypes 1 to 3. **J. Virol.**, v. 81, n. 13, p. 6927-6935, 2007.

ENDERS, M.; SCHALASTA, G.; BAISCH, C. Human parvovirus B19 infection during pregnancy- value of modern molecular and serological diagnostics. **J. Clin. Virol.**, v. 35, p. 400-406, 2006.

ERDMAN, D. D.; DURIGON, E. L.; HOLLOWAY, B. P.; ANDERSON, L. J. Detection of human parvovirus B19 DNA PCR products by RNA probe hybridization enzyme immunoassay. **J.Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 2295-2298, 1994.

ERDMAN, D. D.; DURIGON, E. L.; WANG, Q. Y.; ANDERSON, L. J. Genetic diversity of human parvovirus B19: sequence analysis of the VP1/VP2 gene from multiple isolates. **J Gen Virol.**, v. 77 (Pt 11), p. 2767-74, 1996.

FREITAS, R. B.; MELO, F. L.; OLIVEIRA, D. S.; ROMANO, C. M.; FREITAS, M. R. C.; MACEDO, O.; LINHARES, A. C.; ZANOTTO, P. M. A.; DURIGON, E. L. Molecular characterization of human erythrovirus B19 strains obtained from patients with several clinical presentations in the Amazon region of Brazil. **J. Clin. Virol.**, v. 43, p. 60-65, 2008.

FREITAS, R. B.; WONG, D.; BOSWEL, F.; MIRANDA, M. F. R.; LINHARES, A. C.; SHIRLEY, J.; DESSELBERGER, U. Prevalence of Human Parvovirus (B19) and rubellavirus infections in urban and remote rural areas in Northern Brazil. **J. Med. Virol.** v. 32, n. 4, p. 203-208, 1990.

FU, Y.; ISHII, K. K.; MUNAKATA, Y.; SAITOH, T.; KAKU, M.; SASAKI, T. Regulation of tumor necrosis factor alpha promoter by human parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. **J. Virol.**, v. 76, p. 5395-403, 2002.

GALLINELLA, G.; MUSIANI, M.; ZERBINI, M.; GENTILOMI, G.; GIBELLINI, D.; VENTUROLI, S. Efficient parvovirus B19 DNA purification and molecular cloning. **J. Virol Met.**, v. 41, n. 2, p. 203-211, 1993.

GALLINELLA, G.; VENTUROLI, S. Genome and structure analysis. Unpublished, 1999.

GALLINELLA, G.; VENTUROLI, S.; MANARESI, E.; MUSIANI, M.; ZERBINI, M. B19 virus genome diversity:epidemiological and clinical correlations. **J. Clin. Virol.**, v. 28, p. 1-13, 2003.

GAREUS, R.; GIGLER, A.; HEMAUER, A.; LERUEZ-VILLE, M.; MORINET, F.; WOLF, H.; MODROW, S. Characterization of cis-acting and NS1 protein-responsive elements in the p6 promoter of parvovirus B19. **J. Virol.**, v. 72, n. 1, p. 609-16, 1998.

GAY, N. J.; HESKETH, L. M.; COHEN, B. J.; RUSH, M.; BATES, C.; MORGAN-CAPNER, P.; MILLER, E. Age specific antibody prevalence to parvovirus B19: How many women are infected in pregnancy? **CDR Review**, v. 4 (R), p. 104-107, 1994.

GILLESPIE, S. M.; CARTTER, M. L.; ASCH, S.; ROKOS, J. B.; GARY, G. W.; TSOU, C. J.; HALL, D. B.; ANDERSON, L. J.; HURWITZ, E. S. Occupational risk of human parvovirus B19 infection for school and day-care personnel during an outbreak of erythrovirus infectiosum. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 263, n. 15, p. 2061-2065, 1990.

HEEGAARD, E. D. E BROWN, K. E. Human parvovirus B19. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.15, p. 485-505, 2002.

HEEGAARD, E. D.; JENSEN, I. P.; CHRISTENSEN, J. Novel PCR assay for differential detection and screening of erythrovirus B19 and erythrovirus V9. **J. Med. Virol.**, v. 65, p. 362-367, 2001.

HICKS, K. E.; CUBEL, R. C.; COHEN, B. J.; CLEWLEY, J. P. Sequence analysis of a parvovirus B19 isolate and baculovirus expression of the non-structural protein. **Arch Virol.**, v.141, n. 7, p. 1319-27, 1996.

HOKYNAR, K.; SODERLUND-VENERMO, M.; PESONEN, M.; RANKI, A.; KIVILUOTO, O.; PARTIO, E. K.; HEDMAN, K. A new parvovirus genotype in human skin. **Virology**, v. 302, p. 224-228, 2002.

HSU, T. C.; TZANG, B. S.; HUANG, C. N.; LEE, Y. J.; LIU, G. Y.; CHEN, M. C.; TSAY, G. J. Increased expression and secretion of interleukin-6 in human parvovirus B19 non-structural protein (NS1) transfected COS-7 epithelial cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 144, p. 152-7, 2006.

HSU, T.C. ; WU, W. J.; CHEN, M. C.; TSAY, G. J. Human parvovirus B19 non-structural protein (NS1) induces apoptosis through mitochondria cell death pathway in COS-7 cells. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 36, p. 570-577, 2004.

HUATUCO, E. M.; DURIGON, E. L.; LEBRUN, F. L.; PASSOS, S. D.; GAZETA, R. E.; AZEVEDO NETO, R. S.; MASSAD, E. Seroprevalence of human Parvovirus B19 in a suburban population in São Paulo, Brazil. **Rev. Saúde Pub.**, v. 42, n. 3, p. 443-9, 2008.

INTERNATION COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Virus Taxonomy**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>>. Acesso em: 12 mar. 2010.

JESSICA, T. S.; BRIAN, V. C.; JOSHUA, H. C. Clinical presentation of parvovirus B19 infection. **Am. Family Physician.**, v. 3, p. 373-376, 2007.

KAJIGAYA, S.; FUJII, H.; FIELD, A.; ANDERSON, S.; ROSENFELD, S.; ANDERSON, L. J.; SHIMADA, T.; YOUNG, N. S. Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. **Proc. Natl. Sci.**, v. 88, p. 4646-4650, 1991.

KELLER, L. W.; BARBOSA, M. L.; MELO, F. L.; PEREIRA, L. M.; DAVID NETO, E.; LANHEZ, L. E.; DURIGON, E. L. Phylogenetic analysis of a near-full-length sequence of a parvovirus genotype 3 strain isolated in Brazil. **Arch. Virol.**, v. 154, p. 1685-1687, 2009.

KELLY, H. A.; SIEBERT, D.; HAMMOND, R.; LEYDON, J.; KIELY, O.; MASKILL, W. The age-specific prevalence of human parvovirus immunity in Victoria, Australia compared with other parts of the world. **Epidemiol. Infect.**, v. 124, n. 3, p. 449-457, 2000.

KERR, J. R.; BARAH, F.; MATTEY, D. L.; LAING, I.; HOPKINGS, S. J.; HUTCHINSON, I. V.; TYRRELL, D. A. J. Circulating tumour necrosis factor- α and interferon- γ are detectable during acute and convalescent parvovirus B19 infection and are associated with prolonged and chronic fatigue. **J. Gen. Virol.**, v. 82, p. 3011-3019, 2001.

KLEINMAN, S. H.; GLYNN, S. A.; LEE, T. H.; TOBLER, L.; MONTALVO, L.; TODD, D.; KISS, J. E.; SHYAMALA, V.; BUSCH, M. P. Prevalence and quantitation of parvovirus B19 DNA levels in blood donors with a sensitive polymerase chain reaction screening assay. **Transfusion**, v. 47, p. 1756-1764, 2007.

KNOTT, P. D.; WELPLY, G. A. C.; ANDERSON, M. J. Serologically proved intrauterine infection with parvovirus. **Br. Med. J.** v. 289, n. 6459, p. 1660, 1984.

KOCH, W. C.; ADLER, S. P. Detection of human parvovirus B19 DNA by using the polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, n. 1, p. 65-69, 1990.

KOVACS, B. W.; CARLSON, D. E.; SHAHBAHRAMI, B.; PLATT, L. D. Prenatal diagnosis of human parvovirus B19 in nonimmune hydrops fetalis by polymerase chain reaction. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 167, n. 2, p. 461-466, 1992.

KURTZMAN, G.; FRICKHOFEN, N.; KIMBALL, J.; JENKINS, D. W.; NIENHUIS, A. W.; YOUNG, N. S. Pure red-cell aplasia of 10 years duration due to persistent parvovirus B19 infection and its cure with immunoglobulin therapy. **N. Engl. J. Med.**, v. 321, p. 519-523, 1989.

LISBOA, C. P. Detecção de Parvovirus B19 em doadores de sangue, utilizando a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR). Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1997.

MOFFATT, S.; TANAKA, N.; TADA, K.; NOSE, M.; NAKAMURA, M.; MURAOKA, O.; HIRANO, T.; SUGAMURA, K. A cytotoxic nonstructural protein, NS1, of human parvovirus B19 induces activation of interleukin-6 gene expression. **J. Virol.**, v. 70, p. 8485-8491, 1996.

MOFFATT, S.; YAEHASHI, N.; TADA, K.; TANAKA, N.; SUGAMURA, K. Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. **J. Virol.**, v. 72, n. 4, p. 3018-28, 1998.

MOMOEDA, M.; WONG, S.; KAWASE, M.; YOUNG, N.S.; KAJIGAYA, S. A putative nucleoside triphosphate-binding domain in the nonstructural protein of B19 parvovirus is required for cytotoxicity. **J. Virol.**, v. 68, n. 12, p. 8443-8446, 1994.

MOORE, T. L. Parvovirus – associated arthritis. **Curr. Opin. Rheum.** v. 12, n. 4, p. 289-94, 2000.

MOREY, A. L.; NICOLINI, U.; WELCH, C. R.; ECONOMIDES, D.; CHAMBERLAIN, P. F.; COHEN, B. J. Parvovirus B19 infection and transient fetal hidrops. **Lancet**, v. 337, p. 496, 1991.

MORI, J.; FIELD, A. M.; CLEWLEY, J. P.; COHEN, B. J. Dot blot hybridization assay of B19 virus DNA in clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, n. 3, p. 459-64, 1989.

MORTIMER, P. P.; HUMPHRIES, R. K.; MOORE, J. G. A human parvovirus-like virus inhibits haemopoietic colony formation in vitro. **Nature, Lond**, v. 302, p. 426-429, 1983.

MUSIANI, M.; ZERBINI, M.; GENTILOMI, G.; PLAZZI, M.; GALLINELLA, G.; VENTUROLI, S. Parvovirus B19 clearance from peripheral blood after acute infection. **J. Infect. Dis.**, v. 172 p. 1360-1363, 1995.

NESHER, G.; MOORE, T. L. Human parvovirus infection. **Infect. Med.**, v.14, p. 638-42, 1997.

NGUYEN, Q. T.; SIFER, C.; SCHNEIDER, V.; ALLAUME, X.; SERVANT, A.; BERNAUDIN, F.; AUGUSTE, V.; GARBARG-CHENON, A. Novel human erythrovirus associated with transient aplastic anemia. **J. Cl Microbiol.**, v. 37, p. 2483-2487, 1999.

NGUYEN, Q. T.; SIFER, C.; SCHNEIDER, V.; BERNAUDIN, F.; AUGUSTE, V.; GARBARG-CHENON, A. Detection of an erythrovirus sequencing distinct from B19 in a child with acute anemia. **Lancet**, p. 352: 1524, 1998.

NGUYEN, Q. T.; WONG, S.; HEEGAARD, E. D.; BROWN, K. D. Identification and Characterization of a Second Novel Human Erythrovirus Variant, A6. **Virology**, v. 301, p. 374-380, 2002.

NORJA, P.; HOKYNAR, L. M.; CHEN, R.; RANKI, A.; PARTIO, E. K.; KIVILUOTO, O.; DAVIDKIN, I.; LEIVO, T.; EIS-HUBINGER, A. M.; et al. Bioportfolio:lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA denomes in human tissue. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 103, n. 19, p. 7450-3, 2006.

NUNOUE, T.; OKOCHI, K.; MORTIMER, P. P.; COHEN, B. J. Human parvovirus B19 and erythema infectiosum. **J. Pediatr.**, v. 107, p. 38-40, 1985.

NYMAN, M.; TOLFVENSTAM, T.; PETERSSON, K.; KRASSNY, C.; SKJOLDERBANDSPARRE, L.; BROLIDEN, K. Detection of human parvovirus B19 infection in first-trimester fetal loss. **Obstet. Gynecol.**, v. 99, n. 5, p. 795-798, 2002.

OZAWA, K.; KURTZMAN, G.; YOUNG, N. Replication of the B19 parvovirus in human bone marrow cell cultures. **Science**, v. 233, p. 883-886, 1986.

OZAWA, K.; YOUNG, N. Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. **J. Virol.**, v. 61, n. 8, p. 2627-30, 1987.

PARSYAN, A.; ADDO-YOBO, E.; OWUSU-OFORI, S.; AKPENE, H.; SARKODIE, F.; ALLAIN, J.P. Effects of transfusion on human erythrovirus B19-susceptible or – infected pediatric recipients in a genotype 3-endemic area. **Transfusion**, v. 46, p. 1593-1600, 2006a.

PARSYAN, A.; KERR, S.; OWUSU-OFORI, S.; ELLIOTT, G.; ALLAIN, J.P. Reactivity of genotype-specific recombinant proteins of human erythrovirus B19 with plasmas from areas where genotype 1 or 3 is endemic. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 1367-1375, 2006b.

