

Sérgio Manuel de Freitas Teixeira

Dissertação de Mestrado em Análises Clínicas da FFUP

**Incidência de Bocavirus em crianças com infecção respiratória
no distrito do Porto**

Trabalho realizado sob orientação da Professora Doutora Maria São José Nascimento e

Co-orientação da Dr.^a Joana Sobrinho Simões



Setembro de 2009

É autorizada a reprodução integral desta Dissertação apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de forma directa ou indirecta contribuíram para a elaboração e concretização deste estudo.

À minha orientadora Professora Doutora Maria São José Nascimento, o privilégio de a ter como minha orientadora, de poder partilhar comigo o seu vasto e sólido conhecimento científico, de poder contar com os seus ensinamentos nesta árdua e difícil tarefa.

À minha co-orientadora Dr.^a Joana Sobrinho Simões pela forma como me apoiou, na elaboração deste trabalho e acima de tudo pela sua simpatia.

Às minhas colegas Dr.^a Sílvia Conde e Dr.^a Rosário Costa pela compreensão e colaboração.

Ao director do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de São João, Professor Tiago Guimarães, por ter autorizado a execução do estudo.

À minha família:

À minha linda e querida Filha, pela sua existência que tanto me preenche.

À minha eterna e saudosa Avó, por estar sempre por perto.

À minha amorosa e amada Esposa, pelo carinho e compreensão nos momentos mais difíceis.

À minha inigualável e incansável Mãe, pela coragem e ânimo que sempre me deu.

À minha inteligente e promissora Irmã, pelo incentivo e disponibilidade.

A todos o meu sincero obrigado.

Resumo

O Bocavirus humano (HBoV) pertence á família *Parvoviridae* e foi descrito pela primeira vez em 2005. Vários estudos efectuados um pouco por todo o mundo, têm mostrado a presença do HBoV em crianças com infecção respiratória, mas o seu papel na doença respiratória está ainda por esclarecer.

Foi objectivo deste trabalho avaliar a incidência do HBoV, em crianças com infecção respiratória aguda, residentes no distrito do Porto.

Tratou-se de um estudo transversal prospectivo, que decorreu entre Outubro de 2008 e Abril de 2009. Foram avaliadas, um total de 172 secreções respiratórias de crianças (idade inferior a 14 anos) residentes no distrito do Porto, com infecção aguda do tracto respiratório e de ambos os sexos.

HBoV foi detectado em 19 das 172 amostras (11%), das quais 14 apresentavam concomitantemente outros vírus respiratórios, nomeadamente adenovírus, metapneumovirus, rinovirus, vírus respiratório sincicial. Rinovirus e vírus respiratório sincicial foram os vírus mais frequentemente detectados, em associação com HBoV. O maior número de amostras positivas para HBoV foi observado em Janeiro.

A detecção de HBoV em 11% das amostras está de acordo com outros estudos, que referem valores entre 1,5 e 19%. Foi em crianças com idades superiores a 24 meses que se verificou maior incidência do HBoV.

Palavras-chave: HBoV, diagnóstico, incidência, infecção aguda do tracto respiratório.

Índice

Agradecimentos	III
Resumo	IV
Índice	V
Índice de figuras	VII
Índice de tabelas	VIII
Abreviaturas e símbolos	IX
2. Biologia e Taxonomia de HBoV	3
3. Epidemiologia	6
3.1. Prevalência de HBoV	6
3.2. Distribuição sazonal da detecção de HBoV	7
3.3. Transmissão	7
4. Bocavirus e doença do tracto respiratório	8
5. Objectivos	10
6. Material e Métodos	11
6.1. Amostras Clínicas	11
6.2. Extração dos ácidos nucleicos	11
6.3. <i>Primers</i> e Sonda	11
6.4. Controlo Positivo	12
6.5. Ensaios de <i>PCR</i> em tempo real para detecção do HBoV	12
7. Resultados e Discussão	15
7.1. Incidência da infecção por HBoV e sua distribuição mensal	15
7.3. Incidência / Idade	17
7.4. Incidência / Sexo	18
7.5. Co-deteção do HBoV e outros vírus respiratórios	19
7. Considerações finais	22
8. Conclusão	24

9. Bibliografía	25
10. Anexos	29

Índice de figuras

Fig.1 - Mapa do genoma de HBoV. A - Esquema de HBoV ST1 / B - HBoV ST2 _____	3
Fig.2 - Gráfico representativo de um dos ensaios de <i>PCR</i> em tempo real realizados (Fluorescência verso ciclos de amplificação). _____	14
Fig.3 - Distribuição das amostras positivas para HBoV de Outubro de 2008 a Abril de 2009 _____	15
Fig.4 - Distribuição das amostras positivas para HBoV em função da idade _____	17
Fig.5 - Distribuição das amostras positivas para HBoV em função do sexo _____	18
Fig.6 - Vírus respiratórios co-detectados na presença de HBoV e sua frequência _____	21

Índice de tabelas

Tabela 1 - Família <i>Parvoviridae</i> _____	4
Tabela 2 - <i>Primers</i> e sonda usadas nos ensaios de <i>PCR</i> em tempo real para detecção do HBoV _____	12
Tabela 3 - Reagentes usados na reacção de <i>PCR</i> em tempo real e respectivos volumes _____	13
Tabela 4 - Volume final da reacção de <i>PCR</i> em tempo real _____	13
Tabela 5 – Data e número de amostras analisadas _____	16
Tabela 6 - Técnicas usadas na detecção dos outros vírus respiratórios _____	19
Tabela 7 - Síntese dos resultados da detecção de HBoV e co-deteção de outros vírus respiratórios _____	20

Abreviaturas e símbolos

6-FAM - 6-carboxifluoresceína

AdV - adenovírus

Ct - cycle threshold

DNA - ácido desoxirribonucleico

HBoV - bocavirus humano

HCoV - coronavirus humano

dNTP's - desoxirribonucleotídeos fosfatados

IATR - infecção aguda do tracto respiratório

IATR's - infecções agudas do tracto respiratório

µL – microlitros

MM - *Master Mix*

hMPV - metapneumovirus humano

nm – nanometro

PCR - Polimerase Chain Reaction

HRV – rinovirus humano

ST1 - *Stockholm 1*

ST2 - *Stockholm 2*

TAMRA -tetrametil-6-carboxirodamina

RSV - vírus respiratório sincicial

1. Introdução

As infecções agudas do tracto respiratório (IATR's) são uma das principais causas de mortalidade e morbidade entre as crianças (Allander *et al.*, 2005).

O vírus respiratório sincicial (RSV), o vírus influenza, os vírus parainfluenza, os adenovírus (AdV), são alguns dos vírus responsáveis pelas IATR's. Não obstante, nos últimos anos, foram identificados novos vírus respiratórios entre os quais se destacam: o metapneumovirus humano (hMPV) (Van den Hoogen *et al.*, 2001), os novos coronavirus humanos HCoV- NL63 e HKU1 (Fouchier *et al.*, 2004; Van der Hoek *et al.*, 2004) e os bocavirus humanos (HBoV) (Allander *et al.*, 2005).

Os HBoV foram descritos pela primeira vez em 2005 por, Allander e colaboradores no Hospital Universitário Karolinska, Estocolmo, Suécia (Allander *et al.*, 2005). A descoberta decorreu de um rastreio efectuado em aspirados nasofaríngeos, provenientes maioritariamente de crianças com infecção aguda do tracto respiratório (IATR). Para levar a cabo a investigação, foram usadas técnicas de biologia molecular nomeadamente, *Polimerase Chain Reaction (PCR)* e sequenciação do ácido desoxirribonucleico (DNA). A presença de HBoV nas amostras analisadas sugeriu que este poderia ser responsável pelas IATR's (Allander *et al.*, 2005).

Desde 2005, que um pouco por todo mundo, África do Sul (Smuts *et al.*, 2006), Austrália (Sloots *et al.*, 2006), Brasil (Souza *et al.*, 2009), Canadá (Bastien *et al.*, 2007), China (Enmei *et al.*, 2008), Coreia do Sul (Chung *et al.*, 2006), Espanha (Garcia *et al.*, 2009), Estados Unidos da América (Kesebir *et al.*, 2006), França (Foulongne *et al.*, 2006), Grécia (Haidopoulou *et al.*, 2008), Israel (Musa *et al.*, 2008), Itália (Maggi *et al.*, 2007), Japão (Ma *et al.*, 2006), a presença de HBoV em crianças com infecção aguda do tracto respiratório (IATR), tem sido confirmada por variados estudos de prevalência. Contudo, estes têm tentado apenas demonstrar a presença de HBoV e não correlacioná-la com a IATR.

