LUIZ GUSTAVO BENTIM GÓES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
CORONAVÍRUS HUMANO – HCOV, CIRCULANTES
NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO, SÃO PAULO, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

São Paulo
2012

LUIZ GUSTAVO BENTIM GÓES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
CORONAVÍRUS HUMANO – HCOV, CIRCULANTES
NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO, SÃO PAULO, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Jerez

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2012

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

Goes, Luiz Gustavo Bentim.

Caracterização molecular de coronavírus-HCoV, circulantes no município de São Paulo, São Paulo, Brasil / Luiz Gustavo Bentim Goes. – São Paulo, 2012.

Orientador: José Antonio Jerez.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Virologia Molecular.

Versão do título para o inglês: Molecular characterization of human coronavirus - HCoV, circulating in São Paulo, São Paulo, Brasil.

1. Coronavírus humano 2. Virose respiratória 3. Infecção respiratória 4. Real Time PCR 5. IRA 6. HCoV I. Jerez, José Antonio II. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB092/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato (a): Luiz Gustavo Bentim Goes.

Título da Tese: Caracterização molecular de coronavírus-HCoV, circulantes no município de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Orientador(a): José Antonio Jerez.

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:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 10 de dezembro de 2008.

PARECER 871/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 91ª reunião realizada em 09.12.08, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Epidemiologia e caracterização molecular de coronavírus respiratório humano Hcov, circulantes no Município de São Paulo, no período de 1995 a 2009*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão.**

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **09 de dezembro de 2009.**

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilmo. Sr.
LUIZ GUSTAVO BENTIM GÓES
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - telefax: (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP SH.068/2009

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Parecer 871/CEP de 09.12.2008, informo que o título do Projeto foi alterado para "*Caracterização molecular de coronavírus humano-HCoV, circulantes no município de São Paulo, São Paulo, Brasil*" sob responsabilidade LUIZ GUSTAVO BENTIM GÓES, não apresentando restrições quanto às modificações do protocolo, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 29 de novembro de 2011.

Prof. Dr. Paolo M.A. Zanotto
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Aos meus pais, Vera e Luiz, e meus avós Antenor, Lúcia
(*in memorian*), José (*in memorian*) e Silvia (*in
memorian*), pelo carinho, ensinamentos, apoio, e
principalmente pelo amor dado a mim.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

- Ao meu querido orientador, Prof. Dr. José Antonio Jerez, pelo apoio, discussões, correções, orientações, palavras amigas e de incentivo, sendo sempre um doce e sábio mentor e amigo. Muito obrigado Mestre!
- Ao Grande “Mestre” Prof. Dr. Edison Luiz Durigon, por ter idealizado o presente estudo, me aceito como membro de seu laboratório, estando sempre pronto para transmitir seu conhecimento com grande sapiência e simpatia. Sem você nada seria possível.
- Aos queridos Professores Kathryn Volker Holmes e Samuel Dominguez, por terem auxiliado no direcionamento do presente estudo, na obtenção de resultados, realização de estudos de vanguarda; e por terem possibilitado, por duas vezes, a realização de períodos muito produtivos e de grande aprendizado, no laboratório da Universidade do Colorado.
- A secretaria do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, e principalmente as senhoras Eliane e Fábila, pelas inúmeras orientações extremamente necessárias para o desenvolvimento e finalização do estudo e cumprimento de todos os trâmites administrativos.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por me concederem bolsas de estudo em diferentes períodos. E mais especialmente, ao CNPQ, por prover minha bolsa de doutorado sanduíche no exterior.
- Aos queridos colegas do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular, Claudinha, Jean, Raquel, Teca, Camilinha, Érica, Tatiana, Jansen, Renatinha, Marina, Dani Bastos, Juliana Rodrigues, Dra. Dani Bruna, e todos outros edisonianos, obrigado amigos!
- Aos meus avós, Antenor e Lúcia (*in memoriam*) por todo cuidado e ajuda dado a mim em minha vida.
- Aos meus pais Vera e Luiz, irmãos Marcelo e Mariana, e a toda minha família, pelo amor, compreensão, força e apoio despendida a minha pessoa durante toda minha vida.
- A minha cara metade, Angélica, que encontrei no início de meu doutorado. Obrigado pelo amor, carinho, cuidados, incentivos, direcionamento, e razão de ser. Você é minha luz, minha morada, minha vida. Te amo!

E finalmente a Deus, por todo força, sorte, e por ter permitido que eu encontrasse todas as pessoas citadas acima, cada uma com sua importância singular para a realização deste sonho! Obrigado!!!!

“Facts are never completely independent of each other...every fact reacts upon many others. Every change and every discovery has an effect on a terrain that is virtually limitless. It is characteristic of advanced knowledge, matured into a coherent system, that each new fact harmoniously – though ever so slightly – changes all earlier facts. Here every discovery is actually a recreation of the whole world as construed by a thought collective. “

Ludwik Fleck

RESUMO

Góes LGB. Caracterização Molecular de Coronavírus Humano – HCoV, circulantes no município de São Paulo, São Paulo, Brasil. [Tese (Doutorado em Biotecnologia)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

As infecções respiratórias agudas (IRA) são as doenças infecciosas mais frequentes em seres humanos e os vírus respiratórios são os agentes de maior ocorrência na etiologia das mesmas. Os 4 genótipos de coronavírus humanos (HCoVs 229E, OC43, NL63 e HKU1) são reconhecidos como causa comum de infecções do trato respiratório superior e, menos comumente, do trato respiratório inferior, sendo o segundo agente mais frequente da síndrome do resfriado comum e podendo representar até 1/3 destes casos no mundo. Dados da ocorrência do HCoV no Brasil são escassos, apesar da alta ocorrência de infecções respiratórias durante o outono e inverno. Além disso, considerável porcentagem de casos de IRA não tem o agente causal identificado, tampouco incluem a detecção de coronavírus. O presente estudo teve por objetivo avaliar a ocorrência de HCoV em crianças acometidas por IRA atendidas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (USP) localizado no município de São Paulo, entre o período de 1995 a 2008. Para tanto amostras de cDNA (DNA complementar) oriundos da reação de RT-PCR com RNA total isolado de lavados nasofaríngeos foram analisados por ensaio de PCR em Tempo Real (Real Time PCR) para detecção dos 4 tipos de coronavírus. Amostras positivas foram utilizadas em ensaio de PCR convencional e posteriormente genotipadas por sequenciamento. Amostras negativas pelo método de PCR convencional foram tipificadas através de PCR Real Time e Nested PCR específico para cada genótipo de HCoV. Como atividade adicional, foi realizado o cultivo do HCoV-HKU1 de amostras positivas em cultura de células primárias para subtipagem. Das 4305 amostras analisadas, 401 amostras foram positivas por PCR Real Time (9,3%). Duzentos e noventa e seis amostras tiveram coronavírus genotipado, sendo o tipo OC43 o de maior ocorrência (N=135), seguido pelos tipos recentemente descobertos, NL63 (N=93); HKU1 (N=71) e 229E (N=16). Foi verificada a presença de uma sazonalidade anual, com diferentes tipos e frequência de coronavírus alternando-se a cada ano. Coronavírus HKU1 e NL63 foram detectados em amostras coletadas em períodos anteriores a sua primeira identificação, demonstrando que ambos já circulavam no Brasil anteriormente a sua descoberta. O presente estudo representa a 1^o análise mundial da circulação dos 4 genótipos de HCoV em uma amostragem coletada em um período consecutivo maior do que 4 anos, o primeiro relato de cultivo de cepas de HCoV-HKU1 não americanas e europeias, o primeiro cultivo do

subgenótipo HKU1-B, e a primeira análise da sequência completa do gene Spike de cepas de HCoV-HKU1 Sul Americanas.

Palavras-chave: Coronavírus Humano. Infecções Respiratórias. PCR em Tempo Real. Vírus respiratório.

ABSTRACT

Góes LGB. Molecular Characterization of Human Coronavirus - HCoV, circulating in São Paulo, São Paulo, Brazil. [PhD thesis (PhD in Biotechnology)] Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 2012.

Acute respiratory infections (ARI) are the most common infectious diseases in humans and respiratory viruses are the most frequent agents in the etiology of the same. The human coronaviruses (HCoVs) are recognized as a common cause of upper respiratory tract infections and, less commonly, lower respiratory tract, being the second most frequent cause of common cold syndrome and may represent up to one third of these cases in the world. Data from the occurrence of HCoV in the Brazilian population are scarce, despite the high incidence of respiratory infections each year. In addition, a considerable percentage of ARI cases in Brazil didn't have the causative agent identified and without the inclusion of detection assays for coronaviruses. This study aims to evaluate the occurrence of HCoV in children affected by acute respiratory infections treated at University Hospital of São Paulo (USP) located in São Paulo, between the period 1995 to 2008, representing an retrospective 14 years period analysis. Samples of cDNA were screened by Real Time PCR for detection of the four types of coronavirus simultaneously. Positive samples were used in standard PCR assay and subsequently typed by sequencing. Samples positive by Real Time but negative by standard PCR assay were genotyped by genotype specific Nested PCR and Real-Time. As additional activities, HKU1 virus was cultivated in primary cells line for subtype identification. Four hundred and one (N=401) from four thousand three hundred and five (N=4305) samples included in our study were positive by Real Time PCR assay, present in 9.3% of samples. Two hundred and ninety six (296) coronavirus detected were genotyped. The HCoV-OC43 was the most frequent (N = 135), followed by the recently discovered types, NL63 (N = 93); HKU1 (N = 71) and HCoV-229E (N = 16). The presence of an annual seasonality with different genotypes of coronavirus every year was observed, but all types of coronavirus were detected simultaneously in six years among the 14 years studied. Coronavirus NL63 and HKU1 were detected in samples collected in periods prior to their first identification, showing that both have been circulating in Brazil before its discovery. This study represents the first analysis of the circulation of the 4 types of human coronavirus in a consecutive period longer than 2 years in Brazil and 4 years in the world, the first cultivation of HKU1 isolate from outside Europe and USA, the first cultivation of isolates from HKU1 subtype B and the first analysis of the spike sequence from South American HKU1 isolate.

Key-words: Coronavirus. Respiratory Infection. Real Time PCR. Respiratory viruses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 _Organograma da taxonomia da ordem Nidovirales.....	26
Figura 2 _Análise filogenética do gene da RNA Polimerase Dependente de RNA (RpRd) de coronavírus com sequências completas disponíveis no banco de genes (GenBank).....	27
Figura 3 _Morfologia de partículas virais de coronavírus.....	29
Figura 4 _Representação da estrutura do envelope de coronavírus com a disposição das proteínas Spike, E e M.....	31
Figura 5 _Estrutura genômica HCoV.....	32
Figura 6 _Representação da replicação de coronavírus.....	34
Figura 7 _Representação dos modelos de transcrição de coronavírus.....	36
Figura 8 _Fluxograma geral dos métodos de detecção e tipificação viral do presente estudo.	70
Figura 9 _Fluxograma geral do cultivo de cepas brasileiras de HKU1.....	72
Figura 10 _Metodologia de cultivo de células HTBE em insertos de colágeno.....	75
Figura 11 _Gel de agarose da PCR de padronização.....	81
Figura 12 _Gel agarose da PCR Pancoronavírus em de amostras de 1995.....	81
Figura 13 _Geis de agarose da Nested PCR de amostras de 1995.....	82
Figura 14 _Árvore filogenética de sequências de amostras de 1995 positivas para coronavírus.....	83
Figura 15 _Resultado do ensaios de PCR Real Time com uso de RNA.....	84
Figura 16 _Resultado do ensaio de PCR Real Time com uso de cDNA.....	85
Figura 17 _Gel agarose do resultado do ensaio de PCR específico para HCoV-229E.....	85
Figura 18 _Gel de agarose do resultado da PCR Pancoronavírus.....	86
Figura 19 _Resultado do ensaio de PCR Real Time e PCR convencional de cDNA de Coronavírus Bovino.....	88
Figura 20 _Resultado da padronização do ensaio de Real Time PCR para amostras clínicas.	89
Figura 21 _Gel de agarose do ensaio de padronização da Nested PCR específica.....	90
Figura 22 _Número de amostras totais e porcentagem anual de amostras positivas para HCoV por Real Time PCR entre o ano de 1995 e 2008.....	92
Figura 23 _Distribuição do número de amostras coletadas e número de amostras positivas durante o período entre 1995 a 2001.....	93
Figura 24 _ Distribuição do número de amostras coletadas e número de amostras positivas durante o período entre 2002 a 2008.....	94

Figura 25 _Distribuição dos valores acumulativos de amostras analisadas e amostras positivas em cada mês.....	96
Figura 26 _Relação da distribuição mensal de todas amostras utilizadas em nosso estudo e amostras positivas para HCoV em relação ao mês.....	98
Figura 27 _Árvore filogenética de algumas sequências para diferentes genótipos de HCoV.....	100
Figura 28 _Gráfico da representação da positividade de cada tipo de coronavírus detectados.....	101
Figura 29 _Gráficos da frequência relativa dos 4 tipos de coronavírus detectados em relação a cada ano de estudo.....	102
Figura 30 _Gráficos da frequência relativa dos 4 tipos de coronavírus detectados em relação a cada ano de estudo.	103
Figura 31 _Número mensal de amostras positivas para os 4 tipos de HCoV entre os anos de 1995 a 2001.	104
Figura 32 _Número mensal de amostras positivas para HCoV entre os anos de 2002 a 2008.....	105
Figura 33 _Distribuição do valor acumulativo mensal de amostras positivas em cada mês	106
Figura 34 _ Distribuição sazonal dos diferentes genótipos de HCoV nas estações anuais entre o ano de 1995 e 2001.....	108
Figura 35 _ Distribuição sazonal dos diferentes genótipos de HCoV nas estações anuais entre o ano de 2002 e 2008.....	109
Figura 36 _Análise da sazonalidade de detecção dos genótipos de coronavírus. Distribuição sazonal do valor acumulativo de detecções dos genótipos de HCoV nas 4 estações anuais..	110
Figura 37 _Frequência relativa de detecção dos genótipos nas diferentes estações.....	110
Figura 38 _ Observação de células HTBE e seu crescimento após 3 dias.....	111
Figura 39 _Observação de células HTBE e seu crescimento após 8h em meio de diferenciação celular.....	111
Figura 40 _ Observação células HTBE em insertos apresentando 100% confluência.....	112
Figura 41 _Resultado do ensaio de imunofluorescência indireta amostras controle HKU1#10.....	114
Figura 42 _Resultado do ensaio de imunofluorescência indireta amostras Br4.....	114
Figura 43 _Resultado do ensaio de imunofluorescência indireta com uso de células HTBE inoculadas com amostras brasileiras.....	115

Figura 44 _Exemplo do resultado da PCR em Real Time da amostra e lavagens da inoculação com Br4.....	116
Figura 45 _Resultado do ensaio de imunofluorescência indireta de células HTBE com lavagem Br10 (passagem seriada).....	118
Figura 46 _Resultado do ensaio de imunofluorescência indireta com uso de células HTBE inoculadas com amostras Br10.....	118
Figura 47 _Gel de agarose dos produtos da reação de PCR convencional do gene Spike.....	120
Figura 48 _Gel de agarose dos produtos da reação de PCR convencional completo do gene Spike.....	121
Figura 49 _Relação filogenética entre as sequências do gene Spike obtidos de isolados brasileiros e sequências de HKU1.....	122

LISTA DE QUADROS

Quadro 1_ Características gerais dos coronavírus contendo descrição dos grupos de coronavírus atuais, hospedeiros, doenças, receptores, via de transmissão e distribuição geográfica..	28
Quadro 2_ Características de cultivo de diferentes coronavírus humanos.....	41
Quadro 3_ Número de amostras utilizadas do banco de amostras do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular – ICB/USP.....	62
Quadro 4_ Características dos oligonucleotídeos e sondas utilizadas no presente estudo.....	68
Quadro 5_ Lista de amostras utilizadas nos experimentos de inoculação viral.....	73
Quadro 6_ Resumo do resultado obtido do ensaio de imunofluorescência.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1_ Detecção de coronavírus pelo ensaio PCR Real Time nas amostras coletadas entre os anos de 1995 a 2008.....	91
Tabela 2_ Descrição do valor acumulativo do número de amostras analisadas e do número de amostras positivas em um mesmo mês de diferentes anos.....	96
Tabela 3_ Comparação do número de amostras analisadas, número de amostras positivas para HCoV e porcentagem de amostras positivas para HCoV, considerando detecção pelo ensaio de PCR Real Time Pancoronavírus.....	97
Tabela 4_ Descrição do número de amostras positivas e resultado quanto a metodologia de tipificação utilizada.....	99
Tabela 5_ Descrição do número total de amostras positivas por ano e seus respectivos tipos de coronavírus.....	102
Tabela 6_ Número de amostras positivas do valor acumulativopara cada tipo viral em meses similares dos 14 anos analisadas.....	106
Tabela 7_ Resumo dos valores Ct obtidos nos ensaios de Real Time PCR.....	116
Tabela 8_ Resumo dos valores Ct obtidos nos ensaios de Real Time PCR.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS

PBS: Tampão fosfato-salino

HCoV: Coronavírus Humano

RT-PCR: PCR por Transcriptase Reversa

PCR: Reação em Cadeia pela Polimerase

qPCR: PCR em Tempo Real

cDNA: DNA complementar

IRA: Infecção Respiratória Aguda

HTBE: Células epiteliais traqueo-bronquio alveolares humana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Classificação de Coronavírus	25
1.2 Morfologia viral e proteínas estruturais.....	29
1.3 Genoma Viral.....	31
1.4 Ciclo de replicação de Coronavírus	32
1.5 Receptores celulares de HCoV	36
1.6 Diagnósticos de Coronavírus Humanos.....	37
1.7 Replicação de Coronavírus Humanos em cultura celular	39
1.8 Histórico de Coronavírus Humanos e Cov-SARS	41
1.9 Doenças respiratórias associadas a Coronavírus Humanos e CoV-SARS	47
1.10 Doenças não respiratórias associadas à Coronavírus Humanos	50
1.11 Tratamento e Prevenção	51
1.12 Epidemiologia de coronavírus humanos	52
1.13 Estudos da ocorrência de HCoV no Brasil.....	57
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Geral	60
2.2 Específicos	60
3 MATERIAS E MÉTODOS.....	61
3.1 Grupo de Estudo e coleta de amostras clínicas.....	62
3.2 Manutenção de células HRT-18G e inoculação de BCoV (Controles positivos)	63
3.3 Extração de RNA total e RT-PCR	65
3.4 Real Time PCR (PCR em Tempo Real)	65
3.5 PCR e Nested PCR	68
3.6 Análise e purificação dos produtos amplificados	70
3.7 Sequenciamento e construção de árvore filogenética	71
3.8 Cultivo de cepas de HCoV-HKU1 e análise de sequencias do gene Spike.....	72
3.8.1 Amostras utilizadas na inoculação e controle positivos.....	73
3.8.2 Manutenção de Células HTBE.....	73
3.8.3 Inoculação viral em células HTBE.....	75
3.8.4 Imunofluorescência Indireta.....	76
3.8.5 Extração de RNA e PCR em Tempo Real.....	77
3.8.6 Sequenciamento do gene "Spike" de isolados de HKU1.....	78

4 RESULTADOS.....	79
4.1 Padronização do ensaio de PCR Convencional Pancoronavírus	80
4.2 Análise da presença de HCoV em amostras de 1995 por PCR Pancoronavírus	81
4.3 Análise específica da presença de HKU-1 em amostras de 1995.....	82
4.4 Padronização do ensaio PCR Real Time Pancoronavírus	83
4.5 Padronização do ensaio de Nested PCR HCoV genótipo-específico.....	89
4.6 Análise da ocorrência de HCoV em amostras clínicas (1995-2008).....	90
4.7 Cultivo do coronavírus HKU1 de amostras brasileiras	111
4.7.1 Descongelamento, manutenção e transferência de células para Insertos.....	111
4.7.2 Inoculação viral em células HTBE e ensaios de Imunofluorescência Indireta e PCR Real Time.....	112
4.7.3 2 ^o inoculação viral em células HTBE e ensaios de Imunofluorescência Indireta e PCR Real Time.....	117
4.7.4 Sequenciamento do gene "Spike" de isolados brasileiros de HCoV- HKU1.....	120
4.8 Resultados Complementares	122
5 DISCUSSÃO.....	125
6 CONCLUSÕES.....	138
REFERÊNCIAS	140
APÊNDICES.....	155
Apêndice 1. Alinhamento de nucleotídeos do fragmento da polimerase do coronavírus humanos OC43 dos anos de 1995 a 2008.....	156
Apêndice 2. Alinhamento de nucleotídeos do fragmento da polimerase do coronavírus humanos NL63 dos anos de 1995 a 2008.....	158
Apêndice 3 . Alinhamento de nucleotídeos do fragmento da polimerase do coronavírus humanos NL63 dos anos de 1995 a 2008.....	160
Apêndice 4. Alinhamento de nucleotídeos do fragmento da polimerase do coronavírus humanos 229E dos anos de 1995 a 2008.....	162
Apêndice 5. Tabelas de amostras que apresentaram 100% de homologia nucleotídica no fragmento estudado, para HCoV HKU1, 229E e NL63.....	163
Apêndice 5b. Tabela de amostras que apresentaram 100% de homologia nucleotídica no fragmento estudado, para HCoV OC43	164

Apêndice 6. Tabela de estudos moleculares quanto à ocorrência de coronavírus humanos	
HCoV.....	165
ANEXOS.....	173
Anexo 1_Artigo publicado em periódico.....	174

1 INTRODUÇÃO

As infecções respiratórias agudas (IRA) são as doenças infecciosas mais frequentes em seres humanos e a principal causa mundial de morbidade relacionada a doenças infecciosas, hospitalizações e mortalidade entre crianças, particularmente em países em desenvolvimento e crianças menores do que 5 anos (Williams et al., 2002). De maneira geral, a definição de IRA inclui todas as infecções do trato respiratório.

Infecções do trato respiratório representam a causa da maioria das doenças mundiais, ultrapassando a infecção por HIV, malária, câncer ou doença do coração. A organização mundial da saúde (WHO - World Health Organization) estima que as infecções respiratórias são a causa líder da morte em países de baixo desenvolvimento (Dominguez et al., 2012; WHO 2008), sendo os vírus respiratórios os agentes de maior ocorrência na etiologia das mesmas (McIntosh et al., 1993).

Durante o período de 2000 a 2003 foi estimado que, por ano, morreram 10.6 milhões de crianças menores de 5 anos (Bryce et al., 2005), sendo as IRAs responsáveis por 19% destas mortes, aproximadamente 2 milhões de óbitos (Williams et al., 2002). A maioria destas mortes foi ocasionada por bronquite e pneumonia, geralmente causada ou desencadeada por vírus (Hart e Cuevas, 2007). Estudos conduzidos na cidade de São Paulo em 1996 revelaram que 27,7% das crianças hospitalizadas dentro desta faixa etária, apresentavam infecções respiratórias agudas (Caetano et al., 2002).

Os agentes virais apresentam uma distribuição universal e podem causar diversas síndromes respiratórias clínicas. O vírus de RNA são os agentes etiológicos mais frequente do quadro de resfriado comum, usualmente doença auto-limitante do trato respiratório superior, ou infecção da via áreas superior (IVAS) (Heikkinen e Järvinen, 2003), e são também uma causa comum de infecção do trato respiratório inferior e incluem doenças como bronquiolite, laringotraqueobronquite e pneumonia (Arden et al., 2005).

No Brasil, estudos realizados em diferentes regiões do país indicam a importância de vírus como agentes etiológicos de IRA. Nestes estudos foram detectados diferentes vírus respiratórios como vírus respiratório sincicial, vírus da influenza tipos A e B, vírus parainfluenza, adenovírus, rinovírus humano, metapneumovírus e bocavírus (Arruda et al., 1991; Campos et al., 2007; Costa et al., 2006; Oliveira, 2007, 2009; Pilger et al., 2011; Thomazelli et al., 2007; Tsuchiya et al., 2005; Vieira et al., 2001). Mesmo não incluindo a análise para a presença de outros vírus potenciais, como coronavírus humano (HCoV), a porcentagem de casos de IRA de crianças positivos para algum tipo de vírus respiratório variou entre 28,75 e 75%, ainda permanecendo um razoável número de etiologias sem agente respiratório identificado.

A utilização de técnicas de biologia molecular tem permitido a obtenção de um melhor entendimento do impacto de vírus respiratórios bem como contribuído para melhorar o entendimento da sintomatologia clínica em crianças hospitalizadas com sintomas de IRA, limitando o uso desnecessário de antibióticos, além de possibilitar um possível isolamento e evitar a disseminação viral em ambiente hospitalar (Hart e Cuevas et al., 2007; Vallet et al., 2004).

Apesar dos avanços recentes em metodologias moleculares de detecção, como os ensaios de RT-PCR (Reação da transcriptase reversa seguida de reação em Cadeia pela Polimerase) ou PCR Real Time (PCR em Tempo Real), e a possibilidade de detecção de um grande número de patógenos virais simultaneamente, uma razoável proporção de amostras oriundas de pacientes com quadros de doença respiratória não tem o agente etiológico identificado, podendo atingir até 70% das amostras analisadas, sugerindo que patógenos respiratórios não incluídos nos estudos, ou mesmo, ainda não identificados possam ser os agentes etiológicos responsáveis (Arden et al., 2005; Sloots et al., 2008). De fato, na última década, 8 novos patógenos virais respiratórios foram identificados, entre eles o Bocavírus, Metapneumovírus, novos Rinovírus, poliomavírus e 3 novos coronavírus (Dominguez et al., 2012; Drosten et al., 2003; van der Hoek et al., 2004; Woo et al., 2005).

Mesmo com o número crescente de estudos investigativos nacionais da etiologia viral de IRA e da análise de diferentes vírus respiratório, em um número considerável de casos, não foi possível a identificação do agente etiológico (Costa et al., 2006; Tsuchiya et al., 2005; Vieira et al., 2001). A não identificação do agente etiológico pode ser consequência da baixa sensibilidade do método diagnóstico empregado, da inviabilidade da análise de todos os patógenos potencialmente responsáveis, ou pela ausência de identificação anterior do patógeno. Segundo Baker et al. (2004), pelo menos 20% das infecções de trato respiratório são de origem desconhecidas e os HCoV, ou mesmo os HCoVs ainda não identificados, podem ser responsáveis por uma significativa porcentagem destas infecções. Deste modo, a realização de estudos adicionais buscando identificar patógenos respiratórios não conhecidos, ou mesmo, apenas recentemente descritos, como coronavírus NL63 e HKU1, devem ser realizadas para melhor entendimento da etiologia dos casos de IRA.

Os coronavírus humanos (HCoVs) são reconhecidos como causa comum de infecções do trato respiratório superior e, em menor proporção, no trato inferior, sendo o segundo agente mais freqüente da síndrome do resfriado comum, podendo representar até 30% destes casos em períodos epidêmicos (Hemming, 1994; Holmes, 2001; Makela et al., 1998; van de Pol et al., 2006). Desta maneira, HCoVs podem ser responsáveis por uma porcentagem

considerada das infecções respiratórias sem agente etiológico identificados em estudos anteriores cujos ensaios moleculares não englobavam a detecção dos diferentes genótipos de coronavírus humano.

Da década de 1960 até 2003, apenas 2 tipos de HCoV eram conhecidos: HCoV-229E e HCoV-OC43. Atualmente, foram acrescentados 3 novos tipos de coronavírus capazes de infectar o homem: o coronavírus associado à Síndrome Respiratória Aguda Grave (CoV-SARS), o HCoV-NL63 e o HCoV-HKU-1, todos responsáveis por causar infecções do trato respiratório.

Os genótipos HCoV-229E e OC43 são conhecidos por causar apenas resfriados comuns, sendo responsáveis aproximadamente por 1/3 destes casos. Apenas ocasionalmente estes vírus podem ser responsáveis por infecções severas do trato respiratório inferior, geralmente em crianças e indivíduos imunocomprometidos (Larson et al., 1980; Baker, 2004; McIntosh, 2005). No entanto, apesar das infecções por estes tipos de coronavírus humano serem geralmente brandas, os coronavírus HKU-1 e NL-63, estão associados com infecções mais severas dos tratos respiratórios superiores e inferiores, como laringotraqueite, bronquiolite e pneumonia, especialmente em neonatais, crianças, indivíduos idosos e pacientes imunocomprometidos (Chiu et al., 2005; Kaye et al., 2006; van de Hoek et al., 2006; Vijgen et al., 2005).

O vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS ou SRAG), identificada em março de 2003, foi responsável por uma epidemia grave e considerada o evento mais significativo na virologia médica desde o surgimento, na década de 1980, do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (Mahony e Richardson, 2005). A SARS é classificada como uma doença emergente altamente fatal. Apesar da vasta preocupação internacional, no Brasil foram reportados apenas 3 casos, sendo 3 deles descartados (Organização Panamericana de Saúde “do inglês PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION” - PAHO, 2003). A epidemia de SARS renovou o interesse por coronavírus, estimulando o interesse por esta família, levando a descoberta dos novos tipos de coronavírus em humanos NL63 e HKU1.

O vírus HCoV-NL63 foi inicialmente detectado em 2004 (van der Hoek et al., 2004, 2006) em uma criança alemã, sendo atualmente reconhecido como um vírus de ampla disseminação, causando infecções mais comumente nos meses de inverno em vários países de clima temperado. Dependendo da população, bem como da exclusão de infecções geradas por outros vírus respiratórios, pode ser responsável por 2 a 9% dos casos de IRA, em crianças e adultos, associadas aos resfriados, às bronquites e pneumonias. Este vírus apresenta

distribuição mundial, sendo detectado em diferentes países da Europa como Holanda, Bélgica, Suíça, Alemanha e França, assim como no Canadá, Austrália, Japão, Hong Kong, África do Sul e recentemente Brasil (Albuquerque et al., 2009; Hayden, 2006; Lambert et al., 2007; Smuts et al., 2008; Vabret et al., 2008; van der Hoek et al., 2006).

O vírus HCoV-HKU1 foi identificado em 2005 em adultos com pneumonia e, posteriormente, em crianças com infecção do trato respiratório inferior (Sloots et al., 2006; Vabret et al., 2008; Woo et al., 2005). Este vírus vem sendo reportado principalmente em crianças apresentando doença do trato respiratório e já foi detectado em vários países, tais como China (Lau et al., 2006), Estados Unidos da América (Esper et al., 2006), França (Vabret et al., 2008) e Brasil (Albuquerque et al., 2009), apresentando incidência variável entre 0 a 4,4% em indivíduos com infecções respiratórias (Woo et al., 2009).

Apesar dos diferentes tipos de HCoVs terem sido identificados em diferentes continentes, existem poucos dados comparando a ocorrência e importância clínica dos diferentes HCoVs e o impacto pediátrico de cada um deve ser melhor estabelecido (Esposito et al., 2006).

1.1 Classificação de Coronavírus

Os coronavírus estão classificados na ordem *Nidovirales* e família *Coronaviridae*, que compreende os gêneros *Coronavirus* e *Torovirus*. Apesar de consideráveis diferenças na complexidade genética e arquitetura viral, vírus da família Coronaviridae, Arteriviridae e Roniviridae são caracterizadas pela replicação viral que envolve a produção de múltiplos RNA mensageiros (mRNAs) subgenômicos nested com terminação 3' similar. A denominação da Ordem Nidovirales é originada da palavra “Nested” do latim “Nidus”. A família Arteriviridae incluem patógenos de murinos, equinos e suínos, porém não são conhecidos patógenos humanos, enquanto que os vírus da família Roniviridae incluem patógenos de invertebrados como crustáceos (Lai et al., 2007; Zhong et al., 2012). O organograma da taxonomia da ordem Nidovirales é apresentada na figura 1. Similaridades na sequência gênica entre membros da ordem Nidovirales, apesar de restrita ao gene da polimerase, responsável pela geração de proteínas do complexo da replicase, sugerem que vírus desta ordem evoluíram de um ancestral comum (de Vries et al., 1997). A sub-família coronavirinae se diferencia da sub-família torovirinae pela morfologia viral e tamanho do genoma.

Figura 1_Organograma da taxonomia da ordem Nidovirales

Estão descritos na figura os vírus: HCoV-229E, Coronavírus humano 229E; HCoV-NL63, Coronavírus humano NL63; PEDV, Vírus da diarreia epidêmica de suínos; FIPV, Vírus da Peritonite Felina Infecciosa; HCoV-OC43, Coronavírus humano OC43; BCoV, Coronavírus Bovino; HCoV-HKU1, Coronavírus humano HKU1; MHV, Vírus da hepatite de Murinos; SARS-CoV, coronavirus relacionado com a SARS; IBV, Vírus da bronquite infecciosa; TCoV, Coronavírus de Peru; BWCoV-SW1, Coronavírus de Baleia Beluga; MunCoV HKU13, Coronavírus HKU13 de munia (Lonchura). Fonte: Woo et al., 2010.

Coronavírus são capazes de infectar humanos e uma grande variedade de hospedeiros, incluindo outros mamíferos (ex: camundongos, ratos, suínos, cães, felinos, coelhos, equinos, bovinos, cetáceos e morcegos) e aves (ex: galinhas, perus e faisões), causando uma variedade de doenças respiratórias, entéricas, hepáticas e do sistema nervoso central (Quadro 1). Baseado na caracterização genotípica e sorológica, os coronavírus são divididos em 3 gêneros, inicialmente denominados como grupos 1, 2 e 3. Os grupos 1 e 2 compostos por coronavírus de mamíferos, sendo o grupo 3 composto, até recentemente, apenas por coronavírus aviários. Os coronavírus humano 229E e NL63 pertencem ao grupo 1, e coronavírus OC43, HKU-1 e SARS ao grupo 2 (Holmes, 2001; Mahony e Richardson, 2005; van der Hoek et al., 2006; Weis e Navas-Martin, 2005; Woo et al., 2006). Recentemente, o Grupo de Estudo de Coronavírus do Comitê Internacional para Taxonomia Viral (ICTV) propôs a substituição dos 3 grupos tradicionais pelos gêneros Alfacoronavírus (Grupo 1), Betacoronavírus (Grupo 2) e Gamacoronavírus (grupo 3) (Woo et al., 2009). Historicamente, os grupos alfa e betacoronavírus eram encontrados em mamíferos, enquanto que os gammacoronavírus eram encontrados apenas em aves. No entanto, achados recentes também

sugerem a presença de gamacoronavírus em mamíferos (Jonassen et al., 2005; Mihindukulasuriya et al., 2008; Woo et al., 2009) e a presença de um quarto grupo denominado como Deltacoronavírus identificado em aves e porcos (Woo et al., 2012; Woo et al., 2009bc).

Figura 2_ Análise filogenética do gene da RNA Polimerase Dependente de RNA (RpRd) de coronavírus com sequências completas disponíveis no banco de genes (GenBank).

A árvore foi contruída pelo método de "neighbor-joining" com valores de Bootstrap calculados em 1000 árvores, sendo incluídas 1118 posições de aminoácidos. A barra de escala indica o número estimado de substituições a cada 20 aminoácidos. Estão descritos na figura os vírus: TGEV, gastroenteriti viral transmissível de suínos (NC_002306); PRCV, Coronavírus respiratório de suínos (DQ_811787); FCoV, Coronavírus de Felinos (NC_012937); HCoV-229E, Coronavírus humano 229E (NC_002645); HCoV-NL63, Coronavírus humano NL63 (NC_005831); PEDV, Vírus da diarreia epidêmica de suínos (NC_003436); Sc-BatCoV 512, Coronavírus 512 de morcego Scotophilus (NC_009657); Rh-BatCoV-HKU2, Coronavírus de morcego Rhinolophus HKU2 (NC_009988); Coronavírus HKU-8 de morcego Miniopterus (NC_010438); Mi-BatCoV 1A, Coronavírus 1A de morcego Miniopterus (NC_010437); Coronavírus 1B de morcego Miniopterus (NC_010436); HCoV-OC43, Coronavírus humano OC43 (NC_005147); BCoV, Coronavírus Bovino (NC_003045); PHEV, Vírus da encefalomielite hemaglutinante de suínos (NC_007732); HCoV-HKU1, Coronavírus humano HKU1 (NC_006577); MHV, Vírus da hepatite de Murinos (NC_006852); ECoV, equine coronavirus (NC_010327); SARSr-CoV, human SARS related coronavirus (NC_004718); SARSr-Rh-BatCoV HKU3, Coronavírus HKU3 relacionado a SARS de morcego Rhinolophus (NC_009694); Ty-BatCoV-HKU4, Coronavírus HKU4 de morcego Tylonycteris (NC_009019); Pi-BatCoV-HKU5, Coronavírus HKU5 de morcego Pipistrellus (NC_009020); Ro-BatCoV-HKU9, Coronavírus HKU9 de morcego Rousettus (NC_009021); IBV, Vírus da bronquite infecciosa (NC_001451); TCoV, Coronavírus de Perus (NC_010800); SW1, Coronavírus de Baleia Beluga (NC_010646); BuCoV HKU11, Coronavírus HKU11 de bulbul (FJ376620); ThCoV HKU12, Coronavírus HKU12 de Tordos (NC_011549); MunCoV HKU13, Coronavírus HKU13 de munia (Lonchura) (NC_011550). Fonte: Woo et al., 2010.

Quadro 1_Características gerais dos coronavírus contendo descrição dos grupos de coronavírus atuais, hospedeiros, doenças, receptores, via de transmissão e distribuição geográfica.

Gênero de Coronavírus	Vírus	Hospedeiro	Tropismo tecidual	Receptor celular	Doença(s) associadas	Via de transmissão	Distribuição geográfica
Alfacoronavírus	HCoV-229E	Humano	Trato respiratório	APN	Infecção respiratória branda (resfriado comum)	Aerosol	Mundial
Alfacoronavírus	HCoV-NL63	Humano	Trato respiratório	ACE2	Infecção respiratória branda, croup	Aerosol	Mundial
Alfacoronavírus	TGEV	Suínos domésticos e selvagens	Epitélio do Trato respiratório e entérico	APN	Infecção respiratória e entérica	Fecal-Oral	Mundial
Alfacoronavírus	FIPV	Felinos domésticos e selvagens	Peritoneo, fígado, órgãos linfóides	APN	Peritonite infecciosa felina	Fecal-Oral	Mundial
Alfacoronavírus	BatCoV	Morcegos	?	?	?	?	Mundial
Alfacoronavírus	PEDV	Suíno	Epitélio entérico e respiratório	?	Infecção respiratória e entérica	?	Europa, Ásia
Betacoronavírus	HCoV-OC43	Humano	Trato respiratório superior	9-O- ácido siálico acetilado	Infecção respiratória	Aerosol	Mundial
Betacoronavírus	HCoV-HKU1	Humano	Trato respiratório superior e inferior	?	Infecção respiratória	Aerosol	Mundial
Betacoronavirus	BCoV	Bovinos	Intestino	9-O- ácido siálico acetilado	Infecção entérica	Fecal-Oral	Mundial
Betacoronavirus	MHV	Camundongos	Intestino, fígado, Sistema Nervoso Central	CEACAM	Infecção entérica e neurológica, hepatite	Fecal-Oral	Cobaías de laboratório
Betacoronavirus	SARS	Humano	Trato respiratório	ACE2	Síndrome respiratória aguda grave	Aerosol	Mundial
Betacoronavirus	BatCoV	Morcegos	?	?	?	?	Mundial
Gamacoronavírus	IBV	Galinhas	Epitélio respiratório, Rim	?	Infecção respiratória, hepatite	Aerosol	Mundial
Gamacoronavírus	TCoV	Perus	Jejuno, duodeno, íleo	?	Infecção respiratória e entérica	Fecal-Oral	EUA
Gamacoronavírus	BWCoV-SW1	Baleia Beluga	Fígado ?	?	Infecção respiratória e hepática?	?	Animal em cativeiro
Deltacoronavírus	ALCCoV	Leopardo asiático e Ferret chinês	?	?	?	Fecal-Oral ?	?
Deltacoronavírus	MuCoV	Munia (Passeriforme)	?	?	?	?	?

Na figura estão descritos os vírus: HCoV-229E, Coronavírus humano 229E; HCoV-NL63, Coronavírus humano NL63; PEDV, Vírus da diarreia epidêmica de suínos; FIPV, Vírus da Peritonite Felina Infecciosa; Bat-CoV, Coronavírus de Morcego; HCoV-OC43, Coronavírus humano OC43; BCoV, Coronavírus Bovino; HCoV-HKU1, Coronavírus humano HKU1; MHV, Vírus da hepatite de Murinos; SARS-CoV, coronavirus relacionado com a SARS; IBV, Vírus da bronquite infecciosa; TCoV, Coronavírus de Perus; BWCoV-SW1, Coronavírus de Baleia Beluga; ALCCoV, Coronavírus de leopardo; MuCoV HKU13, Coronavírus HKU13 de munia (Lonchura). Fonte: Lai et al., 2007 Modificado; Góes et al., 2012.

A grande variabilidade de hospedeiros e tropismo tecidual da família *Coronaviridae* pode ser decorrente da alta taxa de recombinação consequente do mecanismo único de sua replicação (Lai e Cavanagh 1997; Woo et al., 2012). A taxa de recombinação elevada somado

a alta frequência de mutações, e o tamanho do genoma, maior genoma entre os vírus de RNA, promove a esta família viral plasticidade extra, e juntos podem ser responsáveis pela capacidade de adaptação em novos hospedeiros e nichos ecológicos (Woo et al., 2006; Woo et al., 2009b). A antigenicidade, características clínicas e severidade da doença também podem ser afetados por mutações que causam substituições, deleções ou inserções de aminoácidos, e eventos de recombinação entre genomas durante co-infecções (Dominguez et al., 2012).

1.2 Morfologia viral e proteínas estruturais

A morfologia de coronavírus é predominantemente esférica, com aproximadamente 100 a 160 nm de diâmetro, todavia são bastante pleomórficos devido à presença de envelope, que é constituído por dupla camada de lipídeos e proteínas estruturais. A denominação da família *Coronaviridae* tem origem na presença de projeções, ou espículas, que emergem do envelope e dão à partícula viral um aspecto sugestivo de coroa (latim: *corona* = coroa) (Figura 3). As principais propriedades ligadas à infectividade, virulência e variabilidade estão associadas às proteínas de envelope (Weis e Navas-Martin, 2005).

Figura 3_Morfologia de partículas virais de coronavírus

(A) Microscopia por coloração negativa de partículas de coronavírus HCoV-OC43 (amplificação 90.000x), setas pretas indicam as proteínas S (“Spike”). (B) Representação das proteínas estruturais componentes da partícula viral de coronavírus. São representadas as glicoproteínas S (Spike); HE (hemaglutinina –esterase); M (glicoproteína da membrana); e a proteína E (envelope). No núcleo observa-se a proteína N (nucleocapsídeo) unida ao RNA simples fita (complexo RNA-proteína do nucleocapsídeo)

FONTE: Norkin, 2010 (A); Holmes, 2003 (B).