PARSYAN, A.; SZMARAGD, C.; ALLAIN, J. P.; CANDOTTI, D. Identification and genetic diversity of two human parvovirus B19 genotype 3 subtypes. **J. Gen. Virol.**, v. 88, p. 428-431, 2007.

PATTISON, J. R.; JONES, S. E.; HODGSON, J.; DAVIS, L. R.; WHITE, J. M.; STROUD, C. E.; MURTAZA, L. Parvovirus infections and hypoplastic crisis sickle-cell anemia. **Lancet**, v. 1, p. 604-665, 1981.

PETERLANA, D.; PUC CETTI, A.; CORROCHER, R.; LUNARDI, C. Serologic and molecular detection of human Parvovirus B19 infection. **Clin. Chim. Acta.**, v. 372, p. 14-23, 2006.

PILLAY, D.; PATOU, G.; HURT, S.; KIBBLER, C. C.; GRIFFITHS, P. D. Parvovirus B19 outbreak in a children's ward. **Lancet**, v. 339, n. 8785, p.107-109, 1992.

PLUMMER, F. An erythema infectiosum-like illness caused by human parvovirus infection. **Lancet**, v. 1, p. 664-665, 1985.

POSADA, D.; CRANDALL, K. R. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinf.**, v. 14, n. 9, p. 817-8, 1998.

POSFAY-BARBE, K. M.; MICHAELS, M. G. Parvovirus B19 in organ transplant recipients. **Curr. Opin. Organ. Transpl.**, v. 8, p. 283-287, 2003.

PRINGLE, C. R. Virus taxonomy update. Taxonomic decisions ratified at the plenary meeting of the ICTV at the 9th International Congress of Virology held in Glasgow on the 10th of August 1993. **Arch. Virol.**, v.133, p. 491-498, 1995.

REDDY, U. M.; BASCHAT, A. A.; ZLATNIK, M. G.; TOWBIN, J. A.; HARMAN, C. R.; WEINER, C. P. Detection of viral deoxyribonucleic acid in amniotic fluid: association with fetal malformation and pregnancy abnormalities. **Fetal Diagn. Ther.**, v. 20, n. 3, p. 203-207, 2005.

SAIKAWA, T.; ANDERSON, S.; MOMOEDA, M.; KAJIGAWA, S.; YOUNG, N. S. Neutralizing linear epitopes of B19 parvovirus cluster in the VP1 unique and VP1-VP2 junction regions. **J. Virol.**, v. 67, p. 3004-3009, 1993.

SALIMANS, M. M. M.; Holsappel, S.; Van de Rijke, F. M.; Jiwa, N. M.; Raap, A. K.; Weiland, H. T. Rapid detection of human parvovirus B19 DNA by dot-hybridization and the polymerase chain reaction. **J. Virol. Met.**, v. 23, p. 19-28, 1989.

SANABANI, S.; KLEINE, W. M.; PEREIRA, J.; SABINO, E. C. Sequence variability of Human Erythrovirus present in bone marrow of Brazilian patients with various parvovirus B19-related hematological symptoms. **J. Clin. Microb.**, v. 44, p. 604-606, 2006.

SCHACKELTON, L. A.; HOLMES, E. C. Phylogenetic evidence for the rapid evolution of human erythrovirus. **J. Virol.**, v. 80, n. 7, p. 3666-9, 2006.

SCHALASTA, G.; SCHMID, M.; LACHMUND, T.; ENDERS, G. LightCycler Consensus PCR for Rapid and Differential Detection of Human Erythrovirus B19 and V9 Isolates. **J. Med Virol.**, v. 73, p. 54-59, 2004.

SCHMIDT, I.; BLUMEL, J.; SEITZ, H.; WILLKOMMEN, H.; LOWER, J. Parvovirus B19 DNA in plasma pools and plasma derivatives. **Vox Sang.**, v. 81, p. 228-235, 2001.

SCHNEIDER, B.; BECKER, M.; BRACKMANN, H. H.; EIS-HUBINGER, A. M. Contamination of coagulation factor concentrates with human parvovirus B19 genotype 1 and 2. **Thromb. Haemost.**, v. 92, n. 2, p. 838-45, 2004.

SCHWARZ, T. F.; ROGGENDORF, M.; HOTTENTRAGER, B.; DEINHARDT, F.; ENDERS, G.; GLONING, K. P.; SCHRAMM, T.; HANSMANN, M. Human parvovirus B19 infection in pregnancy. **Lancet**, p. 566-567, 1988.

SETUBAL, S.; CARDIAS, C. A.; DE OLIVEIRA, S. A.; DO NASCIMENTO, J. P. Viremic blood donor found by a rapid screening method in a season of high human parvovirus B19 activity in Niteroi, Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 95-99, 2004.

SERJEANT, G. R.; TOPLEY, J. M.; MASON, K.; SERJEANT, B. E.; PATTISON, J. R.; JONES, S. E.; MOHAMED, R. Outbreak of aplastic crisis in sickle cell anemia associated with parvovirus-like agent. **Lancet**, v. 2, n. 8247, p. 595-597, 1981.

SERVANT, A.; LAPERCHE, S.; LALLEMAMD, F.; MARINHO, V.; MAUR, G. D. S.; MERITET, J. F.; CHENON, A. G. Genetic Diversity with Human Erythrovirus Identification of Three Genotypes. **J. Virol.**, p. 9124-9134, 2002.

SHADE, R. O.; BLUMDELL, M. C.; COTMORE, S.F.; TATTERSALL, P.; ASTELL, C.R. Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of child during aplastic crisis. **J. Virol.**, v. 58, p. 921-936, 1986.

SHNEERSON, J. M., BORTIMER, P.P., VANDERVELDE, E.M. Febrile illness due to a parvovirus. **Br. Med. J.**, p. 280, 1980.

SIEGL, G.; BATES, R. B.; BERNS, K. I.; CARTER, B. J.; KELLY, D. C.; KURSTAK, E.; TATTERSALL, P. Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. **Intervirology**, v. 23, n. 2, p. 61-73, 1985.

SODJA, I.; MRÁZOVÁ, M.; S MELHAUSOVÁ, M.; KOTRBOVÁ, K.; PAZDIORA, P.; BRUJ, J.; STOJANOV, I.; KADLECIK, D.; SAMAL, J. Seroprevalence of IgG

antibodies against parvovirus B19 in the Czech population. **Epidemiol. Mikrobiol. Imunol**, v. 44, n. 4, p.171-174, 1995.

ST AMAND, J.; BEARD, C.; HUMPHRIES, K.; ASTELL, C. R. Analysis of splice junctions and in vitro and in vivo translation potential of the small abundant B19 parvovirus RNAs. **Virology**, v. 183, p. 133-142, 1991.

SWOFFORD, D. L. **PAUP*** :Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4. Sunderland, USA: Sinauer Associates, 2003.

TSUJIMURA, M.; MATSUSHITA, K.; SHIRAKI, H.; SATO, H.; OKOCHI, K.; MAEDA, Y. Human parvovirus B19 infection in blood donors. **Vox Sang**, v. 69, n. 3, p. 206-212, 1995.

VAN RIJCKEVORSEL, G. C. G.; SONDER, G. J. B.; SCHIM VAN DER LOEFF, M. F.; VAN DER HOEK, J. A. R. Population-based study o the seroprevalence of Parvovirus B19 in Amsterdam. **J. Med. Virol.**, v. 81, p. 1305-1309, 2009.

VICARI, D. Dissertação: Padronização da técnica Semi-Nested-PCR em tubo único para detecção do vírus B19. Biotecnologia, 2002.

WADS WORTH CENETR. **Viruses: Human Parvovirus B19**. Disponível em: <www.wadsworth.org/databank/b19virus.htm>. Acesso em: 12 mar. 2010.

WALTER, S.; RICHARDS, R.; ARMENTROUT, R.W. Cell cycle-dependent replication of the DNA of minute vírus of mice, a parvovirus. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 607, p. 420, 1980.

WEIGEL-KELLY, K. A.; YODER, M. C.; SRIVASTAVA, A. Recombinant human parvovirus B19 vectors erythrocyte P antigen is necessary but not sufficient for siccessful transduction of human hematopoietic cells. **J. Virol.**, v. 75, p. 4110-4116, 2001.

WHITE, D. G.,WOOLF, A. D., MORTIMER, P. P., COHEN, B. J., BLAKEÌ D. R., BACON, P. A. Human parvovirus arthropathy. **Lancet**, v. 1, p. 419-421, 1985.

WONG, S.; ZHI, N.; FILLIPPONE, C.; KEYVANFARN S.; KAJIGAYA, S.; BROWN, K. E.; YOUNG, N. S. Ex vivo-generated CD36+ erythroid progenitors are higly permissive to human parvovirus B19 replication. **J. Virol.**, v. 82, p. 2470-2476, 2008.

WOOLF, A. D.; CAMPION, G. V.; CHISHICK, A.; WISE, S.; COHEN, B. J.; KLOUDA, P. T. Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults. **Arch. Intern. Med.**, v. 149, p. 1153-1156, 1989.

XU, J.; RAFF, T. C.; MUALLEM, N. S.; NEUBERT, A. G. Hidrops fetalis secundaru to parvovirus B19 infections. **J. Am. Board Fam. Pract.**, v. 16, n. 1; p.63-68, 2003.

YOUNG, N. S.; MORTIMER, P .P.; MOORE, J. G.; HUMPHRIES, R. K. Characterization of a virus that causes transient aplastic crisis. **J. Clin. Invest.**, v. 73, p. 224-230, 1984.

YOUNG, N. S. Parvovirus. In: Fields, B.N.; Knipe, D.M.; Howley, P.N. (Ed). **Fields Virology**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 2199-2220, 1996.

YOTO, Y.; KUDOH, T.; HASEYAMA, K.; SUZUKI, N.; ODA, T.; KATOH, T.; TAKAHASHI, T.; SEKIGUCHI, S.; CHIBA, S. Incidence of human parvovirus B19 DNA detection in blood donors. **Br. J. Haematol.**, v. 91, n. 4, p. 1017-1018, 1995.

ZADORI, Z.; SZELEI, J.; LACOSTE, M. C.; LI, Y.; GARIEPY, S.; RAUMOND, P.; ALLAIRE, M.; NABI, I. R.; TJISSEN, P. A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. **Dev. Cell.**, v. 1, p. 291-302, 2001.

ZHI, N.; MILLS, I. P.; JUN, L. U.; WONG, S.; FILLIPPONE, C.; BROWN, K. E. Molecular and functional analysis of a Human Parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles for NS1, VP1 and 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity. **J. Virol.**, v. 80, n. 12, p. 5941-5950, 2006.

ZUFFI, E.; MANARESI, E.; GALLINELLA, G.; GENTILOMI, G. A.; VENTUROLI, S.; ZERBINI, M.; MUSIANI, M. Identification of an immunodominant peptide in the parvovirus B19 VP1 unique region able to elicit a long-lasting immune response in humans. **Viral. Immunol.**, v. 14, p. 151-158, 2001.

ANEXO 1:

Alinhamento da variante brasileira AY647977 (BR543) e sequencias dos 3 genótipos retiradas do banco de dados GenBank.

10 20 30 40 50 60 70 80 90
AF162273 ATGGAGCTATTTAGAGGGGTGCTTCAAATTTCTTCTAATGTTCTGGACTGTGCTAACGATAACTGGTGGTGGCTCTTTACTGGATTAGAC
M13178A.....
AY386330A.....
NC_004595C.G..T..CT.G..CA...C...CA...T...T...A.G..A..C...T
AY044266G..T..T.G..TA...C...CA..T.A...C...T...A.G...T
AY064475G..T..T.G..TA...C...CA..T.A...T...A.G...T
AY083234A...G..T...G..CA...C...CA...C...T...A.G...CC...
AY647977A...G..T...G..CA...C...CA..T...C...T...A.G...C...
AY582125C.G..T..CT.G..CA...C...CA...T...T...A.G..A..C...T
AY582124A...G..T...G..CA...C...CA..A...C...T...A.G...CC...

100 110 120 130 140 150 160 170 180
AF162273 ACTCTGACCTGGGAACCACTAACTCTACTAAAGAGCTAATGGCAATATCTTAAGCAGTGTGGCTTCTAAGCTTGACTTTACCGGGGGGG
M13178C.....
AY386330C.....
NC_004595C..T...T...T...T...T...A...T...T...
AY044266CT...T...T.A...T...A..A.T...T...
AY064475CT...T...T.A...T...A..G...T...
AY083234G...C..CT...C...T...T...C..T...T...T...
AY647977G..C...C..CT...C..A...T...C..T...T...T...
AY582125T...T...T...T...T...T...C...A..T...T...
AY582124C..CT...C...T...T...T...T...T...T...

190 200 210 220 230 240 250 260 270
AF162273 CCACTAGCGGGGTGCTTGTACTTTTTCAAGTAGAATGTAAACAAATTTGAAGAGGCTATCATATTCTGTGGTTATTGGGGGGGCCAGGG
M13178C.....
AY386330A.....
NC_004595 ..G...A..T...A...G..G...G...C...A...T..T...A
AY044266 ..G..G...T...A..T...G..G...G...C...A...T..T...A
AY064475 ..G..G...T...A...G..G...G...C...A...T..T...A
AY083234 ..G..A..T...A...G..G...G...C...A...T..T...A
AY647977 ..G..G..A..T...A...G..G...G...C...T..T...A
AY582125 ..G...A..T...A...G..G..G...G...A...T..T...A
AY582124 ..G..G..A..T...A...G..G...G...C...T..T...A

280 290 300 310 320 330 340 350 360
AF162273 TTAAACCCAGAAACCTCAAGTGTGTGTAGAGGGGTATTTAATAATGTACTTTATCACCTTGTAACTGAAAAATGTAAGCTAAAAATTT
M13178G.....
AY386330G.....
NC_004595 C...TG.T...T.A..T...C...A..T...T...C...T...G...T..A..T...
AY044266 C..T..TG.T...A...A..C..G...T...C...A..G...T..A..T...
AY064475 C..T..TG.T...T.A...A..C..G...G...C...G...A...G...T..A..G...
AY083234 C..G..TG.T...TT.A..T...A..T...T...C...T...C...T..A..T...
AY647977 C...TG.T...T.A..T...C...A..C...T...C...T...C...T..A..T...
AY582125 C...TG.T...T.A..T...A..T...T...C...C...G...T..A..T...
AY582124 C...TG.T...TT.A..T...A..T...T...C...T...C...T..A..T...