Convém salientar que, após a infecção primária e à semelhança de outros vírus respiratórios, o HBoV continua a ser excretado nas secreções respiratórias. Consequentemente, poderá ser detectado por longo período através de técnicas de biologia molecular, designadamente por *PCR*. Este facto condiciona o uso do *PCR* como ferramenta de diagnóstico de infecção aguda e impede também, a correcta interpretação

dos dados disponíveis, quanto ao papel de HBoV, na infecção aguda do tracto respiratório.

2. Biologia e Taxonomia de HBoV

O HBoV é um vírus DNA, com 16 a 28 nm de diâmetro, sem invólucro com cápside icosaédrica constituída por 60 subunidades proteicas. Pertence à família *Parvoviridae*, sub-família *Parvovirinae* e ao género *Bocavirus* (Allander., 2008a).

O genoma completo possui aproximadamente 4000 a 6000 nucleótidos, com três zonas que codificam para duas proteínas estruturais, *VP1*, *VP2* (predominante) e duas proteínas não estruturais, *NS1*, *NP-1*.

A função da proteína *NS1* é desconhecida, mas é possível que esta esteja relacionada com a replicação de HBoV (Allander *et al.*, 2005; Schildgen *et al.*, 2008). A proteína *NP-1*, não é encontrada nos parvovírus, só estando presente nos HBoV e a sua função também não é conhecida (Allander *et al.*, 2005). No que diz respeito, às proteínas estruturais *VP1* e *VP2*, elas apresentam, ao contrário das proteínas não estruturais *NS1* / *NP-1*, grande variabilidade, reflectindo o carácter imunogénico destas proteínas virais.

Com base na análise da sequência nucleotídica do genoma completo, foram detectados dois tipos de sequências nucleotídicas de HBoV: o *Stockholm 1* (ST1) e o *Stockholm 2* (ST2) (Allander *et al.*, 2005).

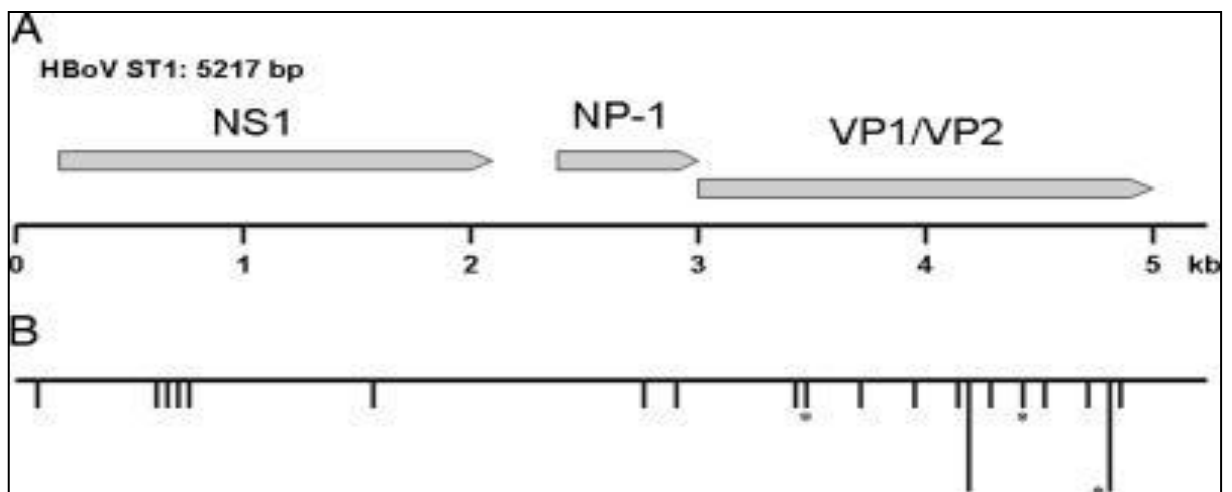


Fig.1 - Mapa do genoma de HBoV. A - Esquema de HBoV ST1 / B - HBoV ST2. Adaptado de Allander *et al.*, 2005.

Até à identificação de HBoV, o parvovírus humano B19 (sub-família *Parvovirinae*, género *Erythrovirus*) era o único vírus desta família patogénico para o homem, sendo o agente etiológico do eritema infeccioso ou 5ª doença (Fauci *et al.*, 2008; Heegaard *et al.*, 2002), estando associado a *hydrops fetalis* na infecção durante a gravidez (Fauci *et al.*, 2008; Heegaard *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003) e a desordens hematológicas em imunodeprimidos ou em indivíduos com anemias hemolíticas (Fauci *et al.*, 2008; Heegaard *et al.*, 2002; Qian *et al.*, 2002).

Tabela 1 - Família *Parvoviridae*

Família	Sub-família	Género	Espécie	Hospedeiro
<i>Parvoviridae</i>	<i>Parvovirinae</i>	<i>Parvovirus</i>	<i>Mice minute virus</i>	Vertebrados
		<i>Erythrovirus</i>	<i>B19 virus</i>	Vertebrados
		<i>Dependovirus</i>	<i>Adeno-associated virus 2</i>	Vertebrados
		<i>Amdovirus</i>	<i>Aleutian mink disease virus</i>	Vertebrados
		<i>Bocavirus</i>	<i>Bovine parvovirus</i>	Vertebrados
	<i>Densovirinae</i>	<i>Densovirus</i>	<i>Junonia coenia densovirus</i>	Invertebrados
		<i>Iteravirus</i>	<i>Bombyx mori densovirus</i>	Invertebrados
		<i>Brevidensovirus</i>	<i>Aedes aegypti densovirus</i>	Invertebrados
		<i>Pefudensovirus</i>	<i>Periplanta fuliginosa densovirus</i>	Invertebrados

Disponível em <http://www.microbiologybytes.com/virology/Parvoviruses.html> (Acedido em 04/03/2009)

Não se conhece em que células, se processa a replicação de HBoV, contudo, os restantes membros da família *Parvoviridae*, designadamente o parvovírus B19 requer células de rápida proliferação para a sua replicação como os reticulócitos, as células alvo destes vírus (Fauci *et al.*, 2008; Heegaard *et al.*, 2002; Qian *et al.*, 2002).

Dados relativos aos bocavirus animal, sugerem infecção do epitélio respiratório, bem como, uma multiplicação em células dos órgãos linfáticos. O DNA de HBoV, detectado nas secreções respiratórias de pacientes com IATR, pode por vezes, atingir um número de cópias elevado, sendo consistente com infecção das células do epitélio respiratório (Allander *et al.*, 2005).

Para além das secreções respiratórias, o DNA de HBoV foi também detectado no soro e fezes dos doentes com IATR (Vicente *et al.*, 2007; Tozer *et al.*, 2009), o que indicia, que a replicação de HBoV, poderá efectuar-se noutras células para além das do epitélio respiratório (Allander *et al.*, 2005; Neske *et al.*, 2007).

Até há pouco, a única metodologia disponível para identificar uma infecção por HBoV, era a detecção do DNA viral e análise da sua sequência nucleotídica (Schildgen *et al.*, 2008). Contudo, actualmente existem outras abordagens no diagnóstico da infecção por HBoV, nomeadamente, o estudo da resposta serológica (Allander *et al.*, 2008b), o isolamento em cultura celular (Dijkman *et al.*, 2009) e a microscopia electrónica (Brieu *et al.*, 2007).

3. Epidemiologia

3.1. Prevalência de HBoV

O HBoV foi detectado em vários países, designadamente na África do Sul (Smuts *et al.*, 2006), na Austrália (Sloots *et al.*, 2006), no Brasil (Souza *et al.*, 2009), no Canadá (Bastien *et al.*, 2007), na China (Enmei *et al.*, 2008), na Coreia do Sul (Chung *et al.*, 2006), em Espanha (Garcia *et al.*, 2009), nos Estados Unidos da América (Kesebir *et al.*, 2006), em França (Foulongne *et al.*, 2006), na Grécia (Haidopoulou *et al.*, 2008), em Israel (Musa *et al.*, 2008), em Itália (Maggi *et al.*, 2007), no Japão (Ma *et al.*, 2006), entre outros.

Na maior parte destes estudos de prevalência, foram usadas secreções respiratórias de crianças com IATR, tendo os resultados apontado para taxas de prevalência, que variaram entre 1,5 e 19% (Allander *et al.*, 2007; Bastien *et al.*, 2007).