As espículas do vírions de coronavírus são oligômeros da glicoproteína S com aproximadamente 180-200 kDa. Estas proteínas são responsáveis pela ligação viral ao receptor celular e podem induzir a fusão do envelope viral com a membrana celular, sendo importantes para a penetração viral em sua célula hospedeira. Esta proteína pode ser dividida em 3 domínios estruturais entre a região N-terminal e C-terminal. O domínio externo é subdividido em 2 subdomínios (S1 e S2), seguido de um domínio transmembrânico e um pequeno fragmento citoplasmático C-terminal. O subdomínio S1 inclui metade da região N-terminal, e formam uma porção globular da espícula que contem as sequências responsáveis para ligação com receptores específicos de células permissivas (Lai et al., 2007). A presença de mutações nestas sequências de S1 vem sendo associadas com alteração da antigenicidade e da patogenicidade viral (Lai et al., 2007). Os receptores celulares são reconhecidos pelas proteínas Spike. A ocorrência de mutações ou incorporação de sequências externas no gene Spike, possivelmente tem forte influencia em acontecimentos de cruzamento da barreira intra- e inter-espécie. Além disso, estas alterações podem possibilitar também o desenvolvimento de interações adicionais com o receptor hospedeiro (Chan et al., 2009).

A glicoproteína HE, presente apenas em alguns coronavírus do grupo Betacoronavírus, apesar de aparentemente não essencial, pode atuar aumentando a virulência viral influenciando na adsorção, inserção ou liberação de vírions na membrana celular. Esta proteína apresenta 30% de homologia de aminoácidos com a proteína do vírus influenza C indicando uma possível recombinação de coronavírus ancestral com mRNA do vírus influenza C (Lai et al., 2007).

A glicoproteína M apresenta apenas um pequeno fragmento do domínio Amino-terminal exposta na parte externa dos vírions, estando presente principalmente no interior da partícula viral. Esta proteína tem participação no arranjo da partícula viral, interage com as proteínas S e N, e pode estar associada a determinação do sítio intracelular de ligação do vírus ao complexo de golgi. A proteína do Envelope (E) é a menor proteína do Envelope viral e também tem função relacionada ao início da formação da partícula viral (Lai et al., 2007).

A proteína estrutural N é uma fosfoproteína de 50-60 kDa e apresenta forte ligação com o RNA genômico viral, compondo o nucleocapsídeo através do envolvimento do RNA viral simples fita. A proteína N também interage com a proteína M, conduzindo a incorporação do nucleocapsídeo nas partículas virais, e pode facilitar a formação de complexos replicativos de RNA, uma vez que sua inibição por anticorpos pode influenciar negativamente a reação *in vitro* da RNA polimerase (Lai et al., 2007).

Figura 4 Representação da estrutura do envelope de coronavírus com a disposição das proteínas Spike, E e M.

Legenda: S1 e S2: Proteína Spike; HR1 e HR2: motivos relacionados a fusão com a membrana celular; E: Proteína E; M: Proteína M.

FONTE: Baker, 2004. Modificado

1.3 Genoma Viral

O genoma de coronavírus é composto por RNA de fita simples (ssRNA), não segmentado, policistrônico e de polaridade positiva. Trata-se do maior genoma conhecido entre os vírus de ssRNA, contendo de 27 a 31,5 kpb; apresenta proteção CAP e cauda poliA, ocorrendo na expressão a produção de um grupo “nested” interno de RNAs subgenômico com seqüências 5’ e 3’ comuns, forma de expressão que caracteriza a ordem *Nidovirales*.

Todos os coronavírus apresentam uma organização genômica similar (Figura 2) onde 2/3 da posição 5’ do genoma contem 2 grandes ORFs (“open reading frames”) denominadas de ORF1a e ORF1b, codificadoras de proteínas não estruturais necessárias para a replicação do RNA contendo, por exemplo, a enzima RNA polimerase RNA dependente (RpRd). No restante 1/3 do genoma da posição 3’ são encontrados os genes codificadores de 4 proteínas: “Spike” (S), do envelope (E), membrana (M) e do nucleocapsídeo (N). O gene de hemaglutinina esterase (HE), característico de alguns Betacoronavírus, localiza-se logo após o gene S e não está presente em Alfacoronavírus (ex: HCoV -NL63, 229E) e Gammacoronavírus (Brian e Baric, 2005; van der Hoek et al., 2006; Weiss e Navas-Martin, 2005). Localizados entre as proteínas estruturais são observados genes codificadores de proteínas específicas e acessórias. As proteínas geradas pelos genes acessórios variam em suas propriedades, número e ordem entre os diferentes grupos de coronavírus, no entanto são

geralmente conservados entre os grupos e aparentemente não essenciais para replicação em cultura celular (Holmes, 1999; Yount et al., 2005).

Anteriormente a cada ORF do genoma existem espaços intergênicos contendo sequências reguladoras denominadas sequências regulatórias da transcrição (TRS). As TRS estão presentes na porção 3' da sequência "leader", anteriormente a ORF 1ª, e na porção 5' de cada um das "ORFs". As TRSs são compostas por uma sequência específica de 6 a 10 nucleotídeos, são conservadas entre coronavírus de mesmo grupo e tem participação no controle da transcrição de cada gene viral (Sawicki et al., 2007)

Figura 5_Estrutura genômica

A) ORFs das principais proteínas representadas em verde claro. B) A poliproteína 1ab pode ser transcrito apenas como a ORF 1a, gerando 11 proteínas não estruturais (nsp 1-16) após processamento autoproteolíticos, representado em azul claro, ou 1ab, gerando 16 proteínas não estruturais, incluindo RNA polimerase RNA dependente (RdRp), proteases (PL1 e PL2) e Helicase (HEL). Este genoma não apresenta o gene HE. Setas indicam sequência TRS.

FONTE: Guan et al., 2003 modificado; Sawiki et al., 2007 modificado.

1.4 Ciclo de replicação de Coronavírus

Apesar da variedade de tecidos alvo e da variedade de hospedeiros, o tropismo de coronavírus é geralmente específico para células epiteliais do trato respiratório ou gastrointestinal (Wevers e van der Hoek, 2009). A replicação viral ocorre no citoplasma da célula hospedeira (Figura 3). Inicialmente a glicoproteína S da partícula viral interage com receptores celulares, e dependendo do coronavírus, a proteína Spike pode mediar a fusão direta do envelope viral com a membrana celular, ou o vírus pode penetrar a célula via endocitose mediada por receptor e a proteína Spike induz a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, liberando o RNA genômico viral no citoplasma. O genoma viral atua inicialmente como um mRNA e a região 5' do genoma, composta pelas ORFs 1a e 1b da polimerase, são diretamente traduzidas por ribossomos gerando a poliproteína replicase (1ab).

A tradução da ORF 1b é dependente de uma mudança do códon de leitura de “frame” ribossomal, permitindo a tradução de proteínas encontradas em diferente frame de leitura quando comparado ao ORF 1a (Figura 5). As poliproteína pp1a e pp1ab são então processadas por proteases virais (“papain-like e “poliovírus 3C-like) gerando 16 proteínas não estruturais (denominadas nsp1-nsp16) componentes do complexo de replicação (Figura 5).

As 16 proteínas não estruturais se arranjam com membranas gerando vesículas de membranas duplas onde ocorrem a síntese de RNA genômico e a transcrição de mRNA subgenômicos. Estes RNAs condificam todas as proteínas localizadas após a ORF1b e cada RNA subgenômico possui a mesma sequência inicial (“leader”) na porção 5’, composta de 65 a 100 nucleotídeos dependendo do tipo viral. A sequência “Leader” de cada RNAm é similar a sequência “leader” presente exclusivamente no início do RNA genômico. Os mRNAs subgenômicos são estruturas policistônicas, contendo um a todos os ORFs seguintes do gene a ser expresso (exceto para RNA do gene N), porém apenas a primeira ORF do RNA subgenômico localizado após a sequência “leader” é traduzida (Figura 7). Por exemplo, o mRNA subgenômico responsável pela tradução da proteína S, conterá em sua sequência as ORFs dos genes E, M e N, porém apenas a proteína S será traduzida.

Os RNAs subgenômicos são então traduzidos para gerar as proteínas estruturais (S, M, N, E, HE) e proteínas acessórias. O n^0 e a função das proteínas variam entre os diferentes tipos de coronavírus. O RNA genômico replicado forma um complexo com a proteína N formando o nucleocapsídeo com estrutura helicoidal. Proteínas estruturais do vírus são inseridas no Retículo Endoplasmático (ER). O nucleocapsídeo é então inserido no compartimento intermediário entre o complexo de golgi e o retículo endoplasmático (ERGIC) onde ocorre a formação do vírion. As partículas virais são então incorporadas a vesículas antes de seu transporte e liberação da célula por exocitose (Baker, 2009) (Figura 6).

Figura 6 Representação da replicação de coronavírus.

Na figura encontram-se exemplificados: receptor celular (“receptor”), RNA genômico (gRNA); Tradução (“Translation”); vesículas de membranas duplas (“Double-membrane vesicles”); Transcrição (“Transcription”); Replicação do RNA (“RNA replication”), RNAs subgenômicos (sgRNAs); Citoplasma (“cytoplasm”); núcleo (“nucleus”); Nucleocapsídeo (“nucleocapsid”), Retículo Endoplasmático (ER); Complexo intermediário do Retículo Endoplasmático e Complexo de Golgi (ERGIC); Vesícula lisa (“Smooth-walled vesicles”).

FONTE: Baker, 2009.

O mecanismo exato de transcrição dos RNAs mensageiros subgenômicos ainda não foi totalmente desvendado, e atualmente dois modelos da transcrição são hipotetizados na literatura: (i). Síntese de RNA polaridade positiva com uso da sequência “leader”, ou (ii) Transcrição descontínua durante síntese de moléculas de polaridade negativa, sendo a última hipótese mais amplamente aceita (Norkin et al., 2010).

Na primeira hipótese da transcrição, o RNA genômico (polaridade positiva) deve inicialmente servir de molde para geração da molécula de RNA polaridade negativa contendo todo o genoma viral, que é então utilizada para geração dos diferentes mRNAs subgenômicos polaridade positiva através da transcrição inicial da porção 5’ contendo a sequência “leader”. Em seguida, a sequência “leader” e a polimerase se deslocam, sem ocorrer a polimerização durante este deslocamento, para um dos sítios TRS complementar presente a frente de cada ORF, recomeçando a transcrição. O deslocamento e a reinicialização da transcrição após

diferentes sítios TRS do genoma geram as diferentes espécies de RNA subgenômico que são então traduzidos para proteínas. Esta hipótese não explica o porquê da presença de fitas RNA de polaridade negativa subgenômica.

No mecanismo de Transcrição descontínua durante a síntese de molécula de polaridade negativa, o RNA genômico é utilizado como molde para a transcrição descontínua de RNAs subgenômicos de polaridade negativa. Estas moléculas subgenômicas são produzidas quando o complexo da polimerase inicia a transcrição na região 3' final do RNA genômico de polaridade positiva, até atingir a sequência TRS onde 2 eventos diferenciais podem ocorrer: o complexo enzimático pode continuar a polimerização ignorando a sequência TRS ou então pode ocorrer a parada da transcrição seguido de relocação do complexo polimerase-TRS-ORF para a sequência TRS do RNA genômico localizado logo após a região da sequência "Leader", onde ocorre sua incorporação e o término da transcrição. O reposicionamento do RNA recém-transcrito na molécula molde é intermediada pela complementaridade das sequências TRS. A forma de controle ou sinalização para a realização ou não da relocação do complexo enzimático junto a ORF após atingir uma sequência TRS ainda não é conhecida. Por fim, as moléculas subgenômicas de polaridade negativa servem então de molde para a geração de RNAs de polaridade positiva que serão utilizados para a tradução das diferentes proteínas virais (Baker, 2009; Holmes, 1999; Lai et al., 2007; Sawiki et al., 2007) (Figura 3). Segundo Norkin, (2010) é possível ainda que os 2 mecanismos ocorram simultaneamente durante a replicação viral.

Figura 7 Representação dos modelos de transcrição de coronavírus.

A) Genoma do vírus MHV-coronavírus murinho, e modelo de sua replicação. Setas brancas indicam local de seqüências TRS., AHE representa a ausência do gene HE; São exemplificados os 7 mRNAs e seus respectivos ORFs; São exemplificados também as respectivas proteínas de cada RNA subgenômico. B) Modelo transcrição “Leader” RNA polaridade positiva; em laranja a seqüência “Leader”; em verde/amarelo região TRS C) Modelo transcrição descontínua de polaridade negativa. FONTE: Sawiki et al., 2007 e Norkin, 2010 modificado.

1.5 Receptores celulares de HCoV

A penetração viral em células permissivas envolve inicialmente a adsorção (ligação) viral seguido inserção na membrana celular. A interação com receptor de adsorção, apesar de não ser essencial, aumenta a infectividade através do aumento da concentração viral na superfície de células alvo, aumentando a probabilidade de ligação da partícula viral com receptor de ancoragem e subsequente penetração viral (Gruenheid et al., 1993; Ugolini et al., 1999).

Os coronavírus com diferentes hospedeiros e tecido alvo, utilizam diferentes moléculas da superfície celular como receptores (Norkin et al. 2010). Alguns exemplos de receptores são apresentados no quadro 1. Os receptores celulares responsáveis pela ancoragem e penetração de coronavírus não são grupo-específico. O coronavírus humano OC43 e o coronavírus Bovino (BCoV), do grupo Betacoronavírus, utilizam como receptor celular o ácido siálico N-acetil-9-O-acetilneuraminico (Vlasak et al., 1988). No entanto, o vírus da hepatite murina (MHV), também um betacoronavírus, utiliza como receptor principal a molécula de adesão célula-antígeno carcino-embriônico (“carcinoembryonic antigen-cell adhesion molecule”) (CEACAM1), e a molécula de heparan sulfato, que pode funcionar como

receptor principal ou um fator de adsorção, dependendo da cepa viral utilizada (Watanabe et al., 2007).

Alguns alfacoronavírus de diferentes hospedeiros podem utilizar o mesmo receptor celular, como exemplificado pelo reconhecimento da molécula receptora APN (aminopeptidase N) pelos coronavírus HCoV-229E, o coronavírus canino e o coronavírus suíno (Tresnan et al., 1998). Entretanto, o coronavírus humano NL63, também componente do grupo Alfacoronavírus, utilizam a enzima ACE2 (conversos de angiotensina 2) como receptor de penetração viral, mesma molécula utilizada pelo Betacoronavírus CoV-SARS, apesar de diferenças significativas na sequência do gene Spike (identidade < 50%) (Li et al., 2007; Hofmann et al., 2005).

O uso de um mesmo receptor por dois coronavírus diferentes permite, teoricamente, a co-infecção de uma mesma célula por tipos distintos de coronavírus, o que pode promover o surgimento de uma linhagem viral nova através da recombinação entre diferentes vírus (van der Hoek et al., 2006).

1.6 Diagnósticos de Coronavírus Humanos

O diagnóstico clínico para infecções por coronavírus humanos é extremamente dificultada pela similaridade dos sintomas clínicos causados por infecções de diversos outros vírus respiratórios (Abdul-Rasool e Fielding, 2010). Infecções por coronavírus humanos e animais eram inicialmente realizadas por microscopia eletrônica e estudos sorológicos, sendo posteriormente utilizada a detecção de antígenos e ensaios baseados em PCR (Lai et al., 2007). O diagnóstico de coronavírus por cultivo celular é considerado de grande dificuldade, seja pelas baixas quantidades virais obtidas, pela ausência de efeito citopático, ou mesmo pela necessidade de culturas de células primárias.

A detecção de coronavírus humanos por métodos sorológicos, geralmente baseados em ELISA e imunofluorescência, consome muito tempo ou apresentam pequena significância clínica. Além disso, anticorpos monoclonais para diferentes tipos de coronavírus não estão disponíveis para rotina de detecção e ainda são necessários estudos a respeito da reatividade cruzada de alguns anticorpos contra coronavírus humanos (Kahn e McIntosh, 2005; Vallet et al., 2004; Vijgen et al., 2005).

Para superar a dificuldade dos métodos convencionais de diagnóstico de coronavírus humanos, ensaios de biologia molecular com maior sensibilidade para a detecção de coronavírus

humanos como a PCR após ensaio de transcrição reversa (RT-PCR), ensaios de Nested PCR e, recentemente, o ensaio de Real Time-PCR (Canducci et al., 2008; Kuypers et al., 2007; Vijgen et al., 2005) vem sendo aplicado nos estudos quanto a ocorrência de infecções por coronavírus, representando métodos de diagnóstico virológico rápido, específico, sensível e capaz de detectar todos os coronavírus em um ensaio único.

No primeiro relato da comparação da sensibilidade entre métodos sorológicos e moleculares de detecção dos coronavírus humanos 229E e OC43 por RT-PCR, mais especificamente, um ensaio de Nested PCR, este se mostrou mais sensível que as técnicas de cultura celular e ELISA, porém menos do que a combinação de ambos os ensaios (Mynt et al., 1994). Sizun et al. (1998) compararam a detecção de coronavírus 229E e OC43, em modelo de cultura celular, pelos métodos de imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais e RT-PCR, sendo a última mais sensível. Vabret et al. (2001) analisaram a presença dos coronavírus 229E e OC43 por RT-PCR seguido de hibridização (Myint et al., 1994) e detectaram estes coronavírus em 13% das amostras coletadas de pacientes adultos com doença aguda do trato respiratório inferior e crianças com asma.

Stephensen et al. (1999) foram os primeiros a descrever um ensaio de RT-PCR Pancoronavírus capaz de detectar RNA de todos os coronavírus descritos até 1999, em um ensaio único. Este método se baseia na elaboração de oligonucleotídeos consensos com alvo em sequências de alta similaridade, como o gene da polimerase viral, devido a sua estrutura e funcionalidade altamente conservada, tornando este gene também base para estudos filogenéticos.

Este método, além de facilitar a análise da ocorrência destes vírus, em um ensaio único, diminuiu o tempo e o custo do diagnóstico, é também, teoricamente, capaz de ser utilizado para a detecção de coronavírus ainda não identificados. No entanto, o referido método se mostrou ineficaz para a amplificação do coronavírus NL63, descoberto posteriormente. Moes et al. (2005) otimizaram os oligonucleotídeos consensos com base no alinhamento de sequências do prototipo NL63 e outras 13 sequências presentes no banco de dados genéticos (GenBank). Apesar da viabilidade de detecção, os oligonucleotídeos consensos se mostram menos sensíveis quando comparados a ensaios de PCR específico para um tipo viral (Moes et al., 2005).

Apesar da menor sensibilidade, diferentes estudos a respeito da ocorrência de coronaviroses utilizam oligonucleotídeos consensos direcionadas para a região do gene RNA polimerase (pol-1ab) (Canducci et al., 2008; Chiu et al., 2005; Escutenaire et al., 2007; Esper et al., 2005; Moes et al., 2005; Sampath et al., 2005; Stephensen et al., 1999; Van Elden et al., 2004; Vijgen et al., 2005). Esta metodologia foi recentemente adaptado para ensaios de PCR em

Tempo Real, sendo descritos ensaios por Real Time PCR SyberGreen ou sistema Exonuclease 5' (TaqMan assay) (Escutenaire et al., 2007; Kuypers et al., 2007). Estes ensaios utilizam oligonucleotídeos degenerados e/ou uma combinação de oligonucleotídeos específicos, podendo ainda ser uma combinação de ambos, como descrito por Kuypers et al. (2007).

Além da polimerase, outros genes podem ser utilizados como alvos de ensaios moleculares. Diversos relatos da literatura descrevem a detecção de coronavírus utilizando oligos (oligonucleotídeos) complementares a regiões do gene N. Devido a características de replicação dos coronavírus, o gene N é, teoricamente, a sequência gênica presente em maior número durante a infecção viral devido a sua presença em todos os sets de RNA subgenômicos (Fouchier et al., 2004; Koetz et al., 2006; Lu et al., 2006; Vabret et al., 2005), no entanto, nos ensaios moleculares para detecção de CoV-SARS, este gene não apresentou vantagens quanto a sensibilidade de detecção quando comparado com ensaios moleculares para detecção de sequências da polimerase (Poon et al., 2004)

1.7 Replicação de Coronavírus Humanos em cultura celular

O isolamento em cultura de células é considerado o “método padrão-ouro” no diagnóstico laboratorial de infecções virais. Entretanto, particularmente, os HCoV são notoriamente difíceis de serem isolados em cultivo celular, requerendo, na maioria da vezes, linhagens celulares específicas, cultura de órgãos, ou cultura de células primárias (Lai et al., 2001; Pyrc et al., 2010). Relatos da grande dificuldade ou inviabilidade de cultivo dos diferentes tipos de HCoV são descritos pela literatura, mesmo utilizando culturas celulares específicas, utilizadas com sucesso no cultivo de outros coronavírus (Gerna et al., 2006, 2007; Kistler et al., 2007; Vabret et al., 2001). A grande dificuldade de isolamento também é consequência da ausência de efeito citopático, ou mesmo, alteração sutil ou pouco detectável, tal como uma lise extensiva. A literatura também descreve a possibilidade de cultivo viral por apenas nas primeiras passagens in vitro (Gerna et al., 2006; Vabret et al., 2001). Em contraste, os HCoV-SARS crescem bem em cultura celular, produzindo efeito citopático em 2-6 dias em células Vero E6 e em 2-4 dias em células de linhagem renal de Rhesus (Richardson et al., 2004).

Apesar da grande dificuldade, alguns HCoV podem ser replicados em diferentes linhagens celulares imortalizadas (Quadro 1). O HCoV-229E já foi cultivado com sucesso em células MRC-5 e L132 (pulmão embrionário humano) (Esper et al., 2005; Sizun et al., 1998;

Vabret et al., 2001; Vallet et al., 2004; van Elden et al., 2004;). O HCoV-OC43, é considerado cultivável em células HRT-18 (Sizun et al., 1998; Vabret et al., 2001) enquanto que o HCoV-NL-63 já foi cultivado com sucesso relativo em células LLC-MK2 (rim de macaco Rhesus) (Van der Hoek et al., 2004) e células CaCO2 (Herzog et al., 2008). Devido às dificuldades no cultivo de coronavírus, o diagnóstico laboratorial por este método não é viável (Kahn e McIntosh, 2005; Vijgen et al., 2005).

O HCoV-HKU1 por sua vez foi cultivado apenas recentemente em células alveolares de pulmão humano (Pyrce, et al., 2010). Este é o único relato do cultivo deste coronavírus, considerado o mais fastidioso entre os HCoVs. O sucesso no cultivo foi obtido com uso de células humanas epiteliais ciliadas do sistema respiratório (HAE do inglês “Human Airway Epithelial cells”). Anteriormente havia sido tentado sem sucesso, cultivo deste vírus em diferentes linhagens, entre elas a HRT-18 (adenocarcinoma coloretal), MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano), Vero E6 (rim de macaco verde africano), LLC-MK2 (rim de macaco Rhesus), MDCK (rím de cão), RD (rabdomiosarcoma humano), L929 (fibroblasto murino) e CaCO2 (adenocarcinoma coloretal humano) (Pyrce et al., 2007; Woo et al., 2005). Esta dificuldade no isolamento viral de vírus explica particularmente porque estes vírus não foram detectados previamente (Sloots et al., 2006). O sucesso no cultivo do vírus HKU1 também foi obtido no laboratório de Coronavíruses do departamento de Microbiologia da Universidade do Colorado pelo Prof. Dr. Samuel Dominguez, com uso de células epiteliais brônquio-alveolares de pulmão humano (do inglês “Human trachealbronquial epithelial cells” - HTBE) sendo utilizado para realização de estudos a respeito de características biológicas do vírus HKU1 (Comunicação pessoal, Dominguez et al., 2012).

Quadro 2 Características de cultivo de diferentes coronavírus humanos.

Tipo de HCOV	Linhagem celular viável	Efeito citopático (CPE)	Referência
229E	L132, MRC5	L132: ausente MRC5: ausente ou não característico apresentando-se como uma lise extensiva	Esper et al., 2005; van Elden et al 2004; Vallet et al., 2004; Vabret et al., 2001; Sizun et al., 1998
OC43	HRT-18	Ausente	Vabret et al., 2001; Sizun et al., 1998
NL-63	LLC-MK2, Vero E6, Vero B4, CaCo2	LLC-MK2 e Vero: não aparente demorando 7 dias até o aparecimento de CPE pouco visível CaCo2: células arredondadas, destacadas, mortas contendo debris no sobrenadante, efeito forte	Van der Hoek et al., 2006 Herzog et al., 2008
HKU-1	HAE / HTBE	Ausente	Pyrç et al., 2010; Presente estudo

FONTE: Góes LGB, 2012

Modelos de células epiteliais respiratórias diferenciadas em placas, como o sistema utilizado por Pyrc et al. (2010), e aplicadas no presente estudo, fornecem um sistema eficiente para isolamento de vírus de amostras clínicas de diferentes coronavírus incluindo CoV-SARS, HCoV-229E, NL63 e HKU1 (Banach et al., 2009; Pyrc et al., 2010; Sims et al., 2005; Wang et al., 2000). Estes modelos celulares demonstraram ser de grande utilidade também para propagação de isolados de diferentes vírus respiratórios como bocavírus, metapneumovírus, parainfluenzavírus, influenza vírus e RSV (Dijkman et al., 2009; Pyrc et al., 2010).

Tanto o sistema de células HAE utilizado por Pyrc et al no cultivo de coronavírus HKU1, quanto o sistema de células HTBE, são derivados de células do epitélio traqueobronquial, ou brônquio-alveolar, isoladas de tecidos frescos de doadores humanos. Estas culturas celulares imitam a morfologia e fisiologia do epitélio respiratório cartilaginoso humano, e após 6 a 8 semanas de crescimento celular, é estabelecido um epitélio ciliado totalmente diferenciado e simulando o ambiente pulmonar, onde células ciliadas estão em contato basal com uma membrana de colágeno, enquanto que sua superfície apical está exposta ao ar.

1.8 Histórico de Coronavírus Humanos e Cov-SARS

O primeiro coronavírus a ser identificado e isolado foi o vírus da bronquite infecciosa de aves (IBV) em 1936, sendo demonstrada também a primeira relação entre coronavírus e doença respiratória (Beach & Schalm, 1936; Lai et al. 2007; Wevers & van der Hoek et al., 2009). Posteriormente, em 1946, foi descrito o primeiro coronavírus em mamíferos sendo causador de enterites em suínos (coronavírus TGEV ou Vírus da gastroenterite infecciosa) (Doyle & Hutchings, 1946).

A associação de coronavírus com doença respiratória em humanos foi descrito por Tyrrel & Boynoe em 1965, após passagem do vírus denominado B814 em cultura de órgão de traqueia de embriões humanos (“human embryonic traqueal organ cultures”) utilizando-se amostras biológicas do trato respiratório de um adulto com resfriado comum e posterior inoculação intranasal do meio de cultura em voluntários. Os voluntários desenvolveram após a inoculação um quadro de resfriado comum (Tyrell & Bynoe 1965). Apesar da passagem em diferentes culturas celulares, não foi obtido sucesso no isolamento do vírus B814.

Em 1966, Hamre & Procknow (1966) conseguiram crescer vírus com propriedades não usuais, em cultura celular a partir de amostras de estudantes de medicina com resfriado, sendo este agente denominado 229E (Kahn & McIntosh et al., 2005). Ambos os vírus (B814 e 229E) eram sensíveis a éter, o que indicava a presença de envelope viral ou capa-lipídica para manter a sua infectividade, porém ambos não eram relacionados com mixo- ou paramixovírus conhecidos. Almeida e Tyrrel et al. (1967) analisaram a morfologia dos vírus B814 e 229E e verificaram sua alta similaridade com o vírus da bronquite infecciosa (IBV) descrito anteriormente, com tamanho médio entre 80-150nm, pleomórficos, apresentando membrana e coberta com projeções gerando um aspecto de coroa. No mesmo período, McIntosh et al. (1967) reportaram a recuperação de 6 linhagens de agentes éter-sensíveis de amostras do trato respiratório humano, também utilizando a técnica de cultura de órgão traqueal denominando as linhagens virais como “OC” para determinar que cresceram em cultura de órgão. Uma linhagem viral, OC43, pode ser adaptada para crescimento em cultura de tecido, e apresentou morfologia similar aos vírus IBV, 229E e B814 descritos anteriormente.

No final da década de 60, um grupo de virologista liderado por Tyrrel, trabalhando com vírus humanos e animais incluindo vírus da bronquite infecciosa (IBV) e da gastroenterite transmissível de suínos (TGEV), todos com morfologia e características similares ao microscópio eletrônico, nomearam o novo grupo viral de Coronavírus devido ao aspecto de coroa proveniente da proteína Spike da partícula viral, sendo a nomenclatura oficialmente aceita para denominação de um novo gênero viral em 1975 (Kahn & McIntosh, 2005; Tyrrel et al, 1975).

Experimentos posteriores verificaram a diferença antigênica entre os vírus 229E, OC43 e o coronavírus IBV. Também foi identificada uma pequena similaridade antigênica entre o coronavírus OC43 com o vírus da hepatite murina (MHV) (McIntosh et al., 1969). A diferenciação entre grupos antigênicos foi base para a classificação de coronavírus em grupos, posteriormente determinados de grupo 1 e 2, e atualmente, grupo Alfa e Betacoronavírus.

Algumas linhagens de coronavírus crescidos em cultura de órgão traqueal como B814 (Tyrrel & Boynoe, 1965) e algumas linhagens OC, obtidos por McIntosh et al. (1967) produziram resfriados em voluntários (Bradburne et al., 1967) e não puderam ser cultivados em cultura celular e nem adaptados a modelos animais. Estas linhagens virais eram distintas ou pelo menos, pouco relacionadas do ponto de vista antigênico quando comparados aos tipos OC43 e 229E. Estas cepas virais podem ter sido representantes do coronavírus humanos apenas recentemente identificados como coronavírus NL63 e HKU1, ou mesmo um tipo distinto (McIntosh, 2005).

Nas 3 décadas seguintes, os coronavírus 229E e OC43 e outros coronavírus animais foram extensivamente e exclusivamente estudados, não se dando importância a outras linhagens de coronavírus humanos não caracterizadas, como coronavírus B814, principalmente devido a dificuldade de estudo gerado pela característica fastidiosa destas cepas (Kahn & McIntosh et al., 2005). Os coronavírus OC43 e 229E, por sua vez, foram adaptados a crescimento em cultura celular. O coronavírus OC43 foi adaptado ao crescimento em células cérebro de camundongos e posteriormente em cultura de tecidos. O coronavírus 229E por sua vez, foi adaptado ao crescimento em células de rins de embriões humanos e posteriormente em fibroblastos humanos (Bradburne et al., 1967). Estudos a respeito da epidemiologia de coronavírus 229E e OC43 se basearam, até meados da década de 90, em ensaios com isolamento viral, ELISA ou detecção de anticorpos em soro de pacientes apresentando diferentes quadros de doença respiratória (Monto, 1974; McIntosh et al., 1967, 1970).

O interesse no estudo de coronavírus foi dramaticamente renovado no início do ano de 2003 quando um novo coronavírus foi identificado como causador de uma nova doença infecciosa emergente conhecida como síndrome respiratória aguda grave (“Severe Acute Respiratory Syndrome” ou SARS) (Ksiazek et al., 2003; Drosten et al., 2003). Esta nova doença apareceu inicialmente em Novembro de 2002 na província de Guangdong na China sendo caracterizada por um pneumonia atípica sem agente causador identificado. A epidemia se alastrou para outros países quando um médico, infectado ao atender pacientes em Guangdong, viajou para Hong Kong e hospedou-se em um hotel, onde foram infectados

indivíduos que posteriormente voaram para a Singapura, Vietnam, Canada e EUA, tornando a SARS a primeira epidemia comprovadamente transmitida por viagens aéreas (Stadler et al., 2003). Após aproximadamente 100 dias da epidemia, a doença atingiu 29 países de diferentes continentes incluindo países da Ásia, Europa, América e Oceania, com taxa de mortalidade de 9.6% (774 mortes / 8098 casos acumulados) (Stadler et al., 2003).

Após inédita colaboração entre laboratórios e cientistas por todo o mundo, um coronavírus nunca antes identificado foi isolado de pacientes com SARS em cultura celular de células VeroE6 e FRhK, sendo a associação do vírus com a doença confirmada após inoculação de amostras virais em cobaias (Stadler et al., 2003). Após poucas semanas, o genoma viral foi sequenciado e a análise filogenética demonstrou se tratar de um vírus diferente aos coronavírus humanos e animais conhecidos (Baker, 2004).

A ausência de anticorpos contra SARS em amostras retrospectivas de 2002 na população indicava que este vírus era emergente na população humana. O fato de grande número de casos iniciais terem sido descritos em trabalhadores de mercados de animais silvestres vendidos como alimentos exóticos no Sul da China, indicavam que o vírus poderia se tratar de um patógeno zoonótico originado de animais silvestres (Baker, 2004). Guan et al. (2003) analisaram o soro e fezes de animais silvestres dos mercados locais e detectaram um vírus similar ao vírus da SARS em civetas e texugos, indicando uma possível origem zoonótica da epidemia. Também foi observado que trabalhadores manipuladores de animais silvestres apresentavam maior soroprevalência de anticorpos contra SARS do que trabalhadores do mercado de vegetais (Baker, 2004).

Outros estudos realizados com civetas e texugos demonstraram que estes animais não eram os reservatórios naturais do vírus. Análises sorológicas indicaram que 80% dos animais do mercado de animais silvestres haviam sido expostos ao coronavírus, no entanto, animais de outras localidades não possuíam os anticorpos contra a CoV-SARS, sugerindo que as civetas podem ter sido infectados por um outro animal não identificado. Além disso, infecções experimentais em civetas geraram um número significativo de animais doentes, e a taxa de mutação viral era relativamente alta, sugerindo que o vírus estava mutando para adaptação de crescimento no novo hospedeiro (Kanh, 2006).

O provável reservatório natural de coronavírus relacionados a SARS foram identificados após a detecção de coronavírus em morcegos asiáticos (“Horseshoe bats”) (Lau et al., 2005). O vírus isolados de morcegos foram sequenciados e apresentaram uma similaridade com o coronavírus da SARS, porém diferenças marcantes puderam ser detectados, como deleções em regiões codificantes. Por fim, presumisse que a epidemia de

SARS-CoV tenha se iniciado pela transmissão de um coronavírus de morcegos para algum animal silvestre vendido nos mercados do Sul da China, sendo posteriormente transmitidos para humanos (Khanh, 2006).

Após 6 meses a epidemia de SARS foi controlada, sendo o último caso da doença referente a uma contaminação acidental em laboratório em abril 2004 (Kahn e McIntosh, 2005). Apesar do importante papel de medidas de controle e de saúde pública, como medidas de quarentena rigorosas com o isolamento de pacientes infectados, acompanhamento de indivíduos em contato com infectados, barreiras sanitárias para detecção de pessoas febris em aeroportos, comunicação e orientação pública entre outras medidas, Khanh (2006) sugere que características ecológicas e biológicas do vírus tenham contribuído para o desaparecimento de sua transmissão natural. Stadler et al. (2003) sugere que a ausência da circulação do vírus após a epidemia pode ter sido influenciada pela atenuação viral seguindo a prolongada passagem em humanos, ou do período do surto, atrapalhado pelo início do verão, uma vez que altas temperaturas geralmente diminuem a incidência de algumas infecções respiratórias. Apesar da atual ausência de circulação deste tipo viral, este vírus está sob constante vigilância epidemiológica.

Diferentemente dos HCoV-229E, OC43, NL63 e HKU1, o CoV-SARS não está atualmente circulando na população humana. De todos os tipos de coronavírus capazes de infectar humanos até a atualidade, o CoV-SARS é responsável pelos sintomas clínicos mais severos e apresenta a maior taxa de mortalidade entre os coronavírus (Wevers & van der Hoek, 2009).

O aumento do interesse no estudo de coronavírus após a SARS, somado a disposição de ferramentas moleculares sensíveis de detecção como a PCR, induziram a descoberta de novos coronavírus em diversas espécies de aves e mamíferos, incluindo a descoberta de coronavírus em baleias, girafas, morcegos, e outros 2 em humanos.

Em 2004, um novo tipo de coronavírus humano do grupo Alfacoronavírus foi identificado por 3 grupos independentes, sendo dois da Holanda e um dos EUA (van der Hoek et al., 2004; Esper et al., 2005; Fouchier et al., 2004).

A primeira identificação ocorreu na Holanda, em uma criança de 7 meses apresentando febre, bronquiolite, coriza e conjuntivite. O novo agente foi inicialmente isolado de lavado nasofaríngeo após inoculação em cultura celular e visualização de efeito citopático. O patógeno foi então identificado pela metodologia molecular denominada VIDISCA (**V**irus **d**iscovery **c**DNA **a**mplified fragment length polymorphism”, traduzido para Descoberta de vírus pela amplificação de fragmentos polimórficos quanto ao tamanho de cDNA), sendo

denominado HCoV-NL63. Este método se baseia na restrição enzimática da sequência viral alvo e ligação de oligonucleotídeos adaptadores em sua extremidade. Estes adaptadores então servem de alvos para oligonucleotídeos utilizados em ensaios de amplificações seguintes. Os fragmentos são então clonados, sequenciados e analisados (van der Hoek et al., 2004). Este novo método permite a amplificação de genomas virais sem conhecimento prévio de suas sequências.

Poucos meses depois, um segundo grupo independente da Holanda, reportaram a identificação de um novo coronavírus isolado de lavado nasofaríngeo de uma criança de 8 meses com pneumonia, denominando o vírus de HCoV-NL. A amostra havia sido coletada em 1988, sendo recentemente inoculada em cultura celular. Após observação de efeito citopático, e observação por microscopia eletrônica da presença de partículas virais similares a coronavírus, ensaios moleculares com uso de oligonucleotídeos randômicos indicaram se tratar também de um coronavírus do grupo 1. Fouchier et al. (2005) detectaram o HCoV-NL em 2.9% das amostras analisadas (4 de 139 amostras).

Ambas as descobertas anteriores deste novo genótipo de HCoV (NL63 e NL) tiveram como passo inicial a passagem de vírus em cultura celular e a observação e efeito citopático inicial. Esper et al. (2005) poucos meses após os achados a respeito do vírus NL63 e NL, utilizando a técnica de biologia molecular com uso de oligonucleotídeos com alvo em regiões genéticas conservadas entre os coronavírus animais e humanos descritos até o momento, evidenciaram a presença de um novo coronavírus nos EUA, na cidade de New Haven, sendo o vírus denominado HCoV-NH. Este tipo de ensaio tem como base características do gene da replicase viral de todos os coronavírus apresentarem sequências genéticas altamente conservadas, uma vez que codificam funções indispensáveis à replicação viral, sendo possível então a utilização destas sequências como alvo em ensaios de amplificação molecular e posterior sequenciamento para detecção e descoberta de novos coronavírus. O método descrito possibilita, teoricamente, a descoberta de novos tipos virais sem a necessidade de cultivo celular ou mesmo geração de efeito citopático visível, fato que certamente tardou a descoberta do vírus HCoV-HKU1, fastidiosa, com apenas um relato de cultivo, e aparentemente não gerador de efeito citopático (Pyrce et al., 2010; dados do presente estudo).

O vírus HKU1, um Betacoronavírus, foi o último coronavírus descoberto e foi identificado em 2005 na cidade de Hong Kong, China. A identificação foi realizada através da amplificação da sequência genética viral por RT-PCR com uso de oligonucleotídeos complementares a região conservada do gene da polimerase viral elaborados inicialmente para a detecção de CoV-SARS. O vírus foi detectado de amostra respiratório de um idoso de

71 anos apresentando doença pulmonar crônica. Apesar da inviabilidade de cultivo, a linhagem viral teve seu genoma totalmente sequenciado, sendo distinto a outros Betacoronavírus como SARS e OC43.

Apesar dos coronavírus humano NL63 e HKU1 terem sido descritos apenas recentemente, estes não são considerados vírus emergentes como a SARS. Estes vírus já foram detectados em amostras de 1983 e 1995 respectivamente (Talbot et al., 2009; Goes et al., 2011). Além disso, análises de suas sequências indicam, através de métodos de relógio molecular, não se tratarem de vírus recentes, podendo o HCoV-NL63 ter sido originado a 10 séculos (Abdul-Rasool e Fielding, 2010). Por fim, alguns achados da década de 60 e 70, indicam a sua possível circulação, uma vez que, vírus sorologicamente distintos aos vírus 229E e OC43 foram isolados de indivíduos com resfriado anteriormente, porém perdidos devido a sua característica fastidiosa, como ocorrido com coronavírus B814 e 3 cepas OC inicialmente isolados por McIntosh et al. (1969) (Esper et al., 2005; McIntosh et al., 1969).

Os coronavírus humanos 229E, OC43, HKU1 e NL63 apresentam circulação constante em todos os continentes e sua relação com doenças respiratórias leves a moderadas é vastamente reportada (Kanh, 2006; Lai et al., 2007; Wevers & van der Hoek, 2009).

1.9 Doenças respiratórias associadas a Coronavírus Humanos e CoV-SARS

A possível relação entre as coronaviroses humanas e doenças respiratórias foi identificado durante a década de 60, após o isolamento destes vírus de amostras de pacientes com quadros respiratórios, e posterior observação da ação viral após a inoculação em voluntários. Durante a décadas de 60 a 80, a ausência de modelos animais para estudos da patogenicidade dos coronavírus 229E e OC43, somado ao fato da baixa severidade de doenças causadas nos indivíduos onde estes vírus puderam ser identificados, levaram a realização de diferentes estudos com a inoculação experimental de vírus em voluntários (Bradburne et al., 1967, 1972), causando geralmente apenas um resfriado comum. Além de ensaios de inoculação, foram realizados também diversos estudos epidemiológicos com uso de técnicas sorológicas buscando entender a participação dos coronavírus na geração dos quadros respiratórios, e características de sua circulação (Candeias et al., 1972; McIntosh et al., 1970; Monto, 1974).

O resfriado comum é tipicamente limitado à doença do trato respiratório superior, caracterizado pela presença de sintomas clínicos moderados como obstrução nasal, rinorréia,

espirros, inflamação de garganta (faringite) e tosse. Diferentes vírus respiratórios de diferentes famílias virais podem ser responsáveis por este tipo de quadro (Heikkinen & Jarvinen, 2003; Wevers & van der Hoek et al., 2009).

Os coronavírus 229E e OC43 são considerados agentes responsáveis por uma alta porcentagem dos casos de infecção respiratória do trato respiratório superior, principalmente no inverno e primavera em países de clima temperado (Larson et al., 1980; Myint et al., 1994). Apesar de diversos estudos reportarem a associação de infecção por HCoV-229E e OC43 com uma variedade de doenças respiratórias, sua patogenicidade é geralmente considerada baixa, causando apenas quadros de resfriados comuns ou faringites, estando associados também com crises de asma e bronquite crônica (Hamre e Procknow, 1966; McIntosh et al., 1970; Bradburne et al., 1967; Monto, 1974; Esposito et al., 2006).