370 380 390 400 410 420 430 440 450
AF162273 TTGCCAGGAATGACTACAAAGGCAAAATACCTTTAGAGATTGGAGAGCAGTTTATAGAAAACTATTTAATGAAAAAATACCTTTAAATGTT
M13178
AY386330
NC_004595G...C...A...T...T...C...T...T...
AY044266T..G..A..G...A...T...CC...T...
AY064475A..G..T...T...CC...T...
AY083234G...T...A...T...T...C...T...
AY647977G...C...A...T...T...T...C...T...
AY582125G...C...A...T...T...T...C...T...
AY582124G...C...A...T...T...T...C...T...

460 470 480 490 500 510 520 530 540
AF162273 GTATGGTGTGTTACTAATATTGATGGATATATAGATACCTGTATTTCTGCTACTTTTAGAAGGGGAGCTTGCCATGCCAAGAAACCCCGC
M13178
AY386330
NC_004595 ..G...A..A...C..G...C...C..CT...C..GC..A...T...T..A..G...
AY044266 ..G...A..A...C..G...C..T...AT...C..A...T..A...T..A
AY064475 ..G...A..A...C..G...C...AT...C..A...T..A...T..A
AY083234 ..G...A..A...C..G...C...CT...C..GC..A...C...T...T..A..G...

AY647977 . . G A . A C . G C CT C GC A . . . C . T . . . T . A
AY582125 . . G A . A . C . A . C . G C . CT C G AA T . A . T . A
AY582124 . . G A . A C . G C CT C GC A . . . C . T . . . T . A

550 560 570 580 590 600 610 620

AF162273 ATTACCA CAGCCATAAATGACACTAGTAGTGATGCTG GGGAGTCTAGCGGCACAGGGGCAGAGGTTGTGCCAATTAAATGGG

M13178T.....T.....

AY386330T.....C.....T.....

NC_004595TG..AAT.C.G.CAGTG...C..A..AA...T.TGG...G..T..G...T..CGC...A

AY044266GTG...AA..C.G.CACTGT...A..A..A..C....A..A..T.TGG...G..T..G...T..GCC..A

AY064475GT...AA..C.G.CACTGTAA..A..A..A.GA....A..A..T.TGG...G..T..G...T..GCC..

AY083234TG..AAT.C.G.CA.TGT...C....AA.C....T.TGG...G..T...A..T..GC...A

AY647977G..AAT.C.G.CA.TGTA..C....AA.C....T.TGG...G..T...A..T..GC...A

AY582125G..G..AATGC.G.CAGTGT...C....AC.C....T.TG...G..T...A..T..GC...A

AY582124G..AAT.C.G.CA.TGT...C....AA.C....T.TGG...G..T...A..T..GC...A

640 650 660 670 680 690 700 710 720

AF162273 AAGGCTAGCATAAAGTTTCAAACTATGGTAAACTG6TTGTGTGAAAAACAGAGTGTTTACAGAGGATAAGTG6AAAAC TAGTTGACTTTAACT

M13178

AY386330

NC_004595 .A..GG.GT.....C.....T..C.A.....A...T..A...A...T...G...T.....

AY044266AG.GT.....A.....T.....A.....T..A..C.A.....GT....G...T..C..T

AY064475AG..T.....A.....T..C.A.....T..A..C.A.....GT....G...T.....T

AY083234AG.GT.....C.....T..C.A.....A...T..A...A...T...A...T.....

AY647977AG.GT.....T.....T..C.A.....A...T..A...A...T...A...T.....

AY582125 .A..GG.GT.....C.....T..C.A.....A...T..A...A...T...A...T.....

AY582124AG.GT.....C.....T..C.A.....A...T..A...A...T...A...T.....

730 740 750 760 770 780 790 800 810

AF162273 CAGTACACTTTACTAAGCAGTAGTCACAGTGGAAAGTTTTCAAATTCAAAGTGCACTAAAACTAGCAATTTATAAAGCAACTAATTTAGTG

M13178

AY386330

NC_004595 .A.T...T...T.C...C.C...CT...GT...T...T...C...A

AY044266 .A.T.A..T...T...G...A...T...G...T...T...C...T

AY064475 ...T.A..T...T...G...A...T...G...T...T...C...T

AY083234 .A.T...T...C.C...G.A...T...GT...T.C...C...C...A

AY647977 .A.T...GT...T...C.C.C...A...T...T...T...C...C...A

AY582125 ...T.C..T..T...C.C...A...CT...GT.G..T...T...C...A

AY582124 .A.T...T...C.C...A...T...GT...T.C...C...A

820 830 840 850 860 870 880 890 900

AF162273 CCTACAAGCATTTCATTTCATACAGACTTTGACGAGTTATGTGTATTAAAGACAATAAAATTGTTAAATGTTACTTTGTCAAAAC

M13178T.....T.....

AY386330T.....T.....

NC_004595 ..C..T..T...CT.G..A..T...CT..C.....A...A..A..T.G...

AY044266T..T.....T..A...T...CC..C.....A...A...C.A..T.A..C...T

AY064475T..T.....T..A...T...CC..C.....A...A...C.A..T.A..C..G..T

AY083234T..T.....T..G..A...T...CT..C.....T...A...G..C...

AY647977T..T.....T..G..A...T...CT..C.....T...A...T..G..C...

AY582125 ..C..T..T...CT.G..A...G...CT..C.....A...A...A...G...G..C...

AY582124T...C..T..G..A...T...CT..C.....T...A...T..G..C...

910 920 930 940 950 960 970 980 990

AF162273 TATGACCCCTATTAGTGGGGCAGCATGTGTTAAAGTGGATTGATAAAAAATGTGGCAAGAAAAATACACTGTGGTTTTATGGGCCGCCA

M13178G.....T.....

AY386330G.....

NC_004595T..T..T.....T..A.....G.....C.....T..A.....C..C.....C..A.....

AY044266T..T..T.....T..A.....T.....C.....T..A.....C..C.....C..C.....C..G.....

AY064475T..T..T.....T..A.....T.....C.....T..A.....C..C.....C..C.....C.....

AY083234T..T..TC.....A.....A.....C.....T..A.....C..CT.....C.....A.....

AY647977T..T..T.....A.....A.....C.....T..A.....C..CT.....C.....A.....

AY582125T..T..GC.....A.....A.....G.....C.....T..A.....C..C..A.....C.....A.....

AY582124T..TC.....A.....A.....C.....T..A.....C..CT.....C.....A.....


```
1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610 1620
AF162273 AGCAGTGGTGGTGAAGCTCTGAAGAACTCAGTGAAAGCAGCTTTTTTAACCTCATCACCCAGGGCCCTGGAACTGAAACCCCGCGC
AY386330 .....
NC_004595 .....C.....T.....G.....
AY044266 .....C.....T.....G.....
AY064475 .....G.....C.....T.....G.....
AY083234 .....C.....T.....G.....
AY647977 .....C.....T.....G.....
AY582125 .....C.....T.....G.....
AY582124 .....C.....T.....G.....
```

```
1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710
AF162273 TCTAGTACGCCATCCCCGGGACAGTTGAGGAGAACTATTTGTCGGAAGCTCAGTTTCCTCCGAAGTTGTAGCTGCATCGTGGGAAGAA
M13178 .....C.....
AY386330 .....C.....
NC_004595 .....G.....C.....G.....C.....G.....G.....
AY044266 .....A.....G.....C.....G.....C.....G.....G.....
AY064475 .....A.....G.....C.....G.....C.....G.....G.....
AY083234 .....G.....C.....G.....C.....G.....G.....
AY647977 .....G.....C.....C.....G.....C.....G.....G.....
AY582125 .....G.....C.....G.....C.....G.....G.....
AY582124 .....G.....C.....G.....C.....G.....G.....
```

```
1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
AF162273 GCCTTCTACACACCTTTGGCAGACCAAGTTTCGTGAACCTGTTAGTTGGGGTTGATTATGTGTGGGACGGGTGAAGGGGTTTACCTGTGTGT
M13178 .....
AY386330 .....
NC_004595 ...T..T...G..GC..T..C..T...A.....C..T...A...T...G...A..G...T..C
AY044266 ...T..T...T..AC..T...C.....T...G...A..G...T..
AY064475 ...T..T...T..AC..T...C.....T...G...A..G...T..
AY083234 ...T..T...G..AC..T...T...A.....C..T...A...T...G...A..G...T..
AY647977 ...T..T...G..AC..T...T...A.....C..T...A...T...G...A..G...T..
AY582125 ...T..T...G..GC..T...T...A.....C..T...A...T...G...A..G...T..C
AY582124 ...T..T...G..AC..T...T...A.....C..T...A...T...G...A..G...T..
```

```
1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
AF162273 TGTGTGCAACATATTAAACAATAGTGGGGGAGGCTTGGGACTTTGTCCCATTTGCATTAAATGTAGGGGCTTGGGTATAATGGATGGAAATTT
M13178 .....G.....
AY386330 .....
NC_004595 .....G.....A.....C.....G.....G.....C..T...T...G...A...
AY044266 .....G.....T.....G...A..C.....T...T...G...A...G.....
AY064475 .....G.....T.....G...A..C.....T...T...G...A...G.....
AY083234 .....G.....T..C.....G...G.....T...T...G...A...
AY647977 .....G.....T..C.....G...G.....T...T...G...A...
AY582125 .....G.....T..C.....G...G.....T...T...G...A...
AY582124 .....G.....T..C.....G...G.....T...T...G...A...
```

```
1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980
AF162273 CGAGAAATTTACCCAGATTTGGTGCGGGTGTAGCTGCCATGTGGGAGCTTCTAATCCCTTTTCTGTGCTAACCTGCAAAAAATGTGCTTAC
M13178 .....A.....
AY386330 .....A.....
NC_004595 A....G....T....C..A....C..C..T..T...A....C....C..A....T...T..T...
AY044266 .....T.....T.....A.....T.....A.....T.....
AY064475 ..T.....T.....A.....C.....A.....T.....
AY083234 A....G....T....C..A....C....T..T...A....C....C..A....T...T..T..G...
AY647977 A....G....T....C..A....C....T..T...A....C....C..A....T...T..T..G...
AY582125 A....G....T....C..A....C....T..T...A....C....C..A....T...T..T...
AY582124 A....G....T....C..A....C....T..T...A....C....C..A....T...T..T..G...
```

```
1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070
AF162273 CTGTCTGGATTGCAAGCTTTGTAGATTATGAGTAAAGAAAGTGCCAAATGGTGGGAAAGTGATGATAAATTTGCTAAAGCTGTGTATCA
M13178 .....A.....
AY386330 .....G.....
NC_004595 .....A.....T.....ACC..C..AA.....CAG...C.....CC..G..AC....A...
AY044266 T.....T.....T.....G.....T.....G.....G.....G.....G.....A...
AY064475 ..T.....A.....T.....G.....A.....A.....G.....G.....G.....A...
AY083234 A....G....T....C..A....C....T..T...A....C....C..A....T...T..T..G...
AY647977 A....G....T....C..A....C....T..T...A....C....C..A....T...T..T..G...
AY582125 A....G....T....C..A....C....T..T...A....C....C..A....T...T..T...
AY582124 A....G....T....C..A....C....T..T...A....C....C..A....T...T..T..G...
```



```

      2080      2090      2100      2110      2120      2130      2140      2150      2160
AF162273  GCAATTTGTGGATTTTATGAAAAGGTTACTGGACAGACTTAGAGCTTATTCAAATATTAAAAGATCAGTATAATTTCTTAGATAA
M13178      .....T.....
AY386330      .....T.....
NC_004595      .G.....C.....A.C.....T.....C.T.C.C.....
AY044266      .....A.....A.....G.....A.....T.....C.....
AY064475      .....A.....A.....AG.....T.....
AY083234      .....AC.....A.C.....T.....T.....A.....T.....T.....C.....
AY647977      .....AC.....A.....T.....T.....A.....T.....T.....C.....
AY582125      .G.....AC.....A.C.....T.....T.....T.....T.....C.C.....C.....
AY582124      .....AC.....A.....T.....T.....A.....T.....T.....C.....

```

```

      2170      2180      2190      2200      2210      2220      2230      2240      2250
AF162273  TCCCTTAGAAAACCCATCCTCTCTGTTTGACTTAGTGTCTCGTATTAAAAATAACCTTAAAACTCTCCAGACTTATATAGTCATCATTT
M13178      .....
AY386330      .....C.....T.....
NC_004595      ..TT.....C.T..T.A.....C.....G..T.....C.....
AY044266      .....T.....C.....G..T.....G.....C.....
AY064475      .....T.....C.....G..T.....G..A.....C.....
AY083234      ..TT.....G.....C.T..CT.A.....C.....G..T.....C.....
AY647977  C..TT.....G.....C.T..CT.A.....C.....G..T.....C.....
AY582125      ..TT.....T.C.T..T.A.....C.....GC..T.....C.....
AY582124      ..TT.....G.....C.T..CT.A.....C.....G..T.....C.....