O HBoV tem sido detectado principalmente em crianças com idade inferior a 36 meses (Allander *et al.*, 2005; Kesebir *et al.*, 2006; Smuts *et al.*, 2006; Vicente *et al.*, 2007) sendo que, em crianças com menos de 6 meses a prevalência é baixa (Allander *et al.*, 2007; Foulongne *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2006), o que sugere alguma protecção conferida pelos anticorpos maternos. A elevada prevalência de HBoV, e a sua distribuição mundial, sugerem que o HBoV é um vírus endémico com elevada incidência em crianças jovens (Allander, 2008a).

Existem alguns estudos, que visaram adultos como população alvo, mas a prevalência de HBoV encontrada neste grupo etário foi baixa (Allander *et al.*, 2005; Bastien *et al.*, 2006; Fry *et al.*, 2007).

Estudos de análise filogenética identificaram 2 linhagens genéticas ligeiramente diferentes a circular em paralelo (ST1/ST2) por todo o mundo (Bastien *et al.*, 2007; Kesebir *et al.*, 2006; Neske *et al.*, 2007). Portanto, é possível afirmar que a variabilidade genética de HBoV é reduzida. Poderá ser questionável, se esta pequena diferença

genética tem relevância clínica ou se poderá ser usada para compreender a epidemiologia e propagação de HBoV.

3.2. Distribuição sazonal da detecção de HBoV

Os estudos efectuados em regiões, cujo clima é temperado, têm registado maior detecção de HBoV nos meses de Inverno e Primavera (Allander *et al.*, 2005; Smuts *et al.*, 2006). Em Itália, Maggi *et al.*, num estudo efectuado em crianças hospitalizadas, não conseguiram confirmar essa distribuição sazonal (Maggi *et al.*, 2007). Todavia, durante os 7 anos deste estudo, foram encontradas diferenças significativas, de ano para ano, pois do ano 2000 a 2002, de 43 amostras nenhuma foi positiva para HBoV. Na Coreia do Sul, o último mês da Primavera e o primeiro do Verão, foram os que apresentaram maior taxa de detecção de HBoV (Choi *et al.*, 2006).

De acordo com os dados disponíveis, não parece haver nenhuma relação entre a infecção por HBoV e as estações do ano, contudo, os resultados foram obtidos através da detecção de HBoV em secreções de crianças com IATR, por *PCR*, não tendo em linha de conta a possibilidade de persistência assintomática, o que poderia influenciar a incidência (Schildgen *et al.*, 2008).

3.3. Transmissão

São desconhecidas as formas de transmissão de HBoV (Schildgen *et al.*, 2008). Provavelmente, os aerossóis e contacto directo com secreções contaminadas, serão as vias mais comuns e eficazes de propagação (Schildgen *et al.*, 2008). O HBoV poderá circular na corrente sanguínea de indivíduos infectados, conseqüentemente, o uso de sangue para transfusões ou órgãos para transplantes, poderá ter implicações e servir como fonte de infecção (Schildgen *et al.*, 2008).

Outra forma de contágio que também deverá ser considerada é a transmissão oral-fecal, visto que o HBoV tem sido detectado em fezes de indivíduos com infecção por HBoV (Vicente *et al.*, 2007).

4. Bocavirus e doença do tracto respiratório

Para estabelecer uma relação, entre um agente específico e a doença que este presumivelmente provoca, são necessários, vários estudos (Fredricks *et al.*, 1996).

Apesar dos estudos de prevalência publicados acerca de HBoV, poucos são aqueles, que correlacionam a infecção com sintomas do tracto respiratório. Porém, alguns estudos indiciam que o HBoV é mais frequente em doentes com sintomatologia respiratória, do que em indivíduos assintomáticos (Allander *et al.*, 2007; Kesebir *et al.*, 2006).

O facto de HBoV ser detectado, frequente e concomitantemente com outros vírus respiratórios, torna difícil concluir acerca da sua patogenicidade. No entanto, a co-infecção não pode ser ignorada já que a sua frequência é elevada, variando nos diversos estudos, entre 18 e 90% (Allander *et al.*, 2005; Fry *et al.*, 2007). Manning *et al.*, detectaram em 43% das amostras positivas para HBoV (Manning *et al.*, 2006) a presença de um ou mais vírus, enquanto Allander *et al.*, num dos seus estudos encontrou co-infecção em 34% dos casos analisados (Allander *et al.*, 2007). Os vírus detectados neste estudo foram: o rinovírus, o adenovírus e o vírus respiratório sincicial (Allander *et al.*, 2007).

Uma explicação, para a grande diferença de resultados, poderá dever-se à falta de uniformização dos métodos de diagnóstico (comum a todas estas investigações) e às diferentes sensibilidades das técnicas de detecção utilizadas. Deverá também ser ponderada, dado ser considerável, o número de infecções por HBoV com carga vírica reduzida (Choi *et al.*, 2006).

A co-deteção de HBoV com outros vírus respiratórios, quando a carga vírica de HBoV é baixa, é frequentemente observada em doentes com IATR, mas a co-deteção tem-se mostrado rara em doentes assintomáticos (Allander *et al.*, 2007). Segundo, Allander *et al.*, os sintomas clínicos mais usuais e supostamente associados à infecção por HBoV são: tosse, rinorreia e febre, os quais são pouco específicos e comuns às demais IATR's, provocadas por vírus respiratórios (Allander *et al.*, 2007). De referir também, que a sibilância poderá ser a manifestação mais comum na infecção respiratória por HBoV (Fry *et al.*, 2007). Dados recentes (Allander *et al.*, 2007) comprovam que a

infecção respiratória por HBoV aparece associada a virémia, o que poderá auxiliar num diagnóstico menos ambíguo.

Bronquite, bronquiolite, pneumonia e exacerbação da asma são os diagnósticos clínicos, atribuídos a doentes, com HBoV nas secreções respiratórias, com ou sem co-infecção por outro vírus respiratório (Schildgen *et al.*, 2008).

Em conclusão, os vários estudos relacionam estatisticamente a presença de HBoV com sintomas agudos de infecção respiratória, porém, uma relação inequívoca requer estudos mais aprofundados, isto porque, nem sempre o HBoV é responsável pelos casos de IATR em que é detectado (Schildgen *et al.*, 2008).

5. Objectivos

Os objectivos deste estudo foram os seguintes:

- Estimar a incidência de HBoV em crianças com idade inferior a 14 anos, apresentando IATR, internadas em hospitais do distrito do Porto.
- Avaliar a distribuição mensal de HBoV, durante o período de estudo.
- Averiguar a presença de outros vírus respiratórios, nas amostras positivas para HBoV.

6. Material e Métodos

6.1. Amostras Clínicas

Foram recolhidas no Laboratório de Biopatologia Molecular, Serviço de Patologia Clínica do Hospital de São João, Porto, Portugal, um total de 172 amostras respiratórias (aspirados nasofaríngeos), provenientes de crianças com idade inferior a 14 anos, apresentando IATR, internadas em hospitais do distrito do Porto, durante um período de 6 meses, compreendido entre Outubro de 2008 e Abril de 2009.

As amostras foram imediatamente submetidas à extracção do DNA e armazenadas a -20 C°.

6.2. Extracção dos ácidos nucleicos

O DNA foi extraído automaticamente, a partir de 200 µL de amostra, usando para o efeito, a estação de trabalho *BioRobot EZ1* (*Qiagen*, Hilden, Alemanha) e o *kit* de extracção *DNA tissue* (*Qiagen*, Hilden, Alemanha), tendo sido seguido o protocolo do fornecedor.

6.3. Primers e Sonda

Os *primers* e a sonda *Taqman*[™] foram sintetizados pela *TIB MOLBIOL*, Berlim, Alemanha, tendo como alvo, a região conservada do genoma do HBoV, designadamente a zona *NS1* (Lu *et al.*, 2006). A sequência nucleotídica dos *primers* e sonda estão representados na tabela 2.

Tabela 2 - *Primers* e sonda usadas nos ensaios de *PCR* em tempo real para detecção do HBoV

Gene alvo	Primer/Sonda	Sequência (5´ para 3´)	Concentração
	<i>Primer forward</i>	TGC AGA CAA CGC Y**TA GTT GTT T	100µ/M
NS1	<i>Primer reverse</i>	CTG TCC CGC CCA AGA TAC A	100µ/M
	Sonda*	CCA GGA TTG GGT GGA ACC TGC AAA	100µ/M

*Sonda marcada na extremidade 5´ com 6-FAM (6-Carboxifluoresceína) e na 3´ com TAMRA (Tetrametil-6-Carboxirodamina)

**Y=C/T

6.4. Controlo Positivo

Foi utilizado como controlo positivo, o *Bocavirus r-gene™ Positive Control*, da *Argene* (Verniolle, França).