Estes vírus estão menos comumente relacionados com doenças do trato respiratório inferior como pneumonias, sendo este quadro encontrado geralmente em crianças, idosos e imunocomprometidos (Kahn, 2006; Wevers & van der Hoek, 2009).

Segundo Principi et al. (2010), a real importância clínica destes tipos virais ainda não foi totalmente definida, principalmente devido a presença de dados discordantes na literatura, onde a infecção por coronavírus puderam ser encontradas entre 3 a 35% do grupo analisado (Monto, 1974). Esta variação pode ser decorrente de características peculiares dos estudos como o período do ano analisado, idade dos indivíduos, pacientes da comunidade ou hospitalizados, e presença de fatores de risco (Principi et al., 2010).

Analizando os quadros clínicos relacionados com os 4 tipos de HCoV conhecidos até a presente data, a associação com infecções do trato respiratório inferior são incomuns em crianças saudáveis, sendo a incidência de bronquiolite ou pneumonia menor do que 5%, com algumas variações (Principi et al., 2010).

A infecção pelo coronavírus humano NL63 vem sendo relacionado a sintomatologia de infecções respiratórias de vias aéreas superiores e inferiores, estando relacionado com diferentes quadros clínicos como febre, rinorréia, tosse e bronquiolite (inflamação da membrana bronqueolar) (Abdul-Rassol e Fielding, 2010). Dados da literatura a respeito de quadros clínicos mais comum relacionado a infecções com HCoV-NL63 indicam uma associação entre infecções por NL63 e laringotraqueite (também denominada laringotraqueobronquite ou “croup”) (Chiu et al., 2005; Sung et al., 2010; van der Hoek et al., 2005). Segundo van der Hoek et al. (2005) a presença de laringotraqueíte tem chance 6.6x maior de ocorrer em crianças infectadas com NL63 quando comparado ao grupo controle não infectado (van der Hoek et al., 2005b). Diversos estudos relatam a alta prevalência de “croup”

em crianças infectadas com NL63, sendo tão detectado quanto as parainfluenzavírus em crianças apresentando este quadro clínico (Chiu et al., 2005; Suzuki et al., 2005; Ebihara et al., 2005; Vabret et al., 2005; Kuypers et al., 2007; Principi et al., 2010; Sung et al., 2010).

Assim como em outros coronavírus, o HCoV-HKU1 é associado com infecções do trato respiratório superior e inferior. Infecções respiratórias do trato superior por HKU1 são associadas com febre, coriza, rinorréia, espirros e tosse, enquanto infecções do trato respiratório inferior com febre, tosse produtiva, dispneia, bronquiolite e pneumonia. Infecções por estes vírus são geralmente autolimitantes, com relato de apenas 2 mortes por pneumonia em pacientes com doenças secundárias graves como câncer e doenças (Woo et al., 2005c). Coronavírus HKU1 também foram detectados em indivíduos de grupo controle ausentes de quadros respiratórios em >2%, adicionando mais dúvidas a respeito do papel de vírus HKU1 na geração de pneumonias (Dare et al., 2007).

A infecção pelo HCoV-HKU1 geralmente acompanham sintomas clínicos como rinorréia, febre, tosse, espirros, convulsões febris, pneumonia e bronquiolite (Woo et al., 2005ab). Posteriormente outros estudos relataram a detecção de coronavírus em amostras de crianças com infecção respiratória do trato superior e inferior, onde a maioria dos pacientes apresentava doença secundária a infecção respiratória, sendo sugerido que a infecção por HKU1 possam agravar a condições de pacientes com doenças secundárias (Pyrc et al., 2007).

De todos os tipos de coronavírus capazes de infectar humanos até a atualidade, o COV-SARS é responsável pelos sintomas clínicos mais severos e maior taxa de mortalidade (Wevers & van der Hoek, 2009). Este coronavírus, curiosamente, aparenta menor agressividade clínica em crianças, sendo raramente encontrado mortalidade neste grupo de indivíduos (Wevers & van der Hoek, 2009). A infecção por SARS-COV, transmitido pela inalação de gotículas (“droplets”) invadem epitélio traqueal, brônquios, bronquíolos e alvéolos (Wevers e van der Hoek, 2009). O período de incubação é estimado entre 2 a 10 dias.

O coronavírus SARS causam inicialmente sintomatologia similar a da infecção por influenza incluindo sintomas como febre alta, mal estar e fadiga. Após início dos sintomas, a infecção pode progredir para uma doença não severa, ou evoluir para sintomas moderados. Após 2 a 7 dias do início dos sintomas, inicia-se os quadros clínicos de dispneia e tosse não produtiva. Em 2/3 dos pacientes infectados a doença evolui para uma pneumonia atípica, com encurtamento da respiração e baixa troca de oxigênio alveolar. A sintomatologia evolui então para a síndrome da angústia respiratória aguda (“Acute Respiratory Distress Syndrome-ARDS”) resultante de uma infiltração pulmonar progressiva imune., formação de membrana

de hialina, dano alveolar difuso e alta carga viral, sendo a causa líder de óbitos em indivíduos infectados com CoV-SARS (Wevers e van der Hoek, 2009).

1.10 Doenças não respiratórias associadas à Coronavírus Humanos

Além de quadros respiratórios, os coronavírus também vêm sendo associados a doenças do trato digestivo e do sistema nervoso central. Diferentes tipos de coronavíroses animais causam diarreia no hospedeiro e são transmitidas pelo contato fecal-oral (Tabela X).

Resta et al. (1985) reportaram o isolamento e propagação de um coronavírus entérico, relacionado antigenicamente com o coronavírus OC43 (Resta et al., 1985), no entanto, sua ação como agente etiológico não foi confirmada através de estudos de inoculação em indivíduos saudáveis (Wevers & van der Hoek et al., 2009). Partículas virais de coronavírus foram observadas por microscopia eletrônica em fezes de crianças com enterocolite necrosante neonatal (Rousset et al., 1984). Gerna et al. (1984) reportaram que uma alta proporção de crianças com gastroenterite continham anticorpos de resposta contra infecções por coronavírus (Gerna et al., 1984). Estudos recentes detectaram RNA de coronavírus humano em amostras de fezes em crianças com gastroenterite (Vabret et al., 2006; Risku et al., 2010; Esper et al., 2010). Risku et al. (2010), utilizando técnicas moleculares de detecção, detectaram 2.5% (22/878) das amostras de fezes de crianças positivas para um dos 4 tipos de HCoV, no entanto, em 80% dos casos, foi verificado a co-infecção com outros vírus causadores de diarreias como norovírus ou rotavírus. No estudo de Esper et al. (2010), o coronavírus HKU1 foi detectado em 0.8% das amostras analisadas de pacientes com diarreia. Vabret et al. (2006) detectaram partículas de HKU1 em fezes em indivíduos com infecção respiratória, porém estes não apresentavam sintomatologia no trato gastrointestinal. Apesar dos dados confirmando a liberação de partículas virais pelas fezes, e da presença de sintomas gastrointestinais em pacientes positivos para NL63 ou HKU1, ainda não está claro se os coronavírus se replicam no sistema digestivo e se a liberação de partículas virais pelas fezes apresenta atuação importante na transmissão de coronavírus humanos.

Estudos também relatam a detecção de RNA de coronavírus em tecido cerebral e da alta concentração de anticorpos anti-coronavírus em pacientes com esclerose múltipla (Wevers & van der Hoek, 2009). Dados recentes obtidos de análises clínicas, biopsias, cultura celular e em modelos animais confirmam o potencial neurotrópico e neuroinvasivo de coronavírus. Resultados de alguns estudos indicam esta associação como: (i) coronavírus

SARS e HKU1 já foram isolados de fluidos cérebro-espinhal humano (Hung et al., 2003; Lau et al., 2006); (ii) HCoV podem representar um fator de risco de co-morbidade em indivíduos com distúrbios mentais (Severance et al., 2011); (iii) presença de complicações psiquiátricas foram observadas em pacientes SARS positivos (Cheng et al., 2004); (iv) similaridade genética entre o coronavírus humano OC43 e o vírus de camundongo MHV indica uma possível ação neurotrópica do vírus humano, uma vez que o vírus MHV pode causar a desmielinização do sistema nervoso central (Principi et al., 2010); (v) presença de coronavírus em pacientes com esclerose múltipla (Severance et al., 2011), e finalmente, (vi) infecções por HKU1 foram associadas com convulsões febris (Lau et al., 2006). No entanto infecções por este vírus não se mostraram associadas a quadros de convulsões febris no estudo de Vabret et al. (2008). Apesar das evidências circunstanciais, a associação de HCoV com doenças neurológicas ainda não foram devidamente esclarecidos (Woo et al., 2009).

O coronavírus NL63 vem sendo associado pela literatura com casos de doença de Kawasaki, uma vasculite sistêmica da infância de causa desconhecida causando o dano na paredes dos vasos sanguíneos (Gedalia, 2007). Esper et al. (2005) identificaram o coronavírus NL63 em amostras respiratórias de pacientes com a doença de Kawasaki., porém outros dados da literatura não encontraram relações entre o vírus e a doença (Dominguez et al., 2006; Pyrc et al., 2007).

Independente do coronavírus humano e de seus quadros sintomáticos, não existem drogas antivirais ou vacinas contra infecções e o tratamento para pacientes apresentando quadros de infecção por estes vírus baseia-se no tratamento de suporte com alvo nos sintomas (Woo et al., 2009).

1.11 Tratamento e Prevenção

Até onde sabemos, não existe droga antiviral e vacinas para o tratamento e prevenção de infecções pelos diferentes coronavírus humanos (Lai et al., 2007). No entanto, a biologia molecular de coronavírus indicam a presença de alvos potenciais para drogas antivirais (Lai et al., 2007). Diferentes inibidores podem agir em diferentes etapas do ciclo de replicação viral, como a ligação do vírus com o receptor celular, a fusão viral com a membrana, o processamento transcricional e o processamento pós-transcricional (van der Hoek et al., 2006). Entre os principais alvos potenciais para a ação de drogas inibitória temos como exemplo a RNA polimerase RNA dependente (replicase viral), proteases virais e proteínas

Spike responsáveis pelo reconhecimento de receptores e fusão com a célula hospedeira (Lai et al., 2007).

O tratamento padrão de pacientes portadores de CoV-SARS, durante a epidemia de 2003, era baseado na utilização de ribavirina, altas doses de esteroides e ventilação mecânica, sendo posteriormente adicionado o uso da imunoglobulina interferon-alfa (Lai et al., 2007). Após o fim da epidemia, uma grande variedade de drogas se mostraram eficiente no controle da infecção *in vitro* da SARS, como inibidores de protease utilizadas no tratamento de HIV (como lopinavir), peptídeos da região de repetição “heptad” do gene spike, responsável pela fusão viral com a membrana celular e RNAs de interferência (Lai et al., 2007).

Inibidores contra a infecção do vírus NL63 também foram recentemente descobertos. Imunoglobulinas administradas por via intravenosa, peptídeos derivados de domínios HR1 e HR2 da proteína Spike (mais especificamente região S2 e inibidores da fusão vírus-célula), RNA de interferência, nucleosídeos análogos de pirimidina e inibidores de proteases se mostraram eficientes contra a infecção viral *in vitro* de NL63 (van der Hoek et al., 2006).

A inibição da infecção por coronavírus humano HKU1 ainda não foram descritos, uma vez que a metodologia de replicação *in vitro* deste vírus foi alcançado apenas recentemente, e é limitado pela característica altamente fastidiosa deste vírus e a necessidade de sistemas de cultivo de células pulmonares primárias para sua replicação *in vitro* (Pyrce et al., 2010).

O uso de drogas específicas para a infecção pelos coronavírus humanos 229E e OC43 não foram desenvolvidos, principalmente pelas infecções por estes vírus ocasionarem apenas infecções leves como resfriado comum (Lai et al., 2007).

1.12 Epidemiologia de coronavírus humanos

A alta ocorrência de infecções por coronavírus humanos nos primeiros meses de vida e o padrão de infecções durante surtos e epidemias sugere que as coronaviroses humanas são eficientemente transmitidas em populações humanas (Lai et al., 2007). Os coronavírus de maneira geral são transmitidos através de aerossóis respiratórios e via fecal-oral de infecção, sendo o alvo primário superfícies de mucosas do trato respiratório ou intestinal, causando doenças de grande variação enquanto sua severidade (Wevers e van der Hoek, 2009). A transmissão de coronavírus humanos pelo ar pode ocorrer através de aerossol ou gotículas

(“droplets”) (Lai et al., 2007; Wevers e van der Hoek, 2009) sendo também disseminado por fomites ou contato direto (Sizun et al., 2000)

A transmissão por gotículas é, teoricamente, um método de transmissão por contato direto ou indireto. As gotículas são geradas pelo indivíduo durante a tosse, espirro e no ato de falar. A transmissão ocorre quando as gotículas geradas por um indivíduo doente, e contendo o agente patogênico, são emitidos a curtas distancias através do ar e se depositam em mucosas do novo hospedeiro, como a mucosa conjuntiva, nasal ou bucal. As gotículas não se mantem suspensas no ar. A transmissão pelo ar, por sua vez, ocorre pela geração de aerossol, cujo gotículas apresentam diâmetros menores do que 5 μM . O aerossol é gerado a partir de gotículas evaporadas contendo patógeno e podem ser depositar em partículas de poeira. Nestas condições, o agente etiológico pode se dispersar pelo ar através de correntes de vento, e pode ser inalado por um hospedeiro suscetível em um mesmo ambiente ou localizada a longas distâncias, dependendo de características ambientais. Para estes patógenos é necessário o tratamento especial do ar para evitar novas contaminações, e as infecções em geral, se iniciam pelo sistema respiratório (Comitê de Doenças Infecciosas e de cuidado Hospitalar do inglês “Committee on Infectious Diseases and Committee on Hospital Care”, 1998).

Coronavírus humanos podem permanecer infectantes por até 7 dias em solução aquosa e secreções respiratórias em temperatura ambiente. Em regiões de alta densidade populacional, a transmissão direta de pessoa para pessoa é considerado a principal via de transmissão (Abdul-Rasool e Fielding, 2010; Hofmann et al., 2005; Muller et al., 2008). A literatura descreve também relatos de transmissão nasocomial de coronavírus humano NL63, 229E e OC43 (Bastien et al., 2005; Lai et al., 2007).

Os 4 tipos de coronavírus humanos conhecidos até o momento, apresentam distribuição mundial, sendo descritos em todos os continentes, exceto nas regiões polares. Entre 2005 e 2012, pudemos contabilizar 32 estudos moleculares envolvendo a detecção dos 4 tipos de coronavírus foram realizados em todo mundo, incluindo África do Sul, Austrália, Brasil, China, Coreia, EUA, Finlândia, França, Grã-Bretanha, Grécia, Hong Kong, Itália, Japão, Noruega, Suíça e Tailândia (Albuquerque et al., 2009; Arden et al., 2006; Bosis et al., 2008; Canducci et al., 2008; Chung et al., 2007; Dare et al., 2007; Dominguez et al., 2009; Esposito et al., 2006; Filho et al., 2012; Gaunt et al., 2010; Gerna et al., 2007; Goes et al., 2011; Gorse et al., 2009; Kistler et al., 2007; Kon et al., 2012; Kristoffersen et al., 2011; Kuyper et al., 2007; Lau et al., 2006; Leung et al., 2012; Lu et al., 2006; Mackay et al., 2012; Papa et al., 2007; Pierangeli et al., 2007; Prill et al., 2012; Ren et al., 2011; Ruohola et al., 2009; Sloot et al., 2006; Talbot et al., 2009; Vabret et al., 2006; 2008; Venter et al., 2011;

Woo et al., 2005) (apêndice 6). A porcentagem geral de positividade considerando os 4 tipos de coronavírus humanos variou entre 1 a 17.8%, podendo atingir picos mensais e sazonais com valores maiores que 30%, conforme descrito nos estudos sorológicos de coronavírus humanos 229E e OC43 das décadas de 60 a 80. A similaridade dos resultados epidemiológicos dos estudos sorológicos envolvendo a análise de apenas 2 tipos de HCoV primeiramente descritos, e estudos da ocorrência dos 4 tipos de HCoV, pode ser consequência da reação cruzada de anticorpos entre coronavírus humanos de mesmo grupo (OC43/HKU1; 229E/NL63) (Shao et al., 2007). A reatividade cruzada entre anticorpos gerados para diferentes membros virais do mesmo grupo (Alfa e Betacoronavírus), como observado por Shao et al. (2007) entre 229E e NL63, ou mesmo grupos diferentes, como a reatividade cruzada de anticorpos anti SARS com vírus HCoV-NL6, indicam que os resultados de soropositividade obtidos nestes estudos devem ser analisados para o grupo e não para o genótipo viral singular.

Estudos sorológicos sugerem que a infecção com HCoV-229E e HCoV-OC43 ocorrem frequentemente nos primeiros anos de vida, e são responsáveis por infecções recorrentes. Anticorpos neutralizantes contra HCoV-OC43 e HCoV-229E foram detectados em 50% das crianças em idade escolar e 80% de adultos (Lai et al., 2007).

Shao et al. (2007), utilizando ensaio de ELISA com base na proteína N do HCoV-229E e NL63, analisaram o soro de 243 crianças e adulto menores de 20 anos, e observaram que mais de 30% crianças menores de 1 ano apresentam evidência sorológica de infecção. O coronavírus 229E é aparentemente mais comum em crianças até 2 anos de idade, apresentado soropositividade de 62.5%, enquanto que o vírus NL63 apresentou soropositividade de 25%.

A soroprevalência sofre uma inversão drástica entre coronavírus 229E e NL63, onde em adultos, a soropositividade para NL63 é variável de 25 a 70% de indivíduos até 20 anos (Shao et al., 2007), e na maioria do soro de indivíduos maiores do que 8 anos de idade (Hofmann et al., 2005), enquanto apenas o soro de uma minoria de adultos apresentavam anticorpos neutralizantes para pseudovírus de 229E (Hofmann et al., 2005).

Anticorpos maternos direcionadas para proteína N de coronavírus 229E e NL63 estão presentes 50% de crianças menores de 2 meses, e a soropositividade geralmente sofre uma queda após 6 meses de vida (Shao et al., 2007).

Segundo Shao et al. (2007) estudos focados na análise da presença de anticorpos para HCoV-229E e OC43 apresentam diferentes resultados quanto a soroprevalência, aparentemente dependente da idade da população e método utilizado para detecção de anticorpos contra coronavírus.

A análise da soroprevalência realizados com uso de diferentes antígenos e metodologias de detecção de anticorpos, como ELISA realizada com a proteína viral S ou N expressos em sistemas heterólogos, obtiveram resultados diferentes quanto a soroprevalência de anticorpos contra HCoV-HKU1, podendo variar de 22% a 59.2% em indivíduos adultos (Woo et al., 2009), apresentando soroprevalência igual ou consideravelmente menor do que outros coronavírus humanos dependendo do estudo.

Estudos realizados em países temperados indicaram uma maior circulação de coronavírus humanos (229E e OC43) nos meses de inverno e primavera, podendo representar o agente etiológico de 5 a 35% de casos de infecção respiratória durante períodos epidêmicos. Também foram observadas variações anuais e mensais dentro de um mesmo estudo, apresentando ciclos de circulação elevada a cada 2 a 4 anos (Monto, 1974; McIntosh et al., 1974).

A variação da ocorrência anual de coronavírus humanos em estudos multianuais é descrito na literatura (Dare et al., 2007; Dominguez et al., 2012; Gaunt et al., 2010; Gerna et al., 2006; Han et al., 2007; Koetz et al., 2006; Lau et al., 2006; Leung et al., 2009; Leung et al., 2012; Ren et al., 2011; Talbot et al., 2009; Vabret et al., 2008). Dominguez et al (2012) sugerem que a característica da infecção com um tipo de coronavírus pode estimular a imunidade de proteção cruzada sobre uma infecção posterior com um diferente coronavírus de um mesmo grupo antigênico (Dijkman et al., 2012), e talvez possa gerar alguma pressão sobre a sazonalidade anual de cada tipo de coronavírus. É possível que a razão de circulação entre cada um dos tipos de coronavírus humanos flutuem independentemente ou possam sofrer influência intra ou inter genótipos de alfacoronavírus (HCoV-229E e HCoV-NL63) e betacoronavírus (HCoV-OC43, HCoV-HKU1) (Gaunt et al., 2010).

Estudos a respeito da incidência dos genótipos dos coronavírus mais recentemente descritos, HCoV- NL63 e HCoV-HKU1, apresentam resultados variáveis. O HCoV-NL63 pôde ser detectado em 0 a 9.3% das amostras analisadas, enquanto que a ocorrência do HCoV- HKU1 foi variável entre 0 e 4.4% (Abdul-Rasool e Fielding, 2010; Woo et al., 2009).

A distribuição sazonal destes coronavírus humanos também não está bem definida (Pyrce et al., 2007; Ren et al., 2011). Entre os fatores que dificultam determinar seguramente a sazonalidade destes vírus podemos citar a sua recém-descoberta, a características da grande maioria dos estudos a respeito da incidência de coronaviroses humanas NL63 e HKU1 incluem apenas curtos períodos de tempo, e o fato de estudos apresentarem diferentes resultados e tendências sazonais, dentro de um mesmo estudo, ou em uma mesma localidade.

O estudo realizado por Talbot et al. (2009) a respeito da circulação dos 3 tipos de coronavírus humanos 229E, NL63 e OC43 durante um período de 20 anos, representando o maior estudo temporal a respeito da circulação de coronavírus humano, demonstraram uma maior frequência de circulação destes vírus nos meses de inverno. No entanto, aparentemente, a prevalência de cada um dos tipos de coronavírus variam de acordo com a região geográfica, sazonalidade e ano estudado (Han et al., 2007).

A periodicidade de infecções por HCoV-HL63 foi relatada em diferentes países como Holanda, Alemanha, Bélgica, Suíça, Suécia, França e China (Fouchier et al., 2004; Leung et al., 2012; Moes et al., 2005; Vabret et al., 2005; van der Hoek et al., 2004, 2010). Estudos a respeito da ocorrência do coronavírus humano NL63 englobando maiores períodos do que 2 anos, demonstram a presença de picos na circulação destes vírus intercalados por períodos com baixa positividade, sendo o período inter-epidêmico de 2 anos (Fouchier et al., 2004; Leung et al., 2012; Moes et al., 2005; Regamey et al., 2008; Vabret et al., 2005; van der Hoek et al., 2004, 2010).

O HCoV-NL63 apresentou tendência de circulação no outono em estudos realizados em Taiwan e Hong Kong (Wu et al., 2008; Leung et al., 2009), enquanto que em países de clima temperado, como em países europeus, Coreia do Sul e na América do Norte (incluindo EUA e Canada), o HCoV-NL63 foi mais prevalente no inverno (Bastien et al., 2005; Esper et al., 2005; Moes et al., 2005; Sung et al., 2010; Vabret et al., 2005). Em contraste aos resultados anteriores, picos de HCoV-NL63 foram mais comuns na primavera e no verão no estudo conduzido também em Hong Kong (Chiu et al., 2005); ou no fim do verão e outono em outro estudo conduzido em Hong Kong e na África do Sul (Lau et al., 2006; Venter et al., 2011). No estudo realizado por Dare et al. (2007) na Tailândia, e Smuts et al. (2008), na África do Sul, o coronavírus NL63 não apresentou nenhuma predileção sazonal.

Alguns estudos indicam uma maior prevalência destes coronavírus em infantes e crianças jovens quando comparado a prevalência em adultos (Bastien et al., 2005; Chiu et al., 2005; Esper et al., 2005).

Estudos relatam a tendência de infecções pelo HCoV-HKU1 no inverno nos EUA, Hong Kong e Austrália (Dominguez et al., 2009; Esper et al., 2005; Kuypers et al., 2007; Lau et al., 2006; Mackay et al., 2012; Sloots et al., 2006) ou nas estações de inverno-outono em outro estudo realizado nos EUA (Kistler et al., 2007) e inverno-primavera em Hong Kong e na China (Woo et al., 2005; Jin et al., 2011). No entanto, a ausência de padrão sazonal também foi observado por Gaunt et al. (2010), Gorse et al. (2009) e Prill et al. (2012) nos EUA; e Ren et al. (2011) ocorrendo na primavera, verão e inverno na China.

Os 2 coronavírus mais recentemente descritos, HCoV-NL63 e HCoV-HKU1, provavelmente não representam vírus emergentes como o coronavírus da SARS. O isolamento de NL63 de amostras oriundas de 1988 (Fouchier et al., 2004) ou mesmo de amostras coletadas de 1983 (Talbot et al., 2009), e o fato de coronavírus sorologicamente diferente dos coronavírus 229E e OC43, terem sido descritos mas não identificados na década de 60 e 70, indicam a possibilidade de se tratarem de vírus apenas recentemente descritos (Abdul-Rasool e Fielding, 2010; van der Hoek et al., 2006). Além disso, a identificação de diferentes subtipos de coronavírus NL63 e HKU1 indica uma introdução não recente na população humana (van der Hoek et al., 2006).

A análise de sequência de coronavírus humanos NL63 não indicam um agrupamento por região geográfica, e os diferentes subtipos podem co-circular em uma mesma população (Dominguez et al., 2012; van der Hoek et al., 2006). Dominguez et al. (2012) identificaram um terceiro subtipo de NL63 circulando nos EUA recentemente.

Hipóteses sobre ao aparecimento deste genótipo de coronavírus humano vem sendo elaborados com base em estudos de marcadores moleculares, ou também denominados relógios moleculares (molecular clocks), que representa resumidamente a análise da razão geral no qual o genoma viral acumula mutações, sendo então utilizado para medir a divergência evolucionária de espécies. Utilizando esta metodologia, foi proposto que o coronavírus NL63 apresenta um ancestral comum com o vírus 229 datado para o século 11, indicando o longo tempo no qual este vírus circula na população humana.

A variabilidade genética de isolados de HCoV-HKU1, por sua vez, sugere que este vírus foi introduzido na população humana não recentemente, no entanto, a descoberta do coronavírus HKU1 em 2005 levantou a possibilidade deste vírus também representar um agente zoonótico similar ao coronavírus CoV-SARS. Yuen et al. (2012) analisaram a presença de HCoV-HKU1 em um amplo espectro de animais silvestres presentes em áreas próximas de Hong Kong. Foram analisados 489 animais, entre espécies de morcegos, roedores e macacos, porém o vírus não foi detectado em nenhuma amostra.

1.13 Estudos da ocorrência de HCoV no Brasil

Indício da presença de HCoV no Brasil foi primeiramente obtido em 1972 onde, através de inquérito sorológicos para a amostra 229E, foi observada a presença de anticorpos de HCoV em 4 de 124 crianças (3%) e em 88 de 321 adultos (27,4%) (Candeias et al., 1972).

Mais recentemente, Macedo (2002); Perosa (2004) e Bellei et al. (2008) por meio da técnica de RT-PCR e hibridização com sonda específica, verificaram a circulação das amostras de HCoV 229E e OC43 com uma frequência similar àquela encontrada em regiões de clima temperado no mundo. Por fim, Albuquerque et al. (2009), Cabeça e Bellei et al. (2012) e da Silva Filho et al (2012), por meio de PCR e Real Time PCR detectaram os vírus HCoV NL63 e/ou HKU-1 no Brasil.

No estudo de Macedo (2002), HCoV 229E e OC43 foram detectados em 18 de 286 (6,3%) amostras de crianças menores de 2 anos, provenientes de creches para comunidades carentes em Salvador, Bahia, e em 3 de 117 (2,5%) amostras de crianças menores de 12 anos atendidas na Unidade Emergencial do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Os resultados sugerem que a frequência de HCoV como causa de IRA no Brasil seja similar àquela encontrada em regiões de clima temperado de todo o mundo.

No estudo de Bellei et al. (2008) foi verificado a presença dos tipos HCoV-229E e HCoV-OC43, já descritos no Brasil, em uma população de adultos apresentando sintomatologia de IRA, ou sintomatologia similar a infecção por influenza (“*ILI - influenza-like illness*”), no período de junho de 2001 a setembro de 2003 na cidade de São Paulo. Dos 420 casos estudados, 18 foram positivos para coronavírus (4,2%), sendo 12 para HCoV-OC43 (2,8%) e 6 (1,4%) para HCoV-229E. No estudo de Albuquerque et al. (2009), em 209 amostras analisadas por PCR Real-Time foi detectado pela primeira vez no Brasil uma amostra positiva para HCoV HKU-1 e duas para o HCoV-NL-63, porém não está descrito o genótipo do HKU-1 e não foram descritas no trabalho ou depositado no Banco de genes (GenBank) seqüências dos vírus detectados.

Na investigação realizada por Silva Filho et al. (2012) a respeito da presença de HCoV em 103 amostras de crianças com Fibrose Cística coletadas entre 2006 e 2007, detectaram HCoV em 19 amostras (4.65%), sendo 8 positivos para NL63, 6 OC43, 4 HKU1 e 1 229E.

Apesar dos estudos indicativos da presença de HCoV na população brasileira, de sua relação com IRA e da grande porcentagem de infecções respiratórias não terem seu agente etiológico identificado mesmo utilizando ensaios moleculares para a detecção simultânea diferentes vírus respiratórios, ainda são poucos os dados epidemiológicos nacionais a respeito da infecção por HCoV, bem como dados a respeito da filogenia dos HCoV circulantes na população brasileira.

Além disso, até onde se pode buscar, nenhum estudo analisou a distribuição de diferentes coronavírus em pacientes com IRA em um período maior do que 2 anos em território Nacional, e maior do que 4 anos em todo o mundo.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a ocorrência de HCoV em crianças com infecção aguda do trato respiratório (infecção respiratória aguda [IRA]) atendidas no Hospital Universitário da USP, São Paulo, SP, nos anos de 1995 a 2008.

2.2 Específicos

- Verificar a circulação de HCoV-HKU-1 e HCoV-NL63 no Brasil em amostras de crianças com IRA em estudo retrospectivo de 1995 a 2008;
- estimar a ocorrência dos diferentes tipos de HCoV e sua relação com variações em diferentes anos e estações do ano, buscando avaliar a presença de sazonalidade
- realizar a análise genotípica das amostras positivas para HCoV e avaliar a relação filogenética entre os coronavírus circulantes

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Grupo de Estudo e coleta de amostras clínicas

A população alvo do estudo foram crianças, menores de 15 anos, do município de São Paulo, apresentando sintomatologia respiratória ou IRA (Infecção aguda do trato respiratório) e atendidas em diferentes setores do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP) incluindo enfermaria pediátrica, retaguarda da pediatria, berçário e unidade de terapia intensiva-UTI, entre o período de 1995 a 2008. Entre os critérios atribuídos à IRA podemos citar a pneumonia, bronquiolite, laringite, broncoespasmo, broncopneumonia, crises de sibilância e infecções das vias aéreas superiores. O HU-USP é um hospital-escola situado na região oeste da cidade de São Paulo e dentro do campus da Universidade de São Paulo. Tem como característica o atendimento regionalizado da população local, de baixo nível sócio-econômico, além de alunos, funcionários e seus dependentes (Souza, 2000).

As amostras foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Edison Luiz Durigon, responsável pela coleção de amostras presente no Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo. Analisamos um total de 4305 amostras, abrangendo o período de 1995 a 2008 (Quadro 3). Amostras múltiplas de um mesmo paciente coletadas em dias diferentes compuseram nossa análise, sendo retirados amostras coletadas com período de intervalo menor do que 5 dias.

Quadro 3_Número de amostras utilizadas do banco de amostras do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular – ICB/USP.

Ano	Número de amostras
1995	150
1996	221
1997	65
1998	82
1999	130
2000	185
2001	121
2002	167
2003	283
2004	412
2005	434
2006	751
2007	790
2008	514
TOTAL	4305

FONTE: Góes LGB, 2012

Amostras foram colhidas por enfermeiras e/ou fisioterapeutas, com consentimento pós-informado dos pais ou responsáveis. Os estudos foram aprovados pela Comissão de Ética do Hospital Universitário e pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Processo: 871/CEP).

Compuseram nosso estudo amostras clínicas de aspirado nasofaríngeo e/ou *swab* nasofaríngeo. No momento da coleta, o *swab* nasal foi umedecido em solução de PBS (0,01 M pH 7,2) sendo imediatamente transferido para frasco contendo PBS estéril. O lavado nasofaríngeo foi obtido através do uso de sondas esterilizadas (sonda uretral nº 6) que aspira a secreção de nasofaringe por vácuo, após fluidificação da narina com 1 mL de PBS. A definição de casos a serem submetidos à coleta foi realizada por pediatras envolvidos no atendimento das crianças ligadas ao estudo.

Após serem transportadas em condições de refrigeração até o Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, as amostras de lavado e o PBS do tubo com o *swab* nasal do mesmo paciente foram unidas e o resultado aliquoteado em 4 tubos de 1,5 mL para realização de diferentes testes diagnósticos componentes da rotina de detecção de vírus respiratórios do referido laboratório. As amostras utilizadas em nosso estudo encontravam-se em TRIZOL LS (Invitrogen corporation, Carlsbad, California, Estados Unidos) ou BRAZOL (LGC Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil), contendo em uma proporção de 1:3 (250 uL amostras + 750 uL Trizol ou Brazol), ou já no estado de DNA complementar (cDNA).

3.2 Manutenção de células HRT-18G e inoculação de BCoV (Controles positivos)

Devido a grande dificuldade de cultivo de coronavírus humanos e a ausência da possibilidade de obtenção de amostras de coronavírus humanos para uso como controle positivos, utilizamos amostras de cDNA de linhagens de coronavírus bovino (BCoV) como controle positivo dos ensaios moleculares iniciais. O uso de amostras de BCoV como controle positivo foi possível graças a similaridade entre o genoma do BCoV e HCoV-OC43, e principalmente de características dos ensaios de detecção utilizados, caracterizados por apresentarem amplo espectro para coronavírus de diferentes grupo por terem como alvo sítios genéticos altamente conservados entre diferentes coronavírus.

Apesar da possibilidade de uso de produtos da PCR provenientes de amostra clínica positiva para algum coronavírus humano, ou mesmo do uso de plasmídeos contendo o

fragmento alvo dos ensaios moleculares, a utilização de ambos foi evitada com intuito de diminuir a possibilidade de eventos de contaminação nos ensaios moleculares de detecção. Amostras clínicas positivas para HCoV e com coronavírus humano tipificado, foram utilizados apenas em ensaios de detecção molecular genótipo-específico, ou nos ensaios de padronização das técnicas moleculares aplicadas. Por sua vez, a utilização de RNA de BCoV como amostra controle de ensaios moleculares de detecção de coronavírus humanos, representa um controle positivo eficaz e de fácil diferenciação com resultados de coronaviroses humanas após sequenciamento.

Células HRT-18G (células epiteliais de adenocarcinoma retal humano, obtidas do banco de células do Instituto de Biofísica da UFRJ), foram cultivadas e inoculadas com amostras de coronavírus bovino conforme descrito anteriormente (Jerez et al., 2005). A linhagem celular HRT-18G foi estabelecida originalmente em 1974 e apresenta uma alta susceptibilidade a coronavírus bovino, permitindo uma boa multiplicação viral (Tompkins et al. 1974; Vautherot, 1981). A linhagem de células HRT-18G é derivada da linhagem de células HRT-18 e apresentam uma maior suscetibilidade a coronavírus bovino quando comparado a linhagem original de acordo com ATCC American Type Culture Collection, sendo utilizada em diferentes estudos envolvendo cultivo de coronavírus bovino (Lin et al., 1997; Silva et al., 1999; Park et al., 2006).

Resumidamente, monocamadas de células HRT-18G, com 48 h de crescimento em garrafas para Cultura de Tecidos (estéril, com dispositivo de aeração T25-25cm² TPP), foram lavadas com PBS 0,01 M pH 7,2, sendo adicionado 500µl da amostra viral de coronavírus bovinos previamente isolados em cultura no Laboratório de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo. Após 1h de incubação a 37°C/5% CO₂, o inóculo foi dispensado sendo adicionado o meio de manutenção DMEM “High Glucose LGC®” com 2% de soro fetal bovino (Cultilab®). As alterações da monocamada foram observadas com microscópio invertido. Para passagens seriadas, foram utilizadas 1mL da passagem anterior.

Parte dos controles positivos utilizados nos ensaios moleculares iniciais foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo.

3.3 Extração de RNA total e RT-PCR

A extração de RNA total de amostras clínicas e de culturas de células inoculadas com BCoV, foram realizadas a partir de alíquotas em TRIzolTMLS (Invitrogen) ou BRAZOL (LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil), seguindo protocolo dos fabricantes. O protocolo de extração foi realizado em gelo, utilizando centrífuga refrigerada (centrífuga 5804R Eppendorf-rotor F45-36-8, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). Resumidamente, foram adicionados 200 µL Clorofórmio (Merk, Darmstadt, Hessen, Alemanha) gelado aos tubos de amostras, sendo homogeneizadas por 15 segundos em vortex. Os tubos foram então centrifugados a 12.000 x g a 4 °C por 15 minutos. O sobrenadante aquoso, com volume aproximado de 700 µL, foi transferido para novos tubos contendo 500 µL de Isopropanol 100% (Merk) e incubados por 15 minutos em gelo. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. O pellet de RNA resultante foi lavado com 800 µL de etanol 75% e a amostra foi centrifugada a 7.500 x g por 8 minutos a 4 °C sendo o sobrenadante descartado. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente até a evaporação total do álcool adicionado anteriormente. O RNA foi eluído com 50 µL de água livre de DNase e RNase (Invitrogen) sendo imediatamente exposto a reação com transcriptase reversa para geração do cDNA.

A transcrição do cDNA foi realizada com uso do kit comercial “High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems). Foram adicionados a 50 µL de RNA extraído 10 µL de Tampão (10x), 4 µL dNTPs (25x); 5 µL enzima MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/µL), e 21 µL água livre de nucleases, totalizando um volume de 100 µL. A reação foi incubada a 25 °C por 10 minutos, seguido de 37 °C por 120 minutos.

3.4 Real Time PCR (PCR em Tempo Real)

Para detecção e triagem inicial de HCoV em nossas amostras, foi utilizado a técnica de PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) em Tempo Real por ensaios 5' nuclease (Real Time PCR). Neste tipo ensaio são utilizados sondas, oligonucleotídeos específicos ligados a um fluoróforo, ou molécula “Reporter” na extremidade 5', e a uma molécula “Quencher” (silenciadora) na porção 3'. A molécula “Quencher” é responsável por absorver ou dissipar a energia emitida pelo fluoróforo, evitando a captação da fluorescência pelo equipamento de Real Time utilizado (Real Time AB 7300, Applied Biosystems, Foster City, California,

Estados Unidos). As sondas são complementares a sequência alvo viral, flanqueado por sítios de ligação de oligonucleotídeos utilizados na amplificação do fragmento durante os ciclos de amplificação da PCR. Durante a polimerização da nova molécula de DNA pela enzima Taq Polimerase, a sonda é clivada após ser atingida pela polimerase devido a atividade exonuclease 5'-3' da enzima. A clivagem libera o fluoróforo da molécula “silenciadora”, resultando no aumento da fluorescência que é captada a cada ciclo da PCR, aumentando de forma exponencial quando a sequência alvo está presente na reação (Lie e Petropoulos, 1998). O resultado do ensaio Real Time é expresso em valor Ct (ciclo “threshold”).

Valores Ct representam a fração do ciclo onde os instrumentos do equipamento de PCR Real Time podem primeiramente detectar fluorescência exponencial derivada da reação de amplificação (Bustin & Mueller et al., 2005). O sinal de fluorescência durante os ciclos iniciais da PCR se encontram abaixo do “threshold” e define-se como linha base do gráfico de amplificação. O aumento da fluorescência sobre a linha do limete de detecção indica a quantidade do produto de PCR acumulado. O acúmulo é decorrente da amplificação do gene alvo e consequente desintegração das sondas, passando a emitir fluorescência. Quanto menor o Ct, maior a quantidade inicial de DNA alvo pois menor é o ciclo onde o equipamento detectou um aumento significativo de fluorescência (Bustin & Mueller et al., 2005).

O protocolo utilizado para detecção de coronavírus humanos por Real Time foi descrito por Kuypers et al. (2007). Este método permite a detecção em um ensaio único, realizado nas mesmas condições de amplificação, de todos os 4 tipos de HCoV descritos até o momento. O ensaio tem como alvo o gene polimerase (replicase) localizado dentro da ORF1ab, altamente conservado entre os coronavírus. O ensaio com uso de 3 pares de oligonucleotídeos e 2 sondas em um único ensaio molecular (Forward 1/2/3/; Reverse1/2/3; sonda P1/P2) (Quadro3). Utilizamos nas reações sondas com gene reporter FAM na extremidade 5', e Quencher NFQ-MGB na porção 3' junto ao Kit TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos).

Todas as reações foram realizadas em duplicata em um volume final de 20 µL cada utilizando 10 µL de tampão TaqMan Universal Master Mix (2x), 2 µL de cDNA, 100 nM de cada sonda, 500 nM do primer F1, e 250 nM dos primers F2, F3, R1, R2, R3 (Dominguez et al., 2009; Kuypers et al., 2007). A reação foi realizada no equipamento “7300 Real Time PCR System” (Applied Biosystems) seguindo o protocolo de temperatura: 95°C por 10 minutos, e 45 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 30 segundos e uma etapa final de 37°C por 1 minuto.

Os oligonucleotídeos e as sondas deste ensaio “Multiplex” Pancoronavírus, podem ser utilizados em protocolos “monoplex”, capaz de detectar um tipo específico de coronavírus

humano, dependendo da combinação de oligos e sonda utilizados. Para ensaios de detecção do grupo Betacoronavírus (ex: OC43 e HKU1) utilizamos a combinação F1/R1/P1; para detecção de HCoV-229E F3/R3/P2 e NL63 F2/P1/R2. Amostras positivas para o Grupo Betacoronavírus foram submetidas a um ensaio adicional para diferenciação entre HKU1 e OC43 com uso dos Oligos F-OC/R-OC/P-OC específicos para detecção do coronavírus OC43. Todos os ensaios de PCR Real Time foram realizados seguindo mesmo protocolo descrito para reação multiplex pancoronavírus.

A detecção inicial de amostras positivas para HCoV através de ensaios de PCR Real Time Pancoronavírus foi incorporado ao estudo após realização de estágio-treinamento no Laboratório de Coronavírus do Departamento de Microbiologia na Universidade do Colorado, Aurora-Co, EUA, coordenado pela Dra. Kathryn Holmes e pelo Prof. Dr. Samuel Dominguez. Esta metodologia foi originalmente descrita no estudo de Kuypers et al. (2007) e utilizada pelo referido laboratório na análise da presença de coronavírus humanas no Estado do Colorado, EUA (Dominguez et al., 2009).

Diferentemente do método original descrito por Kuypers et al. (2007) e utilizado em Dominguez et al. (2009), cujo a reação de transcrição reversa é acoplada a reação de PCR Real Time sendo utilizado amostras de RNA total como amostra inicial (PCR Real Time de passo único), foram utilizados em nosso estudos amostras em cDNA, gerados com oligonucleotídeos randômicos em uma reação de RT-PCR anterior. Esta adaptação foi realizada uma vez que grande parte das amostras utilizadas nestes estudo eram compostos por amostras desta natureza.