```

```

      2260      2270      2280      2290      2300      2310      2320      2330      2340
AF162273  TCAAAATCATGGACAGTTATCTGACCAACCCCATGCGTTATCATCCAGTAGCAGTCATGCAGAACCTAGAGGAGAAAAATGCAGTATTATC
M13178      .....
AY386330      .....G.....
NC_004595      ..G..C.....A.....AG.....
AY044266      .....C.....A.....
AY064475      .....T.....C.....A.....G.....
AY083234      ..G..C.....A.....AG.A.....
AY647977      ..G..C.....GA.....AG.A.....
AY582125      ..G..C.....C.....A.....AG.A.....
AY582124      ..G..C.....GA.....AG.A.....

```

```

      2350      2360      2370      2380      2390      2400      2410      2420      2430
AF162273  TAGTGAAAGACTTACACAAGCCTGGGCAAGTTAGCGTACAACTACCCGGTACTAACTATGTTGGGCGCTGGCAATGAGCTACAAGCTGGGCC
M13178      .....
AY386330      .....
NC_004595      .....A.....T.....
AY044266      .....A.....
AY064475      .....A.....C.....
AY083234      ..A.....A.G.....T.....
AY647977      .....A.....T.....
AY582125      .....A.....T.....
AY582124      .....A.....T.....

```

```

      2440      2450      2460      2470      2480      2490      2500      2510      2520
AF162273  CCCGCAAGGTGCTGTTGACAGTGCTGCAAGGATTATGACTTTAGGTATAGCCAACTGGCTAAGTTGGGAATAAATCCATATACCTATTG
M13178      .....
AY386330      .....
NC_004595  T.....G.A.....G.....T.....T.....A.....
AY044266      .....G.....T.....C.....C.....
AY064475      .....G.....T.....C.....
AY083234  T.....G.A.....G.....T.....C.....T.....C.....
AY647977  T.....G.A.....G.....T.....C.....T.....C.....
AY582125  T.....G.A.....G.....T.....T.....T.....
AY582124  T.....G.A.....G.....T.....C.....T.....C.....

```

```

      2530      2540      2550      2560      2570      2580      2590      2600      2610
AF162273  GACTGTAGCAGATGAAGAGCTTTTAAAAAATATAAAAAATGAAACTGGGTTTCAAGCACAAGTAGTAAAAGACTACTTTACTTTAAAGG
M13178      .....
AY386330      .....
NC_004595      ..G.....AT.G.....A.....C.....T.....
AY044266      .....G..A..G.....C.....T.....
AY064475      .....G..A..G.....C.....T.....
AY083234      ..G.....C.....T.G.....A.....C.....T.....
AY647977      ..A.....C.....T.G.....A.....C.....T.....

```

2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790
AF162273 TAATTTCTGCAGAAAGCCAGCACTGGTGCAGGAGGGGGTGGCAGTAATCCTGTCAAAAGCATGTGGAGTGAAGGGGGCCACTTTTAGTGCCAA
M13178G.....T.....T.....
AY386330G.....
NC_004595C.....C.....A.....T.....C.....ACA.....A.....T.....A.....C.....T.....
AY044266A.....C.....
AY064475A.....
AY083234C.....C.....A.....G.....C.....C.....ACA.....A.....T.....A.....C.....T.....
AY647977C.....A.....C.....A.....G.....C.....C.....ACA.....A.....A.....T.....A.....C.....T.....
AY582125C.....C.....A.....T.....C.....C.....ACA.....A.....A.....T.....A.....C.....T.....
AY582124C.....C.....A.....G.....C.....C.....ACA.....A.....T.....A.....C.....T.....

2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880
AF162273 CTCTGTAACTTGTAATTTCCAGACAGTTTTTAATTCCTTATGACCCAGAGCACTTATAAGGTGTTTTCTCCCGCAGCAAGCAGCTG
M13178G.....T.....A.....G.....T.....
AY386330G.....T.....A.....
NC_004595T.....G.....C.....T.....G.....A.....A.....T.....T.....A.....C.....A.....T.....T.....
AY044266T.....C.....A.....C.....A.....
AY064475C.....A.....G.....G.....A.....T.....T.....
AY083234T.....A.....C.....C.....T.....G.....A.....A.....T.....T.....A.....A.....A.....C.....T.....
AY647977T.....A.....C.....T.....T.....A.....T.....T.....A.....A.....A.....C.....T.....
AY582125T.....T.....G.....A.....A.....A.....T.....T.....T.....A.....C.....A.....T.....T.....
AY582124T.....A.....C.....C.....T.....G.....A.....A.....T.....T.....A.....A.....A.....C.....T.....

2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970
AF162273 CCACAATGCGCACTGGAAAGGAGGCAAGGTTTGACAAATTAGTCCCATAAATGGGATACTCAACCCCATGGAGATATTTAGATTTTAAATGC
M13178C.....C.....
AY386330C.....
NC_004595T.....G.....A.....A.....G.....T.....T.....G.....T.....T.....G.....C.....
AY044266T.....A.....A.....T.....C.....A.....C.....C.....
AY064475T.....G.....A.....T.....C.....G.....C.....C.....
AY083234T.....G.....A.....A.....G.....T.....T.....T.....T.....T.....G.....C.....
AY647977T.....G.....A.....G.....A.....G.....T.....T.....T.....T.....T.....G.....C.....
AY582125T.....T.....A.....A.....G.....T.....T.....G.....T.....G.....C.....
AY582124T.....A.....A.....A.....G.....T.....T.....T.....G.....T.....T.....G.....C.....

2980 2990 3000 3010 3020 3030 3040 3050 3060
AF162273 TTTAAATTTATTTTTTACCTTTAGAGTTTCAGCACATAATTGAAATTTATGGAAGTATAGCTCCTGATGCTTTAAGTAAACCATATC
M13178C.....
AY386330C.....
NC_004595G.....C.....A.....T.....A.....T.....T.....
AY044266C.....A.....A.....T.....C.....T.....
AY064475C.....A.....A.....T.....C.....T.....
AY083234G.....G.....AC.....G.....C.....A.....T.....T.....
AY647977G.....G.....AC.....G.....C.....A.....T.....T.....
AY582125C.....G.....C.....A.....G.....C.....C.....A.....T.....T.....
AY582124G.....G.....AC.....G.....C.....A.....G.....T.....T.....

3070 3080 3090 3100 3110 3120 3130 3140 3150
AF162273 AGAAATTTGCTGTTAAGGATGTTACAGACAAAACTGGAGGGGGGTACAGGTTACTGACAGCACTACAGGGCGCCTATCCATGTTAGTAGA
M13178G.....
AY386330G.....G.....
NC_004595A.....A.....C.....A.....A.....T.....G.....A.....C.....A.....TT.....G.....GT.....G.....
AY044266G.....A.....C.....A.....A.....G.....T.....TT.....G.....
AY064475A.....A.....A.....G.....T.....TT.....G.....
AY083234A.....A.....A.....T.....G.....A.....A.....C.....A.....TT.....G.....GT.....G.....
AY647977A.....A.....A.....A.....T.....G.....A.....G.....C.....A.....TT.....G.....GT.....G.....
AY582125A.....A.....C.....A.....T.....G.....A.....G.....C.....A.....TT.....G.....GT.....G.....
AY582124A.....A.....A.....T.....G.....A.....G.....C.....A.....TT.....G.....GT.....G.....

3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240
AF162273 CCATGAAATACAACTACCCATATGTGTTAGGACAAAGGTACAGGATACCTTAGCCCCAGACCTTCCTATTTGGGTATACCTTTCCCCCTCAATA
M13178G.....
AY386330G.....A.....
NC_004595T.....G.....T.....A.....C.....T.....G.....A.....A.....C.....AC.....T.....G.....C.....T.....C.....G.....
AY044266T.....G.....T.....T.....T.....G.....A.....C.....G.....G.....G.....
AY064475T.....G.....T.....T.....T.....G.....A.....C.....G.....G.....G.....
AY083234T.....T.....C.....G.....T.....G.....A.....A.....C.....A.....T.....G.....G.....T.....C.....G.....
AY647977C.....G.....T.....G.....A.....A.....C.....A.....T.....G.....C.....G.....G.....T.....C.....G.....
AY582125T.....G.....T.....C.....T.....G.....A.....A.....C.....AC.....T.....G.....C.....G.....C.....
AY582124T.....C.....G.....T.....G.....A.....A.....C.....A.....T.....G.....C.....G.....G.....T.....C.....G.....

[illegible]

3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400 3410 3420

AF162273 GGAACACAGTTCTTTTACGCTTTTAGGTACAGGAAGTACAGCAACTATGTCTTATAAGTTTCCTCCAGTGCCCCAGAAAAATTTAGAGGG

M13178T.....

AY386330T.....

NC_004595 A..G.....A..G.A...G.....G..AT.T..C.....C..C..A...AG.T...CC...A..

AY044266 A...A...A..G.A.G...T..CT.T..C.....C...A...A...G...C..G...

AY064475A...G.A.G...T..CT.T..C.....C...A...A...C..G...

AY083234C..C.....T..CT.T..T..A...C...A...AG.C...

AY647977C..C...G.A...T..CT.T..T..A...C...A...AG.C...C...

AY582125 A..G.....A..G.A...G..AT.T..C..A...C..C..A...AG...C...A..

AY582124 A...C...G.A...T..CT.T..T..A...C...A...AG.C...C...

3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510
 AF162273 CTGCAGTCAACACTTTTATGAAATGTACAAATCCCTTATACGGATCCCGCTTAGGGGTTCCTGACACATTAGGAGGTGACCCAAAAATTTAG
 #13178G.....
 AY386330G.....
 NC_004595C.....T.....C..T..G.....T..T..T.....A.....G.....T.....
 AY044266 T..T..C.....C..C..G..T..G.....T.....A.....C.....G..G.....T.....
 AY064475 T..T..C.....C..C..G..T..G..T..T.....A.....C.....G..G.....T.....
 AY083234G..T.....C..C..G..T..T..T.....A.....G.....G.....G.....T.....
 AY647977G..T.....C..C..G..T..T.....T.....A..G.....G.....T.....
 AY582125C.....T.....C..C..G..T.....A.....A.....G.....G.....T.....
 AY582124T.....C..C..G..T..T.....T.....A..G.....G.....T.....

3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600
 AF162273 ATCTTTAAACACATGAAGACCATGCAATTGACCCCCAAAACCTTCATGCCAGGGCCACTAGTAAACTCAGTGTCTACAAAGGAGGGGAGACAG
 J13178
 AY386330
 NC_004595 ...A..G...C...C...A...T...T...A...T...C..A..A...A
 AY044266 ...A...T..C...A...T...T..C...C...T..A...C
 AY064475 ...A...T..C...T...T...T..C...C...T..A...C
 AY083234 ...A...C..G...C...A...T...T...GA..T...C..A..A...C
 AY647977 ...A...C...G...C...T...T...GA..T...C...A...C
 AY582125 ...A...C...C...A...T...A...T...A...C..A...A...A

3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690
 AF162273 CTCTAATACTGGAGCTGGAAAAGCCTTACAGGCCCTTAGCACAGGCCCTCTCAAAACACTAGAAATATCCTTACGCCCTGGGCCAGTGT
 M13178T.....
 AY386330G.....T.....G.....
 NC_004595 T.....A.T.....C.T.G.G...T.T...TAGC.....C...T...C...C...A...
 AY044266 T..C...A.C.C...C.T..G...T.T...TAG...G..C...C.G...A...
 AY064475 T..C...A.C.C...C.T..G...T.T...TAG...G..C...C.G...A..A...
 AY083234A.T.....C.T.G.G...T.T...TAG...G..C...T..C.G...A.T...
 AY647977A.T.....C.T.G.G..A.T.T...AG...G..C...T..C.G...A.T...
 AY582125 T.....A.T.....C.T.G.G...T.T...TAG...C...T..C...A...
 AY582124A.T.....C.T.G.G...T.T...TAG...C...T..C.G...A.T...

2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780

AF162273 ACAGCCATACCACTGGGACACAGATAAATATGTCCAGGAATAAATGCCATTCTCATGGTCAGACCACTTATGGTAACGCTGAAGA
M13178 T.....G.....CA.....
AY386330 T.....G.....CA.....T.....
NC_004595 T.....T.....T.....A.....A.....A.....A.....T.....G.....
AY044266T.....T.....G.....CA.....T.....A.....C.....A.....A.....A.....T.....
AY064475 T.....T.....T.....G.....CA.....T.....A.....C.....A.....A.....T.....
AY083234 T.....T.....T.....AA.....C.....A.....A.....A.....A.....T.....
AY647977 T.....T.....T.....AA.....A.....A.....A.....A.....A.....T.....
AY582125 T.....T.....T.....A.....A.....A.....C.....A.....T.....G.....
AY582124 T.....T.....T.....AA.....A.....A.....A.....A.....A.....