6.5. Ensaios de *PCR* em tempo real para detecção do HBoV

Para a execução das reacções de *PCR* em tempo real foi usado o *kit HotMaster™ Taq DNA Polymerase (5Primer*, Madrid, Espanha), mistura de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP´s), sonda e *primers* anteriormente mencionados. A *Master Mix* (MM) foi elaborada de acordo com o descrito na tabela 3.

Tabela 3 - Reagentes usados na reacção de *PCR* em tempo real e respectivos volumes

Reagente	Volume utilizado por reacção
Água de Biologia Molecular	18 µl
Tampão <i>HotMaster</i> TM com Mg ²⁺	5 µl
dNTP Mix	1 µl
<i>Primer forward</i>	2,5 µl
<i>Primer reverse</i>	2,5 µl
Sonda <i>TaqMan</i> TM	0,5 µl
<i>HotMaster</i> TM <i>Taq</i> DNA Polimerase	0,5 µl
Total <i>Master Mix</i>	30 µl

Para completar a mistura de reacção foi adicionado a 30 µl *Master Mix*, 20 µl de DNA extraído de cada uma das amostras clínicas (Tabela 4).

Tabela 4 - Volume final da reacção de *PCR* em tempo real

	Volume
<i>Master Mix</i>	30 µl
	+
DNA da amostra clínica	20 µl
Volume final de reacção	Total = 50 µl

A amplificação do DNA foi executada no termociclador de tempo real, *Rotorgene 6000™* (Qiagen, Hilden, Alemanha). As condições de amplificação consistiram na activação da taq polimerase elevando a temperatura a 95 C° durante 3 minutos e 45 ciclos de 15 s a 95C° e 45 ciclos de 1 minuto a 60C°.

Foram executadas várias séries de *PCR*, e elaborados relatórios de resultados. Descreve-se de seguida a título exemplificativo alguns desses resultados, tendo sido os restantes colocados na secção anexos.

A figura 2 representa o resultado do *PCR* de 36 amostras, das quais, 4 são positivas para HBoV. De realçar, o incremento exponencial da fluorescência com o aumento do número de ciclos.

Foi considerado um *threshold* de 0.03, valor a partir do qual, as amostras foram consideradas positivas para HBoV. O valor de *cycle threshold (Ct)*, ciclo em que a recta da fluorescência intercepta a recta do *threshold*, foi de 27.99 para o controlo positivo (representado pela recta de cor vermelha). O *Ct* das 4 amostras positivas foi de 25.41, 26.46, 33.27 e 38.90 (ver anexo).

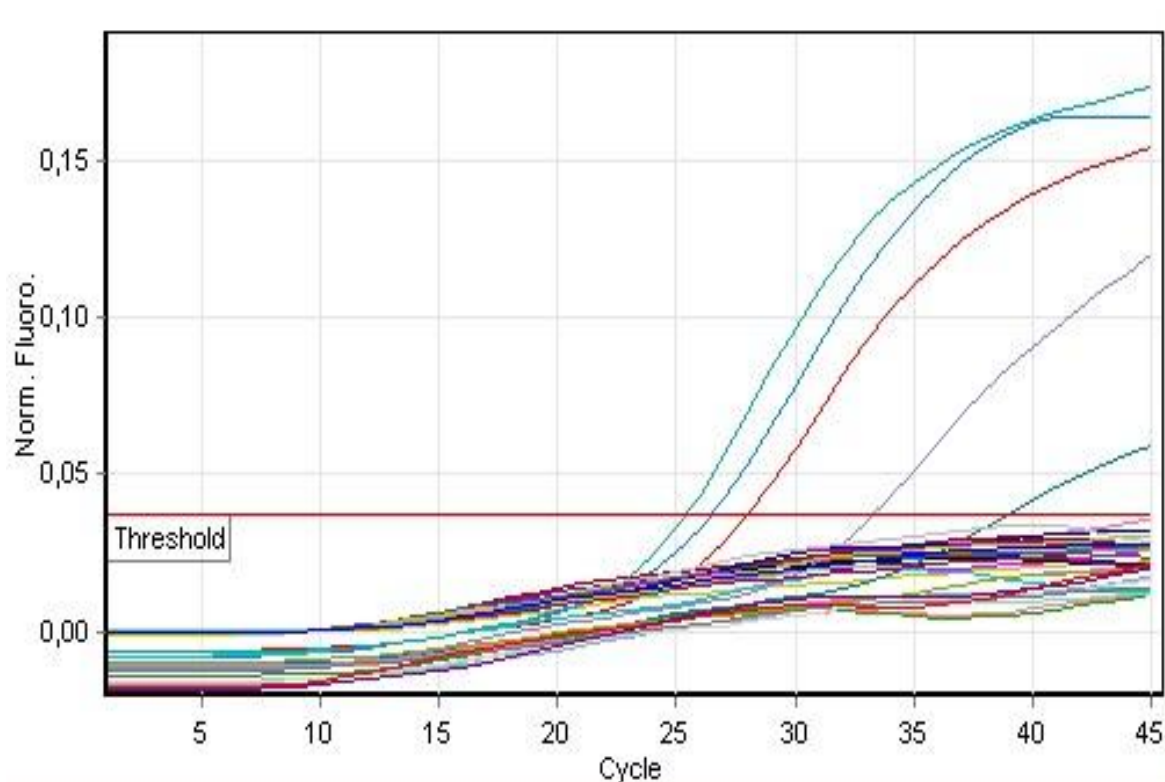


Fig.2 - Gráfico representativo de um dos ensaios de *PCR* em tempo real realizados (Fluorescência verso ciclos de amplificação).

7. Resultados e Discussão

7.1. Incidência da infecção por HBoV e sua distribuição mensal

Das 172 amostras respiratórias de crianças com IATR, foram detectados HBoV em 19 (11%). O maior número de amostras positivas para HBoV foi observado em Janeiro com 8 amostras. Seguiu-se o mês de Dezembro, com 4 amostras positivas e os meses de Fevereiro e Março, ambos com 3 amostras positivas. Curiosamente não se detectaram amostras positivas nos meses de Outubro e Novembro (Fig.3). A data de análise e respectivo número de amostras analisadas encontram-se descritos na tabela 5.

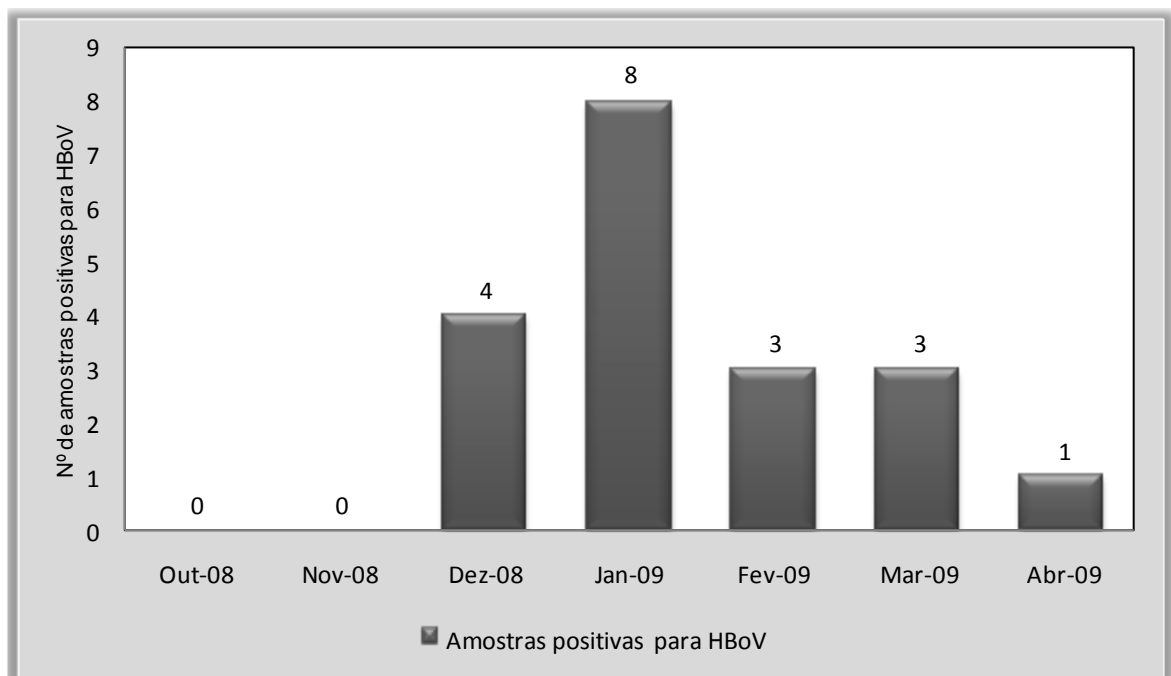


Fig.3 - Distribuição das amostras positivas para HBoV de Outubro de 2008 a Abril de 2009