Inicialmente analisamos a viabilidade do uso da técnica de PCR Real Time Pancoronavírus para detecção de coronavírus em cDNA randômico. Foi inicialmente analisado a presença de RNA de coronavírus em 50 amostras de lavado nasofaríngeo, coletadas no inverno de 2007, com uso do protocolo de Real Time original, e comparamos os resultados obtidos com ensaios de PCR Real Time com uso de cDNA, PCR Pancoronavírus convencional, e ensaios de PCR convencional genótipo-específico de HCoV utilizando as mesmas amostras.

As reações de Real Time PCR Pancoronavírus com uso de RNA, foram realizadas em um volume de 25 uL utilizando 1 uL de RNA, 1,5 mM Mg, 0,2 uM de cada oligonucleotídeo, 200 uM de cada base de dNTP e 0,75 U de enzima no termociclador Veriti (Applied Biosystems) utilizando Kit RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System e equipamento de Reação de PCR Real Time LightCycler 480 (Roche). O ciclo de temperatura utilizado foi o mesmo publicado por Kuypers et al. (2007), sendo realizado com uma etapa

inicial de RT-PCR de 15min a 50⁰C, 2min 95⁰C, seguido de 45 ciclos de amplificação 95⁰C por 15 e 60⁰C por 30 segundos, e uma etapa final de 37⁰C por 1 minuto.

Algumas amostras positivas e algumas negativas pelo ensaio de PCR Real Time Pancoronavírus de passo único (“Real Time PCR One step”) (Dominguez et al., 2009; Kuypers et al., 2007), foram utilizadas em ensaios de PCR Real Time Pancoronavírus modificado, utilizando os mesmos oligonucleotídeos e sondas do método descrito por Kuypers et al., (2007) porém com uso de cDNA obtido após RT-PCR com oligonucleotídeos randômicos, também em ensaios dePCR convencional Pancoronavírus (Canduccci et al., 2008), capaz de detectar em uma única reação todos os tipos de HCoV; e PCR específica para cada genótipo de HCoV (Bastien et al., 2005; Dominguez et al., 2009; Woo et al., 2005). Os protocolos utilizados e as seqüências dos oligonucleotídeos e das sondas estão descritas nas respectivas referências no Quadro4.

Quadro 4_Características dos oligonucleotídeos e sondas utilizadas no presente estudo.

Seqüência (5'- 3')	Gene Alvo	Virus Alvo	Tamanho amplicom	Método de detecção	Referência
F1: TGGTGGCTGGGACGATATGT F2: TTTATGGTGGTTGGAATAATATGTTG F3: TGGCGGGTGGGATAATATGT F-OC43: CCTTATTAAAGATGTTGACAATCCTGTAC R1: GGCATAGCACGATCACAATTAGG R2: GGCAAGCTCTATCACATTTGG R3: GAGGGCATAGCTCTATCACACTTAGG R-OC43: AATACGTAGTAGGTTTGGCATAGCAC P1: ATAATCCCAACCCATRAG P2: ATAGTCCCATCCCATCAA POC43: CACACTTAGGATAGTCCCA	Polimerase (1b)	229E, OC43, NL63, HKU1	103pb	Real Time Pancoronavirus e específico	Kuypers et al., 2007
F-229E: AGTCGCGGTCGTGGTGAATC R-229E: CAGTGTTCCTGACTCTTTG	Nucleocapsídeo	229E	480pb	PCR específica 229E	Dominguez et al., 2009
F-OC43: TGCCTATTGCACAGGAGTC R-OC43: TCAGCCATGTCAGGTGTAC	Nucleocapsídeo	OC43	425pb	PCR específica OC43	Dominguez et al., 2009
F-NL63: AGATGAGCAGATTGGTTATTGG R-NL63: GAAGAGTCTCGTGAGTTGTAC	Nucleocapsídeo	NL63	323pb	PCR específica NL63	Bastien et al., 2005
F-HKU1: GGTGGGACTATCCTAAGTGTGA R-HKU1: CCATCATCAGATAGAAATCATATA	Polimerase (1b)	HKU1	473pb	PCR específica HKU1	Woo et al., 2005
F1-PanCov: TTATGGGTTGGGATTATCCYAARTGTGAT F2-PanCov: ATGGGATGGGACTATCCTAAGTGTGATAGAG R1-PanCov: GTACTAGCRTCACCAAGTYGTACCACC R2-PanCov: TTGCATCACCACRCTAGTRCCACCAGGC	Polimerase (1b)	229E, OC43, NL63, HKU1	215pb	PCR convencional Pancoronavirus	Canducci et al., 2008
HKU1 F_Nested: CGTGCTATGCCAAATATTTTGGC HKU1 R_Nested: TAGCAACCGCCACATAACT OC43 F_Nested: GGTATTAGCCGAAAAACATGAGACA OC43 R_Nested: ACAGCCACACACATAACAA 229E F_Nested: CCAATGATTCGTATGTTGTGGCT 229E R_Nested: CCTCGGTCAAACTTGAGCAAGC NL63 F_Nested: GATTTACGCCATGGTGTGGGCTC NL63 R_Nested: CTTCTGTTAAACTTGTGCCAAC	Polimerase (1b)	229E, OC43, NL63, HKU1	143pb (HKU1) 110pb(OC43) 116pb(229E) 100pb(NL63)	Nested PCR específico	Presente estudo

F: Primer Sense; R: Primer Antisense; P: Sonda Fam-MGB.

FONTE: Góes LGB, 2012

3.5 PCR e Nested PCR

Amostras de resultado positivo para HCoV na reação de Real Time Pancoronavírus foram tipificadas com uso de uma segunda estratégia molecular, PCR convencional Pancoronavírus, previamente descrito por Canducci et al., 2008, capaz detectar até 10⁶ cópias

do gene alvo. Este experimento foi projetado para permitir a detecção de todos os HCoV conhecidos até o momento (HCoV-229E, OC43, HKU1 e NL63) com uso de 2 pares de oligonucleotídeos degenerados em uma reação de PCR convencional única, caracterizando uma PCR “multiplex Pancoronavírus”.

Com intuito de padronizar a reação de PCR Pancoronavírus (Canducci et al., 2008) foram realizadas testes para determinar a concentração ótima de oligonucleotídeos e a sensibilidade da PCR através de diluições seriadas do cDNA de culturas inoculada com BCoVs. Foram testadas 3 concentrações diferentes de oligonucleotídeos na reação, sendo elas 1 μ M, 0,2 μ M e 0,1 μ M de cada oligonucleotídeo. Também foram analisadas a amplificação utilizando diferentes quantidades do cDNA controle, diluído 10 (10^{-1}), 100 (10^{-2}) e 1000 vezes (10^{-3}). As reações foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems), e após padronizadas, foram realizadas em um volume final de 25 μ L utilizando 2,5 μ L de cDNA, 1,5 mM Mg, 1 μ M de oligonucleotídeos e 200 μ M de cada base de dNTP e 0,75 U de enzima. Utilizamos inicialmente como controle positivo amostras de cDNA de coronavírus bovinos, capazes de serem amplificadas pela PCR convencional. Todas as reações de PCR realizadas incluíram controles negativos e positivos (cDNA BCoV).

Com intuito de aumentar a sensibilidade do método descrito por Canducci et al., (2008), e tipificar amostras positivas por Real Time que tenham apresentado resultado negativo pela PCR convencional, consequência de sua menor sensibilidade, desenvolvemos oligonucleotídeos para realização de ensaios de Nested PCR, inicialmente apenas para HKU1, e posteriormente para os outros tipos de HCoV. Os oligonucleotídeos foram desenhados com base em sequências de cada tipo viral obtidas pela PCR convencional assim como de sequências de coronavírus depositados no GenBank (Quadro 3). Resumidamente, sequências de diferentes coronavírus humanos e genótipos dos coronavírus foram obtidos do GenBank e alinhados com auxílio do programa BioEdit. Elaboramos os oligonucleotídeos buscando, dentro do fragmento amplificado pela PCR Pancoronavírus (Canducci et al., 2008), regiões mais variáveis entre os diferentes tipos de coronavírus (229E, OC43, NL63 e HKU1) para anelamento dos oligos, porém, ao mesmo tempo, mais conservados entre os 3 diferentes genótipos de coronavírus HKU1 (HKU1 genótipo A, B e C) e dois subtipos de NL63 (NL63-A, NL63-B). Um terceiro subtipo de HCoV-NL63 foi apenas recentemente descrito (Dominguez et al., 2012), porém todos os ensaios do presente estudo utilizados na detecção deste vírus, são teoricamente eficientes para sua amplificação, já que a região alvo é 100% similar entre os subtipos.

O oligonucleotídeo “Forward” (Consenso) do ensaio Nested PCR-HKU1 foi elaborado com uma degeneração devido a presença de uma base nitrogenada diferencial entre os genótipos A e B de HKU1. Os oligonucleotídeos mostraram-se eficientes no ensaio de Nested PCR para amplificação utilizando como controle os amplicons da PCR positiva para o genótipo. A padronização da PCR Nested HKU1, e de outros tipos virais, foi realizada utilizando diferentes concentrações de oligonucleotídeos e amostras positivas genotipadas anteriormente. As reações, após padronizadas foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems) em um volume final de 25 uL utilizando 10uL do produto da PCR, 1,5mM Mg, 1uM de cada oligonucleotídeo, 200 uM de cada base de dNTP e 0,75 U de enzima polimerase.

O fluxograma geral dos métodos de detecção e tipificação viral utilizados no presente estudo está representado na figura 8.

Figura 8_Fluxograma geral dos métodos de detecção e tipificação viral do presente estudo.

O sinal (+) indica a obtenção de resultados positivos pelo ensaio molecular. O sinal (-) indica a obtenção de resultados negativos no ensaio molecular.

FONTE: Góes LGB, 2012

3.6 Análise e purificação dos produtos amplificados

Os produtos amplificados nos ensaios de PCR e Nested PCR foram analisados através de corrida em gel de agarose 2%, em tampão TBE 1x (89 mM – tris HCL; 89 mM H_3BO_3 ; 2 mM Na_2EDTA , pH 8,3 – InvitrogenTM) e corado com 25ug brometo de etídeo (Edt BR – Digms) para cada 100mL de agarose. Aplicamos 16 μL da reação de PCR junto a 4 μL de tampão de aplicação em gel (“gel loading buffer BlueJuiceTM”(10x) (InvitrogenTM). O gel foi submetido a eletroforese, em cuba horizontal, durante 50 min a 100 volts. Amplicons visíveis em luz ultravioleta (UV) com tamanho esperado de ~200 pb tiveram suas bandas extraídas diretamente do gel com uso do kit de extração “Qiaquick Gel Extraction Kit” (Qiagen, Valencia, California, Estados Unidos) seguindo protocolo do fabricante.

3.7 Sequenciamento e construção de árvore filogenética

Os produtos de PCR foram seqüenciados utilizando kit “ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Big Dye - Applied Biosystems, Inc., EUA), de acordo com as instruções do fabricante, no seqüenciador automático “ABI Prism 3100 DNA Analyzer” (Applied Biosystem). Foram utilizados nas reações de 10 a 50 ng do produto de PCR purificado, quantificadas visualmente em gel de agarose com uso de marcador de concentração “Low DNA Mass Ladder “(Invitrogen).

Reações em volume final de 10 μL , com 2 μL do kit ABI PRISM DyeTM Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Big Dye v3.1 Applied biosystems), 2 μL de tampão “Save Money 5x”, 1 μL de primer a 3.2 pmol/ μL , e o restante com água DEPC (Invitrogen) e amostras, sendo realizado 1 reação para cada oligo da ensaio de PCR anterior. Foram utilizados os mesmos oligonucleotídeos da PCR convencional Pancoronavírus descritos anteriormente. A reação foi exposta a termociclagem no equipamento MasterCycler Gradient Eppendorf, sendo pré-aquecido a 96 °C por 5 min, seguido de 25 ciclos cada um deles composto de 10 seg a 96 °C, seguidos de 15 seg a 50 °C e 4 min a 60 °C. Os produtos foram seqüenciados após purificação com o kit Big Dye X-TerminatorTM Purification Kit (Applied Biosystems), seguindo protocolo do fabricante.

As seqüências obtidas foram alinhadas e analisadas, junto a outras seqüências de coronavírus presentes no banco de dados GeneBank com uso do software BioEdit v7.0.9. A construção da relação filogenética foi inferida pelo método de “neighbor-joining, NJ” (Tamura et al., 2007) com 1000 repetições e a distância evolucionária foi computada utilizando método de Máxima verossimilhança (“Maximum likelihood”), e é representada

pelo número de substituições de nucleotídeos por sítio. A análise foi realizada pelo programa MEGA4 (Tamura et al., 2007).

3.8 Cultivo de cepas de HCoV-HKU 1 e análise de sequências do gene Spike

Com intuito de melhor caracterizar isolados do coronavírus HKU-1 circulantes no Brasil e adquirir o conhecimento da tecnologia de replicação viral em modelos de cultura primária de células epiteliais pulmonares não imortalizadas, foram realizados ensaios de replicação de cepas brasileiras de HCoV-HKU-1 no Laboratório de Coronavírus do Departamento de Microbiologia da Universidade do Colorado, CO, EUA. O sucesso na replicação *in vitro* do coronavírus HKU1 foi apenas recentemente alcançado (Pyrk et al., 2010) sendo, até o momento, o único relato de cultivo deste vírus na literatura. Recentemente, a equipe dos Professores Kathryn V. Holmes e Samuel Dominguez, cultivaram o HCoV-HKU1 com sucesso, em células epiteliais brônquio-alveolares de pulmão humano (do inglês “Human trachealbronchial epithelial cells” - HTBE), sistema celular similar ao utilizado por Pyrc et al. (2010).

O fluxograma das etapas para o cultivo de cepas de HKU1 está descrito na figura 9.

Figura 9_Fluxograma geral do cultivo de cepas brasileiras de HKU1.

FONTE: Góes LGB, 2012

3.8.1 Amostras utilizadas na inoculação e controle positivos

Encaminhamos para o laboratório da Universidade do Colorado, CO-EUA amostras de lavado nasofaríngeo (LNF) previamente descritas como positivas para coronavírus HKU1 através de PCR e sequenciamento. Foram utilizadas 7 amostras nos primeiros ensaios de inoculação (Quadro 5).

Quadro 5 Lista de amostras utilizadas nos experimentos de inoculação viral

N ^o identificação	ID original	Ano de coleta	Valor Ct do PCR RT	Genótipo de HCoV	Co- infecção	Solução de congelamento	Volume amostral
Br1	1246	2006	22	HKU1A	-	PBS 1x	0,4mL
Br3	2141	2007	25,1	HKU1A	-	PBS 1x	1mL
Br4	1233	2006	25,08	HKU1A	-	PBS 1x	1mL
Br6	366	2005	26,67	HKU1C	-	PBS 1x	1mL
Br7	392	2005	29,45	HKU1B	-	PBS 1x	1mL
Br8	2398	2007	30,06	HKU1B	-	PBS 1x	1mL
Br10	1081	2006	31,28/31,8	HKU1A	-	Meio de cultura	1mL

FONTE: Góes LGB, 2012

Para a escolha das amostras encaminhadas para o exterior, foram seguidas as seguintes características: i. positividade para HKU1; ii. negatividade para outras vírus respiratórios como RSV, Influenza, parainfluenza, adenovírus, picornavírus e outros tipos de coronavírus que não HKU1; iii. menor valor do “Ct” no ensaio de PCR Real Time (característica relacionada com a maior quantidade material viral inicial); iv. uso de alíquotas de amostra não descongeladas anteriormente. As amostras encontravam-se congeladas em freezer -80°C, mantidas em PBS ou meio MEM com 5% SFB.

Como controle positivo do ensaio de inoculação, foram utilizados isolados Norte americanos de HKU1 previamente cultivados no laboratório da Universidade do Colorado, CO, EUA, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Samuel Dominguez.

3.8.2 Manutenção de Células HTBE.

O vírus HKU1 foi cultivado em monocamada da cultura primária de células epiteliais brônquio-alveolares de pulmão humano crescidas sobre membranas de colágeno porosas denominadas de insertos (do inglês “inserts”) (Figura 10). As células, obtidas pelo laboratório

de Coronavírus do Departamento de Microbiologia da Universidade do Colorado, são comercializadas pela empresa Life Line Cell Technology, Walkersville, MD, EUA. No único estudo publicado a respeito do cultivo do coronavírus HKU1, foram utilizadas células não comerciais HEA (“Human Epithelial Airway cells”) em um sistema similar (Pyrce et al., 2010).

No presente estudo, criotubos contendo 5×10^5 células foram descongelados e as células foram mantidas submersas em garrafa T75 com meio específico para esta linhagem (Bronchial B/T Medium Complete Kit, Lifeline, Walkersville, MD, EUA) sendo as células mantidas a $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{ CO}_2$. Após 3 dias, as células foram tripsinizadas (Trypsina-EDTA 1x-Gibco) e transferidas para os insertos, caracterizado como uma membrana permeável de colágeno, com poros de $0.4 \mu\text{m}$ denominados “Collagen-Coated Transwell® -COL Inserts” (Corning, Life Sciences, Lowell, MA, EUA), onde é simulado o ambiente pulmonar. Neste modelo, a monocamada celular permanece em contato com a membrana de colágeno na face basal, e em contato com ar na face superior, criando uma interface ar-líquido (“true air condition”), simulando a característica histológica do ambiente pulmonar (Figura 10).

Foram transferidos para cada inserto de colágeno 94×10^4 células e 39×10^4 células, para placa com 12 e 6 poços respectivamente. A contagem da concentração de células viáveis na garrafa T75 foi realizada com uso da solução Trypan Blue (Hyclone) e com hemocítmetro (câmara de Neubauer). Em seguida foi adicionada a superfície basal 0,5 a 1,5mL de meio de cultura dependendo do número de poços da placa (12 e 6 poços respectivamente). Após 8h, o meio de cultura foi trocado por um meio de diferenciação composto de 50% de meio D-MEM com alta concentração de glicose (4500mg/L Glicose), 4mM L-glutamina e piruvato de sódio (Gibco Cat N° 11995-065), com 1% BSA, 25nM ácido retinóico e 1.1mM CaCl_2 , e 50% do meio “Bronchial B/T Medium” (LifeLine, EUA).

As células foram então mantidas em insertos por 3 a 4 semanas, para sofrerem diferenciação para células ciliadas, em meio de diferenciação celular da mesma empresa (BronchiaLife Basal Medium_LifeLine Cell Technology, EUA). O meio de cultura foi trocado a cada 24h. Primeiramente o meio contido na superfície apical e basal foram aspirados, sendo o novo meio adicionado apenas na superfície basal do inserto para simulação da situação do ambiente pulmonar através da interface ar-líquido.

Figura 10_Metodologia de cultivo de células HTBE em insertos de colágeno.

A_Representação do inserto; B_Placa de 12 poços abrigando 12 insertos.; C_Imagem da observação de células crescidas sobre inserto em magnificação de 50x.

FONTE: Góes LGB, 2012

3.8.3 Inoculação viral em células HTBE

Após 3 semanas e meia de manutenção das células em insertos, as células foram inoculadas com as amostras biológicas brasileiras positivas para HKU1 (Br1, 3, 4, 6, 7, 8 e 10) e controles positivos obtidos de experimentos de inoculação anteriores realizados no laboratório no exterior. Ambas amostras utilizadas nas inoculações foram diluídas 10x com DMEM1% BSA, sendo adicionado 150 μ L e 250 μ L respectivamente, para placas de 12 e 6 poços. Após 4h a 34⁰C, o inóculo foi retirado da superfície apical do inserto, sendo adicionada posteriormente, a superfície basal, 0,5 ou 1,5 mL de meio de diferenciação. Foram realizadas lavagens diárias da monocamada do inserto a cada 24h utilizando DMEM 1% BSA, por 5 dias, sendo realizado 3 lavagens com volume de 100 μ L cada. Posteriormente 100 μ L da lavagem foi utilizado para ensaios de PCR em Tempo Real e 200 μ L para novo ensaio de inoculação (dependendo da amostra). Os tubos com as lavagens foram rapidamente congeladas em solução de álcool e gelo seco, e imediatamente transferidas para freezer -80⁰C. O meio de cultura da região basal foi trocado diariamente. No quinto dia a monocamada celular foi fixada com Metanol 100% para posterior análise da infecção viral pelo método de Imunofluorescência indireta. As alíquotas de 100 uL das lavagens dos diferentes dias após a infecção (1 a 5 dpi, do inglês “days post infection”, dias pós-infecção,) foram utilizadas nos

ensaios de PCR Real Time para análise quanto ao aumento gradual da carga viral após a inoculação.

Após a realização dos experimentos de imunofluorescência e Real Time PCR, foram selecionados 3 amostras brasileiras com melhor resultados na qPCR analisando o valor do Ct para um segundo ensaio de inoculação. Ensaios adicionais de inoculação também realizadas com uso de amostras de lavados nasofaríngeos originais.

3.8.4 Imunofluorescência Indireta

O ensaio de Imunofluorescência indireta foi realizado seguindo protocolo desenvolvido no laboratório da Universidade do Colorado com uso de anticorpos primário policlonal de coelho (Anticorpo 1814) anti proteína spike do vírus HKU1, e anticorpo secundário policlonal de Cabra anti-anticorpo de coelho (IgG) (AlexaFluor 488). Este anticorpo emite fluorescência no mesmo comprimento de onda de anticorpos conjugados com fluoresceína isotiocianato (FITC) podendo ser observado em filtros de fluorescência (FITC). O protocolo em questão, utilizado em diferentes estudos da biologia viral do vírus HKU1 no presente laboratório, ainda não foi publicado, não sendo possível referenciar o protocolo de produção do anticorpo 1814.

No ensaio, placas cujos poços foram preenchidos com metanol 100% no quinto dia após a inoculação viral, tiveram o metanol aspirado sendo realizada uma rápida lavagem com PBS 1x (120 g NaCL, 21.6 g NaCl, 3 g KCL, 40g KH₂PO₄, 15 L, pH 7.4). Após retirada do PBS, foi adicionado até o preenchimento completo do poço contendo o inserto um tampão de Imunofluorescência composto de 48.3 mL PBS1x, 667 µL BSA 7,5% (Fraction V-Invitrogen) e 1mL de soro de cabra normal (do inglês normal goat serum), sendo a placa incubada por 1h a 37⁰C. Em seguida, o volume do tampão foi aspirado sendo adicionado 100 µL (placa de 12 poços) ou 250 µL (placa de 6 poços) da solução do anticorpo primário 1814 (0,675 mg/mL), diluído 100 x com tampão da imunofluorescência. A placa foi então incubada por 1 h a 37⁰C sendo o volume aspirado em seguida. Foram realizados então 3 lavagens com tampão de imunofluorescência para retirada de anticorpos livres sendo cada lavagem realizada através da adição de PBS e incubação da placa por 15 min a 37⁰C. Após a terceira lavagem, foi adicionado a solução do Anticorpo Alexafluor 488 cabra anti IgG de coelho diluído 1000 x em tampão de imunofluorescência no mesmo volume utilizado para o anticorpo primário. Após 1h a 37⁰, o volume foi aspirado e foram realizadas novas lavagens conforme descrito anteriormente. Por fim, a membrana de colágeno foi colocada sobre uma

lâmina sendo a membrana circular cortada com estilete cuidadosamente. Foi gotejada a solução “Medium Mount with DAPI” contendo a solução DAPI capaz corar o núcleo das células. Finalmente, foi adicionada a lamínula sobre a membrana cortada, sendo então suas margens seladas com esmalte para unhas. As lâminas foram devidamente identificadas e observadas no microscópio invertido Eclipse TE2000-U da Nikon, combinado com um emissor de luz fluorescente.

3.8.5 Extração RNA e PCR em Tempo Real

Amostras de lavado nasofaríngeo positivos para HKU1 (inóculo original) diluído 10x, assim como as lavagens realizadas nas monocamadas inoculadas a cada 24h por 5 dias (1^o ao 5^o dia após a inoculação viral), tiveram seu RNA extraído com uso do equipamento de extração automática EZ1-Robot (Qiagen, EUA) e o kit de Extração de material genético viral Qiagen EZ-1 Virus Mini Kit (Qiagen, EUA) seguindo protocolo do fabricante. Foi utilizado 100 µL de amostra na extração, sendo o RNA final eluído em 60 µL. Para a realização deste ensaio foram selecionadas amostras previamente positivas pelo Imunofluorescência Indireta.

O RNA extraído das amostras utilizadas para inoculação (0 dpi) e de lavagens da monocamada inoculada (1-5dpi) foram submetidos ao ensaio de Real Time PCR descrito por Kuypers et al. (2007) com uso da enzima UltraSense qPCR Kit (Invitrogen, EUA) e o equipamento de PCR Real Time Roche Light Cycler 480/384 roche plate (Roche, EUA). Utilizamos sondas com gene repórter FAM na extremidade 5' (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As amostras foram amplificadas a partir de uma etapa de Transcriptase reversa, seguida de ciclos de amplificação viral 50^oC/15min; ciclo de 95^oC/2min; 40 ciclos de 95^oC /15seg e 60^oC por 30 segundos. A reação foi realizada com um par de oligonucleotídeos e uma sonda, específicos para detecção de coronavírus do grupo Betacoronavírus como descrito anteriormente (Kuypers et al. 2007) com 1 µL da enzima, 4 µL Buffer 5x, 0,5 µL MgSO₄ e 0,6 µL H₂O estéril DEPC.

3.8.6 Sequenciamento do gene Spike

Como atividade adicional, foram selecionados 3 amostras pós-cultivo de coronavírus HKU1 de isolados brasileiros para tentativa do sequenciamento completo do gene “Spike”. A realização desta etapa adicional tinha como objetivo gerar sequências do gene S para confirmação da subtipagem de genótipos de HKU1 brasileiros, assim como a comparação

direta com sequências do gene S de cepas norte-americanas e mundiais com intuito de verificar a presença ou não de uma grande variabilidade genética entre os mesmos subtipos de coronavírus HKU1. As amostras selecionadas foram Br1 e Br10, de genótipo HKU1-A, e Br8, cujo genótipo é HKU1-B.

As amostras de lavagens da inoculação anterior utilizadas foram as realizadas 3 dias após a inoculação (3dpi), por apresentarem menores valores Ct na PCR Real Time. Estas amostras tiveram seu RNA utilizado no ensaio de transcriptase reversa (RT-PCR) para geração das moléculas de cDNA. Este ensaio foi realizado com enzima Superscript III RT-PCR Kit seguindo protocolo do fabricante (Invitrogen, EUA) com uso de oligonucleotídeos randômicos e enzima RNase OUT (Invitrogen, EUA). O cDNA obtido foi então utilizado em uma reação de PCR convencional com um conjunto de oligonucleotídeos desenvolvidos no Laboratório da Universidade do Colorado a partir do alinhamento das sequências do gene Spike de diferentes subtipos de HKU1 depositadas no GenBank.

Foram realizadas reações de PCR para amplificação do gene “Spike” em uma única reação utilizando oligonucleotídeos flanqueadores do gene, gerando um fragmento de 4,5kb. Também testamos a amplificação do gene em sua totalidade através da realização de 2 reações compreendendo as 2 metades do gene S. Testamos 2 diferentes enzimas, Phusion taq (Finnzymes, EUA) e Accuprime (Invitrogen, EUA) seguindo protocolos propostos pelos fabricantes. Utilizamos em ambas as reações 0,2 uM de concentração dos oligonucleotídeos, 1uL amostra de cDNA, e 1 U por reação de 50 uL de volume final. Produtos da PCR foram purificados em gel de agarose com kit de Extração QIAGEN Gel Extraction Kit (Qiagen, EUA) ou expostas a reação com enzima ExoSap-IT (USB, EUA), seguindo protocolo dos fabricantes. Os produtos da purificação foram então sequenciados pelo centro de sequenciamento da Universidade do Colorado com uso de todos os oligonucleotídeos elaborados.

As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas conforme descrito anteriormente .

4 RESULTADOS

4.1 Padronização do ensaio de PCR Convencional Pancoronavírus

Com objetivo de gerar controle positivo para ser utilizado nas reações de detecção de coronavírus em amostras clínicas humanas, células HRT-18G foram cultivadas e inoculadas com amostras de coronavírus bovino conforme descrito anteriormente (Jerez et al., 2005).

Amostras de cDNA de BCoV foram gerados a partir do RNA total obtidos de culturas celulares inoculados apresentando efeito citopático do tipo sincicial característico. A obtenção deste controle positivo era uma etapa crítica para o início de nosso estudo, já que não tínhamos disponível controles positivos de coronaviroses humanas.

Com intuito de padronizar a reação de PCR Pancoronavírus (Canducci et al., 2008) foram realizadas testes para determinar a concentração ótima de oligonucleotídeos e a sensibilidade da PCR através de diluições seriadas do cDNA de culturas inoculada com BCoVs. Foram testadas 3 concentrações diferentes de oligonucleotídeos na reação, sendo elas 1 μM , 0,2 μM e 0,1 μM de cada oligonucleotídeo. Também foram analisadas a amplificação utilizando diferentes quantidades do cDNA controle, diluído 10 (10^{-1}), 100 (10^{-2}) e 1000 vezes (10^{-3}) (Figura 4). A PCR Pancoronavírus com 1 μM de cada oligonucleotídeo gerou bandas com maior intensidade. A reação utilizando esta concentração de oligonucleotídeos foi notavelmente o protocolo mais eficiente. No entanto, também foi observado nesta condição de 1 μM uma maior quantidade de “Primers-Dimers” (Figura 11). A quantidade de “Primer-Dimers” foi inversamente proporcional a quantidade de cDNA viral presente na amostra, indicando que os oligos tendem a ser utilizados na amplificação do fragmento alvo e não reagir entre si. Ensaios com 0,2 μM e 0,1 μM de oligos geraram bandas únicas, sem a produção de “primer-dimer”, porém a intensidade da banda gerada foi menor quando comparado a reação com 1 μM de oligos..

Uma vez que a quantidade de cDNA obtido de amostras clínicas deve ser menor do que a quantidade viral em cultura, foi utilizado em todas as reações de PCR convencional a maior concentração de oligos testado.

Figura 11_Gel de agarose da PCR de padronização.

Foto-documentação de Gel de agarose 2% com cores invertidas da reação de padronização da PCR Pancoronavírus. Foram realizadas variações na concentração de oligonucleotídeos e de cDNA inicial. Legenda: PM_peso molecular de 100pb; 10⁻¹_controle positivo diluído 10x; 10⁻²_controle positivo diluído 100x; 10⁻³_controle positivo diluído 1000x; C-1_controle de cultura não inoculada não diluído; C-H₂O _controle negativo da reação contendo apenas água pura. PD_Primer Dimer.

FONTE: Góes LGB, 2012

4.2 Análise da presença de HCoV em amostras de 1995 por PCR Pancoronavírus

O estudo da ocorrência de HCoV em amostras clínicas foi iniciado com ensaios de PCR convencional Pancoronavírus descrito por Canducci et al. (2008), uma vez que ainda não pretendíamos utilizar o método de PCR Real Time para a triagem de amostras positivas para coronavírus. Das 169 amostras analisadas, duas amostras apresentaram amplicom compatível com o tamanho esperado, com aproximadamente 220pb (Figura 12).

Figura 12_Gel agarose da PCR Pancoronavírus em de amostras de 1995

Foto-documentação de cores invertidas do gel de agarose 2% da PCR Pancoronavírus das amostras 152 a 169 de 1995. A seta indica a banda referente a amplificação de coronavírus humano.

FONTE: Góes LGB, 2012

Para a confirmação da detecção de coronavírus humano e para se determinar o tipo do coronavírus amplificado, foi realizado o sequenciamento do produto da PCR da amostra positiva para coronavírus. A sequência obtida foi depositada no banco de dados GenBank (acesso FJ931534.1). Apesar de terem sido sequenciados fragmentos de 220pb, analisamos e depositamos uma sequência de 173 pb, uma vez que queríamos evitar a presença das bases

provindas das degenerações dos oligonucleotídeos utilizados. A sequência obtida foi analisada e apresentou 100% de homologia com HCoV-HKU1 genótipo B (AY884001.1).

4.3 Análise específica da presença de HKU-1 em amostras de 1995

Com intuito de aumentar a sensibilidade da PCR para detecção de HCoV-HKU1 e realizar uma análise mais aprofundada a respeito da presença deste vírus em nossa amostragem do ano de 1995, através do aumento da sensibilidade do ensaio de PCR, desenvolvemos oligonucleotídeos para ensaio de Nested PCR. Foi priorizado o desenvolvimento do ensaio de Nested PCR inicialmente apenas para HCoV-HKU1 por este ser o coronavírus mais recentemente descoberto, o único tipo de coronavírus detectado no estudo até aquele momento, o único com sequência conhecida de cepa oriundo do Brasil e pela detecção representar uma evidência de sua circulação anteriormente a sua descrição em 2005 (Woo et al., 2005).

Após verificação da viabilidade do ensaio em amostra positiva para HCoV-HKU1, as 169 amostras providas da PCR Pancoronavírus foram submetidas a Nested PCR específica para HKU1. A amostra 169 foi utilizada como controle positivo de todas as reações. Foram detectadas 5 amostras positivas adicionais para HKU-1 (amostras 9, 37, 90, 99 e 104) (Figura13). A amostra 104 apresentou resultado positivo na repetição da PCR convencional.

Figura 13_Geis de agarose da Nested PCR de amostras de 1995.

Gel de agarose 2%, sendo as cores da foto-documentação invertida, de amostras clínicas submetidas a Nested-PCR. Legenda: 2-105_número respectivo da amostra; C+1 e C+2_ controle positivo (amostra 169). C-H₂O_controle negativo. PM_peso molecular de 100pb.

FONTE: Góes LGB, 2012

As sequências obtidas de cada Nested PCR foram também depositadas no banco de dados GenBank (acessos GU904423, GU904424, GU904425, GU904426, GU904427). Apesar do fragmento da amplificação ter 149pb, depositamos uma sequência de 143pb para cada amostra, de maneira a evitar a presença de bases originadas da degeneração dos oligonucleotídeos.

A genotipagem foi obtida pela análise da relação filogenética inferidas utilizando o método “Neighbor-Joining”, e pelos resultados obtidos no programa BLAST (figura 14). Os resultados indicaram a possível circulação dos 3 subtipos de coronavírus humano HKU1, HKU1-A, B e C. A circulação dos subtipos A e B foram posteriormente confirmadas após a replicação *in vitro* de coronavírus HKU1 e sequenciamento do gene Spike de 3 isolados.

Figura 14_Árvore filogenética de sequências de amostras de 1995 positivas para coronavírus.

Árvore filogenética gerada por Bootstrap e método “Neighbor-Joining” da sequência de 143pb obtidas das amostras 9, 37, 90, 99, 104, 169, obtidas em 1995 e do controle positivo BCoV.

FONTE: Góes LGB, 2012

4.4 Padronização do ensaio PCR Real Time Pancoronavírus

A triagem inicial de amostras positivas para coronavírus utilizando a técnica de PCR Real Time Pancoronavírus foi incorporado ao estudo após realização de estágio-treinamento no Laboratório de Coronavírus do Departamento de Microbiologia na Universidade do Colorado, Aurora-Co, EUA, coordenado pela Dra. Kathryn Holmes., onde foram realizados os ensaios iniciais.

Com intuito de testar a viabilidade do uso da técnica de PCR Real Time de detecção

de coronavírus em cDNA randômico, comparamos diretamente diferentes ensaios moleculares para detecção de coronavírus humano em uma pequena amostragem de 2007. Foram obtidos resultados positivos similares pelos ensaios de (i) PCR em Real Time de passo único, cuja reação de RT-PCR (PCR por Transcriptase Reversa) com a geração do cDNA viral específico aos oligos esta acoplada a reação de amplificação do fragmento de cDNA (Dominguez et al., 2009; Kuypers et al., 2007); (ii). ensaios de PCR Real Time com uso de cDNA randômico, gerado por uma reação de transcriptase reversa anterior; (iii). PCR convencional Pancoronavírus (Canducci et al., 2008), (iv). ensaios de PCR específico para cada tipo de coronavírus humano (4 ensaios) (Bastien et al., 2005; Dominguez et al., 2009; Woo et al., 2005).

O ensaio de PCR Real Time de passo único gerou 3 resultados positivos (amostra 09 (numeração original 1844-2007), amostra 32 (numeração original 2138-2007), e 36 (numeração original 2151-2007) além de 1 resultado não conclusivo (amostra 49, numeração original 2236-2007) (Figura 15).

Figura 15_Resultado do ensaios de PCR Real Time com uso de RNA.

Resultado obtido no ensaio de Real Time PCR de passo único realizado com no equipamento LightCycler 480 (Roche) utilizando Kit RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen). Seis (6) amostras e controle negativo de H₂O estão presentes no gráfico.

FONTE: Góes LGB, 2012

Selecionamos as 3 amostras positivas pelo primeiro ensaio de PCR Real Time (amostras 32, 36, 09), uma amostra com resultado inconclusivo (amostra 49) e outras 5 amostras de resultado negativo (amostras 08, 13, 16, 24, 47) para realização dos outros ensaios propostos. O cDNA foi gerado conforme descrito anteriormente. Amostras de cDNA

resultante foram analisadas por PCR Real Time Pancoronavírus, PCR convencional Pancoronavírus e reações de PCR específicas para cada genótipo de HCoV. Utilizando método de Real Time com uso de cDNA, metodologia adaptada para uso em nosso estudo, obtivemos as mesmas 3 amostras positivas (amostra 09, 32, 36) e dois com resultado não conclusivo (amostras 13 e 49) sendo a amostra 49 aparentemente positiva (Figura 16). Como resultado das PCRs específicas para HCoV- 229E, OC43, NL63 e HKU1, detectamos 4 amostras positivas no total, sendo duas amplificações provenientes do ensaio com oligos específicos para HCoV-HKU1 (amostra 09, 36) e duas para HCoV-229E (amostra 32, 49)(Figura 17).

Após sequenciamento dos fragmentos amplificados, foi confirmado a detecção do HCoV-OC43 (amostra 9-2007), detectado pelo ensaio específico do HCoV-HKU1, e do HCoV- HKU1 (amostra 36-2007). Por sua vez, apenas uma das amostras positivas no ensaio específico para o HCoV 229E gerou sequências legíveis, sendo confirmado a detecção do HCoV-229E na amostra 32.

Figura 16_Resultado do ensaio de PCR Real Time com uso de cDNA.

Resultado obtido no ensaio de Real Time PCR com enzima Taq Platinum (Invitrogen) no equipamento LightCycler 480 (Roche) utilizando cDNA randômico como material inicial.

FONTE: Góes LGB, 2012

Figura 17_Gel agarose do resultado do ensaio de PCR específico para HCoV-229E.

Gel de agarose 2%, sendo as cores da foto-documentação invertida, com resultado da PCR específica para HCoV 229E. Legenda: Número amostra; C-H₂O_controle negativo. PM_peso molecular de 100pb.

FONTE: Góes LGB, 2012

Os ensaios de reação de PCR Pancoronavírus (Canducci et al., 2008) nas amostras selecionadas geraram resultados congruentes e esperados, com 3 amostras positivas para coronavírus (09, 32 e 36), indicando a viabilidade do uso em conjunto desta metodologias nas análises futuras (Figura 18). Amostras com resultados inconclusivos em qualquer uma das técnicas moleculares utilizados anteriormente, como a amostra 49, foram negativas por este método.

Figura 18_Gel de agarose do resultado da PCR Pancoronavírus.

Gel de agarose 2%, de amostras clínicas submetidas a PCR Pancoronavírus. C-1 e C-2_ controles negativos (H₂O) RTPCR e da PCR. PM_peso molecular de 100pb.

FONTE: Góes LGB, 2012

O protocolo de Real Time utilizando cDNA randômicos apresentou sensibilidade similar ao método original e aos ensaios de PCR convencional utilizados, porém gerando resultados em um tempo menor do que as PCRs específicas e a PCR Pancoronavírus. Todos os métodos utilizados demonstraram-se capazes de detectar a presença de coronavírus. Tanto o método de Real Time PCR com uso de cDNA randômico, quanto a PCR convencional específica ou Pancoronavírus indicaram a presença de RNA de coronavírus em 3 das 50 amostras analisadas inicialmente pelo método PCR Real Time originalmente descrito com uso de RNA (6% positividade).

Devolta ao Brasil foram realizados novos ensaios de Real Time PCR com diferentes Kits e equipamentos disponíveis em nosso laboratório. O equipamento de “Real Time LightCycler 480” (Roche) foi substituído pelo equipamento “Real Time 7300” (Applied Biosystems), e passamos a realizar ensaios com o Kit TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems). Foram realizados ensaios de PCR Real Time em amostras de cDNA de BCoV para verificar a viabilidade de seu uso como controle positivo das reações de PCR Real Time, evitando o uso desnecessário de amostras clínicas positivas para algum coronavírus. Fez-se necessário realizar esta verificação, pois o protocolo de PCR Real Time originalmente descrito, foi desenvolvido e utilizado apenas para detecção de coronavírus humanos.

A padronização da quantidade de cDNA de amostras clínicas a serem utilizados na reação de PCR Real Time foi realizada com ensaios utilizando amostras controles de BCoV e

amostras clínicas confirmadas positivas para coronavírus por ensaios anteriores (6 amostras de 1995 e 2 de 2007). Foram realizadas corridas com 4 diluições seriadas de 10x (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4}) e em seguida uma reação com volumes não diluídos com 5, 2 e 1 uL de amostra. Os resultados foram analisados através da comparação direta dos valores Ct (ciclo “threshold”).

Foram obtidos resultados positivos para BCoV pelo ensaio de PCR Real Time para amostras diluídas até 10.000x (10^{-4}) demonstrando a viabilidade de seu cDNA de BCoV como controle positivos de nossas reações de Real Time PCR (Figura 19A). Como esperado, os valores de Ct obtidos aumentam para cada diluição em série realizada, demonstrando variação dos valores Ct conforme a quantidade de material genético alvo na amostra. Comparando diretamente o método de Real Time com a PCR convencional, pudemos observar que o método de Real Time é mais sensível, detectando amostras do controle positivo diluído até 10.000x, enquanto que a PCR detectou nosso cDNA do controle positivo de BCoV diluído apenas até 10x (Figura 19B). Amostras clínicas positivas por Real Time apresentando Ct maior do que 37, com algumas exceções, não geraram resultados positivos por PCR convencional.

Figura 19 Resultado do ensaio de PCR Real Time e PCR convencional de cDNA de Coronavírus Bovino.

Resultado obtido no ensaio de Real Time PCR e PCR convencional utilizando coronavírus bovino em diferentes diluições. (A) Gráfico Real time valor Delta Rn (valor de fluorescência) pelo número de ciclos da reação para cada diluição de BCoV. (B) Resultados Ct para amostra não diluída (BCoV) e amostras diluídas de 10x a 10.000x. (C) Eletroforese em gel de agarose 2% do cDNA de BCoV em diferentes diluições.

FONTE: Góes LGB, 2012.