3790 3800 3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870
AF162273 CAAAGAGTATCAGCAAGGAGTGGGTAGATTTCCAAATGAAAAAGAACAGCTAAAAAGTTACAGGGTTTAAACATGCACACCTATTTC
M13178
AY386330
NC_004595
AY044266
AY064475
AY083234
AY647977
AY582125
AY582124

3880 3890 3900 3910 3920 3930 3940 3950 3960
AF162273 CAATAAAGGAACCCAGCAATATACAGATCAAAATGAGCGCCCCCTAATGGTGGGTTCTGTATGGAAACAGAGAGCCCTTCACATATGAAAG
M13178
AY386330
NC_004595
AY044266
AY064475
AY083234
AY647977
AY582125
AY582124

3970 3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050
AF162273 CCAGCTGTGGAGTAAAAATCCAAATTTAGATGACAGTTTTAAACCTCAGTTTGACGCCTTAGGAGGATGGGGTTTGATCAGCCACCTCC
M13178
AY386330
NC_004595
AY044266
AY064475
AY083234
AY647977
AY582125
AY582124

4060 4070 4080 4090 4100 4110 4120 4130 4140
AF162273 TCAAAATATTTTAAAAATATTACCAAAAGTGGGCCAATTGGAGGTATTAAATCAATGGGAATTACTACCTTAGTTCAAGTATGCCGTGGG
M13178
AY386330
NC_004595
AY044266
AY064475
AY083234
AY647977
AY582125
AY582124

4150 4160 4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230
AF162273 AATTATGACAGTAACTATGACATTAAATTTGGGGCCCCGTAAAGCTACGGGACGGTGGGAATCCTCAACCTGGAGTATATCCCCCGCACCG
M13178
AY386330
NC_004595
AY044266
AY064475
AY083234
AY647977
AY582125
AY582124

4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300 4310 4320
AF162273 AGCAGGTCATTATACCATATGTACTATATGACCCCAAGCTACAGATGCAAAACCAACACCACAGGCATGGATACGAAAGCCCTGAAGAAAT
M13178
AY386330
NC_004595
AY044266
AY064475
AY083234
AY647977
AY582125
AY582124

	
AF162273	GTGGAC
M13178	
AY386330	
NC_004595	
AY044266	
AY064475	
AY083234	
AY647977	
AY582125	
AY582124	

ANEXO 2:

Coleção de amostras clínicas do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e resultados laboratoriais. ELISA e PCR realizados em espécimes clínicos de pacientes com sintomas sugestivos de infecção pelos eritrovírus. Período de 1995-2009.

Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	N
1	1995	1			Neg	Pos	Pos	
2		2			Neg	Neg	Pos	
3		3			Neg	Neg	Neg	
4		4				Pos	Pos	
5		5				Pos	Pos	
6		6				Pos	Pos	
7		8					Pos	
8		9					Neg	
9		10					Neg	
10		11					Pos	
11		12					Neg	
12		13					Neg	
13		14				Neg	Neg	
14		15			Pos	Neg	Pos	
15		16			Pos	Pos	Neg	
16		17			Pos	Pos	Pos	
17		18			Pos	Pos	Neg	
18		19			Pos	Pos	Neg	
19		20				Pos	Pos	
20		21			Pos	Neg	Neg	
21		22			Neg	Neg	Neg	
22		23			Neg	Neg	Neg	
23		24					Neg	
24		25			Neg	Neg	Neg	
25		26			Neg	Neg	Neg	
26		27					Neg	
27		28					Pos	
28		29					Pos	
29		30					Pos	
30		31				Neg	Neg	
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
31		32					Neg	
32		33					Neg	
33		34			Pos	Neg	Neg	
34		35					Neg	
35		36					Neg	
36		37			Neg	Neg	Neg	
37		38			Pos	Neg	Neg	
38		39			Neg	Neg	Neg	
39		40					Neg	
40		41			Pos	Neg	Neg	
41		42			Neg	Neg	Neg	
42		43			Pos	Neg	Neg	
43		44			Pos	Neg	Neg	
44		45					Neg	
45		46			Pos	Neg	Neg	

46		47					Neg	
47		48				Neg	Neg	
48		49				Neg	Neg	Pos
49		50				Pos	Neg	Neg
50		51				Pos	Neg	Neg
51		52				Neg	Neg	Neg
52		53						Neg
53		54				Pos	Neg	Neg
54		55				Pos	Neg	Neg
55		56				Neg	Neg	Neg
56		57				Neg	Neg	Neg
57		58				Neg	Neg	Neg
58		59						Neg
59		60				Neg	Neg	Neg
60		61				Pos	Neg	Neg
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
61		62			Pos	Neg	Neg	
62		63			Pos	Neg	Neg	
63		64			Pos	Neg	Neg	
64		66					Neg	
65		67			Neg	Neg	Neg	
66		69			Neg	Neg	Neg	
67		70			Neg	Neg	Neg	
68		71			Neg	Neg	Neg	
69		72			Neg	Neg	Neg	
70		73			Neg	Neg	Neg	
71		74					Neg	
72		75			Pos	Neg	Neg	
73		76			Pos	Neg	Neg	
74		77			Pos	Pos	Pos	
75		79			Neg	Neg	Neg	
76		81			Neg	Neg	Neg	
77		82				Neg	Neg	
78		83				Neg	Neg	
79		84				Neg	Neg	
80		85				Neg	Neg	
81		86				Neg	Neg	
82		87				Neg	Neg	
83		89				Neg	Neg	
84		90				Neg	Neg	
85		91				Neg	Neg	
86		92				Neg	Neg	
87		93				Neg	Neg	
88		94				Pos	Pos	
89		95				Neg	Neg	
90		96				Neg	Neg	
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
91		97				Neg	Neg	
92		99				Pos	Neg	
93		110			Neg	Neg	Neg	

94		123					Pos	
95		124			Neg	Neg	Neg	
96		133			Neg	Neg	Neg	
97		136			Neg	Neg	Neg	
98		138			Neg	Neg	Neg	
99		140					Neg	
100		142					Neg	
101		144			Pos	Neg	Neg	
102		145					Neg	
103		146			Pos	Neg	Neg	
104		147					Pos	
105		148				Pos	Neg	
106		149			Pos	Neg	Neg	
107		150			Neg	Pos	Neg	
108		151					Neg	
109		152					Neg	
110		153					Neg	
111		154					Neg	
112		155					Neg	
113		156					Neg	
114		157					Neg	
115		159					Neg	
116		160					Neg	
117		161					Neg	
118		162					Neg	
119		163					Neg	
120		164					Neg	
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
121		165					Neg	
122		166					Neg	
123		167					Neg	
124		168					Neg	
125		169					Neg	
126		170					Pos	
127		171					Neg	
128		172			Neg	Neg	Neg	
129		173			Pos	Pos	Neg	
130		174			Pos	Neg	Neg	
131		175			Neg	Pos	Neg	
132		176			Neg	Neg	Neg	
133		177			Neg	Neg	Neg	
134	18/6/1998	179	F	Rn			Neg	
135	8/7/1998	180	F	5a	Neg	Neg	Neg	
136	1998	181			Pos	Neg	Neg	
137	1998	182			Pos	Neg	Neg	
138	1998	183			Pos	Neg	Neg	
139	1998	184			Neg	Neg	Neg	
140	1998	185			Neg	Neg	Neg	
141	15/9/1998	192	M	10a	Neg	Neg	Neg	HIV+
142	1998	193			Neg	Neg	Neg	
143	1998	194			Neg	Neg	Neg	

144	1998	195			Neg	Neg	Neg	
145	1998	196			Neg	Neg	Neg	
146	1998	197			Neg	Neg	Neg	
147	1998	198			Neg	Neg	Neg	
148	16/9/1998	199	F	25a	Neg	Neg	Neg	Curitiba-Pr
149	16/9/1998	200	M	Rn	Neg	Neg	Neg	Curitiba-Pr
150	17/9/1998	201	F	8a	Neg	Neg	Neg	Hospital Universitário da UFSM
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
151	17/9/1998	202	M	8m	Neg	Pos	Neg	
152	21/9/1998	203	F	1a	Neg	Pos	Neg	
153	28/9/1998	204	F		Neg	Neg	Neg	Hosp. Brigadeiro
154	13/10/1998	205	M	28a	Neg	Pos	Neg	
155	1998	206			Neg	Neg	Neg	
156	1998	207			Neg	Neg	Neg	
157	1998	208			Neg	Pos	Neg	
158	13/11/1998	209	F	24a	Neg	Neg	Neg	
159	1/12/1998	210	M	26a	Neg	Neg	Neg	Hosp Brigadeiro
160	8/12/1998	211	M	8a	Pos	Pos	Pos	Hospital Universitário
161	8/12/1998	212	F	10a	Pos	Pos	Pos	Hospital Universitário
162	14/12/1998	213	F		Pos	Neg	Neg	
163	18/12/1998	214	M		Neg	Neg	Neg	UFSM
164	8/1/1999	227		25s	Neg	Pos	Pos	Hosp das Clínicas
165	8/1/1999	228	F	17a	Pos	Pos	Neg	Hosp das Clínicas
166	21/1/1999	229	M	9a	Neg	Neg	Neg	HC Instituto da Criança
167	1999	230			Pos	Neg	Neg	
168	1999	231			Pos	Neg	Neg	
169	1999	232			Neg	Neg	Neg	
170	1999	233			Neg	Neg	Pos	
171	1999	234			Neg	Neg	Neg	
172	1999	235			Pos	Neg	Pos	
173	1999	236			Pos	Neg	Neg	
174	1999	237			Pos	Neg	Neg	
175	1999	238			Neg	Neg	Neg	
176	1999	239			Neg	Neg	Neg	
177	1999	240			Pos	Neg	Neg	
178	1999	241			Neg	Neg	Neg	
179	25/2/1999	242	M		Pos	Neg	Pos	IAL
180	25/2/1999	243	F	31d	Neg	Neg	Neg	IAL
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
181	1/3/1999	244	F	2d	Neg	Neg	Neg	Hospital Universitário
182	16/3/1999	245	F	25a	Neg	Neg	Neg	HC (hosp. Clínicas)
183	17/3/1999	246	F	14d	Neg	Pos	Neg	Hosp das Clínicas
184	22/3/1999	247	F		Pos	Pos	Neg	Hosp. Câncer
185	23/3/1999	248	F	43a	Pos	Neg	Pos	Hospital Universitário
186	25/3/1999	249	M	27a	Neg	Neg	Neg	Hosp. Brigadeiro
187	1999	250			Neg	Neg	Neg	
188	5/4/1999	251	F	4d	Neg	Neg	Pos	IAL
189	5/4/1999	252	F	27a	Neg	Neg	Neg	Hosp das Clínicas
190	18/4/1999	253	M	3a	Neg	Pos	Pos	Hosp. Sta. Maria no RS
191	27/4/1999	254	M	6m	Neg	Pos	Neg	Franco Rocha

192	18/3/1999	255	F	7a	Neg	Pos	Pos	RS, Hosp de Gravataí
193	18/3/1999	256	F	1a	Neg	Pos	Pos	RS, Hosp de Cachoeirinha
194	18/3/1999	257	M	8a	Pos	Neg	Pos	RS, Hosp de Rio Grande
195	23/3/1999	258		5a	Neg	Pos	Pos	RS, Caxias do Sul
196	23/3/1999	259		5a	Neg	Pos	Pos	RS, Caxias do Sul
197	25/3/1999	260		7a	Neg	Neg	Neg	RS, Caxias do Sul
198	25/3/1999	261		7a	Neg	Neg	Neg	
199	2/4/1999	262		1a	Pos	Pos	Neg	
200	8/4/1999	263	M	1a	Neg	Pos	Pos	RS, Hosp. Porto Alegre
201	5/4/1999	264	M	31a	Pos	Pos	Pos	RS, Hosp. de Estação
202	1999	265			Pos	Neg	Neg	
203	19/4/1999	266	M	33a	Neg	Pos	Pos	RS, Hosp. Antonio Prado
204	1999	267			Pos	Pos	Pos	
205	20/5/1999	268	F	14a	Neg	Neg	Pos	RS, Hosp. de cachoeirinha
206	20/5/1999	269	M	11m	Neg	Neg	Neg	Hosp Infantil Darcy Vargas
207	24/5/1999	270	M	22a	Neg	Pos	Neg	Hosp. Brigadeiro
208	24/5/1999	271		<30d	Neg	Neg	Neg	Hosp Mater. Leonor Mendes de Barros
209	1999	272			Neg	Neg	Neg	
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
210	1999	273			Neg	Neg	Neg	
211	31/5/1999	274	M	1a 3m	Neg	Neg	Neg	Hosp São Paulo - UNIFESP
212	31/5/1999	275	F	2a	Neg	Neg	Neg	Hosp São Paulo - UNIFESP
213	31/5/1999	276		3d	Neg	Neg	Neg	Serv. Neonat- Hosp. Evang. de Curitiba
214	1999	277			Pos	Pos	Pos	RS
215	1999	278			Pos	Pos	Pos	
216	1999	279			Pos	Pos	Pos	
217	1999	280			Pos	Pos	Neg	
218	1999	281			Neg	Neg	Neg	
219	1999	282			Neg	Neg	Neg	
220	1999	283			Pos	Pos	Neg	
221	1999	284			Neg	Neg	Neg	
222	1999	285			Neg	Neg	Neg	
223	1999	286			Neg	Neg	Neg	
224	1999	287			Neg	Neg	Neg	
225	28/6/1999	288	F		Neg	Neg	Neg	IAL
226	14/7/1999	289	M	10a	Neg	Neg	Neg	Hosp. de Jundiaí
227	22/7/1999	290	M	4a	Neg	Neg	Neg	Hosp. Dr. Alípio C. Neto (IAL)
228	27/7/1999	291	M	Rn	Neg	Neg	Neg	Hospital Universitário
229	27/7/1999	292	F	7a	Neg	Neg	Neg	Hosp. São Vicente de Paula - Jundiaí
230	4/8/1999	293	M	5a	Neg	Neg	Neg	Hosp das Clínicas
231	4/8/1999	294	M	3a 7m	Neg	Neg	Neg	Hosp. Sta. Maria no RS
232	13/8/1999	295	F	2a	Neg		Neg	Instituto de Infectologia Emilio Ribas
233	27/8/1999	296	M	4d	repetir	Neg	Neg	Hosp e maternidade Sta. Joana - Jundiaí
234	16/9/1999	297	M	2a	Neg	Pos	Neg	Hospital Universitário
235	21/9/1999	298	M	Rn	Neg		Neg	Serv. Neonat- Hosp. Evang. de Curitiba
236	21/9/1999	299	F		Pos	Neg	Neg	Serv. Neonat- Hosp. Evang. de Curitiba
237	24/9/1999	300	M	10a	Neg	Neg	Neg	Hosp São Paulo - UNIFESP
238	24/9/1999	301	M	10a	Neg	Neg	Neg	Hosp São Paulo - UNIFESP
239	27/9/1999	302	F	?	Pos	Pos	Pos	U.P.E - Hosp Brigadeiro
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade

240	30/9/1999	303	M		Neg	Neg	Neg	BH
241	10/8/1999	304	F	4a	Neg	Neg	Neg	Flórida - Sta. Catarina (IAL)
242	10/8/1999	305	M	6a	Neg	Neg	Neg	Flórida - Sta. Catarina (IAL)
243	1999	307	F	7a	Neg	Neg	Neg	Flórida - Sta. Catarina (IAL)
244	1999	308	M	20a	Neg	Neg	Neg	Hosp. Sta. Maria no RS (IAL)
245	1999	309	F	5a	Pos	Pos	Pos	Hosp. Sta. Maria no RS (IAL)
246	1999	310	M	6a	Pos	Pos	Neg	Hosp. Sta. Maria no RS (IAL)
247	1999	311	F	7a	Pos	Pos	Pos	Hosp. Sta. Maria no RS (IAL)
248	1999	312	F	6a	Pos	Pos	Pos	Hosp. Sta. Maria no RS (IAL)
249	1999	313	M	5a	Pos	Pos	Pos	Hosp. Sta. Maria no RS (IAL)
250	1999	314	M	5a	Neg	Pos	Pos	Hosp. Sta. Maria no RS (IAL)
251	1999	315	M	5a	Neg	Pos	Pos	Hosp. Sta. Maria no RS (IAL)
252	1999	316	M	7a	Pos	Pos	Pos	Hosp. Sta. Maria no RS (IAL)
253	1999	317			Pos	Pos	Pos	
254	1999	318			Neg	Neg	Neg	
255	1999	319	F	8a	Neg	Neg	Neg	Hosp. Sta. Maria no RS (IAL)
256	1999	320	F	13a	Neg	Neg	Neg	Hosp. Sta. Maria no RS (IAL)
257	1999	321	F	9a	Pos	Pos	Neg	Hosp. Sta. Maria no RS (IAL)
258	1999	322	F	9a	Pos	Pos	Pos	Hosp. Sta. Maria no RS (IAL)
259	1999	323	M	1a	Pos	Pos	Pos	Hosp. Sta. Maria no RS (IAL)
260	1999	324	M	2a	Pos	Pos	Neg	Hosp. Sta. Maria no RS (IAL)
261	1999	325	F	6a	Pos	Pos	Pos	Hosp. Sta. Maria no RS (IAL)
262	1999	326	F	39a	Pos	Pos	Pos	Hosp. Sta. Maria no RS (IAL)
263	20/9/1999	327	M	21a	Neg	Neg	Neg	IAL
264	6/10/1999	328	F	26a			Neg	IAL
265	26/10/1999	329	M	29a	Neg	Neg	Neg	SUDS - Sto. André
266	27/10/1999	330	M	10a	Neg	Pos	Pos	Instituto de Infectologia Emilio Ribas
267	29/10/1999	331		Rn	Neg	Neg	Pos	IAL
268	1999	332			Neg	Neg	Neg	
269	8/11/1999	333	F	25a	Neg	Neg	Neg	Hosp. Veterinário da USP
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
270	1999	334			Neg	Neg	Neg	
271	10/11/1999	335	F	26a	Neg	Neg	Neg	SUDS - U.P.E. Hosp. Brigadeiro
272	19/11/1999	336	M	2a	Neg	Pos	Neg	Hosp. Inf. Candido Fontoura (Mooca - SP)
273	26/11/1999	337	M	7a	Pos	Pos	Pos	Hosp. São Vicente de Paula - Jundiaí
274	26/11/1999	338	M	9m	Neg	Neg	Neg	Hosp. São Vicente de Paula - Jundiaí
275	15/12/1999	339	F	30a	pos	pos	Pos	Hosp das Clínicas
276	17/12/1999	340		Rn	Pos	Neg	Neg	Hosp das Clínicas
277	17/12/1999	341		Rn	Pos	Neg	Neg	Hosp das Clínicas
278	6/1/2000	342	M	Rn	Pos	Neg	Neg	HC da Unicamp
279	6/1/2000	343	F		Pos	Neg	Neg	HC numero: 704746-7
280	7/1/2000	344	M	7a	Neg	Neg	Neg	Hosp das Clínicas
281	18/1/2000	345	M	3a	Neg	Neg	Neg	Hosp. São Vicente de Paula - Jundiaí
282	2/2/2000	347	F	39a	Pos	Pos	Pos	
283	3/2/2000	348	M	8m	Pos	Neg	Neg	
284	18/2/2000	349	F	23a	Neg	Pos	Pos	IAL-Cotia
285	2000	350			Pos	Pos	Pos	
286	18/2/2000	351			Pos	Neg	Pos	IAL-Cotia
287	2000	352	F	3a	Neg	Neg	Neg	
288	30/3/2000	353	F		Neg	Pos	Pos	
289	2000	354	M	5m	Neg	Neg	Neg	

290	2000	355	F	20a	Neg	Neg	Neg	
291	2000	356	M		Neg	Neg	Neg	
292	2000	357			Neg	Neg	Neg	
293	6/4/2000	358	F		Neg	Neg	Neg	Unicamp
294	19/4/2000	359	M		Neg	Neg	Neg	Unifesp
295	24/4/2000	360	M	10a	rep	Pos	Pos	Instituto de infectologia Emílio Ribas
296	24/4/2000	361	F	33a	Neg	Neg	Neg	Instituto de infectologia Emílio Ribas
297	26/4/2000	362	M	36a	Neg	Neg	Neg	UTI - HC
298	4/5/2000	363	M	10a	Neg	Pos	Pos	Instituto de infectologia Emílio Ribas
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
299	3/5/2000	364	M	36a	Neg	Neg	Neg	Enferm HC
300	17/5/2000	365	M	10m	Neg	Neg	Neg	Secretaria do estado da saúde
301	18/5/2000	366	M		Neg	Neg	Pos	Hosp. Brigadeiro -UPE
302	2/6/2000	367	M	12a	Neg	Pos	Pos	UNIFESP-EPM- Hosp São Paulo
303	6/6/2000	368	M	10a	Neg	Pos	Pos	Secretaria do estado da saúde
304	15/6/2000	369	F	1a 9m	Neg	Neg	Pos	Hosp. Caridade de São Vicent de Paula
305	28/6/2000	370		2d	Pos	Neg	Pos	Hosp. Maternidade Santa Marina
306	28/6/2000	371	M		Neg	Neg	Neg	UNIFESP-EPM
307	28/6/2000	372	F		Neg	Neg	Neg	UNIFESP-EPM
308	7/7/2000	373		29d	Neg	Neg	Neg	Instituto da Criança - HC
309	2000	374					Neg	
310	2000	375					Neg	
311	2000	376					Neg	
312	2000	377					Neg	
313	2000	378					Neg	
314	2000	379					Neg	
315	2000	382					Neg	
316	2000	385					Neg	
317	2000	394					Neg	
318	2000	403					Neg	
319	2000	404					Neg	
320	2000	405					Neg	
321	2000	406					Neg	
322	2000	407					Neg	
323	2000	408					Neg	
324	2000	409					Neg	
325	2000	410					Neg	
326	2000	411					Neg	
327	2000	412					Pos	
328	2000	413					Neg	
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
329	2000	414					Neg	
330	2000	415					Pos	
331	2001	416					Neg	
332	2001	417					Neg	
333	2001	418					Neg	
334	2001	419					Neg	
335	23/1/2001	420					Neg	Hospital Universitário
336	30/1/2001	421					Neg	Centro de Hematologia de São Paulo
337	7/2/2001	422					Neg	Santa Casa

338	22/1/2001	423					Neg	Hospital Universitário Santa Maria
339	24/2/2001	424					Pos	Hospital Universitário
340	21/3/2001	425		9a			Neg	Hospital Candido Fontoura
341	16/4/2001	426		12a			Neg	Hospital de carid. São Vicente de Paula
342	2001	427		17a			Neg	
343	19/4/2001	428		45a			Pos	Hospital Universitário
344	2/5/2001	429		13a			Pos	Unifesp
345	8/5/2001	430					Neg	Hospital Brigadeiro
346	18/5/2001	431	F	12a			Neg	Hospital mandaqui
347	1/6/2001	432	M	6m			Neg	Hospital Universitário
348	2001	433					Neg	Hospital Brigadeiro
349	2001	434					Neg	
350	29/6/2001	435		4a			Neg	Hospital Universitário
351	2001	436					Neg	Hospital Brigadeiro
352	2001	437		6a			Neg	Hospital Brigadeiro
353	18/7/2001	438	M	14a			Neg	Hospital Universitário
354	2/8/2001	439	F	5a			Pos	
355	22/8/2001	440	F				Neg	Hospital Brigadeiro
356	2001	441	M	65a			Neg	Hospital Eliopolis
357	6/9/2001	442	M	11a			Neg	Hospital Clinicas
358	2001	443					Neg	
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
359	2001	444	F				Neg	Santa Casa
360	14/9/2001	445		0d			Neg	Hospital Universitário
361	17/9/2001	446		0d			Neg	Hospital Universitário
362	21/9/2001	447					Neg	
363	21/9/2001	448					Neg	
364	24/9/2001	449	M				Neg	
365	26/9/2001	450		8d			Neg	Hospital Universitário
366	2001	451					Neg	
367	11/10/2001	452					Pos	Hospital Clinicas
368	11/10/2001	453					Pos	Hospital Clinicas
369	28/9/2001	454		4a			Neg	
370	18/10/2001	455		5a			Neg	Hospital Universitário
371	18/10/2001	456					Neg	
372	23/10/2001	457		10m			Neg	HU (Hosp. Universitário)
373	24/10/2001	458		56a			Neg	
374	6/11/2001	459					Neg	Santa Casa
375	6/11/2001	460					Neg	Santa Casa
376	9/11/2001	461					Neg	Hospital Clinicas
377	22/11/2001	462		59a			Neg	
378	2001	463					Neg	
379	5/12/2001	464		8m			Neg	Hospital Universitário
380	7/12/2001	465		8m			Neg	Hospital Universitário
381	11/12/2001	466					Neg	
382	18/12/2001	467		22a			Neg	
383	19/12/2001	468					Neg	
384	28/12/2001	469		1a3m			Neg	Hospital Universitário
385	21/2/2002	470					Neg	
386	21/2/2002	471					Neg	Hospital Brigadeiro
387	21/2/2002	472					Neg	Hospital Emilio Ribas

388	22/2/2002	473		10m			Neg	Hospital Emilio Ribas
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
389	27/2/2002	474		25a			Neg	
390	1/3/2002	475		21a			Neg	Hospital Emilio Ribas
391	1/3/2002	476		1d			Neg	Hospital Universitário
392	2/4/2002	477					Neg	
393	18/4/2002	478		13m			Pos	
394	30/4/2002	479		9a			Neg	Hospital Universitário
395	6/5/2002	480		28a			Pos	
396	20/5/2002	481					Neg	
397	22/5/2002	482		21a			Neg	
398	2002	483					Pos	
399	2002	484					Neg	
400	2002	485					Pos	
401	6/6/2002	486		2a			Pos	Hospital Universitário
402	6/6/2002	487		9a			Neg	
403	13/6/2002	488		7d			Neg	
404	20/6/2002	489		21a			Neg	Hospital Clinicas
405	11/7/2002	490		27d			Neg	
406	31/7/2002	491					Neg	
407	2/8/2002	492		11a			Neg	Hospital Brigadeiro
408	6/8/2002	493					Neg	Hospital Brigadeiro
409	14/8/2002	494		5d			Neg	Unicamp
410	15/8/2002	495		17a			Neg	Emilio Ribas
411	19/8/2002	496		7m			Neg	Hospital Universitário
412	29/8/2002	497		44a			Pos	Emilio Ribas
413	16/9/2002	498		32a			Neg	
414	17/9/2002	499		34a			Neg	
415	20/9/2002	500		4m	Pos	Neg	Neg	Hospital Universitário
416	23/9/2002	501		32a	Pos	Neg	Neg	
417	26/9/2002	502			Neg	Neg	Neg	Hospital Brigadeiro
418	21/10/2002	503		43a	Neg	Neg	Neg	Hospital de carid. São Vicente de Paula
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
419	21/10/2002	504		20d	Pos	Neg	Neg	HU (Hosp. Universitário)
420	23/10/2002	505			Neg	Neg	Neg	Hospital Universitário Santa Maria
421	28/10/2002	506			Pos	Neg	Neg	HU (Hosp. Universitário)
422	8/11/2002	507		14a	Pos	Neg	Neg	Hospital Universitário Santa Maria
423	13/11/2002	508		2m	Pos	Neg	Neg	Hospital Santa Lucia
424	2002	509		12a	Pos	Pos	Neg	
425	29/11/2002	510		29a	Pos	Neg	Neg	Hospital Clinicas
426	29/11/2002	511		31a	Pos	Neg	Neg	Hospital Clinicas
427	29/11/2002	512			Pos	Neg	Neg	
428	4/12/2002	513			Pos	Neg	Neg	
429	12/12/2002	514		42a	Pos	Neg	Neg	Hospital e Maternidade SEPACO
430	17/1/2003	515		2a	Neg		Neg	
431	20/1/2003	516		4a	Neg	Pos	Pos	Hospital Universitário
432	20/1/2003	517		3m	Neg	Neg	Pos	Hospital Universitário
433	23/1/2003	518		8m	Neg	Neg	Neg	Hospital Universitário
434	23/1/2003	519		2a	Neg	Neg	Neg	Hospital Universitário
435	27/1/2003	520		8m	Neg	Neg	Neg	Hospital Universitário