Tabela 5 – Data e número de amostras analisadas

Mês - Ano	Número de amostras analisadas
Outubro 2008	28
Novembro 2008	30
Dezembro 2008	30
Janeiro 2009	24
Fevereiro 2009	25
Março 2009	20
Abril 2009	15
	Total = 172

Estes resultados estão de acordo, com os resultados obtidos no estudo de Ma *et al.*, onde 94% das amostras positivas para HBoV foram detectadas em amostras recolhidas entre Janeiro e Maio (Ma *et al.*, 2006). Em contrapartida, no estudo realizado por Choi *et al.*, o pico da distribuição mensal ocorreu em Maio e Julho, ou seja final da Primavera início do Verão (Choi *et al.*, 2006). Já Maggi *et al.*, em Itália, não conseguiu observar qualquer distribuição sazonal no seu estudo, havendo uma distribuição irregular ao longo do ano (Maggi *et al.*, 2007).

Segundo Schildgen *et al.*, a distribuição sazonal da infecção por HBoV varia de ano para ano (Schildgen *et al.*, 2008).

7.3. Incidência / Idade

Relativamente à idade das crianças com infecção por HBoV, 48% (n=8) possuíam mais de 24 meses, 32% (n=6) apresentavam idades compreendidas entre os 6 meses e os 24 meses, 26% (n=5) tinham menos de 6 meses (Fig.4). Neste estudo, a idade das crianças infectadas por HBoV variou entre 21 dias e 8 anos.

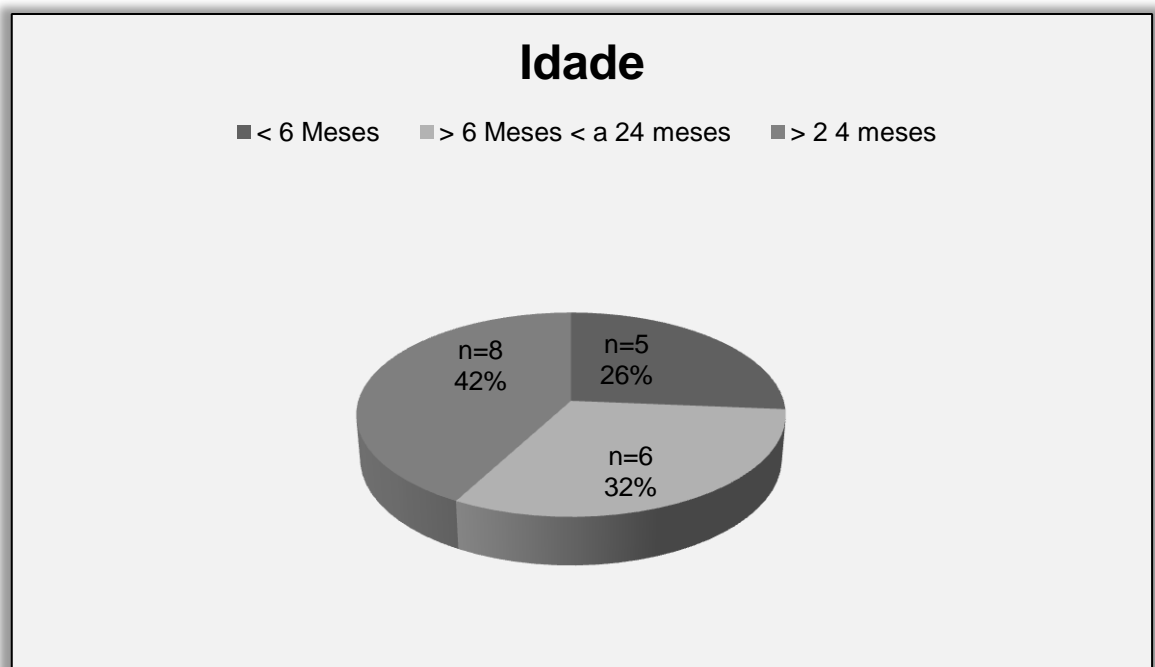


Fig.4 - Distribuição das amostras positivas para HBoV em função da idade

No que diz respeito à idade das crianças e ao contrário de alguns estudos, foi em crianças com idades superiores a 24 meses que se verificou maior incidência do HBoV. Por exemplo, Allander *et al.*, Chung *et al.*, Kesebir *et al.*, Smuts *et al.*, Vicente *et al.*, nos seus estudos verificaram que em crianças com idade inferior a 36 meses a incidência da infecção por HBoV era maior (Allander *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2006; Kesebir *et al.*, 2006; Smuts *et al.*, 2006; Vicente *et al.*, 2007). Contudo, os estudos de Foulongne *et al.* e Ma *et al.*, detectaram uma baixa incidência em crianças com idade inferior a 6 meses (Foulongne *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2006). Em boa verdade e analisando os estudos

publicados, a idade das crianças infectadas com HBoV, pode variar entre os 10 dias e os 11 anos (Schildgen *et al.*, 2008).

7.4. Incidência / Sexo

No que diz respeito à distribuição das amostras positivas para HBoV em relação ao sexo, foram encontradas 9 amostras positivas em crianças do sexo feminino e 10, em amostras de crianças do género masculino (Fig.5).

Não tem sido descrito na literatura nenhuma diferença da incidência de infecção por HBoV em função do sexo (Schildgen *et al.*, 2008).



Fig.5 - Distribuição das amostras positivas para HBoV em função do sexo

7.5. Co-deteccão do HBoV e outros vírus respiratórios

Em todas as amostras positivas para HBoV foram pesquisados outros vírus respiratórios, nomeadamente HRV, hMPV, pela técnica de *PCR* convencional e AdV, Infuenza A/B, Parainfluenza 1/2/3, RSV, pela técnica de imunofluorescência.

Tabela 6 - Técnicas usadas na deteção dos outros vírus respiratórios

Técnica	Vírus Alvo
<i>PCR</i> convencional ‡	HRV; hMPV
<i>PCR</i> em tempo real	HBoV
Imunofluorescência ‡	AdV; Infuenza A/B; Parainfluenza 1/2/3;RSV

‡ Técnica não efectuada neste estudo

De referir que, as técnicas de *PCR* convencional / imunofluorescência, usadas para deteção dos vírus respiratórios, HRV, hMPV, AdV, Infuenza A/B, Parainfluenza 1/2/3, RSV, não foram executadas neste estudo, tendo os resultados sido gentilmente cedidos pelo serviço de Patologia Clínica do Hospital São João.

Do total das 19 amostras positivas para HBoV, 73,7% (n=14) apresentaram-se positivas para outros vírus e apenas 26,3% (n=5), foram exclusivamente positivas para o HBoV. Dos 14 casos de co-deteccão, 63,1% (n=12) corresponderam a co-deteccão dupla, 5.75% (n=1) a tripla e 5.75% (n=1) a quádrupla (Tabela 7).

Tabela 7 - Síntese dos resultados da detecção de HBoV e co-deteção de outros vírus respiratórios

Amostra	Sexo	Idade	Co-deteção	Vírus detectados	Mês de deteção
1	M	8 Anos	Sim	HBoV; HRV	Dez. 2008
2	M	2 Meses	Sim	HBoV; RSV	Dez. 2008
3	M	5 Anos	Sim	HBoV; RSV	Dez. 2008
4	M	16 Meses	Sim	AdV; HBoV	Dez. 2008
5	M	33 Dias	Sim	HBoV; HRV	Jan. 2009
6	F	21 Dias	Sim	HBoV; RSV	Jan. 2009
7	F	47 Dias	Não	HBoV	Jan. 2009
8	F	8 Meses	Não	HBoV	Jan. 2009
9	F	6 Anos	Sim	HBoV; RSV	Jan. 2009
10	F	14 Meses	Sim	hMPV; HRV; RSV	Jan. 2009
11	F	13 Meses	Sim	HBoV; hMPV	Jan. 2009
12	M	23 Meses	Sim	HBoV; hMPV	Jan. 2009
13	M	2 Anos	Sim	AdV; HBoV; hMPV; HRV	Fev. 2009
14	M	4 Anos	Não	HBoV	Fev. 2009
15	M	4 Anos	Sim	AdV; HBoV	Fev. 2009
16	M	4 Anos	Sim	AdV; HBoV	Mar. 2009
17	F	3 Meses	Não	HBoV	Mar. 2009
18	F	4 Anos	Não	HBoV	Mar. 2009
19	F	3 Anos	Sim	HBoV; HRV	Abr. 2009

Os vírus co-detectados com maior frequência foram o HRV e o RSV, ambos em 5 amostras, tendo AdV e os hMPV sido detectados em 4 amostras.