Ensaios com menor valor Ct para amostras clínicas foram obtidas com uso de 2 uL e 5 uL de cDNA em uma reação com volume final de 20 uL (Figura 20), gerando resultados de Ct muito próximos. Em algumas reações, ensaios com 2 uL de cDNA geraram resultados com menores valores Ct quando comparado a resultados de reações realizadas com 5 uL de cDNA na reação (amostra 1884_2007, 09_1995 e 169_95). Desta maneira, optamos em utilizar 2 uL de volume de amostra de cDNA, realizando reações em duplicata.

Após verificação da viabilidade de uso de cDNA de culturas inoculadas com BCoV como controle positivo dos ensaios de Real Time Pancoronavírus, e da escolha do volume de amostras clínicas a compor cada reação, seguimos com a análise das amostras dos anos de 1995 a 2008. Foram realizados ensaios em duplicata, sendo selecionadas para PCR convencional amostras positivas em pelo menos uma das duplicatas. A metodologia por Real Time Pancoronavírus se mostrou viável e ideal para a análise do grande número de amostras de nosso estudo, permitindo a realização de ensaios de detecção para os 4 tipos de HCoV em

94 amostras por corrida (referente a uma placa), levando-se em média 1h para preparação da reação e 1 hora para reação enzimática e imediata obtenção dos resultados, partindo-se de amostras de cDNA de reações de RT-PCR anterior.

Figura 20_Resultado da padronização do ensaio de Real Time PCR para amostras clínicas.

Resultado obtido no ensaio de Real Time PCR utilizando diferentes volumes de amostras clínicas. (A) Gráfico do valor de fluorescência pelo número de ciclos da reação para reações com diferentes volumes de amostra. Amostras identificadas no gráfico: Amostras 1844 (amostra n°49 de 2007 positiva para 229E por PCR) (G1-G3), amostra 104_1995 (E1-E3 / HKU1); amostra 169_1995 (F1-F3 / HKU1); e amostra 09_1995 (A1-A3 / HKU1) (B) Quadro contendo os valores Ct para todas as reações. ND_não determinado (resultado negativo)

FONTE: Góes LGB, 2012

4.5 Padronização do ensaio de Nested PCR HCoV genótipo-específico

Ensaio de Nested PCR específico para cada um dos 4 tipos de coronavírus analisados foram desenvolvidos para aumentar a sensibilidade do ensaio de PCR convencional com objetivo principal de possibilitar a tipificação de coronavírus de amostras anteriormente

positivas para ensaio de Real Time PCR Pancoronavírus e negativa para a PCR convencional ou ensaios de Real Time específico.

Utilizamos na padronização do ensaio de Nested PCR específico amostras anteriormente genotipadas para cada tipo de coronavírus pela PCR convencional. A especificidade do ensaio de Nested PCR foi verificado através de uma reação utilizando oligos para um tipo de coronavírus e cDNA de amostras positivas para coronavírus diferentes porém componente do mesmo grupo, apresentando alta similaridade genética. Por exemplo, testamos a especificidade do ensaio para detecção de coronavírus 229E através da PCR com oligos específicos para HCoV-229E e cDNA de HCoV-NL63, e vice-versa.

A especificidade dos ensaios de Nested PCR específicos para cada genótipo viral foi confirmada. Ensaios com cDNA de HCoV de mesmo grupo porém diferente do genótipo alvo, apresentaram resultado negativos (Figura 21). Os fragmentos obtidos com uso de controles (amostras genotipadas) apresentaram tamanho esperado (116pb para 229E, 100pb para NL63, 110pb para OC43 e 150pb HKU1).

Figura 21_Gel de agarose do ensaio de padronização da Nested PCR específica.

Gel de agarose 2%, sendo as cores da foto-documentação invertida. Foram expostas a eletroforese amostras clínicas submetidas a Nested-PCR específico para cada um dos 4 tipos de coronavírus humano.. Legenda: PM_peso molecular de 100 pb. Setas: indicação do fragmento amplificado.

FONTE: Góes LGB, 2012

4.6 Análise da ocorrência de HCoV em amostras clínicas (1995-2008)

Ensaios para detecção de coronavírus humano foram realizados em 4305 amostras respiratórias coletadas durante um período de 14 anos consecutivos (1995-2008) (Tabela1). O

RNA de coronavírus pode ser detectado em 9.3% das amostras totalizando 401 amostras positivas, e 420 detecções, sendo observado 19 co-deteccões de 2 genótipos diferentes de coronavírus em uma mesma amostra.

O número de amostras positivos para HCoV's e a percentagem de amostras positivas são apresentados na tabela 1. A percentagem de positividade anual no período estudado variou de 3,1% (1997) a 13,8% (2002) (Tabela 1; Figura 22).

Tabela 1_Deteccão de coronavírus pelo ensaio PCR Real Time nas amostras coletadas entre os anos de 1995 a 2008.

Ano de coleta	Nº total amostras	Nº amostras positivos HCoV	% amostras positivas
1995	150	9	6.0
1996	221	9	4.1
1997	65	2	3.1
1998	82	4	4.9
1999	130	10	7.7
2000	185	12	6.5
2001	121	7	5.8
2002	167	23	13.8
2003	283	29	10.2
2004	412	34	8.3
2005	434	48	11.1
2006	751	80	10.7
2007	790	86	10.9
2008	514	48	9.3
TOTAL	4305	401	9.3

FONTE: Góes LGB, 2012

Figura 22 _Número de amostras totais e porcentagem anual de amostras positivas para HCoV por Real Time PCR entre o ano de 1995 e 2008.

FONTE: Góes LGB, 2012

Os anos que apresentaram uma menor taxa de infecção por HCoV foram os anos de 1996, 1997 e 1998. Os anos de 2002, 2005 e 2007 apresentaram maior positividade para coronavírus. O ano com maior porcentagem de amostras positivas foi 2002, onde as amostras positivas para coronavírus representaram 13.8% das amostras coletadas.

A quantidade de amostras coletadas, a frequência de coronavírus e o número de amostras positivas para HCoV em todos os meses durante os 14 anos de estudo estão apresentados na figura 23 e 24.

Analisando a distribuição mensal de amostras positivas para RNA de coronavírus, notamos que o coronavírus humano pode ser detectado em todos os meses do ano, em qualquer estação e apresentando picos múltiplos em um mesmo ano.

Figura 23 Distribuição do número de amostras coletadas e número de amostras positivas durante o período entre 1995 a 2001.

(A): Total de amostras analisadas junto ao total de amostras positivas para HCoV; (B) Total de amostras positivas. A linha verde representa a porcentagem de amostras positivas a cada mês. Setas pretas indicam período de interrupção da coleta de amostras clínicas. FONTE: Góes LGB, 2012

Figura 24_ Distribuição do número de amostras coletadas e número de amostras positivas durante o período entre 2002 a 2008.

(A): Total de amostras analisadas junto ao total de amostras positivas para HCoV; (B) Total de amostras positivas. A linha verde representa a porcentagem de positividade a cada mês. Setas pretas indicam período de interrupção da coleta de amostras clínicas. FONTE: Góes LGB, 2012

O maior número de detecções de HCoV em um único mês ocorreu em 2 ocasiões. Em setembro de 2006 e dezembro de 2007, foram detectados 18 amostras positivas para HCoV, representando 37.5% (18 de 48 amostras) e 40.9% (18 de 44 amostras) das amostras analisadas em cada mês respectivamente.

A porcentagem de amostras positivas para HCoV, na análise individual de cada mês, variou de 0 a 100%, ocorrendo a detecção em 100% das amostras em 3 ocasiões durante todo o período estudado. No mês de fevereiro de 2002 e novembro de 2008, foi analisado apenas uma única amostra, sendo esta amostra positiva para HCoV, enquanto que no mês de agosto de 2002 foram analisadas 5 amostras, coletadas em dias e pacientes diferentes, sendo todas positivas. A ocorrência de HCoV em mais de 10% das amostras ocorreu em 41 meses dos 142 meses com amostras coletadas e analisadas. Positividade maior ou igual a 20% foram observadas em 15 meses, e acima de 30% em 11 meses, geralmente no período de inverno e primavera (mais especificamente novembro de 1999, maio de 2001, dezembro de 2001, fevereiro de 2002, agosto, setembro, outubro de novembro de 2002, setembro de 2006, dezembro de 2007 e novembro de 2008).

Levando-se em consideração o valor acumulativo de amostras estudadas e amostras positivas para HCoV, obtido em meses similares de diferentes anos analisados (Ex: soma do número de amostras analisadas e positivas do mês de janeiro dos diferentes anos $N_{Jan95} + N_{Jan96} + \dots + N_{Jan08}$), o mês com maior número de detecções foi abril com 67 amostras positivas (9.3%), seguido do mês de maio com 52 detecções (7.6%), representando 16.9% e 13% respectivamente do total de amostras positivas com mês de coleta conhecido (Tabela 2). O elevado número de detecções nestes meses pode ser decorrência do maior número de amostras coletadas e analisadas.

Se considerarmos a porcentagem de amostras positivas na análise dos valores acumulativos para cada mês similar dos 14 anos estudados, o mês de dezembro, primavera brasileira, representa o mês com maior positividade, sendo o RNA de coronavírus detectado em 15.7% das amostras deste mês (Tabela 2; Figura 25). O segundo mês de maior porcentagem de detecções foi Setembro, apresentando uma positividade de 15.2%. Estes dados indicam uma maior circulação de HCoV nos meses do inverno e da primavera. Os meses de menor ocorrência foram junho (4.7%) e fevereiro (6.9%).

Tabela 2_Descrição do valor acumulativo do número de amostras analisadas e do número de amostras positivas em um mesmo mês de diferentes anos.

Mês	N total	N positivas	% HCoV positivos
Janeiro	113	11	9.7
Fevereiro	160	11	6.9
Março	402	32	8.0
Abril	719	67	9.3
Mai	686	52	7.6
Junho	491	23	4.7
Julho	500	50	10.0
Agosto	350	52	14.9
Setembro	237	36	15.2
Outubro	238	21	8.8
Novembro	175	18	10.3
Dezembro	140	22	15.7
TOTAL	4211	395	9.4

Dados referentes ao segundo semestre de 2000 não foram incluídos nesta análise devido a ausência de informações quanto ao mês de coleta (N=94 amostras, N positivos=6).

FONTE: Góes LGB, 2012

Figura 25_Distribuição dos valores acumulativos de amostras analisadas e amostras positivas em cada mês.

Legenda: N total: Número total de amostras analisadas; N positivas: número de amostras positivas

FONTE: Góes LGB, 2012

Com intuito de realizar uma melhor análise quanto a possível sazonalidade na circulação de coronavírus no Brasil, verificamos a ocorrência de coronavírus humano em relação a cada estação anual durante todo o período analisado. As datas de início e fim de cada estação nos 14 anos estudados foram obtidos no endereço eletrônico <http://astro.if.ufrgs.br/estacoes.html> (Fonte das datas de solstícios e Equinócios).

Observamos uma alta porcentagem de amostras positivas para HCoV principalmente nos meses de inverno e primavera, porém também no outono e menos comumente no verão, dependendo do ano analisado. É possível que a variação na sazonalidade de coronavírus humano esteja diretamente relacionada com padrão de circulação específica e diferenciada de cada tipo coronavírus.

Tabela 3_ Número de amostras analisadas e positivas para HCoV por estação anual.

Anos	Estações - período	Nº amostras analisadas	Nº amostras positivas	Positividade para HCoV (%)
1995	Verão - 22dez/19mar	8	1	12,5%
	Outono - 20mar/20jun	54	1	1,9%
	Inverno - 21jun/22set	64	5	7,8%
	Primavera - 23set/21dez	24	2	8,3%
1996	Verão - 22dez/19mar	21	0	0,0%
	Outono - 20mar/19jun	127	9	7,1%
	Inverno - 20jun/21set	73	0	0,0%
	Primavera - 22set/20dez	0	0	0,0%
1997	Verão - 21dez/19mar	0	0	0,0%
	Outono - 20mar/20jun	40	2	5,0%
	Inverno - 21jun/21set	25	0	0,0%
	Primavera - 22set/20dez	0	0	0,0%
1998	Verão - 21dez/19mar	0	0	0,0%
	Outono - 20mar/20jun	54	2	3,7%
	Inverno - 21jun/22set	28	2	7,1%
	Primavera - 23set/20dez	0	0	0,0%
1999	Verão - 21dez/19mar	0	0	0,0%
	Outono - 20mar/20jun	72	3	4,2%
	Inverno - 21jun/22set	46	2	4,3%
	Primavera - 23set/21dez	12	5	41,7%
2000	Verão - 22dez/19mar	13	1	7,7%
	Outono - 20mar/19jun	78	5	6,4%
	Inverno - 20jun/21set	0	0	0,0%
	Primavera - 22set/20dez	0	0	0,0%
2001	Verão - 21dez/19mar	0	0	0,0%
	Outono - 20mar/20jun	55	5	9,1%
	Inverno - 21jun/21set	23	1	4,3%
	Primavera - 22set/20dez	43	1	2,3%
2002	Verão - 21dez/19mar	8	1	12,5%
	Outono - 20mar/20jun	107	4	3,7%
	Inverno - 21jun/22set	35	8	22,9%
	Primavera - 23set/20dez	17	10	0,0%
2003	Verão - 21dez/19mar	4	0	0,0%
	Outono - 20mar/20jun	107	13	12,1%
	Inverno - 21jun/22set	95	10	10,5%
	Primavera - 23set/21dez	77	6	7,8%
2004	Verão - 22dez/19mar	84	12	14,3%
	Outono - 20mar/19jun	188	7	3,7%
	Inverno - 20jun/21set	101	11	10,9%
	Primavera - 22set/20dez	39	4	10,3%
2005	Verão - 21dez/19mar	8	1	12,5%
	Outono - 20mar/20jun	207	17	8,2%
	Inverno - 21jun/21set	188	28	14,9%
	Primavera - 22set/20dez	31	2	6,5%
2006	Verão - 21dez/19mar	1	0	0,0%
	Outono - 20mar/20jun	333	28	8,4%
	Inverno - 21jun/21set	255	38	14,9%
	Primavera - 22set/21dez	144	14	9,7%
2007	Verão - 22dez/20mar	159	9	5,7%
	Outono - 21mar/20jun	263	23	8,7%
	Inverno - 21jun/22set	202	27	13,4%
	Primavera - 23set/21dez	184	27	14,7%
2008	Verão - 22dez/19mar	190	13	6,8%
	Outono - 20mar/19jun	251	30	12,0%
	Inverno - 20jun/21set	56	2	3,6%
	Primavera - 22set/20dez	17	3	17,6%
	Verão - 21dez/19mar	0	0	0,0%

A análise quanto ao valor acumulativo de amostras analisadas e amostras positivas, em cada uma das 4 estações e considerando os 14 anos de circulação de coronavírus humanos é apresentado no gráfico da figura 26. Apesar do maior número de amostras positivas serem oriundos do outono, este mês apresentou a mesma porcentagem de detecção do que o valor acumulativo dos meses do verão, sendo o maior número absoluto de detecções decorrente do maior número de amostras analisadas neste período. As estações com maior positividade para HCoV foram o inverno e a primavera (11,3% e 12,6% de positividade respectivamente).

Figura 26 Distribuição dos valores acumulativos de amostras positivas para HCoV em relação ao mês.

Demonstrado na figura o número de amostras positivas para HCoV pelo método de Real Time PCR pancoronavírus e a porcentagem de amostras positivas.

A metodologia de detecção de HCoV pelo ensaio de PCR convencional realizado em amostras de cDNA anteriormente positivos pelo ensaio de PCR Real Time Pancoronavírus gerou resultados positivos em 175 amostras dos 401 amostras testadas, sendo posteriormente obtidos sequências nucleotídicas de 166 amostras (Tabela 3). A inviabilidade de geração de amplicons por PCR para um grande porcentual de amostras positivas pelo ensaio de PCR Real Time era esperado já que a técnica de Real Time apresenta maior sensibilidade quando comparado à metodologia de PCR convencional. Verificamos que amostras com Ct (ciclo “threshold”) maiores do que 37 no ensaio de PCR Real Times Pancoronavírus foram raramente amplificadas pela PCR convencional.

A genotipagem do coronavírus presente nas amostras positivas pelo ensaio de PCR Real Time Pancoronavírus foi realizado com uso conjunto de ensaios de PCR seguido de sequenciamento do fragmento amplificado, ensaios de PCR Real Time específico (monoplex), e/ou ensaios de Nested PCR específico com uso dos produtos da PCR convencional Pancoronavírus (Tabela 4).

Tabela 4_ Descrição do número de amostras positivas e resultado quanto a metodologia de tipificação utilizada

Grupo de amostras	Nº amostras
Total de amostras analisadas	4305
Total amostras positivas HCoV (Real Time Pancoronavírus)	401
Amostras com Co-deteção de diferentes genótipos de HCoV	19
Amostras positivas por PCR convencional	175
Amostras sequenciadas	166
Amostras genotipadas por Real Time e Nested PCR específicos	130
Amostras HCoV genotipadas	296
Amostras com genótipo de HCoV não identificado	105

Para amostras cuja reação de sequenciamento geraram sequências viáveis para análise, o genótipo de HCoV foi determinado por meio da análise genealógica das sequências além da identificação de sequências similares através do programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi), conforme descrito anteriormente. A árvore filogenética gerada pela análise é apresentada na Figura 27. Não foi possível confirmar casos de co-deteção de genótipos diferentes de HCoV por sequenciamento, sendo cada sequência originada de uma amostra diferente.

A relação filogenética das amostras sequenciadas está demonstrada na figura 27. Retiramos da árvore filogenética resultante amostras 100% homólogas, sendo estas apresentadas no apêndice 5. Foram identificados em amostras brasileiras todos os 4 genótipos de coronavírus humano conhecidos até o momento. A porcentagem de cada tipo de coronavírus detectado, genotipados e não genotipados é apresentado no gráfico da figura 28.

O coronavírus OC43 foi o genótipo de maior ocorrência, seguido de NL63, HKU1, e algumas raras detecções de HCoV-229E.

Figura 27 Relação filogenética de sequências de HCoV de diferentes genótipos de HCoV obtidos no presente estudo.

A árvore filogenética foi gerada por Bootstrap e método Neighbor-Joining utilizando a sequência de 173pb obtidas. Amostras cujas sequências foram menores do que 173pb, ou 100% homólogas, foram retiradas da análise e são apresentados no apêndice 5ab. Utilizamos para análise sequências do GenBank de coronavírus detectados no Brasil e nos EUA, e sequências protótipos para cada genótipo de HCoV. Amostras sequenciadas no presente estudo são apresentadas seguindo padrão: número da amostra_ano de coleta_número de sequências homólogas. As cores indicam o tipo de coronavírus identificado nestas amostras: Vermelho_OC43, Roxo_HKU1, Laranja_229E, Verde_NL63.

FONTE: Góes LGB, 2012

Figura 28_Gráfico da representação da positividade de cada tipo de coronavírus detectados.

Gráfico A representa o número total de amostras analisadas. Gráfico B total de amostras positivas e a representação de % de cada tipo viral. NT_HCoV de tipo (genótipo) não identificado. A ocorrência combinada de cada coronavírus é maior do que a porcentagem de amostras positivas devido a co-infecções.

FONTE: Góes LGB, 2012

O vírus OC43 foi detectado em 3.1% do total de amostras analisadas (135/4305) (Figura 28), representando 33.6% das amostras positivas (135/401). O coronavírus NL63 foi o segundo tipo de coronavírus humano mais frequente, sendo detectado em 2.2% das amostras analisadas (93/4301), 23% das amostras positivas. As infecções pelo coronavírus HKU1 representaram 1.6% das amostras analisadas (71/4301) e 17.7% das amostras positivas. O coronavírus 229E, por sua vez, foi o coronavírus de menor ocorrência em nosso estudo, sendo detectado em apenas 0.4% das amostras analisadas (16/4301) e representando apenas 4% das amostras positivas (16/401). Cento e quatro amostras (104/401), 2,4% das amostras analisadas, não tiveram o genótipo identificado, porém 44 (44/105) amostras apresentaram resultado positivo para ensaio de Real Time PCR betacoronavírus específico (Kuypers et al., 2007).

Todos os 4 tipos de coronavírus humanos puderam ser detectados em 6 anos dos 14 estudados, apesar de apresentarem variações quanto a frequência de detecção. Em apenas 2 anos estudados (1995 e 1997), foi verificado a circulação de apenas um tipo de coronavírus, não ocorrendo a detecção de coronavírus sem amostra tipificada nestes anos. Os dados da frequência relativa das amostras positivas para cada tipo viral durante os 14 anos estudados estão dispostos no gráfico da Figura 29, sendo os valores apresentados na tabela 3.

O vírus OC43 foi o coronavírus de circulação mais constante, presente em 12 anos dos 14 estudados, sendo o vírus de maior ocorrência em 6 anos (1996, 1997, 2000, 2002, 2004, 2007) (Tabela 6, Figura 30). Por outro lado, o vírus 229E, vírus de menor frequência entre os outros coronavírus estudados, não pode ser detectado em 6 anos e foi mais prevalente apenas

no ano de 1999. Este vírus não pode ser detectados por 3 anos consecutivos em nossa amostragem (2000-2002). O vírus HCoV-NL63 foi detectado em nossa amostragem a partir de 1998, sendo detectado em todos os anos seguintes analisados, circulando por 11 anos consecutivos. O coronavírus NL63 foi prevalente em apenas 3 anos estudados (1998, 2006, 2008). O Vírus HKU1, por sua vez, pode ser detectado em nossa amostragem em 10 anos analisados estando ausente em apenas 4 anos estudados (1996, 1997, 2000 e 2002).

Figura 29_Gráficos da frequência relativa dos 4 tipos de HCoV detectados em relação a cada ano de estudo.

Tabela 5_Descrição do número total de amostras positivas por ano e seus respectivos tipos de coronavírus

Ano	Nº total amostras	Nº amostras positivas HCoV	OC43	229E	NL63	HKU1	NT
1995	150	9	0	0	0	9(6%)	0
1996	221	9	8(3.6%)	1(0.5%)	0	0	0
1997	65	2	2(3.1%)	0	0	0	0
1998	82	4	0	1(1.2%)	2(2.4%)	1(1.2%)	0
1999	130	10	1(0.8%)	3 (2.3%)	2(1.5%)	1(0.8%)	3(2.3%)
2000	185	12	6(3.2%)	0	4(2.2%)	0	2(1.1%)
2001	121	7	1(0.8%)	0	2(1.7%)	2(1.7%)	2(1.7%)
2002	167	23	19(11.4%)	0	1(0.6%)	0	3(1.8%)
2003	283	29	5(1.8%)	1(0.4%)	1(0.4%)	9(3.2%)	13(4.6%)
2004	412	34	15(3.6%)	2(0.5%)	9(2.2%)	2(0.5%)	6(1.5%)
2005	434	48	14(3.2%)	3(0.7%)	3(0.7%)	17(3.9%)	12(2.8%)
2006	751	80	15(2%)	1(0.1%)	41(5.5%)	16(2.1%)	19(2.5%)
2007	790	86	39(4.9%)	4(0.5%)	10(1.3%)	6(0.8%)	28(3.5%)
2008	514	48	10(1.9%)	0	18(3.5%)	8(1.6%)	17(3.3%)
TOTAL	4305	401	135	16	93	71	105

Pos NT: Amostras positivas por Real Time com tipo de HCoV não identificado. FONTE: Góes LGB, 2012

A distribuição anual de cada um dos genótipos de coronavírus humano é apresentado na tabela 5 e na figura 30. Foi possível observar uma variação anual quanto a ocorrência de cada tipo de coronavírus humano e a inversão de maior ocorrência de coronavírus humanos pertencentes ao mesmo grupo (alfacoronavírus_229E/NL63 e betacoronavírus_OC43/HKU1) a cada ano (Figura 30).

Figura 30 Gráficos da frequência relativa dos 4 tipos de coronavírus detectados em relação a cada ano de estudo.

A distribuição mensal de cada genótipo de coronavírus humano em relação a totalidade dos meses analisados é apresentada na figura 31 e 32.

A porcentagem de amostras positivas para HCoV-OC43 variou entre 0 a 100%, porém nos 2 meses apresentando positividade de 100% para OC43, apenas 1 amostra foi analisada. Este coronavírus esteve presente em mais e 10% das amostras analisadas em 16 meses de nosso estudo. O vírus HCoV-OC43 teve o maior número de amostras detectados nos meses de Maio e Dezembro de 2007, com 12 amostras positivas em cada mês e representando 17,8% e 40,9% das amostras analisadas nos referidos meses. A alta ocorrência de HCoV-OC43 obtido nestes meses possivelmente representam surtos de infecção. Considerando os valores acumulativos (“pool” de valores) do número total de amostras e de amostras positivas de meses similares dos 14 anos estudados, o coronavírus OC43 foi mais frequente no mês de dezembro, sendo detectado em 14 amostras das 140 coletadas neste mês (10%), seguido de setembro e maio com 4,2% de positividade em ambos os meses (10/237 e 29/686 respectivamente). Este vírus pode ser detectado em todos os meses do ano considerando o total de período analisado.

Figura 31_ Número mensal de amostras positivas para os 4 tipos de HCoV entre os anos de 1995 a 2001.

Legenda: HCoV NT_amostras cujo genótipo de HCoV não foi identificado
FONTE: Góes LGB, 2012

Figura 32_ Número mensal de amostras positivas para HCoV entre os anos de 2002 a 2008.

Legenda: HCoV NT_amostras cujo genótipo de HCoV não foi identificado
FONTE: Góes LGB, 2012

Tabela 6_Número de amostras positivas do valor acumulativopara cada tipo viral em meses similares dos 14 anos analisadas.

Mês	N total	N positivas	OC43	229E	NL63	HKU1	NI
Janeiro	113	11	3 (2.7%)	0	2 (1.8%)	2 (1.8%)	4 (3.5%)
Fevereiro	160	11	4 (2.5%)	0	4 (2.5%)	0	3 (1.9%)
Março	402	32	9 (2.2%)	0	16 (4%)	4 (1%)	6 (1.5%)
Abril	719	67	22 (3.1%)	0	23 (3.2%)	9 (1.3%)	17 (2.4%)
Mai	686	52	29 (4.2%)	2 (0.3%)	4 (0.6%)	0	16 (2.3%)
Junho	491	23	6 (1.2%)	1 (0.2%)	6 (1.2%)	5 (1%)	6 (1.2%)
Julho	500	50	14 (2.8%)	5 (1%)	5 (1%)	21 (4.2%)	8 (1.6%)
Agosto	350	52	9 (2.6%)	4 (1.1%)	10 (2.9%)	13 (3.7%)	19 (5.4%)
Setembro	237	36	10 (4.2%)	2 (0.8%)	13 (5.5%)	7 (3%)	8 (3.4%)
Outubro	238	21	4 (1.7%)	1 (0.4%)	6 (2.5%)	6 (2.5%)	5 (2.1%)
Novembro	175	18	6 (3.4%)	0	4 (2.3%)	3 (1.7%)	6 (3.4%)
Dezembro	140	22	14 (10%)	1 (0.7%)	0	1 (0.7%)	6 (4.3%)
TOTAL	4211	395	130 (3.1%)	16 (0.4%)	93 (2.2%)	71(1.7%)	104 (2.5%)

Representado na tabela o número de amostras analisadas seguido da percentagem %.

NI_HCoV positivo por PCR Real Time não genotipados.

Não foram considerados os dados das amostras coletadas no segundo semestre de 2000.

FONTE: Góes LGB, 2012

Figura 33_Distribuição do valor acumulativo mensal de amostras positivas em cada mês

FONTE: Góes LGB, 2012

O coronavírus humano HKU1 foi detectado em 0 a 25% amostras coletadas de um único mês. O maior número de detecções em um único mês foi obtido em julho e agosto de 2005, com detecção deste coronavírus em 11.3% (7 de 62 amostras) e 9.2% (7 de 76 amostras) das amostras analisadas respectivamente. Considerando o valor acumulativo de

deteccões e a frequência de detecção em meses similares dos diferentes anos analisadas, o coronavírus humano HKU1 foi mais comumente detectado em amostras do mês de julho, agosto e setembro com 4.2%, 3.7% e 3% de amostras positivas.

O vírus NL63 pode ser detectado em 0 a 50% das amostras analisadas em um único mês. O maior pico de detecção deste coronavírus, em relação ao número total de amostras positivas, ocorreu em setembro de 2006, onde 13 de 48 amostras analisadas foram positivas para este vírus (27% de amostras positivas). Este coronavírus também foi detectado em 50% das amostras coletadas do mês de novembro de 1999, sendo detectado em 2 das 4 amostras coletadas. Considerando o valor acumulativo de amostras coletadas e amostras positivas de um mesmo mês de todos os anos analisados, a maior frequência deste coronavírus foi obtido no mês de setembro, onde foram detectados 13 amostras positivas de 237 analisadas (5,5%).

O coronavírus 229E, coronavírus menos frequente em nosso estudo, apresentou maior frequência de detecção em um único mês em setembro de 1999, estando presente em uma amostra de 6 analisadas. O maior número de amostras positivas em um único mês foi obtido em julho de 2005 onde foram detectados em 2 amostras das 62 coletadas. Considerando o valor acumulativo de amostras testadas e da frequência de detecção de meses similares, o coronavírus 229E foi mais comum nos meses de agosto, julho e setembro, com 1.1, 1 e 0.8% de amostras positivas. Em geral, este vírus pode ser detectado em apenas 1 amostra em cada mês quando presente, sendo o número máximo de detecções em um único mês restrito a duas amostras.

A circulação simultânea dos 4 tipos de HCoV em um único mês é raro, e ocorreu em apenas 2 meses do total de meses analisados (Agosto de 2006 e Março de 2008). A circulação simultânea de 3 tipos também é raro ocorrendo em apenas 3 meses de nosso estudo (Dezembro de 2003, abril de 2006 e abril de 2008).

Por fim, foram realizadas análises da distribuição de cada genótipo de coronavírus humano considerando os valores obtidos nas diferentes estações do ano dos 14 anos analisados. O coronavírus OC43 apresentou um pico de ocorrência, estando presente em mais de 10% das amostras em 3 estações individuais do total das estações analisadas, mais especificamente no verão de 2001-2002, detectado em 12.5%, inverno de 2002, com 20% de amostras positivas, e primavera de 2002 (52.9%). O maior número de detecções de HCoV-OC43 em uma estação individual ocorreu em outono de 2007, onde 14 amostras das 263 amostras analisadas foram positivas para este coronavírus (5.3%).

A detecção de coronavírus HKU1 em amostras de uma única estação do ano variou de 0 a 12.5%. Foram observados picos de ocorrência deste HCoV em amostras no verão de 1995

(12.5%), Primavera de 1995 e 1999 (8.3%), e no inverno de 2005 (9%), sendo último representante do maior número de detecções de HCoV-HKU1 em uma única estação (17 amostras positivas de 188 analisadas).

O coronavírus NL63 foi detectado em 0 a 16.7% de amostras analisadas quando considerado a percentagem em estações individuais. A maior percentagem de positividade foi obtida na primavera de 1999 (16.7%), seguido do verão de 2004-2005 com 12.5% (1 amostra positiva de 8 analisadas). A estação do ano com maior número de detecções para este tipo viral ocorreu no Inverno de 2006, com 20 amostras positivas de 255 amostras testadas (7.8%). O coronavírus 229E, de menor ocorrência, apresentou positividade variável de 0 a 8.3%, e o maior número de detecções (N=3) ocorreu no inverno de 2005.

Figura 34_ Distribuição sazonal dos diferentes genótipos de HCoV nas estações anuais entre o ano de 1995 e 2001

(N: número de amostras).

FONTE: Góes LGB, 2012

Figura 35_ Distribuição sazonal dos diferentes genótipos de HCoV nas estações anuais entre o ano de 2002 e 2008

(N: número de amostras analisadas). FONTE: Góes LGB, 2012

A análise do valor acumulativo de amostras positivas para cada genótipo viral nas 4 estações anuais indicou a estação com maior número absoluto de detecções assim como a estação com maior frequência de detecção para os diferentes genótipos analisados (Figura 36). O maior número de amostras positivas para HCoV-OC43 foi observado no outono (61 amostras_3,2%), sendo o HCoV mais frequente na primavera, detectado em 4.8% das amostras coletadas desta estação (28 amostras). O HCoV-HKU1 foi mais frequente no inverno (3.4%), mesmo mês do maior número de detecção (41 amostras positivas); HCoV-NL63 apresentou maior frequência de detecção no verão, sendo detectado em 3.2% das amostras, sendo o maior número de detecções provenientes do outono com 37 amostras positivas.; e o coronavírus 229E apresentou maior circulação no inverno e primavera (0.8% e 0.7% respectivamente), não sendo detectado no verão.

Figura 36 Análise da sazonalidade de detecção dos genótipos de coronavírus. Distribuição sazonal do valor acumulativo de detecções dos genótipos de HCoV nas 4 estações anuais

FONTE: Góes LGB, 2012

A análise do valor acumulativos de detecções dos diferentes genótipos de coronavírus em cada estação anual indicou que o HCoV-OC43 é o coronavírus com maior número de detecções no outono (41% das amostras positivas), e na primavera (38%), HCoV-HKU1 no inverno (31%), e HCoV-NL63 no verão (41%) (Figura 37).

Figura 37 Frequência relativa de detecção dos genótipos nas diferentes estações
Frequência relativa de genótipos de HCoV em relação a cada estação anual

Número de amostras detectadas está indicado dentro do gráfico. FONTE: Góes LGB, 2012

4.7 Cultivo do coronavírus HKU1 de amostras brasileiras

4.7.1 Descongelamento, manutenção e transferência de células para Insertos

Após o descongelamento do criotubo contendo células HTBE (passagem2), as células foram transferidas para insertos (membrana de colágeno) após manutenção por 3 dias (Figura 38) em frascos de cultura e imersos em meio de manutenção. Após transferência para os insertos, as células tiveram o meio de cultura modificado para meio de diferenciação celular, e rapidamente a morfologia da monocamada celular sofreu modificação visível (Figura 39).

Figura 38_ Observação de células HTBE e seu crescimento após 3 dias.

Amplificação de 50x em microscópio invertido. FONTE: Góes LGB, 2012

Figura 39_ Observação de células HTBE e seu crescimento após 8h em meio de diferenciação celular.

Amplificação 50x. FONTE: Góes LGB, 2012

A grande maioria dos insertos apresentaram 100% confluência após 24h de manutenção em meio de diferenciação (Figura 40A, B), no entanto, alguns insertos, passaram a apresentar espaços vazios na monocamada (gaps) (Figura 40C, D). Também foram observados traços esbranquiçados na monocamada, aparentemente sem células, porém análise mais acurada mostrou se tratar de camadas de células sobrepostas.

Figura 40_ Observação células HTBE em insertos apresentando 100% confluência. (

Magnificação 50x e 100X. FONTE: Góes LGB, 2012

Legenda: A,C_ amplificação de 50x; B,D_ amplificação de 100x. Circulos indicam região com células em diferente profundidade; seta indica a formação de espaço vazio ou gap.

4.7.2 Inoculação viral em células HTBE e ensaios de Imunofluorescência Indireta e PCR Real Time

Foram realizados inoculações em duplicata de 7 amostras brasileiras (1,3,4,6,7,8,10), duas amostras controle positivos, cepas norte americanas de HKU1 denominados HKU1-10 e

HKU1- 18 previamente cultivados no mesmo tipo de cultura celular, e 2 controles negativos (denominado MOCKs) que foram apenas inoculados com meio DMEM 1%BSA. Os resultados da Imunofluorescência estão sumarizados no quadro 6.

Quadro 6_Resumo do resultado obtido do ensaio de imunofluorescência.

Identificação (ID) EUA	ID Brasil / ano coleta	Tipo de HKU1	Resultado Imunofluorescência	Natureza do sinal de positividade
Br1	1246/06	HKU1-A	+	+
Br3	2141/07	HKU1-A	+	+ / margens do inserto
Br4	1233/06	HKU1-A	+	+
Br6	366/05	HKU1-C?	+	+ / margens do inserto
Br7	392/05	HKU1-B	-	-
Br8	2398/07	HKU1-B	+	+
Br10	1081/06	HKU1-A	+	+
HKU1#18	X	HKU1-A	+	+
HKU1#10	X	HKU1-A	+	+
MOCK	X	X	-	-

Legenda: +_positivo; -_negativo; MOCK_controle negativo.

Foram obtidos resultados positivos em 6 duplicatas das 7 amostras brasileiras utilizadas na inoculação e nos controles de inoculação utilizando as cepas americanas (Figura 41). O sinal de imunofluorescência apresentou diferentes características quanto a distribuição no inserto. Algumas amostras apresentaram infecções distribuídas aleatoriamente pelo inserto (ex: amostra Br4_Figura 42; e amostras Br8 e Br10_Figura 43C,D), enquanto que outras apresentaram células infectadas apenas nas margens do inserto (amostra Br3 e Br6_Figura 43A). Amostras Br10, por apresentar o maior Ct no ensaio de Real Time PCR entre as amostras encaminhadas para EUA, foram inoculadas nos insertos apresentando condições de confluência menor do que 75% devido a presença de grande quantidade de Gaps na monocamada celular. No entanto, ainda com esta condição desfavorável, foi observada a presença de células infectadas (Figura 43D). Obtivemos um resultado negativo na imunofluorescência de culturas inoculada na amostra Br7 e nas culturas não inoculadas (Mock) (Figura 43B).

Foi possível observar, em magnificação de 250x de aumento, a distribuição das proteínas Spike presentes no citoplasma das células sítios de replicação viral, provavelmente distribuído pelo retículo endoplasmático, complexo de golgi e membrana celular, estando ausente no núcleo de células infectadas, característica do ciclo viral de todos os coronavírus.

Figura 41_Resultado do ensaio de imunofluorescência indireta amostras controle HKU1#10.

Em azul o núcleo celular corado com DAPI, e em verde presença de antígenos virais referentes a proteína S “Spike” (fluorescência FITC). A_amplificação 25x; B_amplificação 50x; C_amplificação 250x.

FONTE: Góes LGB, 2012

Figura 42_Resultado do ensaio de imunofluorescência indireta amostras Br4.

Em azul o núcleo celular corado com DAPI, e em verde presença de antígenos virais referentes a proteína S “Spike” observáveis pelo fluorescência FITC. A_amplificação 25x; B_amplificação 50x; C_amplificação 250x.

FONTE: Góes LGB, 2012

Figura 43 Resultado do ensaio de imunofluorescência indireta com uso de células HTBE inoculadas com amostras brasileiras.

A_Amostra Br3 com características infecções nas margens do inserto; B_Br7: amostras negativa; C_ Br-8, D_ Br-10: monocamada celular contendo Gaps porém apresentando infecção. Em azul o núcleo celular corado com DAPI, e em verde presença de antígenos virais referentes a proteína S “Spike”. Fotos com magnificação de 25x. FONTE: Góes LGB, 2012

Com base nos resultados obtidos do ensaio de imunofluorescência, selecionamos os lavados de culturas inoculadas com 5 cepas brasileiras e as respectivas amostras originais para realização de ensaios de PCR Real Time. O referido ensaio pode ser utilizado para análise quanto ao possível aumento na concentração de vírus em diferentes dias após a inoculação, através de ensaios de Real Time específico e comparação direta dos valores Ct obtidos. A figura 40, resultante da reação de PCR Real Time na amostra Br4, exemplifica o resultado obtido no ensaio de PCR Real Time para cada amostra (Figura 44).

Os resultados do ensaio de PCR Real Time obtidos para amostras originais utilizadas na inoculação (identificadas como 0 dias pós-infecção_0dpi) e para as lavagens diárias (1 a 5 dias após a inoculação-1-5dpi) são apresentados na tabela 8. Foi possível detectar o aumento de até 3 logs na concentração viral obtida entre a amostra original e o lavado obtido de 2 a 3 dias após a inoculação, demonstrando o sucesso da replicação de cepas brasileiras *in vitro*. O referido aumento foi demonstrado pela diferença de 9 unidades no valor Ct entre as amostras,

sendo cada unidade Ct equivalente a uma diferença de 10x na concentração de material genético alvo) (Comunicação pessoal, Prof. Dr. Samuel Dominguez). Em geral, os menores valores Ct, e consequentemente, a maior quantidade de material genético viral foram obtidos nas lavagens do terceiro dia pós-infecção (Tabela 7).

Figura 44_Exemplo do resultado da PCR em Real Time da amostra e lavagens da inoculação com Br4.

Ao lado o quadro apresentando a cor referência para cada amostra, a sua identificação e o valor Ct obtido. DPI_dias após-infecção.FONTE: Góes LGB, 2012

Tabela 7_Resumo dos valores Ct obtidos nos ensaios de Real Time PCR.

Amostra	dpi	Ct	Pos
HKU1 10	1	17,6	2
HKU1 10	2	16,65	1
HKU1 10	3	20,02	3
HKU1 10	4	20,5	4
HKU1 10	5	22,24	5
Amostra	dpi	Ct	Pos
HKU1 18	1	22,16	5
HKU1 18	2	16,78	1
HKU1 18	3	17,02	2
HKU1 18	4	19,2	3
HKU1 18	5	20,82	4
Amostra	dpi	Ct	Pos
Br1	0	25	6
Br1	1	21,43	5
Br1	2	17,95	2
Br1	3	17,49	1
Br1	4	20,49	3
Br1	5	20,69	4
Amostra	dpi	Ct	Pos
Br4	0	28,39	6
Br4	1	27,11	5
Br4	2	19,82	4
Br4	3	17,39	1
Br4	4	18,73	2
Br4	5	19,18	3
Amostra	dpi	Ct	Pos
Br8	0	26,34	6
Br8	1	25,77	5
Br8	2	20,33	3
Br8	3	18,21	1
Br8	4	20,21	2
Br8	5	22,82	4
Amostra	dpi	Ct	Pos
Br10	0	27,41	5
Br10	1	26,54	4
Br10	2	0	3
Br10	3	17,69	1
Br10	4	18,53	2
Br10	5	18,6	3

Apresentado na tabela: Identificação amostras / DPI_dias após-infecção / Valor Ct Ensaio Real Time / Pos_Posição da amostra em escala crescente considerando o valor Ct. Em vermelho o menor valor Ct obtido representando a maior concentração viral da amostra.

4.7.3 2^o Inoculação viral em células HTBE e ensaios de Imunofluorescência Indireta e PCR Real Time

Selecionamos lavagens de 3 ensaios de inoculação anterior para tentativa de passagens seriadas, e utilizamos como controle positivo as amostras originais de cada inoculação (amostra Br1, Br8 e Br10).

Uma vez que não foi observado diferenças na quantidade de sinal nos ensaios de imunofluorescência entre as amostras inoculadas, selecionamos a amostra Br1 por apresentar o menor valor Ct no ensaio de PCR em tempo Real, a amostra BR8 por ser positiva para coronavírus HKU1 genótipo B, ainda sem relato de cultivo, e a amostra Br10 por ter apresentado resultado positivo no ensaio de imunofluorescência indireta mesmo com a monocamada celular apresentando áreas sem células, e por ser a única amostra congelada em meio de cultura e soro fetal bovino, forma considerada ideal para manutenção da infectividade viral após o processo de congelamento e descongelamento da amostra (Comunicação pessoal, Prof. Samuel Dominguez).