436	27/1/2003	521		7a	Neg	Neg	Neg	Hospital Universitário
437	28/1/2003	522		6m	Neg	Neg	Neg	Hospital Universitário
438	29/1/2003	523			Neg	Pos	Neg	Hospital Universitário
439	29/1/2003	524			Neg	Neg	Neg	Hospital Universitário
440	7/2/2003	525		14a	Pos	Neg	Neg	Hospital Clinicas
441	7/2/2003	526		8a	Pos	Neg	Neg	Hospital Brigadeiro
442	11/2/2003	527		40a	Pos	Neg	Neg	Hospital Santa Cruz
443	11/2/2003	528		9m	Pos	Pos	Neg	Hospital Universitário
444	13/2/2003	529		12a	Pos	Neh	Neg	Hospital do Servidor Publico Estadual
445	18/2/2003	530		1m	Pos	Neg	Neg	Hospital Universitário
446	20/2/2003	531		14a	Neg	Neg	Neg	Hospital e Maternidade SEPACO
447	27/2/2003	532		4m	Pos	Neg	Neg	Hospital Universitário
448	28/2/2003	533			Neg	Neg	Neg	
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
449	12/3/2003	534		1a3m	Pos	Neg	Neg	
450	12/3/2003	535			Pos	Neg	Neg	Hospital e Maternidade SEPACO
451	17/3/2003	536		29a	Pos		Neg	
452	18/3/2003	537		1a1m	Neg	Neg	Neg	Hospital Clinicas
453	18/3/2003	538		7a	Pos	Neg	Neg	Hospital Clinicas
454	21/3/2003	539		5m	Pos	Neg	Neg	HU (Hosp. Universitário)
455	3/3/2003	540			Neg		Neg	Hospital Geral de Guarulhos
456	27/3/2003	541		60a	Pos		Neg	
457	4/4/2003	542		15a	Pos		Pos	Santa Casa
458	25/4/2003	543		16a	Pos	Neg	Pos	Hospital Clinicas
459	20/5/2003	544		16a	Pos		Neg	Hospital Clinicas
460	27/5/2003	545		2a7m	Pos		Neg	
461	28/5/2003	546		3d	Pos		Neg	Hospital Universitário
462	2003	547			Pos		Neg	Hospital do Câncer
463	30/5/2003	548			Pos		Neg	
464	4/6/2003	549		23a	Pos		Neg	Santa Casa
465	5/6/2003	550		9m	Pos		Pos	
466	9/6/2003	551		2a	Pos		Neg	Hospital Clinicas
467	2003	552			Neg		Neg	Hospital Clinicas
468	16/6/2003	553		1a	Pos		Neg	Hospital Santa Marcelina
469	25/6/2003	554		20a	Pos		Neg	Santa Casa
470	30/6/2003	555			Pos		Neg	
471	4/7/2003	556		36d	Pos	Neg	Neg	
472	7/7/2003	557		40a	Pos	Neg	Neg	H Clinicas
473	14/7/2003	558		4a6m	Neg	neg	Pos	Hospital Universitário
474	15/7/2003	559		3m	Neg	Neg	Neg	Hospital Universitário
475	25/7/2003	561		4a	Pos	Neg	Neg	Hospital Universitário
476	28/7/2003	562		1d	Pos	Neg	Neg	Hospital Universitário
477	27/8/2003	563		4a	Neg	Neg	Neg	Emilio Ribas
478	9/9/2003	564		39a	Pos	Neg	Neg	H Clinicas
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
479	9/9/2003	565		4a	Neg	Neg	Neg	
480	2/10/2003	566		5a	Pos	Neg	Neg	Hospital Santa Marcelina
481	8/10/2003	567		3a	Pos	Neg	Pos	
482	10/10/2003	568		34a	Pos	Neg	Pos	Emilio Ribas
483	5/11/2003	569			Pos	Neg	Neg	

484	11/11/2003	570			Pos	Neg	Neg	
485	12/11/2003	571		3a9m	Pos	Neg	Neg	Hospital Geral de Guarulhos
486	8/12/2003	572		22a	Pos	Pos	Pos	Hospital Universitário
487	10/12/2003	573		11d	Pos	Neg	Neg	Hospital Universitário
488	15/12/2003	575		17d	Pos	Neg	Neg	Hospital Universitário
489	28/1/2004	576		12d	Pos	Neg	Neg	Hospital Universitário
490	4/2/2004	577		22a	Pos	Pos	Neg	Hospital Universitário
491	11/2/2004	578		15d	Pos	Neg	Neg	Hospital Universitário
492	12/2/2004	579			Neg	Neg	Neg	Jundiaí
493	26/2/2004	580			Pos	Neg	Neg	Emilio Ribas
494	2004	581		35d	Pos	Neg	Neg	Hospital Universitário
495	15/3/2004	582		31a	Neg	Neg	Neg	
496	19/3/2004	583			Pos	Neg	Neg	
497	19/3/2004	584			Pos	Pos	Neg	
498	20/4/2004	585		71a		Neg	Neg	
499	2004	586		56a		Neg	Pos	
500	29/4/2004	587		16a		Neg	Neg	Santa Casa
501	29/4/2004	588		46a		Neg	Neg	
502	4/5/2004	589		22a		Neg	Neg	Hospital Universitário
503	11/5/2004	590		44a			Neg	Hospital Clinicas
504	13/5/2004	591		1a			Neg	
505	21/5/2004	592		19a			Neg	
506	26/5/2004	593		16a			Neg	Hospital Nipo-Brasileiro
507	1/6/2004	594		61a			Neg	
508	4/6/2004	595		41a			Neg	
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
509	2004	596		57a			Neg	Hospital Clinicas
510	17/6/2004	597		57a			Neg	Jundiaí
511	21/6/2004	598		6d			Neg	Hospital Clinicas
512	5/7/2004	599		2a4m			Neg	Hospital Universitário
513	23/7/2004	600					Neg	Hospital Universitário
514	2004	601					Neg	UNICAMP
515	9/8/2004	602		6a			Neg	Hospital Brigadeiro
516	27/8/2004	603		14a			Neg	Hospital Clinicas
517	2/9/2004	604		14a			Neg	Hospital Clinicas
518	9/9/2004	605					Neg	Santa Casa
519	21/9/2004	606		7d			Neg	
520	4/10/2004	607		45a			Neg	Hospital Santa Marcelina
521	6/11/2004	608		51a			Neg	
522	7/10/2004	609		9a			Pos	Hospital Santa Marcelina
523	7/10/2004	610		11a			Pos	Hospital Santa Marcelina
524	27/10/2004	611		10a			Neg	Hospital Brigadeiro
525	27/10/2004	612		10m			Neg	
526	9/11/2004	613		4a			Neg	
527	9/11/2004	614		8a			Neg	
528	11/11/2004	615		1a6m			Neg	
529	18/11/2004	616					Pos	Santa Casa
530	18/11/2004	617		5a			Pos	Instituto Adolfo Lutz
531	19/11/2004	618					Pos	
532	24/11/2004	619		11a			Pos	Emilio Ribas
533	24/11/2004	620					Neg	Hospital Clinicas

534	25/11/2004	621					Neg	
535	30/11/2004	622					Neg	
536	2/12/2004	623					Neg	
537	10/12/2004	624					Neg	
538	22/12/2004	625					Neg	Hospital Brigadeiro
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
539	2005	626					Neg	Hospital Brigadeiro
540	2005	627					Neg	Hospital Brigadeiro
541	13/1/2005	628		28a			Neg	Hospital do Servidor Publico Estadual
542	2005	629		22a			Neg	
543	2005	630		9a			Neg	Campinas
544	25/1/2005	631		4a			Neg	UNICAMP
545	2005	632		30a			Pos	Instituto Adolfo Lutz
546	2005	633		11a			Neg	Instituto Adolfo Lutz
547	25/1/2005	634		10a			Pos	UNICAMP
548	18/2/2005	635					Neg	Hospital Universitário
549	18/2/2005	636					Neg	Hospital Universitário
550	4/4/2005	637					Neg	Atibaia
551	29/3/2005	638		11a			Neg	Hospital Brigadeiro
552	11/4/2005	639		4a			Pos	Hospital Brigadeiro
553	12/4/2005	640		1m8d			Neg	Hospital Universitário
554	13/4/2005	641		3d			Pos	Hospital Universitário
555	14/4/2005	642		54a			Neg	Emilio Ribas
556	18/4/2005	643		29a			Pos	Hospital Universitário
557	20/4/2005	644		7m			Neg	H Clinicas
558	2005	645		2a2m			Neg	Itapecerica da Serra
559	5/5/2005	646					Neg	
560	10/5/2005	647		4a			Neg	Hospital Santa Marcelina
561	30/5/2005	648					Neg	Hospital Santa Marcelina
562	30/6/2005	649					Neg	
563	26/6/2005	650		13d			Neg	UNIFESP
564	23/6/2005	651					Neg	
565	23/6/2005	652					Neg	
566	30/6/2005	653		15a			Neg	Santa Casa
567	30/6/2005	654		15a			Neg	Santa Casa
568	7/7/2005	655		53a			Neg	São Caetano do Sul
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
569	13/7/2005	656					Neg	
570	14/7/2005	657		3a11m			Neg	HU (Hosp. Universitário)
571	21/7/2005	658		10m			Neg	HU (Hosp. Universitário)
572	28/7/2005	659		5a			Neg	
573	1/8/2005	660					Neg	
574	1/8/2005	661		18a			Neg	Hospital Universitário
575	18/8/2005	662					Neg	Hospital Universitário
576	19/8/2005	663		8a			Pos	
577	22/8/2005	664		17a			Neg	Hospital Universitário
578	31/8/2005	665					Neg	Santa Casa
579	2005	666		8m			Neg	Hospital Universitário
580	2005	667		9d			Neg	Hospital Renascença
581	2005	668		22a			Neg	Hospital Renascença

582	2005	669		15a			Neg	Hospital Infantil Darci Vargas
583	2005	670		1m5d			Neg	Hospital Universitário
584	21/9/2005	671		2a			Neg	Emilio Ribas
585	2005	672		9a			Neg	Emilio Ribas
586	25/9/2005	673		4a			Neg	Hospital Universitário
587	27/9/2005	674		6a			Neg	Santa Casa
588	2005	675		2a			Neg	Emilio Ribas
589	30/9/2005	676		8a			Neg	Emilio Ribas
590	5/10/2005	677		9m			Neg	Hospital Santa Marcelina
591	14/10/2005	679					Neg	
592	2005	680		5a			Neg	Hospital Universitário
593	2005	681		3a			Neg	Hospital Universitário
594	9/11/2005	682		10a			Neg	Emilio Ribas
595	11/11/2005	683		18a			Neg	Hospital São Paulo
596	16/11/2005	684		7a		Pos	Neg	São João da Boa Vista
597	2005	685		5a		Neg	Neg	Hospital Universitário
598	18/11/2005	686		11a		Pos	Neg	Emilio Ribas
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
599	2005	687		4m15d		Pos	Neg	Hospital Universitário
600	18/11/2005	688		7a			Neg	
601	1/12/2005	689		11a			Neg	
602	2005	690		12a			Neg	Emilio Ribas
603	6/12/2005	691		6a			Pos	
604	7/12/2005	692					Neg	
605	8/12/2005	693		24a			Neg	Hospital São Joaquim
606	12/12/2005	694		29a			Neg	Itapeceira da Serra
607	13/12/2005	695		10a			Neg	Hospital Universitário
608	13/12/2005	696		13a			Neg	Hospital Universitário
609	18/12/2005	697					Neg	
610	18/12/2005	698					Neg	
611	13/1/2006	699		1m27d			Neg	Hospital Universitário
612	15/12/2005	700	M	1a4m			Neg	
613	15/12/2005	701	M	29 a			Neg	
614	23/1/2006	702	M	42 a			Neg	
615	30/6/2006	703	M	2a			Neg	
616	30/6/2006	704	F	61 a			Neg	
617	3/2/2006	705	F	1a10m			Neg	
618	6/2/2006	706	F	9a			Neg	
619	21/2/2006	707	M	15a			Neg	
620	8/3/2006	708	M	11a			Neg	
621	8/3/2006	709	F				Neg	
622	27/3/2006	710	M	2a			Neg	
623	27/3/2006	711	M	14a			Neg	
624	27/3/2006	712	F				Neg	
625	6/4/2006	713	M	27a			Neg	
626	6/4/2006	714	F	6a			Neg	
627	13/4/2006	715	M	9a			Neg	
628	19/4/2006	716	M	10a			Neg	
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
629	19/4/2006	717	M	2a			Neg	