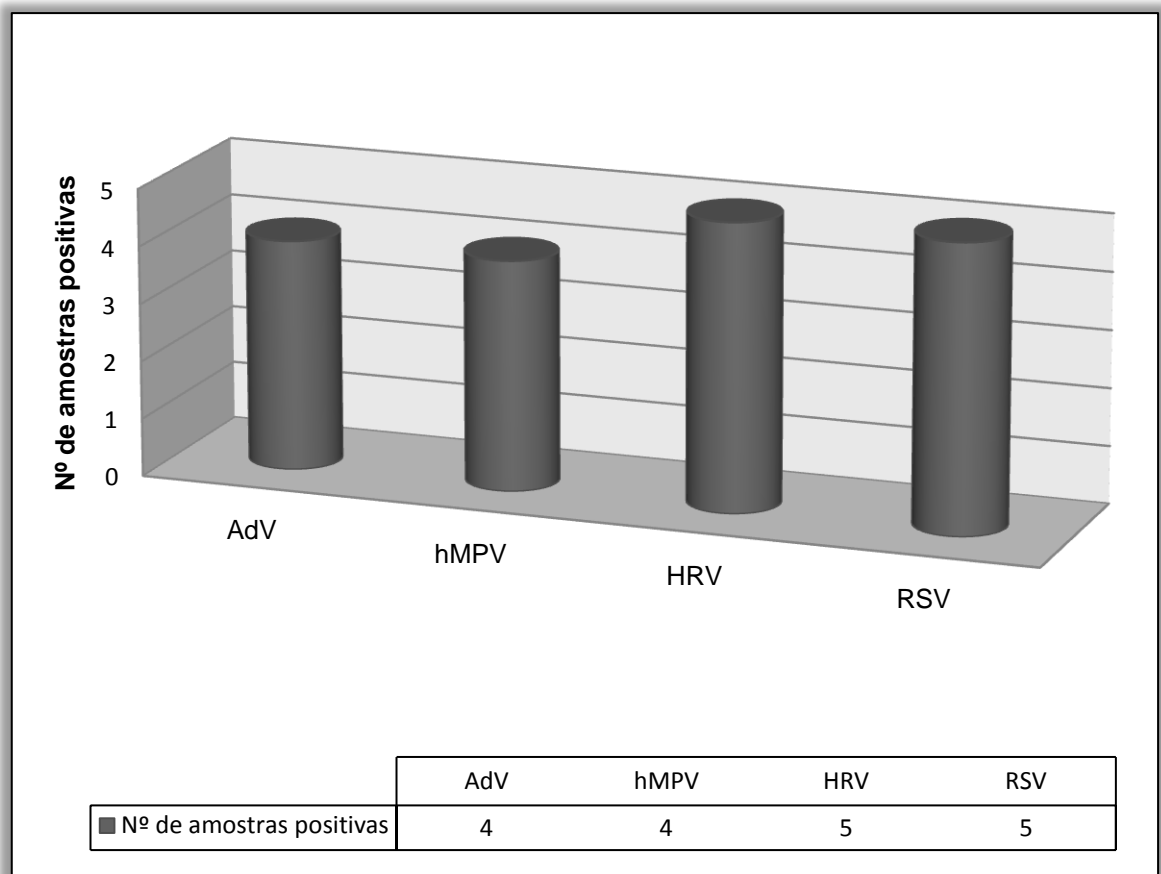


Fig.6 - Vírus respiratórios co-detectados na presença de HBoV e sua frequência

Esta presença de outros vírus respiratórios em amostras positivas para HBoV tem sido descrita em vários estudos, sendo os mais frequentemente detectados os AdV, hMPV, HRV e o RSV (Allander *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2006; Foulongne *et al.*, 2006; Kesebir *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2006; Maggi *et al.*, 2007; Smuts *et al.*, 2006; Sloots *et al.*, 2006).

7. Considerações finais

Nos últimos anos foram identificados novos vírus respiratórios, incluindo o hMPV (Van den Hoogen *et al.*, 2001) e os novos coronavírus humanos HCoV- NL63 e HKU1 (Fouchier *et al.*, 2004; Van der Hoek *et al.*, 2004) pertencentes a famílias como a *Paramyxoviridae* e *Coronaviridae*, respectivamente. Estes vírus são agentes patogénicos, cujo papel etiológico na infecção respiratória é bem conhecido. O HBoV foi o primeiro membro da família *Parvoviridae* a ser detectado em doentes com patologia respiratória (Allander *et al.*, 2005), e ainda hoje o papel de HBoV permanece por esclarecer.

Neste estudo, a incidência de HBoV em crianças com IATR detectada foi de 11%, ou seja, das 172 amostras respiratórias, 19 foram positivas para HBoV. A alta incidência de HBoV observada no presente estudo está de acordo com o descrito na literatura, nomeadamente, com o estudo realizado na África do Sul (Smuts *et al.*, 2006) onde foi apurado um valor de incidência igual a 11%. O intervalo de valores de incidência obtidos em outras investigações varia entre os 1,5% de Bastien *et al.*, Canada (Bastien *et al.*, 2007) e os 19% de Allander *et al.*, Suécia (Allander *et al.*, 2007). Esta variação de incidência poderá ser explicada pelas disparidades geográficas do HBoV circulante, pelas discrepâncias nos doentes seleccionados, pelos desiguais tipos de amostras respiratórias usados e pelos desiguais tipos de sensibilidades dos ensaios de *PCR* empregados (Allander, 2008a).

No presente estudo, em 73,7% (n=14) das amostras positivas para HBoV foram co-detectados outros vírus respiratórios, nomeadamente, AdV, hMPV, HRV e o RSV. Esta elevada taxa de co-deteção foi também encontrada em outros estudos já publicados (Allander *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2006; Sloots *et al.*, 2006).

Grande parte dos vírus respiratórios apresenta uma distribuição sazonal, com maior actividade no Inverno (Bastien *et al.*, 2007). No presente estudo, foi de facto, nos meses de Dezembro e Janeiro em que a incidência de HBoV foi maior. Contudo, vários estudos obtiveram diferentes resultados. Choi *et al.*, obteve uma maior deteção de HBoV no fim da Primavera e início do Verão (Choi *et al.*, 2006). Já Maggi *et al.* não conseguiu obter uma distribuição sazonal de HBoV (Maggi *et al.*, 2007).

Ficou comprovado que o HBoV apresenta uma elevada incidência em crianças com IATR, à semelhança do que foi verificado por todo o mundo. Também em concordância, está o facto de HBoV ter sido co-detectado com outros vírus respiratórios, o que torna o papel de HBoV na infecção respiratória mais difícil de definir.

Mais estudos são necessários, para clarificar o significado clínico e epidemiológico da presença de HBoV, não só nas amostras respiratórias, mas também, em outras amostras biológicas, de forma a estabelecer, uma relação causa/efeito.

8. Conclusão

Dos resultados obtidos neste trabalho podem ser retiradas as seguintes conclusões:

1. Elevada incidência (11%) de HBoV em crianças com IATR residentes no distrito do Porto.
2. Dezembro e Janeiro foram os meses com maior incidência de HBoV.
3. A incidência de HBoV é maior em crianças com idades superiores a 24 meses.
4. A incidência da co-infecção por outros vírus respiratórios, designadamente, AdV, hMPV, HRV e RSV, é elevada (73,7%).
5. Não há diferença significativa da incidência de HBoV em relação ao sexo.

9. Bibliografia

Allander T. Human bocavirus. *J Clin Virol* 2008a; 41(1): 29-33.

Allander T, Hedman L, Jartti T, Kantola K and Lehtinen P. Serodiagnosis of human bocavirus infection. *Clin Infect Dis* 2008b; 46(4): 540-6.