Para a passagem seriada, foram selecionadas amostras do terceiro dia após a inoculação por apresentarem os menores valores Ct no ensaio de PCR Real Time, indicativo da maior concentração viral da amostra. Os resultados do ensaio de imunofluorescência para as diferentes amostras foram similares e pode ser exemplificado pelo resultado obtido para passagem seriada de vírus da amostra Br10 (Figura 45)

Obtivemos resultados positivos na imunofluorescência para todas as inoculações exceto para os controles negativos. A inoculação realizada com a amostra Br10 gerou os melhores resultados no ensaio de imunofluorescência, apresentando uma elevada quantidade de células infectadas (Figura 46). De fato este resultado foi congruente com os valores Ct obtidos no ensaio de PCR Real Time, menor valor Ct entre as amostras do 5^o dias após a inoculação (18.6 Ct).

Figura 45_Resultado do ensaio de imunofluorescência indireta de células HTBE com lavagem Br10 (passagem seriada).

Em azul o núcleo celular corado com DAPI, e em verde presença de antígenos virais referentes a proteína S “Spike” observáveis pelo fluorescência FITC. A_amplificação 25x; B_amplificação 50x; C_amplificação 250x
 FONTE: Góes LGB, 2012

Figura 46_Resultado do ensaio de imunofluorescência indireta com uso de células HTBE inoculadas com amostras Br10.

Em azul o núcleo celular corado com DAPI, e em verde presença de antígenos virais referentes a proteína Spike observáveis pelo fluorescência FITC. A_amplificação 25x; B_amplificação 50x; C_amplificação 250x
 FONTE: Góes LGB, 2012

Tabela8_Resumo dos valores Ct obtidos nos ensaios de Real Time PCR.

Amostra	dpi	Ct	Amostra	dpi	Ct
Br1 W	0	17.71	Br1 S	0	25.36
Br1 W	1	23.22	Br1 S	1	28.12
Br1 W	2	21.91	Br1 S	2	25.44
Br1 W	3	21.07	Br1 S	3	18.55
Br1 W	4	23.06	Br1 S	4	19.29
Br1 W	5	26.21	Br1 S	5	21.51
Br8 W	0	19.65	Br8 S	0	27.10
Br8 W	1	X	Br8 S	1	X
Br8 W	2	20.55	Br8 S	2	25.47
Br8 W	3	21.69	Br8 S	3	18.72
Br8 W	4	X	Br8 S	4	20.75
Br8 W	5	27.29	Br8 S	5	23.38
Br10 W	0	19.33	Br10 S	0	28.35
Br10 W	1	20.87	Br10 S	1	X
Br10 W	2	19.69	Br10 S	2	25.28
Br10 W	3	20.68	Br10 S	3	19.29
Br10 W	4	23.95	Br10 S	4	18.30
Br10 W	5	24.15	Br10 S	5	17.58

DPI_dias pós-infecção;. Em vermelho o menor valor Ct obtido. BrW= amostra de inoculação anterior; BR2: amostras LNF original. X_resultado negativo

Legenda. X= resultado negativo

Os resultados obtidos no ensaio de PCR Real Time dos lavados das inoculações demonstraram o aumento da titulação viral, principalmente para amostras originais(Tabela 8). Este aumento foi bem evidente na amostra 10 original (Br10 S), cujos valores Ct da PCR aumentaram em até 10 unidades (de 28.35 para 17.58), demonstrando, similarmente aos primeiros ensaios de inoculação um aumento de até 3 logs na quantidade de material viral inicial. A alta quantidade de vírus também foi evidenciado no ensaio de imunofluorescência indireta (Figura 46). Os valores obtidos para inoculações de vírus a partir de amostras de lavagens de inoculações anteriores geraram resultados positivos, porém não ficou evidente o aumento da titulação viral, e sim apenas sua manutenção (amostras Br1,8,10 W) (Tabela 8).

No geral, obtivemos o sucesso da replicação de cepas de HKU1 oriundos de todas as amostras utilizadas. Foi possível realizar, pela primeira vez, o cultivo e a propagação seriada do coronavírus HKU1 genótipo B, representando também o primeiro relato de cultivo de cepas brasileiras de HCoV-HKU1. O domínio da tecnologia de cultivo é parte essencial para o início de estudos a respeito de diferentes características biológicas deste vírus, principalmente por possibilitar a produção de uma grande quantidade de partículas virais infectantes. Como exemplo destes estudos podemos citar o sequenciamento de diferentes genes destes vírus, análises quanto aos receptores necessários para adsorção e penetração viral, estudos para geração de metodologias de detecção, entre outros.

4.7.4 Sequenciamento do gene “Spike” de isolados brasileiros de HCoV-HKU-1

Com intuito de melhor caracterizar os isolados brasileiros de HKU1, e confirmar a circulação dos genótipos A e B de HKU1, foram realizados diferentes ensaios moleculares para amplificação do gene Spike. Até onde sabemos este é o primeiro estudo a realizar o sequenciamento do gene Spike de coronavírus humanos da América Latina. Foram selecionadas 2 amostras apresentando o genótipo HKU1-A (amostras Br1 e Br10), e uma do genótipo de HKU-B (Amostra Br8) para sequenciamento do gene alvo.

Os melhores resultados da PCR, caracterizados pela presença e/ou maior intensidade das bandas obtidas neste ensaio, foram gerados com uso da enzima “Phusion taq” (Finnzymes) (Figura 47A). Foram realizadas duas reações de amplificação separadas, uma para cada metade do gene S, e com uma pequena região consenso, permitindo a obtenção da sequência completa do referido gene. Para a amplificação da metade 3’ do gene, foram necessários a realização de duas reações de PCR, utilizando os mesmo oligos e o produto da primeira reação (Figura 47B). A amplificação do gene S em uma única reação foi funcional apenas com a enzima “Phusion taq”, e para as amostras BR1 e Br10. (Figura 48).

Figura 47_Gel de agarose dos produtos da reação de PCR convencional do gene Spike.

A_Primeira reação de PCR. B_Segunda reação PCR. Legenda: R1_reação da primeira metade do gene (F1-R4), R2_reação da segunda metade do gene S; Enzimas utilizadas Accuprime (Invitrogen, EUA) e Phusion taq (Finnzymes, EUA). Setas em azul indicam os produtos do gene Spike gerados.FONTE: Góes LGB, 2012

Figura 48_Gel de agarose dos produtos da reação de PCR convencional completo do gene Spike.

Setas indicam os produtos gerados referente ao gene completo da proteína "Spike".

FONTE: Góes LGB, 2012

Os resultados obtidos do sequenciamento dos produtos da PCR com uso de uma combinação de oligonucleotídeos senso e consenso foram satisfatórios para grande maioria dos 14 oligos utilizados. Apesar da presença de gaps, pudemos sequenciar grande parte do gene para os 3 isolados. O resultado da relação filogenética obtida a partir do alinhamento e análise filogenética posterior está presente na figura 49. A análise confirmou a circulação dos subtipos A e B de HCoV-HKU1 no Brasil, resultado similar ao encontrado pela análise do fragmento de 173pb da polimerase realizado anteriormente.

Figura 49_Relação filogenética entre as sequências do gene Spike obtidos de isolados brasileiros e sequências de HKU1

Legenda: Cons8_consenso da sequência obtida para amostra Br8; Cons1 ou 10_ consenso das sequências obtidas para as amostras Br1 e Br10. Seta: indicação da cepa brasileira sequenciada

FONTE: Góes LGB, 2012

4.8 Resultados Complementares

Devido a realização de ensaios de detecção na totalidade da biblioteca de cDNA obtido de crianças atendidas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, presente no Laboratório de Virologia Clínica e Molecular, sem a seleção prévia das amostras a serem testadas, realizamos inadvertidamente ensaios de detecção em múltiplas amostras coletadas em diferentes dias de um mesmo pacientes; amostras respiratórias de diferente natureza colhidas de um mesmo paciente (Swabs + lavado nasofaríngeo e amostra de saliva),

e amostras não respiratórias de swab ocular de pacientes com conjuntivite, que não compunham originalmente a coorte de nosso estudo, porém componentes da mesma biblioteca de cDNA utilizado no estudo. Estas amostras não foram incluídas nos cálculos do N amostral e de ocorrência de coronavírus apresentados, porém algumas curiosidades puderam ser observadas.

Foi possível verificar a presença de HCoV em amostras de um mesmo paciente com múltiplas coletas realizadas em um período de 7 dias a 6 meses, em um total de 13 pacientes durante todo o período analisado. Amostras de mesmo paciente, coletadas por um período igual ou menor do que 5 dias foram retiradas de nossa análise. Os resultados indicaram a manutenção da positividade na detecção do mesmo genótipo de coronavírus em um mesmo paciente em períodos de 5 a 20 dias, e infecções por diferentes coronavírus intercalados por 2 a 6 meses. Foi possível ainda observar a detecção de dois diferentes tipos de coronavírus por um período de 11 dias, representando, até onde sabemos, o primeiro relato de liberação ou infecção prolongada por 2 tipos de coronavírus simultaneamente em um mesmo paciente

Durante a análise dos dados de ocorrência de coronavírus, identificamos a realização de ensaios moleculares de detecção em amostras respiratórias composto de swab somado a lavado nasofaríngeo ou saliva, coletados de mesmo paciente e no mesmo momento. Observamos a detecção de coronavírus em amostras de swab de 6 pacientes, sendo as amostras de salivas negativas. A positividade em ambas as amostras ocorreu apenas para 2 pacientes, porém o menor valor Ct de Real Time foi encontrado na amostra de lavado (Ct35 vs Ct38.9), indicando uma diferença na concentração do material viral em 1 log (1000x). Duas amostras apresentaram resultados positivos para saliva e negativos para swab e lavado nasofaríngeo.

Foram analisadas inadvertidamente 84 amostras de swab ocular de crianças com conjuntivite e atendidas no hospital universitário, sendo uma amostra positiva pelo ensaio de PCR Real Time Pancoronavírus, não sendo possível a identificação do genótipo do coronavírus detectado.

Por fim, a observação da co-detecção de coronavírus humano e outros vírus respiratórios foi possível graças ao cruzamento de resultados da análise da presença de diferentes viroses respiratórias em algumas amostras similares de nosso estudo, realizado pela rotina de diagnóstico clínico do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular, do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, gentilmente cedido pelo Prof. Edison Luiz Durigon. Foi possível verificar a co-detecção de coronavírus humano com diferentes vírus respiratórios, como RSV, Vírus da

Influenza A e B, Adenovírus, e Parainfluenzavírus 1 e 2, em 126 das 401 amostras positivas para HCoV (31.5%), no entanto, não foi possível confirmar em quantas amostras e para quais viroses respiratória, estas amostras foram especificamente analisadas, sendo considerado apenas a informação da detecção nas amostras quando disponível.

A co-deteção mais comum ocorreu com o vírus respiratório sincicial (RSV), sendo a co-deteção OC43/RSV a mais comumente encontrada, presente em 31 amostras, seguido da detecção NL63/RSV (25 amostras). Foram observados também co-deteções entre OC43/Adenovírus, OC43/Parainfluenza, OC43/Influenza, HKU1/RSV, HKU1/Influenza B, HKU1/adenovírus, NL63/InfluenzaA e B, e HCoV-229E/RSV.

A co-deteção de diferentes genótipos de coronavírus humano também foi verificado, sendo observado em 19 amostras analisadas (4.7% das amostras positivas e 0.44% do total de amostras analisadas), apesar da ausência da confirmação da co-deteção por sequenciamento. Foram verificados co-deteções entre betacoronavírus e entre betacoronavírus e alfacoronavírus, sendo observado a co-deteção entre OC43/HKU1, HKU1/NL63 e OC43/NL63.

5 DISCUSSÃO

Até onde sabemos, o presente estudo representa a primeira análise quanto a ocorrência de HCoV por um período maior do que 2 anos em amostras brasileiras e o maior estudo longitudinal já realizado a respeito da circulação dos 4 tipos de HCoV em todo mundo. Estudos longitudinais da epidemiologia de coronavíroses são raros na literatura. Apenas um estudo envolveu a análise dos 4 tipos de coronavírus em um período de 4 anos (Ren et al., 2011), sendo os outros estudos restritos a 3 anos ou períodos menores (Dare et al., 2007; ; Dominguez et al., 2009; Gaunt et al., 2010; Kuypers et al., 2007; Lau et al., 2006; Leung et al., 2012; Regamey et al., 2008; Ren et al., 2011) (Apêndice 6).

Em nosso estudo o RNA de coronavírus foi detectado em 9,3% (N=401) de 4305 amostras analisadas distribuídas entre os 14 anos estudados (1995-2008), sendo detectado em em todos os anos analisados. A positividade geral obtida para HCoV em nosso grupo de estudo foi semelhante ao descrito na literatura em estudos epidemiológicos realizados em diferentes continentes, cujos valores podem atingir até 17% de positividade (Abdul-Rasool e Fielding, 2010; Bastien et al., 2005; Dare et al., 2007; Vabret et al., 2001; Esper et al., 2005; Ren et al., 2009; Talbot et al., 2009; Woo et al., 2009). Em 2 relatos utilizando a mesma metodologia de detecção de HCoV por Real Time PCR utilizado em nosso estudo, foi verificado a circulação de diferentes genótipos de coronavírus nos EUA, apresentandouma positividade de 6.3% (66/1043) e 5% (84/1683) (Dominguez et al., 2009; Kuypers et al., 2007).

Nos estudos realizados no Brasil, a frequência de positividade de coronavíroses variou entre 1,2% a 6,3% (Albuquerque et al., 2009; Bellei et al., 2008; da Silva Filho et al., 2012; Macedo, 2002; Perosa, 2004). Desta maneira, nosso resultado apresentou o maior índice de positividade para HCoV entre os estudos nacionais, porém apenas nos estudos mais recentes, a partir de 2009, foram utilizados metodologias capazes de detectar os 4 tipos de HCoV, fator este que pode elevar o índice de positividade obtido.

Os coronavírus humanos apresentaram aparente tendência de circulação no período de inverno e primavera, característica já descrita anteriormente na literatura mundial, englobando estudos realizados em países temperados (ex: EUA e países Europeus como Itália, Grã-Bretanha Holanda) e países Sub-Tropicais e Tropicais (Chiu et al., 2005; Dominguez et al., 2009; Kuypers et al., 2009; Lau et al., 2006; Leung et al., 2012; Mackay et al., 2012; Prill et al., 2012; Woo et al., 2005).

Dados quanto a sazonalidade de coronavírus no Brasil são escassos e de difícil interpretação quando presentes. A ausência de análises e informações quanto a frequência mensal de ocorrência de HCoV, somado ao baixo número de amostras analisadas, a não

utilização de metodologia capaz de detectar os 4 tipos de coronavírus e o curto período analisado nestes estudos, torna difícil a comparação do padrão sazonal de HCoV obtidos em território Nacional. Além disso, o fato de a sazonalidade anual variar consideravelmente, torna padrões de ocorrência em estudos realizados em períodos inferiores a dois anos insuficientes para tentar supor qualquer variação ou tendência sazonal.

A análise dos dados apresentados em nosso estudo permitiu a observação de padrões de circulação viral, demonstrando por exemplo uma variação anual da presença e frequência dos diferentes genótipos de HCoV circulantes além de uma tendência de alternância da prevalência entre coronavírus de mesmo grupo. Dominguez et al (2012) sugerem que a característica da infecção com um determinado genótipo de coronavírus pode estimular a imunidade de proteção cruzada sobre uma infecção posterior por um diferente coronavírus de mesmo grupo antigênico (Dijkman et al., 2012), e talvez podendo gerar alguma pressão sobre a sazonalidade anual de um genótipo específico de coronavírus, no entanto, as causas das variações na circulação dos diferentes genótipos de HCoV não são conhecidas.

A porcentagem de amostras positivas na análise absoluta (valor acumulativo) de coronavírus humanos detectados para cada mês similar dos 14 anos estudados, indicam uma maior circulação de HCoV nos meses de agosto, setembro e dezembro com 14.9%, 15.2% e 15.7% das amostras analisadas sendo positivas. No estudo realizado por Bellei et al. (2008), na cidade de São Paulo, o coronavírus apresentou padrão sazonal, sendo detectado principalmente nos meses de julho e agosto, meses do inverno brasileiro (Bellei et al., 2008; Perosa, 2004); enquanto que no estudo de Macedo (2002) houve sazonalidade aparente em apenas 1 dos anos estudados, com detecções coronavírus principalmente entre julho e setembro em 1996 (inverno), e abril de 1997 (outono). Porém, os dados de maior ocorrência apresentados podem ser decorrentes do maior número de amostras coletadas nos referidos meses já que nos estudos não são informados o número de amostras analisadas a cada mês. Os estudos de Albuquerque et al. (2009) e Silva Filho et al. (2012) também não informam a frequência mensal de detecções de coronavírus.

A análise de frequência de detecção obtido em nosso estudo indica que a infecção por coronavírus é mais comum nos meses de frio, geralmente distribuídos no inverno e na primavera, característica já descrita em estudos realizados em países temperados e em um estudo brasileiro (Bastien et al., 2005; Bellei et al., 2008; Dominguez et al., 2009; Gorse et al., 2009; Kuypers et al., 2007; Macedo, 2002; Moes et al., 2005; Talbot et al., 2009; Vabret et al., 2005; van der Hoek et al., 2005). Apesar desta tendência, foi possível detectar HCoV em meses das 4 estações do ano, indicando que o HCoV não apresenta uma distribuição

sazonal restrita como encontrado em países temperados. Outros estudos realizados em países tropicais e subtropicais demonstram a mesma característica (Chiu et al., 2005; Dare et al., 2007; Lau et al., 2006).

Uma vez que o ensaio de Real Time Pancoronavírus não é suficiente para a identificação do genótipo do coronavírus humano detectado, o método utilizado para genotipagem baseou-se, inicialmente, no sequenciamento dos produtos da PCR convencional utilizando a polimerase como gene alvo. O método em questão se mostrou menos sensível do que os ensaios de PCR Real Time Pancoronavírus, uma vez apenas 43.6% das amostras inicialmente positivas pelo ensaio de Real Time Pancoronavírus apresentaram resultado positivo pelo ensaio de PCR convencional, permitindo o sequenciamento dos produtos para genotipagem dos coronavírus. O uso dos ensaios adicionais de tipificação, como os ensaios de Real Time genótipo-específico descrito por Kuypers et al. (2007) e de nested PCR específico para cada genótipo de HCoV, elaborado no presente estudo, possibilitaram a genotipagem de 73.8% do total de amostras positivas para HCoV, permanecendo 26.2% sem genótipo identificado.

A ausência de tipificação do coronavírus humano detectado no ensaio de Real Time Pancoronavírus, pode ser consequência da baixa quantidade de material viral inicial na amostra, uma vez que estas amostras apresentavam, em sua maioria, valores de Ct elevados no ensaio de PCR Real Time. A baixa concentração de cDNA viral pode ser decorrente do período e severidade da infecção, falhas nas etapas de extração e RT-PCR por ação de inibidores presentes nas amostras, ou mesmo degradação da amostra por problemas de armazenamento, contaminação com nucleases, ou sucessivos congelamentos e descongelamentos.

Apesar da ausência de genotipagem para 1/4 das amostras inicialmente positivas para coronavírus pelo ensaio PCR Real Time, a tipificação de aproximadamente 75% de nossas amostras positivas para HCoV, tornou possível realizar a mais ampla análise temporal, e no maior número de amostras, da circulação de cada um dos tipos de coronavírus humano em território nacional. O presente estudo também representa a maior análise temporal já realizado incluindo os 4 genótipos de coronavírus simultaneamente. O estudo de maior amplitude a respeito de coronaviroses humanas foi publicado em 2009 por Talbot et al. (2009) onde foram analisados amostras de 20 anos, porém a análise englobou apenas 3 tipos de HCoV, não sendo utilizados metodologias para a detecção de HKU1. O estudo de maior amplitude temporal a respeito da circulação dos 4 tipos de coronavírus analisou a circulação de coronavírus por apenas 4 anos (Ren et al., 2011).

Durante os 14 anos estudados, pudemos detectar variações anuais na circulação e na ocorrência de cada tipo de HCoV. Este padrão de alteração na circulação e ocorrência de cada tipo de coronavírus humano, em um mesmo estudo, já foi descrito anteriormente (Dare et al., 2007; Gaunt et al., 2010; Ren et al., 2011; van der Hoek et al., 2010).

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, ficou evidente que o estudo da ocorrência de coronavírus humanos em um período igual ou menor do que 2 anos pode não representar o padrão de circulação de cada tipo viral em uma determinada coorte e região geográfica. Por exemplo, o vírus OC43 apresentou-se como vírus de maior ocorrência nos anos de 1996 e 1997, estando ausente e com baixa ocorrência nos anos de 1995, 1998 e 1999 respectivamente. Assim, tomando-se de base os anos de 1998 e 1999, este vírus seria considerado de baixa ocorrência, sendo que a análise mais ampla demonstra o inverso, já que este vírus foi o coronavírus de maior ocorrência em mais de 40% dos anos analisados.

A co-circulação dos 4 tipos de coronavírus ocorreu em 6 anos dos 14 anos analisados (42%), sendo a circulação dos 4 tipos mais comum do que a circulação de 3 (21%) a 1 tipo de coronavírus anualmente. Este resultado foi similar ao resultado obtido por Ren et al. (2011) no estudo da circulação dos 4 genótipos de HCoV durante 4 anos. No entanto, no estudo de Talbot et al. (2009), que analisaram a circulação de 3 genótipos de coronavírus em amostras coletadas durante um período de 20 anos, a detecção de 3 genótipos de HCoV em amostras coletadas em um mesmo ano ocorreu em apenas 3 anos analisados, sendo mais comum a detecção de 2 genótipos. Também observamos a co-circulação dos 4 genótipos de coronavírus simultaneamente em um determinado mês, que apesar de raro, já foi descrito anteriormente (Kuypers et al., 2007), ou mais comumente em uma mesma estação.

O coronavírus humano OC43 foi o vírus de maior ocorrência em nosso estudo, presente em aproximadamente 3% das amostras analisadas. A maior predominância deste tipo de coronavírus perante aos outros é descrita na grande maioria dos estudos epidemiológicos realizados em diferentes partes do globo (Albuquerque et al., 2009; Dare et al., 2007; Dominguez et al., 2009; Gaunt et al., 2010; Gorse et al., 2009; Lau et al., 2006; Leung et al., 2012; Prill et al., 2012; Ren et al., 2011; Sloots et al., 2006; Talbot et al., 2009). No Brasil, até o momento, este foi o vírus de maior ocorrência em 3 estudos, porém em apenas em um foi utilizado ensaio molecular capaz de detectar os coronavírus apenas recentemente descobertos NL63 e HKU1 (Albuquerque et al., 2009; Bellei et al., 2008; Macedo, 2002; Silva Filho et al., 2012).

No presente estudo foi possível observar a ocorrência de surtos de HCoV-OC43 em 16 meses analisados, sendo este coronavírus detectado em mais de 10% das amostras analisadas.

Surtos de coronavírus OC43 já foram descritos anteriormente na literatura. Vabret et al. (2003) detectaram um surto de HCoV-OC43 na França, onde o coronavírus esteve presente em 6% das amostras analisadas em um período pouco maior do que um mês.

O coronavírus OC43 apresentou maior frequência de detecção, considerando os valores acumulativos para cada mês, nos meses de dezembro, maio e setembro, e apresentou pico de ocorrência nas estações de outono, inverno, primavera e verão, dependendo do ano estudado. Considerando os valores acumulativos para cada um das quatro estações, o HCoV-OC43 foi mais frequente do que outros tipos de coronavírus na primavera e no outono. Com base nos resultados obtidos, é possível que o padrão sazonal de circulação deste tipo viral no Brasil ocorra preferencialmente no outono e na primavera, diferentemente dos resultados obtidos em países temperados, com maior circulação deste tipo de coronavírus no inverno e na primavera (Arden et al., 2006; Chiu et al., 2005; Lai et al., 2007; Lau et al., 2006; Leung et al., 2012; Moes et al., 2005; Prill et al., 2012; Venter et al., 2011). Picos da infecção por OC43 no outono foram reportados em estudos realizados no EUA (Kistler et al., 2007), enquanto que Ren et al. (2011) não observaram nenhum padrão sazonal para este coronavírus nos estudos realizados na China.

O coronavírus NL63 foi o segundo coronavírus de maior ocorrência em nossa amostragem (2,2%). Dados da literatura descrevem a incidência de HCoV-NL63 em pacientes com ARI variando entre 0% e 16,3% (Abdul-Rasool e Fielding, 2010; Arden et al., 2005; Esper et al., 2005; Kistler et al., 2007; Lien Do et al., 2011; Regamey et al., 2008; Ren et al., 2011; Sung et al., 2010; Vabret et al., 2005; van der Hoek et al., 2010). Este coronavírus foi detectado em amostras brasileiras em 3 estudos recentes, conduzidos na cidade de São Paulo, e no Rio de Janeiro, sendo detectado em 1,5 a 7,7% das amostras analisadas (Albuquerque et al., 2009; Cabeça e Bellei, 2012; da Silva Filho et al., 2012). A maior ocorrência deste vírus foi obtida no estudo conduzido com crianças apresentando fibrose cística (da Silva Filho et al., 2012).

O coronavírus NL63 foi detectado em nossas amostras a partir de 1998, sendo circulante durante todos os anos seguintes de nosso estudo. Apesar de este vírus ter sido recentemente descoberto (Van der Hoek et al., 2004), o mesmo foi isolado em amostras coletadas em 1988 (Fouchier et al., 2004) e posteriormente foi verificado sua circulação em amostras de 1981 (Talbot et al., 2009). Estes resultados, somados a estudos moleculares e taxa evolucionária entre os tipos 229E e NL63, indicam que é provável que o coronavírus NL63 já esteja circulando entre a população humana a pelo menos 10 séculos (Abdul-Rasool e Fielding, 2010). Além disso, estudos conduzidos na década de 60 podem ter detectado este

genótipo viral uma vez que determinados vírus causadores de infecções respiratórias foram isolados de pacientes e caracterizados como coronavírus por estudos de microscopia, porém apresentaram sorologia distinta entre as cepas 229E e OC43 conhecidas na época (Abdul-Rasool e Fielding, 2010).

O coronavírus NL63 não apresentou sazonalidade aparente. Este vírus foi mais frequentemente detectado no mês de setembro considerando o valor acumulativo de amostras positivas e coletadas nos meses similares dos anos estudados, apresentou pico de ocorrência nas estações da primavera, inverno, outono, e verão, dependendo do ano estudado, e foi o coronavírus mais frequentemente detectado no verão. O resultado obtido em nosso estudo está de acordo com a conclusão obtida por Abdul-Rasool et al. (2010), que após a revisão de 15 estudos moleculares quanto a frequência deste tipo viral, concluíram que este vírus não apresenta predileção por estação específica, variações de temperatura, podendo ocorrer durante um ano completo.

As metodologias moleculares utilizados no presente estudo não possibilitaram a diferenciação quanto aos subtipos de coronavírus NL63 circulantes no Brasil. Até o ano de 2012, apenas 2 subtipos de HCoV-NL63 eram descritos na literatura. Recentemente, Dominguez et al (2012) descreveram a identificação de um terceiro subtipo de NL63, caracterizado como subtipo C, após sequenciamento de 16 genomas de isolados de NL63 HCoV no Colorado, EUA. Os genótipos A e B foram previamente identificados em amostras clínicas da Europa (Fouchier et al., 2004; Pyrc et al., 2006; van der Hoek et al., 2004). Apesar disso, análises das sequências deste novo subtipo de HCoV-NL63 indicam a viabilidade teórica de sua detecção pelos ensaios moleculares usados em nosso estudo.

O coronavírus humano 229E foi raramente detectado em nossa amostragem estando presente em apenas 0.4% das amostras analisadas (N=16). Diferentes relatos da literatura apontam para a menor prevalência deste tipo de coronavírus perante os outros 3 tipos de HCoVs, tanto em estudos internacionais quanto nos estudos nacionais, variando entre 0 a 9.8% das amostras analisadas em diferentes estudos (Albuquerque et al., 2009; Arden et al., 2006; Bellei et al., 2008; Bosis et al., 2008; Canducci et al., 2008; Dominguez et al., 2009; Gaunt et al., 2010; Kuypers et al., 2007; Lu et al., 2012; Macedo et al., 2002; Perosa et al., 2004; da Silva Filho et al., 2012; Leung et al., 2012; Mackay et al., 2012). Nos estudos moleculares realizados no Brasil, a maior positividade absoluta reportada para HCoV-229E foi de 1.4% das amostras analisadas (6/420 amostras analisadas) (Bellei et al., 2007; Macedo, 2002), não sendo detectado no estudo de Albuquerque et al. (2009); e sendo detectado em apenas 1% das amostras do estudo de da Silva Filho et al (2012). Apesar do pequeno número

de detecções do coronavírus humano 229E apresentou maior circulação no inverno e na primavera, conforme anteriormente descrito na literatura (Lai et al., 2007).

O coronavírus HKU1 foi detectado em 1.6% das amostras de nosso estudo. A literatura descreve a frequência de HKU1 variável entre 0% a 4,4% considerando estudos nacionais e internacionais, a apresenta distribuição global, já tendo sido detectado na Austrália, África do Sul, Brasil, China, Tailândia e países europeus como Suíça, França, Itália e Grã-Bretanha (Albuquerque et al., 2009; Bosis et al., 2008; Canducci et al., 2008; Dare et al., 2007; Dominguez et al., 2009; Esper et al., 2006; Gaunt et al., 2010; Kuypers et al., 2007; Leung et al., 2012; Mackay et al., 2012; Vabret et al., 2008; Venter et al., 2011)

Nossos estudos indicaram uma maior circulação deste coronavírus nos meses de inverno (julho, agosto e setembro), sendo o principal coronavírus detectado nesta estação considerando os valores acumulativos. Estudos relatam a tendência de infecções pelo HCoV-HKU1 no inverno nos EUA, Hong Kong e Austrália (Dominguez et al., 2009; Esper et al., 2005; Kuypers et al., 2007; Lau et al., 2006; Mackay et al., 2012; Sloots et al., 2006) ou nas estações de inverno-outono em outro estudo realizado nos EUA (Kistler et al., 2007) e inverno-primavera em Hong Kong e na China (Jin et al., 2011; Woo et al., 2005). No entanto, a ausência de padrão sazonal também foi observado por Gaunt et al. (2010), Gorse et al. (2009) e Prill et al. (2012) nos EUA; e Ren et al. (2011) ocorrendo na primavera, verão e inverno na China.

No que se tem conhecimento, até junho de 2012, apenas 3 estudos nacionais haviam analisado a ocorrência de coronavírus HKU1, sendo um oriundo dos resultados deste trabalho (Albuquerque et al., 2009; Goes et al., 2011; da Silva Filho et al., 2012). Albuquerque et al. (2009) analisaram amostras de crianças com IRA e detectaram o HCoV-HKU1 em apenas 0,49% das amostras analisadas (1/ 205) (Albuquerque et al., 2009). No estudo de da Silva Filho et al. (2012), conduzido em São Paulo, o coronavírus HKU1 esteve presente em 3.9% de amostras, porcentagem similar ao encontrado no ano de 1995 em nossa amostragem (Goes et al., 2011).

Até onde sabemos, nosso achado quanto a circulação de HCoV-HKU1 em amostras de 1995 representou o segundo relato da presença de HKU-1 no Brasil e a detecção em amostras mais antigas analisadas até o momento em toda literatura. Anteriormente ao nosso resultado, indícios da circulação de HKU-1 haviam sido encontrados em amostras Finlandesas coletadas entre os anos de 1996 a 1998, não sendo especificada a data exata da coleta da amostra positiva (Ruohola et al., 2009). Estes resultados vêm fortalecer o indício de que este tipo novo de coronavírus está circulando em humanos do continente Americano pelo menos desde 1995

e possivelmente já apresentavam distribuição mundial neste período. Apesar de recentemente descritos, existem indícios que os coronavírus NL63 e HKU-1 já haviam sido observados anteriormente, na década de 60, porém a ausência de técnicas moleculares na época e a perda das linhagens virais isoladas impossibilitaram a tipificação e provável identificação viral (van der Hoek et al., 2006). Os resultados obtidos nas amostras coletadas no ano de 1995 pelo método de PCR convencional (Canducci et al., 2008) e Nested PCR-HKU1, foram publicados em Góes et al. (2011).

Com intuito de melhor caracterizar isolados do coronavírus HKU-1 circulantes no Brasil, realizamos o cultivo de cepas brasileiras de coronavírus humano HKU1 em modelo celular utilizando células HTBE. O sucesso no cultivo foi evidente após a análise dos ensaios de imunofluorescência e ensaios de PCR Real Time, caracterizando o primeiro relato do cultivo de coronavírus humano HKU1-B, e o primeiro cultivo de cepas brasileiras. Assim como no estudo de Pyrc et al. (2010), primeiro e único relato até a presente data com o cultivo de coronavírus humano HKU1, não foi evidenciado nenhum efeito citopático nas monocamadas inoculadas apresentando aumento da concentração de material genético viral. A produção de vírions de HCoV-HKU1 foi evidenciado pela passagem seriada de vírus oriundos do primeiro ensaio de cultivo viral.

O sequenciamento de produtos da PCR com alvo no gene polimerase, realizado após o ensaio de PCR convencional Pan-coronavírus, indicaram a circulação dos 3 subtipos do genótipo de coronavírus HKU1. No entanto, segundo Woo et al. (2009), a análise de um único gene para identificação do subtipo de coronavírus humano HKU1 não é suficiente, sendo necessário o sequenciamento de regiões de 2 diferentes genes entre nsp10 e 16 (polimerase utilizada no presente estudo é nsp12), e entre o gene HE e N como o gene Spike.

No presente estudo só foi possível confirmar a circulação dos subtipos A e B, uma vez que sequências do gene Spike, necessário para a subtipagem segura, foram obtidos apenas para estes subtipos. A distribuição geográfica dos diferentes tipos de coronavírus HKU1 não é bem conhecida. Woo et al. (2005), através do sequenciamento completo de 22 linhagens de HKU1, confirmaram a presença dos 3 genótipos em Hong Kong. Sloot et al (2006), com base na análise de um fragmento de 400pb da polimerase, constataram a circulação apenas do genótipo B de HKU1 na Austrália. Apesar de sequências do genoma completo de HKU1 terem sido obtidos de apenas 2 diferentes localidades mundiais (Europa e Ásia) a análise de sequências do GenBank indicam que os 3 genótipos de HKU1 apresentam provável distribuição mundial (Woo et al., 2009). Resultados de nosso estudo confirmam a circulação de 2 genótipos de HKU1 na América do Sul (HCoV-HKU1-A, HCoV-HKU1B), sendo

possível ainda a circulação do subtipo C, quando levado em consideração resultados filogenéticos baseado apenas na análise do fragmentos do gene da polimerase viral obtida.

A porcentagem de co-deteção entre HCoV e outros vírus respiratórios em nosso estudo foi similar ao encontrado na literatura (Arden et al., 2005; Esposito et al., 2006; Mackay et al., 2012; Kuypers et al., 2007), ocorrendo em aproximadamente 30% das amostras positivas. No entanto, uma vez que não foi possível confirmar em quantas amostras positivas e para quais viroses respiratórias estas amostras foram analisadas, consideramos apenas a informação da detecção nas amostras quando disponível, podendo assim não representar a frequência real de co-infecções. Estudos a respeito da ocorrência de co-infecções entre coronavírus humanos e outras viroses respiratórias são descritos na literatura podendo representar de 0 a 75% das amostras positivas para HCoV (Albuquerque et al., 2009; Arden et al., 2005; Bellei et al., 2008; Canducci et al., 2008; Chiu et al., 2005; Dare et al., 2007; Dominguez et al., 2012; Esper et al., 2005; Esposito et al., 2006; Kuypers et al., 2007; Mackay et al., 2012; Talbot et al., 2009; Sung et al., 2010).

A observação de co-deteção de diferentes coronavírus humanos em uma mesma amostra, também pode ser observado em nosso estudo e já foram descritos na literatura, e podem ocorrer entre coronavírus de mesmo grupo ou de grupos diferentes (Dominguez et al., 2009; Gaunt et al., 2010; Gorse et al., 2009; Kaiser et al., 2005; Prill et al., 2012; Sloots et al., 2006; Vabret et al., 2008).

Apesar de ainda não estar claro se casos de co-infecções de HCoV com outros vírus respiratórios, ou mesmo entre coronavírus, tem influência na maior severidade de sintomas clínicos respiratórios (Abdul-Rasool e Fielding, 2010; Esposito et al., 2006), a co-infecção em um mesmo paciente podem potencializar a geração de novas cepas virais através da evento de recombinação genética entre as linhagens virais (Abdul-Rasool et al., 2010). De fato, é provável que o coronavírus humano NL63 tenha sido originado de eventos de recombinação do coronavírus PEDV com um segundo coronavírus ancestral (Abdul-Rasool e Fielding, 2010).

A co-deteção de diferentes vírus respiratórios ou HCoV em uma mesma amostra podem representar uma co-infecção real ou apenas a liberação prolongada de um tipo viral oriundo de uma infecção anterior (Esposito et al., 2007; Kaiser et al., 2005), sendo difícil identificar qual dos vírus é responsável pela sintomatologia clínica.

Devido a realização de ensaios de detecção na totalidade de amostras da biblioteca de cDNA do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular, sem a seleção prévia das amostras a serem testadas, realizamos o ensaio de detecção em amostras coletadas de mesmo pacientes

porém em dias diferentes, amostras de um mesmo paciente de diferentes naturezas (Swabs+lavado nasofaríngeo vs amostra saliva), e amostras não respiratórias de swab ocular de pacientes com conjuntivite, que não compunham a coorte de nosso estudo.

A detecção de coronavírus humano em amostras de um mesmo paciente, porém coletado em dias diferentes, pode demonstrar a liberação prolongada de vírus, a ocorrência de infecções persistentes, ou mesmo episódios de re-infecções (Chiu et al., 2005; Dominguez et al., 2012). Em nosso estudo foi possível verificar a presença de HCoV em amostras de um mesmo paciente com múltiplas coletas realizadas em um período de 7 dias a 6 meses. A liberação prolongada, ou a detecção prolongada, de coronavírus em amostras respiratórias já foi relatada em diferentes estudos (Chiu et al., 2005; Dominguez et al., 2007, 2012; Esper et al., 2005; Kaiser et al., 2005; van Elden et al., 2004). Esper et al. (2005) e van Elden et al. (2004) reportaram a detecção de RNA de coronavírus até 14 dias após a infecção. Kaiser et al. (2005) detectaram os coronavírus OC43 e NL63 em crianças de até um ano durante 3 semanas consecutivas. Chiu et al. (2005) detectaram HCoV 229E durante 3 meses e Dominguez et al. (2012) relataram a detecção do HCoV-NL63 por pelo menos 5 a 10 meses, em indivíduos imunocomprometidos. Por fim, com base em nossos resultados, observamos pela primeira vez, até onde sabemos, a liberação ou infecção prolongada de um indivíduo positivo para dois diferentes genótipo de coronavírus (HCoV-HKU1/NL63) por um período de 11 dias, representando, até onde sabemos, o primeiro relato de liberação ou infecção prolongada por 2 tipos de coronavírus em um indivíduo infectado.

Também observamos casos de re-infecções por diferentes genótipos de coronavírus humanos, em uma mesmo paciente, em um intervalo de 6 meses, sendo detectado até 3 infecções por 2 diferentes coronavírus humanos neste período, com infecções intercaladas dos diferentes genótipos virais.

Durante a análise dos dados de ocorrência de coronavírus, identificamos a realização de ensaios moleculares de detecção amostras respiratórias composto de swab / lavado nasofaríngeo e saliva, coletados de mesmo paciente e no mesmo momento. Observamos que a detecção de coronavírus em amostras de swab/lavado nasofaríngeo se mostrou melhor para a detecção de coronavírus humano em 60% dos casos analisados, sendo ambas as amostras positivas, ou apenas a saliva positiva em 20% dos casos analisadas cada uma. Estes resultados podem ser consequência de uma fase inicial da infecção, onde o vírus ainda encontra-se na mucosa da boca, não tendo atingido, ou ainda, não gerando quantidades virais suficientes no trato respiratório superior no momento da coleta. Sendo assim, com base nos resultados obtidos, amostras compostos de Swab somado ao lavado nasofaríngeo são mais eficaz para a

detecção de coronaviroses quando comparado a amostras de saliva, certamente devido ao tropismo viral por células das vias aéreas superiores e inferiores. A ausência da informação de quando determinadas amostras eram compostas por lavado nasofaríngeo, swab nasofaríngeo, ou ambas, não parece importante, já que estas amostras são consideradas ideais para análise de vírus respiratórios, e não apresentam diferenças significativas na capacidade de detecção para os diferentes vírus (Sung et al., 2009).

Por fim, foram analisadas inadvertidamente 84 amostras de swab ocular de crianças com conjuntivite e atendidas no hospital universitário. Foi possível detectar 1 amostra de swab ocular positiva para coronavírus humano. Diferentes estudos relatam a presença de conjuntivite em pacientes positivos para coronavírus humano NL63 (van der Hoek et al., 2004), no entanto, não foi encontrado na literatura relatos de tentativa de detecção de coronavírus em fluidos oculares de pacientes com amostras respiratórias positivas.

Apesar de coronaviroses serem considerados importantes causadores de doenças respiratórias, a ausência de métodos de detecção adequados vem impedindo a realização vasta de estudos epidemiológicos dos 4 diferentes tipos de coronavírus humanos (Kuypers et al., 2007). O método de detecção por Real Time utilizado neste estudo, se mostrou eficiente na detecção das 4 coronaviroses humanas circulantes no Brasil. Consideramos esta metodologia sensível, relativamente barata e rápida para a detecção dos 4 tipos de coronaviroses humana, uma vez que não é necessário realização de ensaio moleculares individuais de HCoV gerando uma economia de tempo, volume de amostra, e reagentes. Apesar desta vantagem, faz-se necessário o uso de equipamentos de custo relativamente alto, como o equipamento de real time PCR, além de ser necessária a realização de ensaios adicionais para genotipagem viral.

Mesmo utilizando a combinação de 4 metodologias de detecção, composto por i.Real Time Pancoronavírus para triagem inicial, seguido de ii.PCR convencional, iii. 4 ensaios de Nested PCR, e iv. 4 ensaios de Real Time específico, não foi possível tipificar 26% de amostras inicialmente positivas para HCoV, não sendo possível identificar a qual grupo de coronavírus pertencem.

O número de detecções para os coronavírus encontrado em nosso estudo encontra-se dentro da faixa de variação para a detecção em outros estudos nacionais e internacionais, utilizando técnicas moleculares sensíveis de detecção, demonstrando a grande importância da inclusão da detecção deste vírus em prática diagnóstica de agentes etiológicos virais.