630	19/4/2006	718	F	21a			Neg	
631	19/4/2006	719	F	20a			Neg	
632	27/4/2006	720	F	11a			Neg	
633	27/4/2006	721	M				Neg	
634	8/5/2006	722	F	24a			Neg	
635	10/5/2006	723	M	Desc			Neg	
636	11/5/2006	724	F	31a			Neg	
637	19/5/2006	725	M	3a			Neg	
638	22/5/2006	726		8d			Neg	
639	23/5/2006	727	M				Neg	
640	12/6/2006	728	F	1a			Neg	
641	13/6/2006	729	M	2a			Neg	
642	19/6/2006	730	F				Neg	
643	5/7/2006	731	F	16a			Neg	
644	5/7/2006	732		<28d			Neg	
645	21/7/2006	733	M	Desc			Neg	
646	23/7/2006	734	M	4a			Neg	
647	25/7/2006	735	F	4a			Neg	
648	27/7/2006	736	M				Neg	
649	4/8/2006	737	F	9m			Neg	
650	10/8/2006	738	F	13a			Neg	
651	14/8/2006	739	M	7a			Neg	
652	21/8/2006	740	F	1a2m			Neg	
653	2006	741					Neg	
654	24/8/2006	742	F				Neg	
655	2006	743		4a			Neg	
656	29/8/2006	744	M	7a			Neg	
657	11/9/2006	745	M	1a			Neg	
658	11/9/2006	746	M				Neg	
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
659	13/9/2006	747	F	14a			Neg	
660	21/9/2006	748	M	7m20d			Neg	
661	28/9/2006	749	F	5a			Neg	
662	28/9/2006	750	M	59			Neg	
663	2006	751					Neg	
664	19/10/2006	752	F				Neg	
665	14/11/2006	753	M				Pos	
666	15/11/2006	754					Neg	
667	19/10/2006	755	M	38a			Neg	
668	22/11/2006	756					Neg	
669	22/11/2006	757	M	32a			Pos	
670	24/11/2006	758	M	13a			Neg	
671	6/12/2006	759	M	<18a			Neg	
672	6/12/2006	760	M	<18a			Pos	
673	18/12/2006	761	M	<18a			Pos	
674	19/12/2006	762	M	33a			Neg	
675	2007	763		1a			Neg	Emílio Ribas
676	24/1/2007	764		3d			Neg	HU (Hosp. Universitário)
677	2007	765		26a			Neg	UNICAMP
678	12/2/2007	766		13d			Neg	
679	2007	767					Neg	

680	22/2/2007	768		14a			Neg	
681	2007	769		12a			Neg	
682	23/2/2007	770		12a			Neg	Hospital Brigadeiro
683	23/2/2007	771		35a			Neg	UNICAMP
684	28/2/2007	772		20a			Neg	Emilio Ribas
685	28/2/2007	773		10a			Neg	Santa Casa
686	1/3/2007	774		5d			Neg	H Clinicas
687	2007	775					Neg	
688	2007	776		20a			Neg	UNICAMP
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
689	1/3/2007	777					Neg	Hospital Brigadeiro
690	7/3/2007	778		2a9m			Neg	H Clinicas
691	10/4/2007	779					Neg	
692	11/4/2007	780		31d			Neg	HU (Hosp. Universitário)
693	2007	781		4a			Neg	Emilio Ribas
694	12/4/2007	782					Neg	Campinas
695	13/4/2007	783		9a			Neg	Emilio Ribas
696	24/4/2007	784		2a	Pos	Neg	Neg	H Clinicas
697	25/4/2007	785					Neg	Hospital Brigadeiro
698	26/4/2007	786		12a			Neg	Hospital Brigadeiro
699	3/5/2007	787		3d	Pos	Neg	Neg	HU (Hosp. Universitário)
700	3/5/2007	788		14a	Neg	Neg	Neg	Santa Casa
701	14/5/2007	789		40a			Neg	Emilio Ribas
702	17/5/2007	790		15a			Neg	Emilio Ribas
703	29/5/2007	791		44a			Neg	
704	6/6/2007	792		43a			Neg	Emilio Ribas
705	2007	793		40a			Neg	
706	6/6/2007	794		7m			Neg	Santa Casa
707	11/6/2007	795		29a			Neg	Emilio Ribas
708	2007	796		37a			Neg	Emilio Ribas
709	14/6/2007	797		12a			Pos	Santa Casa
710	18/6/2007	798		41a			Neg	Emilio Ribas
711	22/6/2007	799		14a			Neg	Santa Casa
712	22/6/2007	800		2m			Neg	HU (Hosp. Universitário)
713	2/7/2007	801		36a			Neg	Emilio Ribas
714	5/7/2007	802		8m			Neg	HU (Hosp. Universitário)
715	6/7/2007	803		22a			Neg	Emilio Ribas
716	12/7/2007	804		5a			Neg	UNICAMP
717	2007	805		13a			Pos	Santa Casa
718	13/7/2007	806		2m			Neg	Santa Casa
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
719	13/7/2007	807		2a4m			Neg	Emilio Ribas
720	16/7/2007	808		3a5m			Neg	Emilio Ribas
721	17/7/2007	809		11a			Neg	HU (Hosp. Universitário)
722	18/7/2007	810		13a			Neg	Instituto Adolfo Lutz
723	20/7/2007	811		42a			Neg	Emilio Ribas
724	24/7/2007	812		3a			Neg	Hospital Brigadeiro
725	26/7/2007	813		28a			Neg	Instituto Adolfo Lutz
726	31/7/2007	814		26a			Neg	Hospital São Paulo
727	3/8/2007	815		53a			Neg	Emilio Ribas

728	13/8/2007	816		67a			Neg	Emilio Ribas
729	20/8/2007	817		9a			Neg	HU (Hosp. Universitário)
730	23/8/2007	818		32a			Neg	UNICAMP
731	30/8/2007	819		66a			Neg	Instituto Adolfo Lutz
732	2007	820		1a			Neg	Emilio Ribas
733	11/9/2007	821		1a			Neg	Hospital Brigadeiro
734	12/9/2007	822		7m			Neg	HU (Hosp. Universitário)
735	13/9/2007	823		13a			Pos	Santa Casa
736	24/9/2007	824		10a			Neg	Santa Casa
737	26/9/2007	825		10m			Neg	HU (Hosp. Universitário)
738	1/10/2007	826		2m11d			Neg	Itapecerica da Serra
739	3/10/2007	827		33a			Neg	
740	3/10/2007	828		10a			Neg	Emilio Ribas
741	4/10/2007	829		2m18d			Neg	HU (Hosp. Universitário)
742	9/10/2007	830					Neg	
743	17/10/2007	831					Neg	
744	17/10/2007	832		6a			Neg	
745	17/10/2007	833					Neg	
746	19/10/2007	834		15a			Neg	HU (Hosp. Universitário)
747	22/10/2007	835		11a			Neg	Santa Casa
748	24/10/2007	836		1a2m			Neg	Emilio Ribas
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
749	4/11/2007	837		32a			Neg	Emilio Ribas
750	2007	838		2a			Neg	UNICAMP
751	2007	839		36a			Neg	Emilio Ribas
752	14/11/2007	840		14a			Neg	Emilio Ribas
753	14/11/2007	841		21a			Neg	HU (Hosp. Universitário)
754	14/11/2007	842		0d			Neg	HU (Hosp. Universitário)
755	22/11/2007	843					Neg	Hospital Brigadeiro
756	29/11/2007	844		19a			Neg	HU (Hosp. Universitário)
757	2007	845		31a			Neg	UNICAMP
758	30/11/2007	846					Neg	Hospital Brigadeiro
759	2007	847		2m			Neg	HU (Hosp. Universitário)
760	13/12/2007	848		37a			Neg	Instituto Adolfo Lutz
761	21/12/2007	849		29a			Neg	Emilio Ribas
762	2007	850		9m			Neg	Santa Casa
763	27/12/2007	851		62a			Neg	Emilio Ribas
764	31/1/2007	852		6a7m			Neg	HU (Hosp. Universitário)
765	11/2/2008	853		62a			Neg	Emilio Ribas
766	11/2/2008	854		2m13d			Neg	HU (Hosp. Universitário)
767	14/2/2008	855		12a			Neg	Santa Casa
768	21/2/2008	856		22a			Neg	Instituto Adolfo Lutz
769	2008	857		3m19d			Neg	HU (Hosp. Universitário)
770	28/2/2008	858		12a			Neg	Instituto Adolfo Lutz
771	3/3/2008	859		39a			Neg	Emilio Ribas
772	3/3/2008	860					Neg	Emilio Ribas
773	2008	861		17a			Neg	Emilio Ribas
774	2008	862		21a			Neg	HU (Hosp. Universitário)
775	2008	863		2a			Neg	Santa Casa
776	2008	864		4m			Neg	HU (Hosp. Universitário)
777	18/3/2008	865		2a			Neg	Jundiaí

778	1/4/2008	866		13d			Neg	HU (Hosp. Universitário)
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
779	2/4/2008	867		6a			Neg	Santa Casa
780	8/4/2008	868		10m			Neg	HU (Hosp. Universitário)
781	22/4/2008	869		3h			Neg	HU (Hosp. Universitário)
782	30/4/2008	870		16a			Neg	Instituto Adolfo Lutz
783	30/4/2008	871		17a			Neg	Emilio Ribas
784	6/5/2008	872		1m14d			Neg	HU (Hosp. Universitário)
785	8/5/2008	873		6m			Neg	HU (Hosp. Universitário)
786	15/5/2008	874		66a			Neg	UNICAMP
787	15/5/2008	875		52a			Neg	UNICAMP
788	21/5/2008	876		16a			Neg	Instituto Adolfo Lutz
789	29/5/2008	877		15a			Neg	UNICAMP
790	2/6/2008	878		35a			Neg	Emilio Ribas
791	6/6/2008	879		30a			Neg	Emilio Ribas
792	6/6/2008	880					Neg	Emilio Ribas
793	12/6/2008	881		17a			Neg	UNICAMP
794	17/6/2008	882		3a7m			Neg	HU (Hosp. Universitário)
795	19/6/2008	883		9a			Neg	HU (Hosp. Universitário)
796	19/6/2008	884		66a			Neg	
797	23/6/2008	885		81a			Neg	Emilio Ribas
798	30/6/2008	886		35a			Neg	Emilio Ribas
799	3/7/2008	887		1d			Neg	Santa Casa
800	4/7/2008	888		27a			Pos	Santa Casa
801	2008	889		1a25d			Neg	HU (Hosp. Universitário)
802	22/7/2008	890		1m			Neg	Santa Casa
803	29/7/2008	891		9a			Neg	Santa Casa
804	4/8/2008	892		38a			Neg	Instituto Albert Einstein
805	5/8/2008	893		27a			Neg	Santa Casa
806	6/8/2008	894		4a			Neg	HU (Hosp. Universitário)
807	14/8/2008	895					Pos	
808	27/8/2008	896		14a			Pos	Emilio Ribas
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
809	4/9/2008	897		3m			Neg	HU (Hosp. Universitário)
810	10/9/2008	898		30a			Neg	Santa Casa
811	18/9/2008	899		7a			Neg	HU (Hosp. Universitário)
812	19/9/2008	900					Neg	Emilio Ribas
813	22/9/2008	901		1m19d			Neg	HU (Hosp. Universitário)
814	10/10/2008	902		14a			Neg	Emilio Ribas
815	15/11/2008	903		39a			Neg	Emilio Ribas
816	2008	904					Neg	Emilio Ribas
817	2008	905		32a			Neg	Emilio Ribas
818	2008	906		1a8m			Pos	HU (Hosp. Universitário)
819	19/11/2008	907		22a			Neg	Emilio Ribas
820	25/11/2008	908		17d			Neg	Santa Casa
821	26/11/2008	909		13a			Neg	Emilio Ribas
822	11/12/2008	910		39a			Neg	São Jose do Rio Preto
823	19/12/2008	911		30a			Neg	Emilio Ribas
824	5/1/2009	912		11a			Pos	Santa Casa
825	14/1/2009	913		11a			Pos	HU (Hosp. Universitário)

826	16/1/2009	914		48a			Neg	Emilio Ribas
827	29/1/2009	915		8a			Pos	Santa Casa
828	5/2/2009	916		15a			Pos	Santa Casa
829	18/2/2009	917		15a			Pos	Santa Casa
830	25/2/2009	918		6m			Pos	Santa Casa
831	26/2/2009	919		8m			Neg	HU (Hosp. Universitário)
832	11/3/2009	920		11a			Neg	Santa Casa
833	19/3/2009	921		4a			Neg	Santa Casa
834	30/3/2009	922		26d			Neg	HU (Hosp. Universitário)
835	1/4/2009	923		6m			Neg	Santa Casa
836	2/4/2009	924		2m			Pos	HU (Hosp. Universitário)
837	2/4/2009	925		15a			Neg	Santa Casa
838	15/4/2009	926		11a			Pos	Santa Casa
Nº	Data entrada	No Amostra	Sexo	Idade	IgG	IgM	PCR	Localidade
839	29/4/2009	927		1a			Neg	Santa Casa
840	28/5/2009	928		1m 4d			Neg	Hospital Universitário
841	1/6/2009	929		9a			Pos	Franco da Rocha
842	1/6/2009	930		34a			Neg	Franco da Rocha
843	16/6/2009	931		11m			Neg	Hospital das Clinicas
844	24/6/2009	932		13a			Pos	Santa Casa
845	22/7/2009	933		5m			Pos	Santa Casa
846	30/7/2009	934		29a			Neg	UNICAMP
847	5/8/2009	935		11m			Pos	Santa Casa
848	11/8/2009	936		1a			Neg	Hospital Universitário
849	20/8/2009	937					Neg	UNICAMP
850	20/8/2009	938					Neg	UNICAMP
851	20/8/2009	939					Pos	UNICAMP
852	8/9/2009	940		34a				UNICAMP

ANEXO 3:

KELLER, L. W.; BARBOSA, M. L.; MELO, F. L.; PEREIRA, L. M.; DAVID NETO, E.; LANHEZ, L. E.; DURIGON, E. L. Phylogenetic analysis of a near-full-length sequence of an erythrovirus genotype 3 strain isolated in Brazil. **Arch. Virol.**, v. 154, p. 1685-1687, 2009.