Allander T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinen P, Osterback R, Vuorinen T, Waris M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Van den Hoogen BG, Hyypia T, and Ruuskanen O. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis* 2007; 44(7): 904-10.

Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:12891–6.

Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, and Li Y. Human bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:848-850

Bastien N, Chui N, Robinson J, Lee B, Dust K, Hart L, and Li Y. Detection of Human Bocavirus in Canadian Children in a 1-Year Study. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 610 - 613.

Brieu N, Gay B, Segondy M, Foulongne V. Electron microscopy observation of human bocavirus (HBoV) in nasopharyngeal samples from HBoV infected children. *J Clin Microbiol* 2007; 45:3419-3420

Choi EH, Lee HJ, Kim SJ, Eun BW, Kim NH, Lee JA, Lee JH, Song EK, Kim SH, Park JY and Sung JY. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005. *Clin Infect Dis* 2006. 43:585-592.

Chung JY, Han TH, Kim CK, and Kim SW. Bocavirus infection in hospitalized children, South Korea. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:1254-1256.

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

Enmei L, Yu D, Xiaodong Z, Yuan D, Qubei L, Zhengxiu L, Lijia W, and Xiqiang Y. Children with persistent wheezing associated with human bocavirus infection in china. *Pediatrics* 2008; 121: S114 - S115.

Fauci A, Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J, and Loscalzo J, Eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition 2008. Chapter 177; P.3569-3579.

Fouchier RAM, Hartwig NG, Besteboer TM, Niemeyer B, de Jong JC, Simon JH. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:6212–6.

Foulongne V, Olejnik Y, Perez V, Elaerts S, Rodière M, and Segondy M. Human bocavirus in French children. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:1251-1253.

Fredricks DN, Relman DA. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:18-33.

Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF, Anderson LJ, Erdman D, and Olsen SJ. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis* 2007; 195(7): 1038-45.

Garcia M, Calvo C, Pozo F, Pérez-Brena P, Vazquez M, and Casas I. Detection of human bocavirus in ill and healthy Spanish children: a 2-year study. *Arch Dis Child* 2009; 10:1136-1145.

Haidopoulou K, Eboriadou M, Saliakelis S, Goutaki M, Damianidou L, Pavlidou V, and Papa A. Human bocavirus in greek children with respiratory tract infection. *Pediatrics* 2008; 121: S107 - S108.

Heegaard ED and Brown KE. Human Parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 485 - 505.

Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, and Kahn JS. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis* 2006; 194:1276-1282.

Lau SK, Woo C P, Tse H, Fu CT, Au WK, Chen XC, Tsoi HW, Tsang TH, Chan JS, Tsang DN, Li KS, Tse CW, Keung T, Tsang OT, Zheng BJ, Tam S, Chan KH, Zhou B and Yung K. Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. *J Gen Virol* 2008; 89: 1840 - 1848.

Lu X, Chittaganpicht M, Olsen SJ, Mackay IM, Sloots TP, Fry AM. PCR assays for detection of bocavirus in human specimens. *J Clin Microbiol* 2006; 44:3231-5.

Ma X, Endo R, Ishiguro N, Ebihara T, Ishiko H, Ariga T, and Kikuta H. Detection of Human Bocavirus in Japanese Children with Lower Respiratory Tract Infections. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1132 - 1134.

Maggi F, Andreoli E, Pifferi EM, Meschi S, Rocchi J, and Bendinelli M. Human bocavirus in Italian patients with respiratory diseases. *J Clin Virol* 2007.38:321-325.

Manning A, Russell V, Eastick K, Leadbetter GH, Hallam N, Templeton K, and Simmonds P. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J Infect Dis* 2006.194:1283-1290

Musa Y, Hindiyeh, Keller N, Mandelboim M, Ram D, Rubinov J, Regev L, Levy V, Orzitzer S, Shaharabani H, Azar R, Mendelson E, and Grossman Z. High Rate of Human Bocavirus and Adenovirus Coinfection in Hospitalized Israeli Children. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 334 - 337.

Neske F, Blessing K, Tollmann F, Schubert J, Rethwilm A, Kreth HW, and Weissbrich B. Real-Time PCR for Diagnosis of Human Bocavirus Infections and Phylogenetic Analysis. *J Clin Microbiol* 2007; 45(7): 2116 – 2122.

Qian XH, Zhang GC, Jiao XY, Zheng YJ, Cao YH, Xu DL, and Chen CS. Aplastic anaemia associated with parvovirus B19 infection. *Arch Dis Child* 2002; 87: 436 - 437.

Schildgen O, Muller A, Allander T, Mackay IM, Volz S, Kupfer B, Simon A. Human Bocavirus: Passenger or Pathogen in Acute Respiratory Tract Infections? *Clin Microbiol* 2008; Rev. 21: 291-304.

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

Smuts H and Hardie D. Human bocavirus in hospitalized children, South Africa. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:1457-1458.

Souza E, Ramos J, Proença J, Diniz A, Carvalho G, Ciuffo I, César A. Neto A, Andrade C, Souza L, Arruda E, and Silva L. Human Bocavirus in Very Young Infants Hospitalized with Acute Respiratory Infection in Northeast Brazil. *Clin Infect Dis* 2008 46:547-9.

Sun Y, Chen AY, Cheng F, Guan W, Johnson FB, and Qiu J. Molecular Characterization of Infectious Clones of the Minute Virus of Canines Reveals Unique Features of Bocaviruses. *J Virol* 2009; 83: 3956 - 3967.

Tozer SJ, Lambert SB, Whiley DM, S Bialasiewicz, Lyon MJ, Nissen MD, and SlootsTP. Detection of human bocavirus in respiratory, fecal, and blood samples by real-time PCR. *J Med Virol* 2009; 81(3): 488-93.

Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7:719–24.

Van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJM, Wolthers KC, et al. Identification of a new coronavirus. *Nat Med* 2004; 10:368–73.

Vicente D, Cilla G, Montes M, Perez-Yarza EG, and Perez-Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(4): 636-7.

Xu J, Raff TC, Muallem NS, and Neubert AG. Hydrops Fetalis Secondary to Parvovirus B19 Infections. *J Am Board Fam Pract* 2003; 16: 63.

10. Anexos

Quantitation Report

Experiment Information

Run Name	Bocavirus 2009-06-05 (1)
Run Start	05-06-2009 16:17:39
Run Finish	05-06-2009 17:49:50
Operator	Sérgio
Notes	Bocavirus
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.87
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	5,33

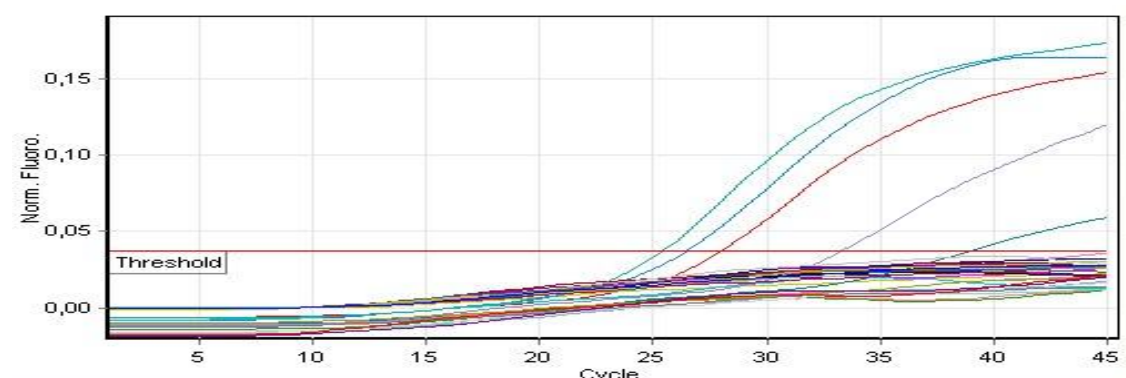
Quantitation Information





































Threshold	0,03699
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	N/A
Standard Curve (2)	N/A
Start normalising from cycle	11
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1

Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 95°C, 3 min 0 secs	
Cycling (45 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 15 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Green][1][1])