Diferenças na incidência dos tipos de HCoV entre nosso estudo e outros estudos da literatura podem ser consequência de diversos fatores como: (i). método de detecção empregado, devido a diferenças na sensibilidade de detecção entre os métodos de cultivo

viral, sorológicos e moleculares (Sizun et al., 1998), e mesmo métodos moleculares podem apresentar diferenças quanto a sensibilidade dependendo da técnica molecular (PCR convencional x PCR Real Time x Nested PCR) ou mesmo da sensibilidade dos oligos utilizados no mesmo tipo de ensaios (Gerna et al., 2006; Chung et al., 2007); (ii). amplitude da metodologia empregada, sendo ou não capaz de detectar todos os 4 tipos de HCoV's descritos; (iii). características da população estudada como idade, doenças secundárias, características clínicas e severidade de sintomas (Infecção do trato respiratório superior ou inferior); (iv). natureza da amostra biológica (Heikkinen et al., 2002; Lambert et al., 2008; Lien Do et al., 2011); (v). região geográfica, o que representa diferenças em parâmetros como umidade, altitude, características das estações do ano e (vi). período e amplitude temporal do estudo.

Ainda se faz necessário a realização de estudos adicionais buscando entender o papel destes vírus na evolução de quadros clínicos em diferentes grupos de pacientes com diferentes gravidades de quadros respiratórios. Por fim, se faz necessário a realização de estudos envolvendo a pesquisa de coronavírus em diferentes regiões do Brasil para verificação de sua importância em regiões com climas diferenciados, como a região sul, norte e nordeste brasileiro.

O presente estudo trouxe diversos esclarecimentos quanto ao padrão de circulação dos 4 tipos de coronavírus em crianças com quadros de IRA. Além disso, também representa o primeiro isolamento e cultivo do genótipo B de HCoV- HKU-1, o primeiro cultivo de cepas oriundas da América Latina e o primeiro sequenciamento do gene Spike de isolados de cepas do Hemisfério Sul, o que pode vir a permitir a realização de análises evolutivas entre cepas de diferentes continentes.

6 CONCLUSÕES

1. O coronavírus humano OC43 foi o tipo viral de maior ocorrência absoluta e o vírus de maior circulação entre os coronavírus humanos na grande parte dos anos analisados,
2. os coronavírus humanos OC43, NL63 e HKU1 apresentam aparente importância no quadro de infecções respiratórias sendo detectadas em aproximadamente 9% das amostras analisadas,
3. coronavírus HKU1 e NL63 foram detectados em amostras coletadas em períodos anteriores a sua descoberta, demonstrando que ambos já circulavam no Brasil anteriormente a sua descrição,
4. dois genótipos de HCoV-HKU1 circulam no Brasil (HKU1-A, HKU1-B),
5. a ocorrência e a frequência de cada tipo de coronavírus no grupo estudado apresentam variação anual,
6. é possível a co-circulação dos 4 tipos de coronavírus em um mesmo ano , estação ou, menos comumente, no mesmo mês;
7. os coronavírus apresentam tendência de circulação nos meses do inverno e primavera no entanto, podem ser detectados durante todo os meses do ano.

REFERÊNCIAS¹

- Abdul-Rasool S, Fielding BC. Understanding human coronavirus HCoV-NL63. *Open Virol J*. 2010; 4:76-84.
- Albuquerque MC, Pena GP, Varella RB, Gallucci G, Erdman D, Santos N. Novel respiratory virus infections in children, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009;5:806-8.
- Almeida JD, Tyrrell DA. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. 1967; 1(2):175-8.
- Arden KE, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. New Human Coronavirus, HCoV-NL63 Associated With Severe Lower Respiratory Tract Disease in Australia. *J Med Virol*. 2005; 75:455-462.
- Arden KE, McErlean P, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *J Med Virol*. 2006;78(9):1232-40.
- Arruda E, Hayden FG, McAuliffe JF, Sousa MA, Mota SB, McAuliffe MI, Geist FC, Carvalho EP, Fernandes MC, Guerrant RL, Gwaltney Jr JM. Respiratory viral infections in ambulatory children of urban northeast Brazil. *J Infect Dis*. 1991;164:252-8.
- Baker SC. From common colds to severe acute respiratory syndrome. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23(11):1049-50.
- Baker SC. Coronaviruses: Molecular Biology. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV. *Desk Encyclopedia of General Virology*. Oxford (UK): Elsevier; 2009; 445-453.
- Banach, S., J. M. Orenstein, L. M. Fox, S. H. Randell, A. H. Rowley, and S. C. Baker. Human airway epithelial cell culture to identify new respiratory viruses: coronavirus NL63 as a model. *J. Virol. Methods* 2009;156:19–26
- Bastien N, Anderson K, Hart L, Van Caeseele P, Brandt K, Milley D, Hatchette T, Weiss EC, Li Y. Human coronavirus NL63 infection in Canada. *J Infect Dis*. 2005; 191(4):503-6.
- Beach JR & Schalm OW. A Filterable Virus, Distinct from that of Laryngotracheitis, the Cause of a Respiratory Disease of Chicks. *Poult Sci*. 1936;:199-206.
- Bellei N, Carraro E, Perosa A, Watanabe A, Arruda E, Granato C. Acute respiratory infection and influenza-like illness viral etiologies in brazilian adults. *J Med Virol*. 2008;80:1824-27.
- Boivin G, Baz M, Côté S, Gilca R, Deffrasnes C, Leblanc E, Bergeron MG, Déry P, De Serres G. Infections by human coronavirus-NL in hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(12):1045-8.
- Bosis S, Esposito S, Niesters HG, Zuccotti GV, Marseglia G, Lanari M, Zuin G, Pelucchi C, Osterhaus AD, Principi N. Role of respiratory pathogens in infants hospitalized for a first

¹ De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2011 Jul 15].

episode of wheezing and their impact on recurrences. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(7):677-84

Bradburne AF, Bynoe ML, Tyrrell DA. Effects of a “new” human respiratory virus in volunteers. *Br Med J.* 1967;3:767–769.

Bradburne AF, Somerset BA. Coronative antibody tires in sera of healthy adults and experimentally infected volunteers. *J Hyg (Lond).* 1972;70:235–244.

Brian DA, Baric RS. Coronavirus genome structure and replication. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;287:1-30.

Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates the causes of death in children. *Lancet.* 2005;365:1147-52.

Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond).* 2005;109(4):365-79.

Cabeça TK, Bellei N. Human coronavirus NL-63 infection in a Brazilian patient suspected of H1N1 2009 influenza infection: description of a fatal case. *J Clin Virol.* 2012;53(1):82-4.

Caetano JRM, Bordin IAS, Puccini RF, Peres CA. Fatores associados à internação hospitalar de crianças menores de cinco anos, São Paulo, SP. *Rev Saude Publica.* 2002;36(3):285-91.

Campos ACA, Durigon EL, Leal AL, Silva TS, Bosso PAR, Moraes CTP, Oliveira DBL, Lima HN, Vieira SE, Botosso VF, Zannotto PMA, Stewien KE. Comparison between ectodomain and G2 region of G glycoprotein for genotyping of HRSV. *Braz J Microbiol.* 2007;38:413-6.

Candeias JAN, Carvalho RPS, Antoniacio F. Seroepidemiologic study of coronavirus infection in brazilian children and civilian adults. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1972;14(2):121-5.

Canducci F, Debiaggi M, Sampaolo M, Marinozzi C, Berrè S, Terulla C, Gargantini G, Cambieri P, Romero E, Clementi M. Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. *J Med Virol.* 2008;80:716-23.

Chan CM, Lau SK, Woo PC, Tse H, Zheng BJ, Chen L, Huang JD, Yuen KY. Identification of major histocompatibility complex class I C molecule as an attachment factor that facilitates coronavirus HKU1 spike-mediated infection. *Virol.* 2009;83(2):1026-35.

Cheng SK, Wong CW, Tsang J, Wong KC. Psychological distress and negative appraisals in survivors of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Psychol Med.* 2004;34(7):1187-95.

Chiu SS, Chan KH, Chu KW, Kwan SW, Guan Y, Poon LL, Peiris JS. Human coronavirus NL63 infection and other coronavirus infections in children hospitalized with acute respiratory disease in Hong Kong, China. *Clin Infect Dis.* 2005;40(12):1721-9.

Choi EH, Lee HJ, Kim SJ, Eun BW, Kim NH, Lee JA, Lee JH, Song EK, Kim SH, Park JY, Sung JY. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005. *Clin Infect Dis*. 2006;43(5):585-92.

Chung JY, Han TH, Kim SW, Kim CK, Hwang ES. Detection of viruses identified recently in children with acute wheezing. *J Med Virol*. 2007;79(8):1238-43.

Costa LF, Yokosawa LFC, Mantese OC, Oliveira TFM, Silveira HL, Nepomuceno LL, Moreira LS, Dyonisio G, Rossi LMG, Oliveira RC, Ribeiro LZG, Queiroz DAO. Respiratory viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlândia, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(3):301-6.

da Silva Filho LV, Zerbinati RM, Tateno AF, Boas LV, de Almeida MB, Levi JE, Drexler JF, Drosten C, Pannuti CS. The differential clinical impact of human coronavirus species in children with cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 2012 Aug;206(3):384-8. Epub 2012 Mar 29.

de Vries AAF, Horzinek MC, Rottier PJM, de Groot RJ. The Genome Organization of the Nidovirales: Similarities and Differences between Arteri-, Toro-, and Coronaviruses. *Seminars in VIROLOGY* 1997; 8, 33–47

Dare RK, Fry AM, Chittaganpitch M, Sawanpanyalert P, Olsen SJ, Erdman DD. Human coronavirus infections in rural Thailand: a comprehensive study using real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assays. *J Infect Dis*. 2007;196:1321-8.

Dijkman, R., S. M. Koekkoek, R. Molenkamp, O. Schildgen, and L. van der Hoek. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells. *J. Virol*. 2009;83:7739–7748.

Dijkman, R., Jebbink, M. F., Gaunt, E., Rossen, J. W., Templeton, K. E., Kuijpers, T. W. & 468 van der Hoek, L. The dominance of human coronavirus OC43 and NL63 469 infections in infants. 2012. *J Clin Virol* 53, 135-139.

Dominguez SR, Anderson MS, Glodé MP, Robinson CC, Holmes KV. Blinded case-control study of the relationship between human coronavirus NL63 and Kawasaki syndrome. *J Infect Dis*. 2006;194(12):1697-701.

Dominguez SR, Robinson CC, Holmes KV. Detection of four human coronaviruses in respiratory infections in children: a one-year study in Colorado. *J Med Virol*. 2009;81(8):1597-604.

Dominguez SR, Sims GE, Wentworth DE, Halpin RA, Robinson CC, Town CD, Holmes KV. Genomic Analysis of 16 Colorado Human NL63 Coronaviruses Identifies a New Genotype, High Sequence Diversity in the N-terminal Domain of the Spike Gene, and Evidence of Recombination. *J Gen Virol*. 2012;[Epub ahead of print]

Doyle LP & Hutchings LM. A transmissible gastroenteritis in pigs. *J Am Vet Med Assoc*. 1946;108:257-9.

Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. 2003. *N Engl J Med*. 348:1967–1976.

- Ebihara T, Endo R, Ma X, Ishiguro N, Kikuta H. Detection of human coronavirus NL63 in young children with bronchiolitis. *J Med Virol*. 2005;75(3):463-5.
- Escutenaire S, Mohamed N, Isaksson M, Thorén P, Klingeborn B, Belák S, Berg M, Blomberg J. SYBR Green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses. *Arch Virol*. 2007;152(1):41-58.
- Esper F, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children. *J Infect Dis*. 2005;191(4):492-8.
- Esper F, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in United States. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:775-9.
- Esper F, Ou Z, Huang YT. Human coronaviruses are uncommon in patients with gastrointestinal illness. 2010. *J Clin Virol*. 48(2):131-3.
- Esposito S, Bosis S, Niesters HG, Tremolati E, Begliatti E, Rognoni A, Tagliabue C, Principi N, Osterhaus AD. Impact of human coronavirus infections in otherwise healthy children who attended an emergency department. *J Med Virol*. 2006;78(12):1609-15.
- Fabbiani M, Terrosi C, Martorelli B, Valentini M, Bernini L, Cellesi C, Cusi MG. Epidemiological and clinical study of viral respiratory tract infections in children from Italy. *J Med Virol*. 2009;81(4):750-6.
- Falsey AR, Walsh EE, Hayden FG. Rhinovirus and coronavirus infection-associated hospitalizations among older adults. *J Infect Dis*. 2002;185(9):1338-41.
- Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, Niemeyer B, de Jong JC, Simon JH, Osterhaus AD. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(16):6212-6.
- Gaunt ER, Hardie A, Claas EC, Simmonds P, Templeton KE. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. *J Clin Microbiol*. 2010;48(8):2940-7.
- Gedalia A. Kawasaki disease: 40 years after the original report: *Curr Rheumatol Rep* 2007; 9:336-41
- Gerna G, Passarani N, Cereda PM, Battaglia M. Antigenic relatedness of human enteric coronavirus strains to human coronavirus OC43: a preliminary report. 1984. *J Infect Dis*. 150(4):618-9.
- Gerna G, Campanini G, Rovida F, Percivalle E, Sarasini A, Marchi A, Baldanti F. Genetic variability of human coronavirus OC43-, 229E-, and NL63-like strains and their association with lower respiratory tract infections of hospitalized infants and immunocompromised patients. *J Med Virol*. 2006;78(7):938-49.
- Gerna G, Percivalle E, Sarasini A, Campanini G, Piralla A, Rovida F, Genini E, Marchi A, Baldanti F. Human respiratory coronavirus HKU1 versus other coronavirus infections in Italian hospitalised patients. *J Clin Virol*. 2007;38(3):244-50.

Goes LG, Durigon EL, Campos AA, Hein N, Passos SD, Jerez JA. Coronavirus HKU1 in children, Brazil, 1995. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(6):1147-8.

Gorse GJ, O'Connor TZ, Hall SL, Vitale JN, Nichol KL. Human coronavirus and acute respiratory illness in older adults with chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis.* 2009;199(6):847-57.

Gruenheid, S., L. Gatzke, H. Meadows, and F. Tufaro. Herpes simplex virus infection and propagation in a mouse L cell mutant lacking heparin sulfate proteoglycans. *J. Virol.* 1993. 67:93–100.

Guan Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL, Luo SW, Li PH, Zhang LJ, Guan YJ, Butt KM, Wong KL, Chan KW, Lim W, Shortridge KF, Yuen KY, Peiris JS, Poon LL. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science.* 2003;302(5643):276-8.

Hamre D, Procknow JJ. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1966;121(1):190-3.

Han TH, Chung JY, Kim SW, Hwang ES. Human Coronavirus-NL63 infections in Korean children, 2004-2006. *J Clin Virol.* 2007;38(1):27-31

Hart CA, Cuevas LE. Acute respiratory infections in children. *Rev Bras Saude Mater Infant.* 2007;7(1):23-9.

Hayden FG. Respiratory viral threats. *Curr opin Infect Dis.* 2006;19:169-78.

Heikkinen T, Järvinen A. The common cold. *Lancet.* 2003;361(9351):51-9. Review.

Heikkinen T, Marttila J, Salmi AA, Ruuskanen O. Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses. *J Clin Microbiol.* 2002;40(11):4337-9.

Hemming VG. Viral respiratory diseases in children: classification, etiology, epidemiology, and risk factors. *J Pediatr.* 1994;124(5Pt2):S13-6.

Herzog P, Drosten C, Müller MA. Plaque assay for human coronavirus NL63 using human colon carcinoma cells. *Virol J.* 2008;5:138.

Hofmann H, Pyrc K, van der Hoek L, Geier M, Berkhout B, Pöhlmann S. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(22):7988-93.

Holmes KV. Coronaviruses. In: Knipe DM and Howley PM eds. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins; 2001. Cap. 36, p. 1187-1203.

Holmes, KV. Coronaviruses (Coronaviridae). In: Granoff A e Webster RG eds. *Encyclopedia of Virology*. 2nd ed. Academic Press. 1999. p. 291-298

Holmes KV. SARS-Associated Coronavirus. *N Engl J Med.* 2003; 348 (20): 1948-1951.

Hung EC, Chim SS, Chan PK, Tong YK, Ng EK, Chiu RW, Leung CB, Sung JJ, Tam JS, Lo YM. Detection of SARS coronavirus RNA in the cerebrospinal fluid of a patient with severe acute respiratory syndrome. *Clin Chem*. 2003;49(12):2108-9.

Jerez JA, Gregori F, Brandão PE, Ito FH, Buzinaro MG, Sakai T. Isolation of bovine coronavirus (BCov) in HmLu-1 monolayer cells. *Braz J Microbiol*. 2005;36:207-10.

Jin Y, Zhang RF, Xie ZP, Yan KL, Gao HC, Song JR, Yuan XH, Cheng WX, Hou YD, Duan ZJ. Newly identified respiratory viruses associated with acute lower respiratory tract infections in children in Lanzou, China, from 2006 to 2009. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(1):74-80.

Jonassen CM, et al. Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columbia livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). *J. Gen. Virol*. 2005; 86: 1597–1607.

Kahn JS. The widening scope of coronaviruses. *Current Opin Pediatr*. 2006;18:42-46.

Kahn JS, McIntosh K. History and recent advances in coronavirus discovery. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24:s223-7.

Kaiser L, Regamey N, Roiha H, Deffernez C, Frey U. Human coronavirus NL63 associated with lower respiratory tract symptoms in early life. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(11):1015-7.

Kaye M. SARS-associated coronavirus replication in cell lines. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(1):128-33.

Kusel MM, de Klerk NH, Holt PG, Keadze T, Johnston SL, Sly PD. Role of respiratory viruses in acute upper and lower respiratory tract illness in the first year of life: a birth cohort study. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25(8):680-6.

Kuypers J, Martin ET, Heugel J, Wright N, Morrow R, Englund JA. Clinical disease in children associated with newly described coronavirus subtypes. *Pediatrics*. 2007;119(1):70-6.

Kistler A, Avila PC, Rouskin S, Wang D, Ward T, Yagi S, Schnurr D, Ganem D, DeRisi JL, Boushey HA. Pan-viral screening of respiratory tract infections in adults with and without asthma reveals unexpected human coronavirus and human rhinovirus diversity. *J Infect Dis*. 2007;196(6):817-25.

Koetz A, Nilsson P, Lindén M, van der Hoek L, Ripa T. Detection of human coronavirus NL63, human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in children with respiratory tract infections in south-west Sweden. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(11):1089-96.

Kon M, Watanabe K, Tazawa T, Watanabe K, Tamura T, Tsukagoshi H, Noda M, Kimura H, Mizuta K. Detection of human coronavirus NL63 and OC43 in children with acute respiratory infections in Niigata, Japan, between 2010 and 2011. *Jpn J Infect Dis*. 2012;65(3):270-2.

Kristoffersen AW, Nordbø SA, Rognlien AG, Christensen A, Døllner H. Coronavirus causes lower respiratory tract infections less frequently than RSV in hospitalized Norwegian children. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(4):279-83.

Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. 2003. *N Engl J Med*. 348:1953–1966.

Lai MM, Perlman S, Anderson LJ. Coronaviridae. In: Knipe DM and Howley PM eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins; 2007. Cap 36., p. 1306-35.

Lai MM, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res*. 1997;48:1-100.

Lambert SB, Allen KM, Druce JD, Birch CJ, Mackay IM, Carlin JB, Carapetis JR, Sloots TP, Nissen MD, Nolan TM. Community epidemiology of human metapneumovirus, human coronavirus NL63, and other respiratory viruses in healthy preschool-aged children using parent-collected specimens. *Pediatrics*. 2007;120(4):e929-37.

Larson HE, Reed SE, Tyrell DAJ. Isolation of rhinoviruses and coronaviruses from 38 colds in adults. *J Med Virol*. 1980;5:221-9.

Lau SK, Woo PC, Li KS, Huang Y, Tsoi HW, Wong BH, Wong SS, Leung SY, Chan KH, Yuen KY. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(39):14040-5.

Lau SK, Woo PC, Yip CC, Tse H, Tsoi HW, Cheng VC, Lee P, Tang BS, Cheung CH, Lee RA, So LY, Lau YL, Chan KH, Yuen KY. Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong. *J Clin Microbiol*. 2006;44(6):2063-71.

Leung TF, Li CY, Lam WY, Wong GW, Cheuk E, Ip M, Ng PC, Chan PK. Epidemiology and clinical presentations of human coronavirus NL63 infections in Hong Kong children. *J Clin Microbiol*. 2009;47(11):3486-92.

Leung TF, Chan PK, Wong WK, Ip M, Cheng WT, Ng PC. Human coronavirus NL63 in children: epidemiology, disease spectrum, and genetic diversity. *Hong Kong Med J*. 2012;18 Suppl 2:27-30.

Li, W., J. Sui, I. C. Huang, J. H. Kuhn, S. R. Radoshitzky, W. A. Marasco, H. Choe, and M. Farzan. 2007. The S proteins of human coronavirus NL63 and severe acute respiratory syndrome coronavirus bind overlapping regions of ACE2. *Virology* 367:367-374.

Lie YS e Petropoulos CJ. Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Curr Opin Biotechnol*. 1998; 9:43-48

Lien Do AH, van Doorn HR, Nghiem MN, Bryant JE, Hoang TH, Do QH, Van TL, Tran TT, Wills B, Nguyen VC, Vo MH, Vo CK, Nguyen MD, Farrar J, Tran TH, de Jong MD. Viral etiologies of acute respiratory infections among hospitalized Vietnamese children in Ho Chi Minh City, 2004-2008. *PLoS One*. 2011;6(3):e18176.

Lin X, O'Reilly KL, Storz J. Infection of polarized epithelial cells with enteric and respiratory tract bovine coronaviruses and release of virus progeny. *Am J Vet Res*. 1997;58(10):1120-4.

Lu R, Yu X, Wang W, Duan X, Zhang L, Zhou W, Xu J, Xu L, Hu Q, Lu J, Ruan L, Wang Z, Tan W. Characterization of human coronavirus etiology in Chinese adults with acute upper respiratory tract infection by real-time Rt-PCR assays. *PLoS One*. 2012;7(6):e38638.

Macedo IS. Frequência de coronavírus e rinovírus como causa de infecções respiratórias agudas em crianças. [dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada)] - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

Mackay IM, Arden KE, Speicher DJ, O'Neil NT, McErlean PK, Greer RM, Nissen MD, Sloots TP. Co-circulation of four human coronaviruses (HCoV) in Queensland children with acute respiratory tract illnesses in 2004. *Viruses*. 2012 Apr;4(4):637-53.

Mahony JB, Richardson S. Molecular diagnosis of severe acute respiratory syndrome: the state of the art. *J Mol Diag*. 2005;7(5):551-9.

Makela MJ, Puhakka T, Ruuskanen O, Leinonen M, Saikku P, Kimpimäki M, Blomqvist S, Hyypiä T, Arstila P. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol*. 1998; 36(2):539-42.

McIntosh K, Dees JH, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock RM. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967;57(4):933-40.

McIntosh K, Kapikian AZ, Hardison KA, Hartley JW, Chanock RM. Antigenic relationships among the coronaviruses of man and between human and animal coronaviruses. *J Immunol*. 1969;102(5):1109-18.

McIntosh K, Kapikian AZ, Turner HC, Hartley JW, Parrott RH, Chanock RM. Seroepidemiologic studies of coronavirus infection in adults and children. *Am J Epidemiol*. 1970;91(6):585-92

McIntosh K, Chao RK, Krause HE, Wasil R, Mocega HE, Mufson MA. Coronavirus infection in acute lower respiratory tract disease of infants. *J Infect Dis*. 1974; 130(5):502-7.

McIntosh K, Halonen P, Ruuskanen O. Report of a workshop on respiratory viral infections: epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Infect Dis*. 1993;16(1):151-64.

McIntosh K. Coronaviruses in the limelight. *J Infect Dis*. 2005;191(4):489-91.

Mihindukulasuriya KA, Wu G, St Leger J, Nordhausen RW, Wang D. Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. *J Virol*. 2008;82(10):5084-8.

Minosse C, Selleri M, Zaniratti MS, Cappiello G, Spanò A, Schifano E, Lauria FN, Gualano G, Puro V, Campanini G, Gerna G, Capobianchi MR. Phylogenetic analysis of human coronavirus NL63 circulating in Italy. *J Clin Virol*. 2008;43(1):114-9.

Moes E, Vijgen L, Keyaerts E, Zlateva K, Li S, Maes P, Pyrc K, Berkhout B, Van der Hoek L, Van Ranst M. A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. *BMC Infect Dis*. 2005;5(1):6.

Monto AS. Medical reviews: coronaviruses. *Yale J Biol Med* 1974; 47:234–251.

Muller A, Tillmann RL, Muller A, Simon A, Schildgen O. Stability of human metapneumovirus and human coronavirus NL63 on medical instruments and in the patient environment. *J Hosp Infect.* 2008;69: 406-8.

Myint S, Johnston S, Sanderson G, Simpson H. Evaluation of nested polymerase chain methods for the detection of human coronaviruses 229E and OC43. *Mol Cell Probes.* 1994;8(5):357-64.

Norkin LC. In: *Virology: Molecular Biology and Pathogenesis*. 1 ed. Washington DC. American Society for Microbiology. Press: 2010, Cap 9. P. 235-260.

Oliveira DBL. Epidemiologia e caracterização molecular do Metapneumovírus humano na cidade de São Paulo, Brasil (2003 a 2006). [tese (Doutorado em Ciências - Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007.

Oliveira DB, Durigon EL, Carvalho AC, Leal AL, Souza TS, Thomazelli LM, Moraes CT, Vieira SE, Gilio AE, Stewien KE. Epidemiology and genetic variability of human metapneumovirus during a 4-year-long study in Southeastern Brazil. *J Med Virol.* 2009;81(5):915-21.

Papa A, Papadimitriou E, Luna LK, Al Masri M, Souliou E, Eboriadou M. Antoniadis A, Drosten C. Coronaviruses in children, Greece. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:947-9.

Park SJ, Jeong C, Yoon SS, Choy HE, Saif LJ, Park SH, Kim YJ, Jeong JH, Park SI, Kim HH, Lee BJ, Cho HS, Kim SK, Kang MI, Cho KO. Detection and characterization of bovine coronaviruses in fecal specimens of adult cattle with diarrhea during the warmer seasons. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3178-88.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION *Pan American Sanitary Bureau, Regional Office of the WORLD HEALTH ORGANIZATION*. Prepared by PAHO's SEVERE acute respiratory syndrome (SARS) update. *Epidemiological Bulletin/PAHO.* 2003;V24(2):11. Area of Disease Prevention and Control, Communicable Diseases Unit (DPC/CD). Disponível em: http://www.paho.org/english/dd/ais/EB_v24n2.pdf

Perosa AHS. Infecção por rinovírus e coronavírus em grupos de pacientes da cidade de São Paulo. [dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias)] - Departamento de Infectologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2004.

Pierangeli A, Gentile M, Di Marco P, Pagnotti P, Scagnolari C, Trombetti S, Lo Russo L, Tromba V, Moretti C, Midulla F, Antonelli G. Detection and typing by molecular techniques of respiratory viruses in children hospitalized for acute respiratory infection in Rome, Italy. *J Med Virol.* 2007;79(4):463-8.

Pilger DA, Cantarelli VV, Amantea SL, Leistner-Segal S. Detection of human bocavirus and human metapneumovirus by real-time PCR from patients with respiratory symptoms in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(1):56-60.

Poon LL, Chan KH, Wong OK, Cheung TK, Ng I, Zheng B, Seto WH, Yuen KY, Guan Y, Peiris JS. Detection of SARS coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome by conventional and real-time quantitative reverse transcription-PCR assays. *Clin Chem.* 2004;50(1):67-72.

Prill MM, Iwane MK, Edwards KM, Williams JV, Weinberg GA, Staat MA, Willby MJ, Talbot HK, Hall CB, Szilagyi PG, Griffin MR, Curns AT, Erdman DD; New Vaccine Surveillance Network. Human coronavirus in young children hospitalized for acute respiratory illness and asymptomatic controls. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(3):235-40.

Principi N, Bosis S, Esposito S. Effects of coronavirus infections in children. 2010. *Emerg Infect Dis*. 16(2):183-8.

Pyrk K, Berkhout B, Van der Hoek L. Identification of new human coronaviruses. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007;5(2):245-53.

Pyrk K, Dijkman R, Deng L, et al. Mosaic structure of human coronavirus NL63, one thousand years of evolution. *J Mol Biol* 2006; 364: 964-73.

Pyrk K, Sims AC, Dijkman R, Jebbink M, Long C, Deming D, Donaldson E, Vabret A, Baric R, Van der Hoek L, Pickles R. Culturing the unculturable: human coronavirus HKU1 infects, replicates, and produces progeny virions in human ciliated airway epithelial cell cultures. *J Virol*. 2010;84(21):11255-6.

Regamey N, Kaiser L, Roiha HL, Deffernez C, Kuehni CE, Latzin P, Aebi C, Frey U; Swiss Paediatric Respiratory Research Group. Viral etiology of acute respiratory infections with cough in infancy: a community-based birth cohort study. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27(2):100-5.

Ren L, Gonzalez R, Xu J, Xiao Y, Li Y, Zhou H, Li J, Yang Q, Zhang J, Chen L, Wang W, Vernet G, Paranhos-Baccalà G, Wang Z, Wang J. Prevalence of human coronaviruses in adults with acute respiratory tract infections in Beijing, China. *J Med Virol*. 2011;83(2):291-7.

Resta S, Luby JP, Rosenfeld CR, Siegel JD. Isolation and propagation of a human enteric coronavirus. 1985. *Science*. 229(4717):978-81.

Richardson SE, Tellier R, Mahony J. The laboratory diagnosis of severe acute respiratory syndrome: emerging laboratory tests for an emerging pathogen. *Clin Biochem Rev*. 2004;25(2):133-42.

Rihkanen H, Rönkkö E, Nieminen T, Komsu KL, Rätty R, Saxen H, Ziegler T, Roivainen M, Söderlund-Venermo M, Beng AL, Hovi T, Pitkäranta A. Respiratory viruses in laryngeal croup of young children. *J Pediatr*. 2008;152(5):661-5.

Risku M, Lappalainen S, Räsänen S, Vesikari T. Detection of human coronaviruses in children with acute gastroenteritis. 2010. *J Clin Virol*. 48(1):27-30.

Rousset S, Moscovici O, Lebon P, Barbet JP, Helardot P, Macé B, Bargy F, Le Tan Vinh, Chany C. Intestinal lesions containing coronavirus-like particles in neonatal necrotizing enterocolitis: an ultrastructural analysis. 1984. *Pediatrics*. 73(2):218-24.

Ruohola A, Waris M, Allander T, Ziegler T, Heikkinen T, Ruuskanen O. Viral etiology of common cold in children, Finland. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(2):344-6.

Sampath R, Hofstadler SA, Blyn LB, Eshoo MW, Hall TA, Massire C, Levene HM, Hannis JC, Harrell PM, Neuman B, Buchmeier MJ, Jiang Y, Ranken R, Drader JJ, Samant V, Griffey RH, McNeil JA, Crooke ST, Ecker DJ. Rapid identification of emerging pathogens: coronavirus. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(3):373-9.

Sawicki SG, Sawicki DL, Siddell SGJ. A contemporary view of coronavirus transcription. *J Virol*. 2007;81(1):20-9.

Silva MR, O'Reilly KL, Lin X, Stine L, Storz J. Sensitivity comparison for detection of respiratory bovine coronaviruses in nasal samples from feedlot cattle by ELISA and isolation with the G clone of HRT-18 cells. *J Vet Diagn Invest*. 1999;11:15-9.

Sizun J, Arbour N, Talbot PJ. Comparison of immunofluorescence with monoclonal antibodies and RT-PCR for the detection of human coronaviruses 229E and OC43 in cell culture. *J Virol Methods*. 1998;72(2):145-52.

Shao X, Guo X, Esper F, Weibel C, Kahn JS. Seroepidemiology of group I human coronaviruses in children. *Clin Virol*. 2007;40(3):207-13.

Sloots TP, McErlean P, Speicher DJ, Arden KE, Nissen MD, Mackay IM. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J Clin Virol*. 2006;35(1):99-102.

Sloots TP, Whiley DM, Lambert SB, Nissen MD. Emerging respiratory agents: new viruses for old diseases? *J Clin Virol*. 2008;42(3):233-43.

Stadler K, Masignani V, Eickmann M, Becker S, Abrignani S, Klenk HD, Rappuoli R. SARS--beginning to understand a new virus. *Nat Rev Microbiol*. 2003;1(3):209-18.

Wang, AC, Baric RS, Yount B, Burkett SE, Collins PL, Pickles RJ. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of human ciliated airway epithelia: role of ciliated cells in viral spread in the conducting airways of the lungs. *J. Virol*. 2005;79:15511–15524.

Severance EG, Dickerson FB, Viscidi RP, Bossis I, Stallings CR, Origoni AE, Sullens A, Yolken RH. Coronavirus immunoreactivity in individuals with a recent onset of psychotic symptoms. *Schizophr Bull*. 2011;37(1):101-7.

Sizun J, Yu MW, Talbot PJ. Survival of human coronaviruses 229E and OC43 in suspension and after drying on surfaces: a possible source of hospital-acquired infections. *J Hosp Infect*. 2000;46(1):55-60.

Souza EC. Perfil Etiológico das diarreias agudas em crianças atendidas em um pronto socorro de hospital regional da cidade de São Paulo. [dissertação (Mestrado em Medicina - Pediatria)] - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

Smuts H, Workman L, Zar H. Role of human metapneumovirus, human coronavirus NL-63 e human bocavirus in infants and young children with acute wheezing. *J Med Virol*. 2008;80(5):906-12.

Sung RY, Chan PK, Tsen T, Li AM, Lam WY, Yeung AC, Nelson EA. Identification of viral and atypical bacterial pathogens in children hospitalized with acute respiratory infections in Hong Kong by multiplex PCR assays. *Med Virol*. 2009;81(1):153-9.

- Sung JY, Lee HJ, Eun BW, Kim SH, Lee SY, Lee JY, Park KU, Choi EH. Role of human coronavirus NL63 in hospitalized children with croup. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(9):822-6.
- Stephensen CB, Casebolt DB, Gangopadhyay NN. Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. *Virus Res*. 1999;60(2):181-9.
- Suzuki A, Okamoto M, Ohmi A, Watanabe O, Miyabayashi S, Nishimura H. Detection of human coronavirus-NL63 in children in Japan. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(7):645-6
- Talbot HK, Crowe JE, Edwards KM, Griffin MR, Zhu Y, Weinberg GA, Szilagyi PG, Hall CB, Podsiad AB, Iwane M, Williams JV and New Vaccine Surveillance Network. Coronavirus infection and hospitalizations for acute respiratory illness in young children. *J Med Virol*. 2009;81(5):853-6.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007;24:1596-9.
- Theamboonlers A, Samransamruajkit R, Thongme C, Amonsin A, Chongsrisawat V, Poovorawan Y. Human coronavirus infection among children with acute lower respiratory tract infection in Thailand. *Intervirology*. 2007;50(2):71-7
- Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL, Sousa TS, Oliveira DB, Golono MA, Gillio AE, Stewien KE, Erdman DD, Durigon EL. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83(5):422-8.
- Tompkins, W.A.; Watrach, A.M.; Schmale, J.D.; Schultz, R.M.; Harris, J.A. Cultural and antigenic properties of newly established cell strains derived from adenocarcinomas of the human colon and rectum. *J Natl Cancer Inst*. 1974; 52(4):1101-10.
- Tresnan, D. B., and K. V. Holmes. 1998. Feline aminopeptidase N is a receptor for all group I coronaviruses. *Adv. Exp. Med. Biol*. 1998;440:69–75.
- Tsuchiya LRRV, Costa LMD, Raboni SM, Nogueira MB, Pereira LA, Rotta I, Takahashi GRA, Coelho M, Siqueira MM. Viral respiratory infection in Curitiba, Southern Brazil. *J Infect*. 2005;51:401-7.
- Tyrrel DA & Bynoe ML. 1965. Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *Br Med. J* 1: 1467-70
- Tyrrel DA, Bynoe ML. 1966. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Lacente* 1:76-77
- Tyrrell DA, Almeida JD, Cunningham CH, Dowdle WR, Hofstad MS, McIntosh K, Tajima M, Zakstelskaya LY, Easterday BC, Kapikian A, Bingham RW. 1975. Coronaviridae. *Intervirology*. 5(1-2):76-82.
- Ugolini, S, Mondor I, Sattentau QJ. HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol*. 1999;7:144–149.

- Vabret A, Mouthon F, Mourez T, Gouarin S, Petitjean J, Freymuth F. Direct diagnosis of human respiratory coronaviruses 229E and OC43 by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 2001;97(1-2):59-66.
- Vabret A, Mourez T, Gouarin S, Petitjean J, Freymuth F. An outbreak of coronavirus OC43 respiratory infection in Normandy, France. *Clin Infect Dis*. 2003 Apr 15;36(8):985-9.
- Vabret A, Mourez T, Dina J, van der Hoek L, Gouarin S, Petitjean J, Brouard J, Freymuth F. Human Coronavirus NL63, France. *Emerging Infectious Diseases*. 2005;11(8): 1225-1229.
- Vabret A, Dina J, Gouarin S, Petitjean J, Corbet S, Freymuth F. Detection of the new human coronavirus HKU1: a report of 6 cases. *Clin Infect Dis*. 2006;42(5):634-9.
- Vabret A, Dina J, Gouarin S, Petitjean J, Tripey V, Brouard J, Freymuth F. Human (non-severe acute respiratory syndrome) coronavirus infections in hospitalised children in France. *J Paediatr Child Health*. 2008;44(4):176-81.
- Vallet S, Gagneur A, Talbot PJ, Legrand MC, Sizun J, Picard B. Detection of human Coronavirus 229E in nasal specimens in large scale studies using an RT-PCR hybridization assay. *Mol Cell Probes*. 2004;18(2):75-80.
- Van Elden LJ, Van Loon AM, Van Alphen F, Hendriksen KA, Hoepelman AI, Van Kraaij MG, Oosterheert JJ, Schipper P, Schuurman R, Nijhuis M. Frequent detection of human coronaviruses in clinical specimens from patients with respiratory tract infection by use of a novel real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Infect Dis*. 2004;189(4): 652-7.
- Van de Pol AC, Wolfs TF, Jansen NJ, Van Loon AM, Rossen JW. Diagnostic value of real-time polymerase chain reaction to detect viruses in young children admitted to the pediatric intensive care unit with lower respiratory tract infection. *Critical Care*. 2006;10(2):R61.
- Van der Hoek L, Ihorst G, Sure K, Vabret A, Dijkman R, de Vries M, Forster J, Berkhout B, Uberla K. Burden of disease due to human coronavirus NL63 infections and periodicity of infection. *J Clin Virol*. 2010;48(2):104-8.
- van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PM, Kaandorp J, Spaargaren J, Berkhout B. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med*. 2004;10(4):368-73.
- van der Hoek L, Pyrc K, Berkhout R.J. Human coronavirus NL63, a new respiratory virus. *FEMS Microbiol Rev*. 2006;30:760-73.
- van der Hoek L, Sure K, Ihorst G, Stang A, Pyrc K, et al. 2005. Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS Med* 2(8):e240
- van der Hoek L, Ihorst G, Sure K, Vabret A, Dijkman R, de Vries M, Forster J, Berkhout B, Uberla K. Burden of disease due to human coronavirus NL63 infections and periodicity of infection. *J Clin Virol*. 2010;48(2):104-8.
- Vautherot, J.F. Plaque assay for titration of bovine enteric coronavirus. 1981. *J Gen Virol*. 56(Pt 2):451-5.

Venter M, Lassaunière R, Kresfelder TL, Westerberg Y, Visser A. Contribution of common and recently described respiratory viruses to annual hospitalizations in children in South Africa. *J Med Virol*. 2011;83(8):1458-68.

Vieira SE, Stewien KE, Queiróz DAO, Durigon EL, Torok TJ, Anderson LJ, Miyao CR, Hein N, Botosso VF, Pahl MM, Gilio AE, Ejzenberg B, Okay Y. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2001;43:125-31.

Vijgen L, Keyaerts E, Moës E, Maes P, Duson G, Van Ranst M. Development of one-step, real-time, quantitative reverse transcriptase PCR assays for absolute quantitation of human coronaviruses OC43 and 229E. *J Clin Microbiol*. 2005;43(11):5452-6.

Vlasak, R., W. Luytjes, W. Spaan, and P. Palese. 1988. Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4526–4529

Wang, G., C. Deering, M. Macke, J. Shao, R. Burns, D. M. Blau, K. V. Holmes, B. L. Davidson, S. Perlman, and P. B. McCray, Jr. Human coronavirus 229E infects polarized airway epithelia from the apical surface. *J. Virol*. 2000;74:9234–9239.

Watanabe, R., S. G. Sawicki, and F. Taguchi. Heparan sulfate is a binding molecule but not a receptor for CEACAM1-independent infection of murine coronavirus. *Virology* 2007; 366:16–22.

Weiss SR, Navas-Martin S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2005;69:635-64.

Wevers BA e van der Hoek L. Recently discovered human coronaviruses. *Clin Lab Med*. 2009;29(4):715-24. Review.

Williams BG, Gouws E, Boschi-Pinto C, Bryce J, Dye C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *Lancet Infect Dis*. 2002;2:25-32.

WHO (2008). *The Global Burden of Disease: 2004 Update*. Geneva, Switzerland: WHO Press.

Woo PC, Chiu SS, Seto WH, Peiris M. Cost-effectiveness of rapid diagnosis of viral respiratory tract infections in pediatric patients. *J Clin Microbiol*. 1997;35(6):1579-81.

Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, Poon RW, Cai JJ, Luk WK, Poon LL, Wong SS, Guan Y, Peiris JS, Yuen KY. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol*. 2005;79:884-95.

Woo PC, Lau SK, Li KS, Poon RW, Wong BH, Tsoi HW, Yip BC, Huang Y, Chan KH, Yuen KY. Molecular diversity of coronaviruses in bats. *Virology*. 2006;351(1):180-7.

Woo PC, Lau SK, Huang Y, Yuen KY. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med*. 2009a;234(10):1117-27.

Woo PC, Lau SK, Yip CC, Huang Y, Yuen KY. More and More Coronaviruses: Human Coronavirus HKU1. *Viruses*. 2009b;1:57-71.

Woo PC, Lau SK, Lam CS, Lau CC, Tsang AK, Lau JH, Bai R, Teng JL, Tsang CC, Wang M, Zheng BJ, Chan KH, Yuen KY. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus Deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *J. Virol*. 2012; 86:3995-4008.

Wu PS, Chang LY, Berkhout B, van der Hoek L, Lu CY, Kao CL, Lee PI, Shao PL, Lee CY, Huang FY, Huang LM. Clinical manifestations of human coronavirus NL63 infection in children in Taiwan. *Eur J Pediatr*. 2008;167(1):75-80.

Yount B, Roberts RS, Sims AC, Deming D, Frieman MB, Sparks J, Denison MR, Davis N, Baric RS. Severe acute respiratory syndrome coronavirus group-specific open reading frames encode nonessential functions for replication in cell cultures and mice. 2005. *J Virol*. 79(23):14909-22.

Yuen KY, Lau SK, Woo PC. Wild animal surveillance for coronavirus HKU1 and potential variants of other coronaviruses. *Hong Kong Med J*. 2012;18(2):25-6.

Zhong Y, Tan YW, Liu DX. Recent progress in studies of arterivirus- and coronavirus-host interactions. *Viruses*. 2012;4(6):980-1010.

APÊNDICES

Apêndice 1. Alinhamento de nucleotídeos do fragmento da polimerase do coronavírus humanos OC43 dos anos de 1995 a 2008

(Continuação)

[illegible]

Apêndice 2. Alinhamento de nucleotídeos do fragmento da polimerase do coronavírus humanos NL63 dos anos de 1995 a 2008 (Continuação)

(Continuação)

		100	110	120	130	140	150	160	170
NC005831	NL63	TTT	TATAGG	CTTGGT	AATGAG	TGGCAC	AAGTTT	TAAACAG	AAGTTGTTTATTCTAATGGTGGTTTTTATTTTAAGCCAGGTGG
158_1999		.	.	.	.	.	.	.	.
06_2000		.	.	.	.	.	.	.	.
51_2000		.	.	.	.	.	.	.	.
65_2000		.	.	.	.	.	.	.	.
26_2001		.	.	.	.	.	.	.	.
85_2002		.	.	.	.	.	.	.	.
212_2003		.	.	.	.	.	.	.	.
70_2004		.	.	.	.	.	.	.	.
76_2004		.	.	.	.	.	.	.	.
124_2004		.	.	.	.	.	.	.	.
139_2004		.	.	.	.	.	.	.	.
238_2004		.	.	.	.	.	.	.	.
290_2004		.	.	.	.	.	.	.	.
317_2004		.	.	.	.	.	.	.	.
359_2004		.	.	.	.	.	.	.	.
369_2004		.	.	.	.	.	.	.	.
9_2005		.	.	.	.	.	.	.	.
78_2005		.	.	.	.	.	.	.	.
303_2005		.	.	.	.	.	.	.	.
555_2006		.	.	.	.	.	.	.	.
586_2006		.	.	.	.	.	.	.	.
587_2006		.	.	.	.	.	.	.	.
671_2006		.	.	.	.	.	.	.	.
911_2006		.	.	.	.	.	.	.	.
994_2006		.	.	.	.	.	.	.	.
1135_2006		.	.	.	.	.	.	.	.
1167_2006		.	.	.	.	.	.	.	.
1176_2006		.	.	.	.	.	.	.	.
1195_2006		.	.	.	.	.	.	.	.
1221_2006		.	.	.	.	.	.	.	.
1281_2006		.	.	.	.	.	.	.	.
1283_2006		.	.	.	.	.	.	.	.
1286_2006		.	.	.	.	.	.	.	.
1288_2006		.	.	.	.	.	.	.	.
1290_2006		.	.	.	.	.	.	.	.
1304_2006		.	.	.	.	.	.	.	.
1639_2007		.	.	.	.	.	.	.	.
2871_2007		.	.	.	.	.	.	.	.
2902_2008		.	.	.	.	.	.	.	.
2903_2008		.	.	.	.	.	.	.	.
2977_2008		.	.	.	.	.	.	.	.
2978_2008		.	.	.	.	.	.	.	.
3090_2008		.	.	.	.	.	.	.	.
3671_2008		.	.	.	.	.	.	.	.

Apêndice 3 . Alinhamento de nucleotídeos do fragmento da polimerase do coronavírus humanos NL63 dos anos de 1995 a 2008 (Continuação)

(Continuação)

		100	110	120	130	140	150	160	170
AY597011 HKU1 A	TTTTATCGCCTTGC	GAATG	TGCTCAAGTTT	GAGTGA	AGTTATG	TGGCGT	TGCTATATG	TTAAGCCT	GGTGG
AY884001 HKU1 B	..C								
DQ339101 HKU1 AB	..C			A					
DQ415912 HKU1 C N16	..C			A					
09_1995 GU904423									
37_1995 GU904424									
99_1995 GU904426	..C								
90_1995 GU904425	..C								
104_1995 GU904427									
115_1995									
169_1995 FJ9315341	..C								
89_1998	..C								
148_1999									
50_2001	..C								
78_2001	..C				A				
77_2003	..C								
255_2003				C					
269_2003									
278_2003									
279_2003									
282_2003									
421_2003	..C								
399_2004	..C								
422_2004	..C			A					
286_2005	..C								
306_2005	..C								
308_2005	..C								
315_2005	..C								
321_2005	..C								
322_2005	..C								
334_2005	..C								
337_2005	..C								
366_2005	..C			A					
374_2005	..C			A					
383_2005	..C								
384_2005	..C								
386_2005	..C								
392_2005	..C								
393_2005									
427_2005	..C								
469_2005	..C								
1041_2006									
1052_2006									
1081_2006									
1109_2006									
1199_2006									
1233_2006									
1246_2006									
1266_2006									
1287_2006									
1293_2006									
1299_2006									
2141_2007									
2151_2007	..C								
2398_2007	..C								

Apêndice 4. Alinhamento de nucleotídeos do fragmento da polimerase do coronavírus humanos 229E dos anos de 1995 a 2008

Apêndice 5. Tabelas de amostras que apresentaram 100% de homologia nucleotídica no fragmento estudado, para HCoV HKU1, 229E e NL63 . Amostras similares foram retiradas das análises genealógicas. Amostras com * possuem sequenciamento adicional do gene spike.

Amostra	100% homólogas	HCoV
90_1995 GU904425 (1)	99_1995 GU904426	HKU1B
169_1995 FJ9315341 (17)	89_1998	HKU1B
	50_2001	
	421_2003	
	399_2004	
	286_2005	
	306_2005	
	308_2005	
	315_2005	
	321_2005	
	322_2005	
	334_2005	
	337_2005	
	384_2005	
	386_2005	
	392_2005	
	427_2005	
	2151_2007	
104_1995 GU904427 (13)	1081_2006*	HKU1A
	1246_2006*	
	115_1995	
	148_1999	
	269_2003	
	278_2003	
	279_2003	
	1041_2006	
	1109_2006	
	1199_2006	
	1233_2006	
	1266_2006	
	1287_2006	
09_1995 GU904423 (1)	37 1995 GU904424	HKU1A
422_2004 (2)	366_2005	HKU1C
	374_2005	

Amostra	100% homólogas	HCoV
158_1999 (26)	51_2000	NL63
	65_2000	
	26_2001	
	85_2002	
	212_2003	
	70_2004	
	76_2004	
	124_2004	
	238_2004	
	317_2004	
	359_2004	
	369_2004	
	9_2005	
	78_2005	
	555_2006	
	911_2006	
	1135_2006	
	1176_2006	
	1195_2006	
	1221_2006	
	1281_2006	
	1283_2006	
	1286_2006	
	1290_2006	
	1639_2007	
	3671_2008	
2871_2007 (3)	2902_2008	NL63
	2977_2008	
	2978_2008	
994_2006	1167_2006	NL63
86_1998	395_2005	229E
414_2003 (3)	343_2004	229E
	358_2004	
	2236_2007	

Apêndice 5b. Tabela de amostras que apresentaram 100% de homologia nucleotídica no fragmento estudado, para HCoV OC43. Amostras similares foram retiradas das análises genealógicas.

Amostra	100% homólogas	HCoV
11_1997 (3)	143_2000	OC43
	168_2000	
	172_2002	
50_2002 (12)	122_2002	OC43
	147_2002	
	158_2002	
	43_2004	
	60_2005	
	80_2005	
	415_2005	
	1776_2007	
	1844_2007	
	1930_2007	
	1989_2007	
	3690_2008	
363_2004 (2)	393_2004	OC43
	402_2004	
590_2006 (7)	599_2006	OC43
	753_2006	
	778_2006	
	783_2006	
	785_2006	
	1018_2006	
	1205_2006	
417_2003 (7)	09_2004	OC43
	42_2004	
	63_2004	
	77_2004	
	111_2004	
	131_2004	
	257_2004	
127_2001 (4)	01_2002	OC43
	149_2002	
	157_2002	
	391_2004	
01_1996 (6)	21_1996	OC43
	23_1996	
	39_1996	
	64_1996	
	55_2000	
	493_2005	

Apêndice 6. Tabela de estudos moleculares quanto à ocorrência de coronavírus humanos HCoV

País	Grupo estudo	Tipo de Amostra	Método detecção (gene alvo)	HCoV estudado	Positividade					N	Co-infecção HCoV	Período do estudo		Sazonalidade	Referência
					Total	229E	NL63	OC43	HKU1			Total	Intervalo		
África do Sul	< 6 anos com sibilância	-	Nested PCR (Pol)	NL63	2,5% (6)	-	2,5% (6)	-	-	242	-	1a 6m	Maio2004 - Nov2005	Ausente	Smuts et al., 2008
	< 5 anos com IRA	ANF	Real Time	4 tipos	4,42% (27)	0,3% (2)	2,1% (13)	1,8% (11)	0,2% (1)	610	-	2a	Jan2007- Dez2007	OC43 Inverno e Primavera / NL63 Verão e Outono	Venter et al., 2011
Alemanha	Pacientes hospitalizados ou externos	SeNF	RT-PCR / Real Time PCR (M, N)	NL63	3,9% (69)	-	3,9% (69)	-	-	1756	-	2a	Nov1999 - Out2001	Inverno (pico 10% amostras)	van der Hoek et al., 2010
Austrália	Crianças com IRA	-	RT-PCR	229E OC43	5,5% (54)	-	-	-	-	984	-	3a	Jul1996 - Jul1999	Não informado	Kusel et al., 2006
	Pacientes com IRA	93% LNF	RT-PCR	NL63	2% (16)	-	2% (16)	-	-	766	-	2a 3m	Nov2001 - Fev2004	Pico NL63 Inverno (3.1%)	Arden et al., 2005
	Pacientes com IRA (1 a 80 anos; 78.9% < 5 anos)	ANF	RT-PCR	4 tipos	3,8% (11)	0,3% (1)	1,9% (6)	4 (1,3%)	0	315	-	Não informado	2003-2004	NL63 Outono-Inverno / OC43 e 229E Primavera	Arden et al., 2006
	Pacientes < 5 anos	SNG	RT-PCR	NL63	3,3% (18)	-	3,3% (18)	-	-	534	-	1a	Jan2003 - Jan2004	Não informado	Lambert et al., 2007
	Crianças com IRA (79% < 5 anos)	ANF	RT-PCR (Pan-Pol)	4 tipos	6,8% (22)	0,3% (1)	0	3,4% (11)	3,1% (10)	324	1 (OC43, HKU1, Mpv)	4m	Maio2004 - Ago 2004	HKU1 predominante Inverno	Sloot et al., 2006
	Crianças e adultos com IRA (41% <1 ano)	ANF	Real Time	4 tipos	8,3% (74)	0,45% (4)	1% (9)	3% (27)	3,82% (34)	888	-	5m	Maio2004 - Set 2004	Pico prevalência no Inverno (Hemisfério Sul)	Mackay et al., 2012
Bélgica	Pacientes Hospitalizados com IRA	SF, LBA, ANF	RT-PCR (Pan_Pol)	NL63 229E OC43	4,8% (15)	0,3% (1)	2,3% (7)	2,3% (7)	-	309	-	1a 2m	Jan2003 - Mar2004	OC43 e NL63 - Inverno e Primavera	Moes et al., 2005

Continuação

Apêndice 6. Tabela de estudos moleculares quanto à ocorrência de coronavírus humanos HCoV

Continuação

País	Grupo estudo	Tipo de Amostra	Método detecção (gene alvo)	HCoV estudado	Positividade					N	Co-infec HCoV	Período do estudo		Sazonalidade	Referência
					Total	229E	NL63	OC43	HKU1			Total	Intervalo		
Brasil	Crianças e Adultos	-	Sorologia	229E	3,2% Crianças - 26,2% Adultos	3.2%	-	-	-	321	-	2m	Maio - Junho 1969	Não informado	Candeias et al., 1972
	7 dias-15 anos 63% IRA, 15,3% doença entérica, outros	-	PCR (Pol) + Nested PCR HKU1	4 Tipos	3,8% (6)	0	0	0	3,8% (6)	169	-	9m	Mar1995-Dez1995	Maioria Inverno	Goes et al., 2011
	Crianças com Chiado - SP / Crianças de creche - BA	-	RT-PCR e hibridização	OC43 229E	2,5% (3/118) 6,3% (18/286)	0,5% (1/118) / 0,3% (1/286)	-	1,6% (2/118) / 6% 17/286	-	118 SP 286 BA	-	1a / 1a 8m	Maio1996 - Abr1997 / Out1998 - Jun2000	Pico amostras positivas Jul e Ago / Ausência de padrão sazonalidade	Macedo, 2002
	Adultos > 18 anos com IRA	LN	RT-PCR e hibridização	OC43 229E	4,2% (18)	1,4% (6)	-	2,8% (12)	-	420	-	2a 3m	Jun2001 - Set 2003	Não informado	Bellei et al., 2008
	Crianças com IRA Sup ou Inf	SN	Real Time (Dare et al., 2007)	4 Tipos	3,9% (8)	0	1,5% (3)	1,9% (4)	0,5% (1)	205	-	1a 7m	Mar2006 - Out2007	Não informado	Albuquerque et al., 2009
	Pacientes com Fibrose Cística < 17 anos	-	RT-PCR e Nested PCR (pol)	4 tipos	4,65% (19)	0,1% (1)	7,7% (8)	5,8% (6)	3,9% (4)	103	-	1a	Set2006 - Set 2007	Não informado	da Silva Filho et al., 2012
Canada	Crianças < 3 anos com IRA	ANF	Real Time (N)	NL63	3% (12)		12 (3%)	-	-	396	-	2a	Dez2001 - Jan 2003	Inverno ano1 / Primavera ano2 / sem amostras do Verão e Outono	Boivin et al., 2005
	Pacientes < 17 anos pacientes hospitalizados	ANF ou swabs	RT-PCR (Pol)	NL63	2,1% (26)		2,1% (26)	-	-	1240	-	1a	Nov2002 - Dez2003	Pico NL63 no Inverno (~ 7% em março)	Bastien et al., 2005

Apêndice 6. Tabela de estudos moleculares quanto à ocorrência de coronavírus humanos HCoV

Continuação

País	Grupo estudo	Tipo de Amostra	Método detecção (gene alvo)	HCoV estudado	Positividade					N	Co-infecção HCoV	Período do estudo		Sazonalidade	Referência
					Total	229E	NL63	OC43	HKU1			Total	Intervalo		
China	Adultos com quadro respiratório (14-97 anos)	SNG	RT-PCR - Seq	4 tipos	1% (87)	0,2% (15)	0,1% (8)	0,6% (50)	0,2% (14)	8396	-	4a	Maio2005-Abril2009	Picos a cada 2 anos	Ren et al., 2011
	Crianças < 14 anos com LRTI	ANF	PCR-Seq	HKU1, NL63	5,6% (49)		3,81% (31)		2,21% (18)	877	-	3a	Dez2006-Nov2009	HKU1 Inverno e Primavera / NL63 sem padrão	Jin et al., 2011
	Adultos > 14 anos com IRA (IVAS)	ANF	Real Time (N)	4 tipos	16% (157)	9,8% (96)	1,1% (11)	4,3% (42)	1,6% (16)	981	-	2a	Mar2009-Fev2011	Não informado	Lu et al., 2012
Coreia	< 5 anos com IRA TR inf (bql, pnm, crupe) 73% < 2 anos	-	RT-PCR (Pol)	NL63 229E OC43	1,7% (9)	0	1,6% (8)	0,2% (1)		515	-	5a	Set 2000 - Ago 2005	Não informado	Choi et al., 2006
	1 a 5 anos com chiado agudo (IVAI)	ANF	PCR	4 tipos	3,5% (8)	0,9% (2)	1,3% (3)	1,3% (3)	0	231	-	10m	Feb 2006 - Nov 2006	Não informado	Chung et al., 2007
Coréia do Sul	Crianças < 6 anos	ANF	RT-PCR (Pol)	NL63	1,7% (14)	-	1,7% (14)	-	-	827	-	2a	Abr 2004 - Abr 2006	NL63 - Primavera e Inverno-2004 e Primavera-2006 (ausente Inverno 05-06)	Han et al., 2007
	Crianças com Crupe	-	RT-PCR	NL63	16,5% (30)	-	16,5% (30)	-	-	182	-	4a 5m	Jan2005 - Jun 2009	> prevalência NL63 inverno	Sung et al., 2010
EUA	Crianças < 5 anos com IRA (IVAI / IVAS)	LN	Real Time	NL63 229E OC43	4,9% (92) [8,4% (10) / 3% (82)]	0,43% (8)	1,6% (30)	2,9% (54)	-	1854 (119 IVAI / 1735 IVAS)	-	20a	Jul 1981-Dez2001	Pico Inverno (Jan)	Talbot et al., 2009

Apêndice 6. Tabela de estudos moleculares quanto à ocorrência de coronavírus humanos HCoV

Continuação

País	Grupo estudo	Tipo de Amostra	Método detecção (gene alvo)	HCoV estudado	Positividade					N	Co-infecção HCoV	Período do estudo		Sazonalidade	Referência
					Total	229E	NL63	OC43	HKU1			Total	Intervalo		
EUA	Crianças com IRA	ANF	Real Time	4 tipos	5% (84)	0,65% (11)	2,2% (37)	2% (34)	0,12% (2)	1683	1(NL63/229E)	1a	Dez2004-Nov2005	Predominante Inverno	Dominguez et al., 2009
	Crianças	-	Real Time (Pan-Pol) S e N NL63 esp	NL63	1% (92)	-	1% (92)	-	-	9380	5% NL63 / 229E	3a	Jan 2009 - Dez 2011	Não informado	Dominguez et al., 2012
	Crianças e adultos < 65 anos	-	RT-PCR, Sorologia	229E OC43	8% (8)	5% (5)	-	3% (3)	-	100	-	5m	Nov 1999 - Abr 2000	Não informado	Falsey et al., 2002
	Crianças < 5 anos com IRA [negativo outros vírus]	SNF	RT-PCR	HKU1 e NH	1% (9)	-	0	-	1% (9)	1048	-	1a	Dez2001 - Dez 2002	HKU1 Inverno (5% das amostras do período)	Esper et al., 2006
	Crianças <16 anos	SNG	Real Time (N e Pol)	4 tipos	1,8% (19)	0	1,14% (12)	0,38% (3)	0,28% (4)	1055	-	2a	Out2001-Set 2003	Não informado	Talbot et al., 2009
	23 dias - 17 anos	LN	Real Time (Pol)	4 tipos	6,3% (66)	0,07% (8)	1,05% (11)	1,82% (19)	2,68% (28)	1043	-	1a	Out 2003 - Set 2004	Inverno	Kuypers et al., 2007
	Adultos com e sem asma	LN	Viroship	4 tipos	9,8% (8)	0	4,9% (4)	1,2% (1)	3,7% (3)	82	-	3a 2m	Out 2001 - Dez 2004	NL63 Inverno / HKU1 Outono-Inverno / OC43 Outono	Kistler et al., 2007
	Crianças hospitalizadas < 5 anos	Amostra Respiratória	RT-PCR Pan-Pol / RT-PCR esp NL	NL63	8,8% (79)	-	8,8% (79)	-	-	895	-	1a	Jan 2002 - Fev 2003	Inverno (63% Jan-Mar)	Esper et al., 2005
	Crianças < 5 anos hospitalizadas + Grupo C-	SNG	Real Time	4 tipos	7,6% (113) / 7,1% (53)	1% (15) / 0,4% (3)	1,8% (26) / 2,4% (18)	3,9% (58) / 2,7% (20)	1,1% (17) / 1,6% (12)	2223 =1481 + 742	2 (HKU1/ OC43); 1 (NL63 / 229E)	1a	Dez2003-Abr2004 / Out2004-Abr2005	OC43 Inverno NL63 Primavera 229E Inverno	Prill et al., 2012

Apêndice 6. Tabela de estudos moleculares quanto à ocorrência de coronavírus humanos HCoV

País	Grupo estudo	Tipo de Amostra	Método detecção (gene alvo)	HCoV estudado	Positividade					N	Co-infecção HCoV	Período do estudo		Sazonalidade	Referência
					Total	229E	NL63	OC43	HKU1			Total	Intervalo		
EUA	> 50 anos com doença pulmonar	SNO	PCR / Elisa	4 tipos	14,6% (99)	3,4% (23)	1,2% (8)	10% (68)	0,1% (1)	679	1 (229E / OC43)	8m	Out 1998- Maio1999	Não informado	Gorse et al., 2009
Finlândia	Crianças hospitalizadas com croup ou chiado	SNF	RT-PCR (Pan-Pol)	NL63 229E OC43	1,8% (4)	0	1,8% (4)	0	-	222	-	1a	Out 2003 - Set 2004	Não informado	Rihkanen et al., 2008
	Crianças < 4 anos	ANF	RT-PCR	4 tipos	6% (11)	0	3,6% (7)	1% (2)	1% (2)	194	-	2a	Feb 1996 - Abr 1998	Não informado	Ruohola, 2009
França	Adultos e Crianças com IRA	-	RT-PCR	229E OC43	3,4% (12/348)	1,4% (5)	-	2% (7)	-	348	-	7m	Out 2000 - Abril 2001	Não informado	Vabret et al., 2001
	Menores de 20 anos	AN	RT-PCR (N, M)	NL63 229E OC43	9,3% (28/300) e 0,5% (7/1427)	0	9,3% (28/300)	0,5% (7/1427)	-	1427 (229E e OC43)	1 (NL63 / OC43)	5m	Nov 2002 - Abril 2003	NL63 Inverno (18% fev)	Vabret et al., 2005
	Pacientes hospitalizados IRA (44% < 2 anos)	-	RT-PCR (M)	229E OC43	6% (30)	0	-	6% (30)	-	501	-	2m	Fev - Mar 2001	Não informado	Vabret et al., 2003
	61%< 5 anos	ANF	RT-PCR (N, S)	4 tipos	7,4% (10)	0	1,5% (2)	1,5% (2)	4,4% (6)	135	-	1m	Fev-Mar 2005	Não informado	Vabret et al., 2006
	Crianças de 0 - 16 anos [58.4% < 2 anos]	NA	RT-PCR (M, N)	4 tipos	97 (9,8% / 1002)	0,2% (2)	3,3% (33)	2,7% (27)	3,8% (38)	1002	2 (OC43/HKU1); 1 (229E / NL63)	9m	Set 2004- Maio2005	Inverno e primavera - Pico fev	Vabret et al., 2008
Grã-Bretanha	-	ANF, AB, NA	Real Time	4 tipos	2,3% (267)	0,3% (35)	0,64% (75)	0,95% (111)	0,52% (61)	11661	2 (OC43/NL63)	3a	Jul2006- Jun2009	Inverno	Gaunt et al., 2010
Grécia	2meses- 14anos / 1,6 a 8,5 anos	SF	RT-PCR	4 tipos	2,9% (7)	1,2% (3)	0,8% (2)	0,8% (2)	0	200+44 = 244	-	1a / 4m	Jun 2003 - Maio 2004 / Dez2005 - Mar 2006	Não informado	Papa et al., 2007

Continuação

Apêndice 6. Tabela de estudos moleculares quanto à ocorrência de coronavírus humanos HCoV

Continuação

País	Grupo estudo	Tipo de Amostra	Método detecção (gene alvo)	HCoV estudado	Positividade					N	Co-infecção HCoV	Período do estudo		Sazonalidade	Referência
					Total	229E	NL63	OC43	HKU1			Total	Intervalo		
Holanda	Pacientes com IRA (IVAS, IVAI)	ANF, Oral, SF, LBA	RT-PCR	NL63	1,6% (8)		1,6% (8)		-	614	-	9m	Dez 2002 - Ago 2003	NL63 Inverno/Jan-Fev (7% amostras Jan)	van der Hoek et al., 2004
	Pacientes com IRA (48% < 1 ano/4 dias-66 anos)	-	Real Time (N de NL63)	NL63	3,6% (5)		3,6% (5)		-	139	-	1a 2m	Nov 2000 - Jan 2002	NL63 (Outono-Inverno)	Fouchier et al., 2004
	Pacientes com IRA	LN, SNF, LBA	Real Time (N)	OC43 e 229E	11% (28)		-		-	261	-	Não informado	Não informado		van Elden et al., 2004
	Crianças < 5 anos com IRA TR inferior	-	Real Time	NL63 229E OC43	13% (3)		-		-	22	-	6m	Dez 2004 - Maio 2005	Não informado	Van de Pol et al., 2006
Hong Kong	Crianças < 18 anos com IRA (87% < 6 anos)	ANF	RT-PCR Pan-Pol + RT-PCR esp + Real Time NL63	NL63 229E OC43	4,4% (26)	0,3% (2)	2,6% (15)	1,5% (9)	-	587	-	1a	Ago 2001 - Ago 2002	OC43 Inverno / NL63 Primavera-Verão	Chiu et al., 2005
	Infecção respiratória aguda	ANF	RT-PCR (4 reações específicas)-Seq	4 tipos	2,1% (87)	0,1% (4)	0,4% (17)	1,3% (53)	0,3% (13)	4181	-	1a	Abril2004-Março 2005	HKU1 e OC43 Inverno / NL63 verão-outono	Lau et al., 2006
	Crianças IRA < 18 anos	ANF	RT-PCR (Pan-Pol)	NL63 229E OC43	2,6% (74)	0,2% (6)	0,6% (17)	1,3% (37)	0,5% (14)	2803	-	2a	Jan 2005 - Jan 2007	NL63 Outono; OC43 Inverno	Leung et al., 2009
	Crianças < 5 anos com IRA	ANF e SN	RT-PCR	229E OC43	3,8% (18)	0,9% (2)	-	7% (16)	-	225	-	1a	Nov 2005 - Out 2006	OC43 Inverno e Primavera	Sung et al., 2009
	Crianças hospitalizadas < 18 anos	ANF	RT-PCR pan / Cultura	4 Tipos	2,5% (74)	0,2% (6)	0,6% (17)	1,2% (37)	0,5% (14)	2982	-	2a	Feb 2006 - Jul 2008	OC43 Inverno / NL63 Outono	Leung et al., 2012

Apêndice 6. Tabela de estudos moleculares quanto à ocorrência de coronavírus humanos HCoV

Continuação

País	Grupo estudo	Tipo de Amostra	Método detecção (gene alvo)	HCoV estudado	Positividade					N	Co-infecção HCoV	Período do estudo		Sazonalidade	Referência
					Total	229E	NL63	OC43	HKU1			Total	Intervalo		
Itália	Adultos com doença pulmonar	esputo e AET	RT-PCR	NL63 229E OC43	17	0	2% (10)	1,4% (7)	-	510	-	1a	Abr2004-Maio2005	Não informado	Minosse et al., 2008
	Crianças < 12 meses com chiado	SNF	Real Time	4 tipos	3,53% (3)	0	0	2,35% (2)	1,18% (1)	85	-	6m	Out 2005 - Mar 2006	Não informado	Bosis et al., 2008
	Crianças IRA < 2 anos / 94% < 1 ano	ANF	RT-PCR - Seq (Pan-Pol)	4 tipos	28 (8,7%)	0,3% (1)	3,1% (10)	3,4% (11)	1,9% (6)	322	-	2a	Out 2004 - Set 2006	Inverno e Primavera	Canducci et al., 2008
	Pacientes com IRA	ANF	RT-PCR (Pan-pol, N)	NL63 229E OC43	6,4% (53)	1,7% (14)	9 (1,1%)	3,3% (27)	-	823	-	18m	Dez 2003 - Maio 2005	Inverno	Gerna et al., 2006
	Pacientes atendidos com IRA	ANF	RT-PCR (Pan-pol) + Cultura + DFA	4 tipos	9,1% (62)	3,1% (21)	2,2% (15)	1,6% (11)	2,2% (15)	685	-	7m	Nov 2005 - Maio 2006	Inverno-Primavera	Gerna et al., 2007
	Crianças 0-13 anos com IRA	70 Swabs / 30 ANF	PCR (gene pol)	-	1,3% (3)	0	0,42% (1)	0,85% (2)	0	237	-	7m	Out2006-Abr2007	Não informado	Fabbiani et al., 2009
	Crianças Hospitalizadas com IRA (0-139meses)	LN	RT-PCR, Nested NL63	4 tipos	3% (7)	0	0,4% (1)	2,6% (6)	0	227	-	1a	Out 2004 - Set 2005	Não informado	Pierangeli et al., 2007
	Crianças < 15 anos (41,6% < 2 anos; 75% < 5 anos)	ANF	Real Time	4 tipos	3,8% (79)	2,04% (42)	0,97% (20)	0,82% (17)	0	2060	-	5m	Nov 2003 - Mar 2004	Não informado	Esposito et al., 2006
Japão	Crianças < 2 anos com bql		Nested PCR (Pol)	NL63	2,5% (3)	-	2,5% (3)	-	-	118	-	1a	Out 2002 - Set 2003	Inverno	Ebihara et al., 2005
	IRA (IVAS e IVAI)	SNG	RT-PCR e Nested PCR	4 tipos	13% (17)	0	-	7,63% (10)	0	131	-	1a	Ago2010-Jul2011	Não informado	Kon et al., 2012
	Crianças hospitalizadas com IRA	SNG	RT-PCR	NL63	1,2% (5)	-	-	1,2% (5)	-	419	-	2a	Jan 2002 - Dez 2003	Detecção apenas em março (18% de amostras+)	Suzuki et al., 2005

Apêndice 6. Tabela de estudos moleculares quanto à ocorrência de coronavírus humanos HCoV

Continuação

País	Grupo estudo	Tipo de Amostra	Método detecção (gene alvo)	HCoV estudado	Positividade % (N)					N	Co-infecção HCoV	Período do estudo		Sazonalidade	Referência
					Total	229E	NL63	OC43	HKU1			Total	Intervalo		
Noruega	Crianças < 5 anos com IRA	ANF	Real Time	4 tipos	12,7% (68)	0	4,5% (24)	8,2% (44)	0	536	-	8m	Nov2006-Jun2007	OC43 Inverno (25% Dez06)	Kristoffersen et al., 2011
Suécia	< 10 anos com Sintomas infecção respiratória	-	RT-PCR (Pol, N); Real Time (N)	NL63	6% (12)	-	6% (12)	-	-	221	-	1a 6m	Nov 2003 - Maio 2005	Não informado	Koetz et al., 2006
Suiça	Crianças < 1 ano (1 episódio IRA IVAI)	-	RT-PCR (Pol)	NL63 229E OC43	16% (13)	3,7% (3)	7,3% (6)	6% (5)	-	82	1 (OC43 /NL63)	-	-	Detecções Inverno e Primavera	Kaiser et al., 2005
	Crianças com IRA < 1 ano (média 6m; 0,5-12meses)	SN	Real Time	4 tipos	17,86% (20)	2,68% (3)	8% (9)	6,25% (7)	0,9% (1)	112	-	5a 8m	Abril 1999 - Dez 2004	Inverno e Primavera	Regamey et al., 2008
Tailândia	Crianças com Infecção Respiratória IVAI	SNF	RT-PCR (M, Pol)	229E OC43	4,4% (10)	3,54% (8)	-	0,9% (2)	-	226	1 (OC43/229E)	1a 4m	Mar 2002 - Jul 2003	Não informado	Theamboonlers et al., 2007
	Todas idades /Hospital/ Pneumonia + Grupo C -	SNF	Real Time (N e Pol)	4 tipos	3% (82) - 3,4% (64) pnm / 2,3% (18) controle	0,53% (10) pnm	0,42% (8) pnm	1,85% (35) pnm	0,63% (12) pnm	1890 (pnm) +793 Controle = 2683	-	2a	Set 2003 - Ago 2005	OC43 Inverno HKU1 Inverno	Dare et al., 2007
Taiwan	Crianças hospitalizadas < 15 anos (63% < 1 ano)	ANF	Real Time (N, pol)	NL63	1,3% (7)	-	1,3% (7)	-	-	539	-	1a	Maio2004 - Abr2005	> prevalência NL63 outono (5%)	Wu et al., 2008
Vietnã	Crianças < 15 anos com IRA (59% < 2 anos)	SNG e ANF	RT-PCR / Real Time	NL63 229E OC43	7,7% (24)	0,3% (1)	6,8% (21)	0,6% (2)	-	309	-	4a	Nov 2004 - Jan 2008	Não informado	Lien Do et al., 2011

IVAI =Infecção via aérea inferior; IVAS= Infecção Via aérea Superior, Pol= Polimerase, Pan-Pon= ensaio de PCR pancoronavírus; ANF=Aspirado nasofaríngeo; AB=Aspirado bronqueal; AN=Aspirado nasal; AET=Aspirado endotraqueal; SNF=Swab nasofaríngeo; SeNF=Secreção nasofaríngea; SNG=Swab nasal e de garganta; SNO=Swab nasal e orofaríngeo; LNF=Lavado nasofaríngeo; LN=Lavado nasal; LBA=Lavado broncoalveolar; SF=Swab faríngeo; SN=Swab nasal; IRA=Infecção respiratória aguda; TR=Trato respiratório; bql=Bronquiólite pnm= pneumonia.

ANEXOS

Anexo 1_Artigo publicado em periódico

Goes LG, Durigon EL, Campos AA, Hein N, Passos SD, Jerez JA. Coronavirus HKU1 in children, Brazil, 1995. Emerg Infect Dis. 2011;17(6):1147-8.

Coronavirus HKU1 in Children, Brazil, 1995

To the Editor: Coronavirus HKU1 is a newly identified human coronavirus (HCoV) that was reported first in 2005 in Hong Kong Special Administrative Region, People's Republic of China; later in Australia, Europe, and the United States, and more recently in Brazil, demonstrating a global distribution (1–3). We examined the circulation of HCoV in Brazil and the possible presence of the new HCoV types, with special attention to coronavirus HKU1, in samples collected back to 1995, tested by using universal coronavirus PCR.

The epidemiologic profile of HCoV was retrospectively investigated with samples collected during March–December 1995 in a pediatric ward of University Hospital, São Paulo University, São Paulo, Brazil. The Ethics Committee on Research Involving Human Subjects of the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, approved the study. Samples of nasopharyngeal aspirates were collected from 169 hospitalized children, ages 7 days–15 years, of whom 104 had respiratory symptoms, 23 had enteric disease, and 3 had both (4). The mean age of the study population was 19.6 months (median 7 months). Viral nucleic acid was extracted from specimens by using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Total RNA was then submitted to reverse transcription PCR

with a High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) by using random primers according to the manufacturer's instructions. The cDNA obtained was screened with primers able to amplify a 220-bp product in the conserved polymerase region of all known HCoVs (5) and other coronaviruses (e.g., bovine coronavirus). We used cDNA obtained from cultured human rectal tumor cell line HRT-18G cells inoculated with bovine coronavirus strain Kakegawa as positive controls for PCR.

In an attempt to improve the sensitivity of HKU1 detection, we analyzed samples with negative results by PCR with a nested PCR specific for coronavirus HKU1. This nested assay was designed on an alignment of our HKU1-positive sample sequence (BRA169) and different HKU1 genotype sequences deposited in GenBank. Primers Fn-HKU1 (forward 5'-CGTGCTA TGCCAAATATTTTGCG-3', HKU1-NC_006577, nt 15433–15454) and Rn-HKU1 (reverse 5'-TAGCAACC GCCACACATAAC-3', HKU1-NC_006577, nt 15562–15581) produced an amplicon of 149 bp. The nested PCR was run in a 50- μ L reaction comprising 10 μ L of PCR product, 1.5 units of DNA Polymerase (Biotoools, Madrid, Spain), 1 μ mol/L of each primer, 200 μ mol/L of each dNTP (Applied Biosystems), 2 mmol/L MgCl₂, and 1 $\times$ buffer. PCR mixtures were heated to 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 1 min at 95°C, 30 s at 62°C, and 40 s at 72°C, followed by a final 10

min at 72°C. Clinical samples positive for HKU1 were used as positive controls in the HKU1 nested PCR. All fragments obtained from PCR and nested PCR were analyzed in a 2% (wt/vol) agarose gel by electrophoresis, stained with 0.5 μ g/mL of ethidium bromide, and subsequently sequenced to confirm the type of coronavirus. Nucleotide sequencing reactions were performed on both amplicon strands by using an ABI PRISM Big Dye Cycle Sequencing Kit with the ABI PRISM 3100 automatic sequencer (Applied Biosystems).

Six (3.6%) samples tested positive for HCoV-HKU1: 2 samples by PCR and 4 by nested PCR. HCoV types 229E, OC43, and NL63 were not detected in any sample by PCR. Samples positive for HCoV were associated with pertussis, pneumonia, bronchiolitis, and diarrhea (Table).

In a recent review, an analysis of 18 studies indicated that the median (range) incidence of HCoV-HKU1 was 0.9% (0%–4.4%) (2), which is similar to the detection rate in our study. To our knowledge, the only study that has screened for HKU1 in Brazil found that 0.48% of children were positive for HKU1 (3), which is lower than our results.

Although we did not detect other HCoV types, all HCoV types were detected previously in Brazil in samples collected during 2006–2008 (3,6). The absence of detection of 229E, OC43, and NL63 HCoV might have resulted from the seasonality and natural viral year cycle or from the characteristics of the children studied

Table. Epidemiologic and laboratory data of children with coronavirus infection, Brazil, 1995*

Specimen no.: HCoV strain by pol analyses	Age/sex	Sample collection date	Clinical diagnosis	Co-infections	Detection method, fragment sequenced
09: HKU1A	3 mo/F	Mar	Pertussis	ND	Nested PCR, 143 bp
37: HKU1A	2 mo/M	Apr	Bronchiolitis plus bronchopneumonia	RSV	Nested PCR, 143 bp
90: HKU1B	4 mo/M	Jul	Upper respiratory infection	ND	Nested PCR, 143 bp
99: HKU1 B	9 y/M	Jul	Pleural effusion pneumonia	ND	Nested PCR, 143 bp
104: HKU1 A	2 mo/F	Jul	Pertussis	ND	Pancoronavirus PCR, 143 bp
169: HKU1B	3 y/F	Nov	Fever, diarrhea	Worms	Pancoronavirus PCR, 173 bp

*HCoV, human coronavirus; ND, not detected; RSV, respiratory syncytial virus.

because we included samples from children hospitalized with or without respiratory disease.

BLAST search (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) and phylogenetic analysis of amplicons from PCR and nested PCR indicated that samples were positive for HKU1 genotype B (samples BRA169, BRA90, and BRA99) or HKU1 genotype A (samples BRA09, BRA37, and BRA104). The sequences obtained in this study have been deposited in GenBank under accession nos. FJ931534.1 (BRA169), GU904424 (BRA37), GU904427 (BRA104), GU904423 (BRA09), GU904425 (BRA90), and GU904426 (BRA99).

This may be the oldest collection of human samples in which HKU1 has been detected. To our knowledge, the oldest previous sample positive for HCoV-HKU1 was detected in children in Finland during 1996–1998, without an exact date specified (7). Retrospective studies also have been conducted in the United States and Greece that showed the HKU1 virus in different countries in Europe and North America before its discovery (8,9). We have confirmed the circulation of HKU1 coronaviruses in children in Brazil in 1995.

This work was supported by the São Paulo Research Foundation and the Coordination for the Improvement of University Level Personnel.

**Luiz G. Góes,
Edison L. Durigon,
Angélica A. Campos,
Noely Hein, Saulo D. Passos,
and José A. Jerez**

Author affiliations: Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil (L.G. Góes, E.L. Durigon, A.A. Campos, N. Hein, J.A. Jerez); and Faculdade de Medicina de Jundiaí, Jundiaí, Brazil (S.D. Passos)

DOI: 10.3201/eid1706.101381

References

1. Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol*. 2005;79:884–95. doi:10.1128/JVI.79.2.884-895.2005
2. Woo PC, Lau SK, Yip CC, Huang Y, Yuen K. More and more coronaviruses: human coronavirus HKU1 viruses. *Viruses*. 2009;1:57–71. doi:10.3390/v1010057
3. Albuquerque MC, Pena GP, Varella RB, Gallucci G, Erdman D, Santos N. Novel respiratory virus infections in children, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:806–8. doi:10.3201/eid1505.081603
4. Hein N. Epidemiological aspects of the respiratory viruses infection in a pediatric ward [dissertation] [in Portuguese]. São Paulo (Brazil): Universidade de São Paulo; 1997.
5. Canducci F, Debiaggi M, Sampaolo M, Marinozzi MC, Berre S, Terulla C, et al. Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. *J Med Virol*. 2008;80:716–23. doi:10.1002/jmv.21108
6. Bellei N, Carraro E, Perosa A, Watanabe A, Arruda E, Granato C. Acute respiratory infection and influenza-like illness viral etiologies in Brazilian adults. *J Med Virol*. 2008;80:1824–7. doi:10.1002/jmv.21295
7. Ruohola A, Waris M, Allander T, Ziegler T, Heikkinen T, Ruuskanen O. Viral etiology of common cold in children, Finland. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:344–6. doi:10.3201/eid1502.081468
8. Esper F, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Coronavirus HKU1 infection in the United States. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:775–9.
9. Papa A, Papadimitriou E, Lina LK, Al Masri M, Souliou E, Eboriadou M, et al. Coronaviruses in children, Greece. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:947–9.

Address for correspondence: Edison L. Durigon, University of São Paulo, 1374 ICB-II, CEP: 05508-900, São Paulo, São Paulo, Brazil; email: eldurigo@usp.br

EID
online
www.cdc.gov/eid

Macrolide Resistance-associated 23S rRNA Mutation in *Mycoplasma genitalium*, Japan

To the Editor: *Mycoplasma genitalium* is now recognized as a serious pathogen in sexually transmitted infections (1,2). Azithromycin regimens have been commonly used for treatment of *M. genitalium* infections (3). However, failure of azithromycin treatment has been reported in cases of *M. genitalium*-positive nongonococcal urethritis (NGU) (4,5), and macrolide-resistant strains of *M. genitalium* have been isolated from case-patients in Australia, Sweden, and Norway for whom azithromycin treatment has failed (4,5). In these strains, mutations in the 23S rRNA gene were associated with macrolide resistance, and mutations in ribosomal protein genes L4 and L22 were also found (5). Surveillance for antimicrobial resistance of *M. genitalium* is essential to identify antimicrobial resistant strains and to then determine appropriate treatment. Coculture of patient specimens with Vero cells has improved the primary isolation rate of *M. genitalium* from clinical specimens and offered some current clinical strains for antimicrobial drug susceptibility testing (6). To determine their antimicrobial susceptibilities, a molecular real-time PCR method has been developed (7,8). However, isolating *M. genitalium* from clinical specimens and antimicrobial drug susceptibility testing of clinical isolates remain labor-intensive, time-consuming tasks. In addition, no methods are available to directly determine antimicrobial drug susceptibilities of *M. genitalium* in clinical specimens. To monitor macrolide susceptibilities in clinical