Quantitation data for Cycling A.Green



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1		cp	Positive Control	27,99			
2		23924	Unknown				
3		23963	Unknown				
4		24013	Unknown				
5		24126	Unknown				
6		23795	Unknown	26,46			
7		24035	Unknown	38,90			
8		23906	Unknown				
9		23808	Unknown				
10		23868	Unknown				
11		23953	Unknown				
12		24034	Unknown				
13		23955	Unknown				
14		23018	Unknown				
15		23325	Unknown				
16		23728	Unknown				
17		23710	Unknown	33,27			
18		23956	Unknown				
19		23967	Unknown				
20		22764	Unknown				
21		23846	Unknown				
22		23756	Unknown				
23		23795	Unknown	25,41			
24		23711	Unknown				
25		23628	Unknown				
26		23016	Unknown				
27		23191	Unknown				
28		23886	Unknown				
29		23281	Unknown				
30		23557	Unknown				
31		23574	Unknown				
32		23158	Unknown				
33		23230	Unknown				
34		23516	Unknown				
35		23416	Unknown				
36		23199	Unknown				

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

Quantitation Report

Experiment Information

Run Name	Bocavirus 2009-05-18 (1)
Run Start	18-05-2009 17:20:27
Run Finish	18-05-2009 18:51:43
Operator	Sérgio
Notes	Bocavirus
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.87
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	4,

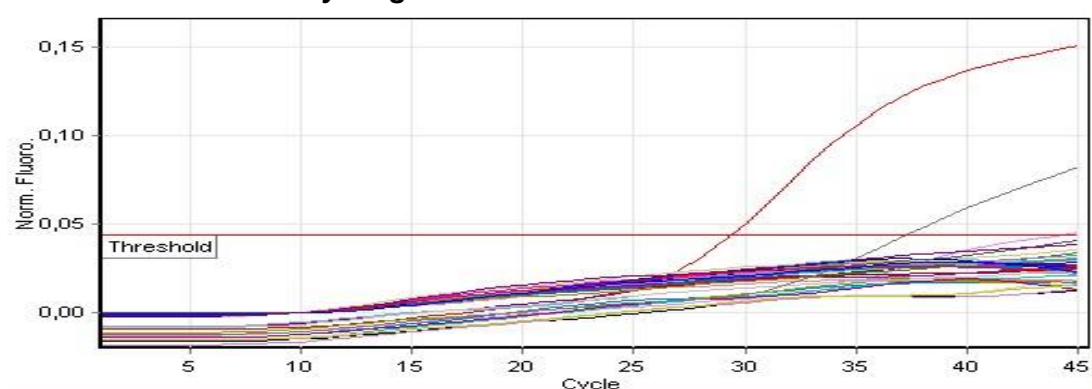
Quantitation Information


Threshold	0,04398
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	N/A
Standard Curve (2)	N/A
Start normalising from cycle	11
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 95°C, 3 min 0 secs	
Cycling (45 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 15 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Green])[1][1]

Quantitation data for Cycling A.Green



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1		cp	Positive Control	29,38			
2		26181	Unknown				
3		26104	Unknown				
4		26224	Unknown				
5		u28361	Unknown	44,21			
6		26281	Unknown				
7		26074	Unknown				
8		26073	Unknown				
9		25888	Unknown				
10		25976	Unknown				
11		25845	Unknown				
12		26103	Unknown				
13		u31383	Unknown				
14		26077	Unknown				
15		26163	Unknown				
16		25770	Unknown				
17		u20322	Unknown				
18		25718	Unknown				
19		25509	Unknown				
20		25425	Unknown				
21		25783	Unknown				
22		25604	Unknown				
23		25668	Unknown				
24		25631	Unknown				
25		25496	Unknown				
26		u97143	Unknown				
27		25610	Unknown				
28		27531	Unknown				
29		25413	Unknown				
30		27568	Unknown				
31		25511	Unknown	37,27			
32		27606	Unknown				
33		u96929	Unknown				
34		25541	Unknown				
35		u6442	Unknown				
36		u96646	Unknown				

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

Quantitation Report

Experiment Information

Run Name	Bocavirus 2009-05-31 (1)
Run Start	31-05-2009 12:38:54
Run Finish	31-05-2009 14:11:21
Operator	Sérgio
Notes	Bocavirus
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.87
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	4,

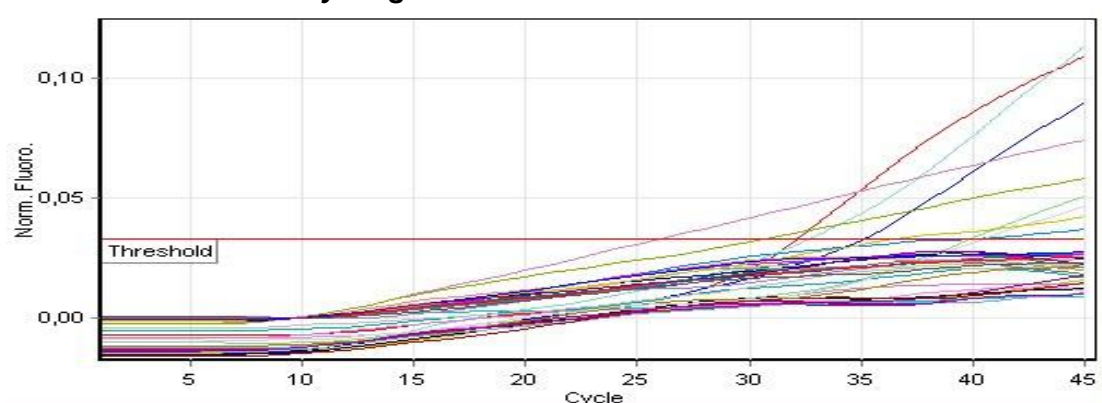
Quantitation Information





































Threshold	0,03313
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	N/A
Standard Curve (2)	N/A
Start normalising from cycle	11
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 95°C, 3 min 0 secs	
Cycling (45 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 15 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Green][1][1])

Quantitation data for Cycling A.Green



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1		cp	Positive Control	32,21			
2		26647	Unknown				
3		24926	Unknown	35,16			
4		24817	Unknown				
5		24736	Unknown				
6		24714	Unknown	40,38			
7		25003	Unknown				
8		24844	Unknown				
9		24863	Unknown				
10		24593	Unknown				
11		24694	Unknown				
12		24791	Unknown				
13		24887	Unknown				
14		24758	Unknown	39,93			
15		24921	Unknown	32,74			
16		24703	Unknown				
17		24737	Unknown				
18		24562	Unknown				
19		24537	Unknown	26,11			
20		24399	Unknown				
21		24449	Unknown				
22		24650	Unknown	30,86			
23		24627	Unknown				
24		24626	Unknown				
25		24669	Unknown				
26		24395	Unknown				
27		24470	Unknown				
28		24704	Unknown	40,57			
29		24374	Unknown				
30		24433	Unknown				
31		26747	Unknown				
32		24328	Unknown				
33		24467	Unknown				
34		24380	Unknown	36,75			
35		23946	Unknown				
36		23935	Unknown				

Quantitation Report

Experiment Information

Run Name	Bocavirus 2009-05-27 (1)
Run Start	27-05-2009 13:10:28
Run Finish	27-05-2009 14:42:54
Operator	Sérgio
Notes	Bocavirus
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.87
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	5,33

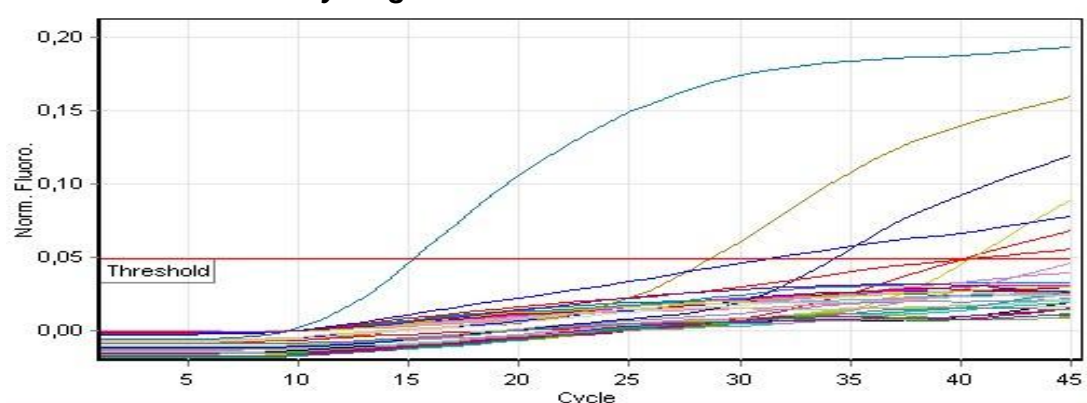
Quantitation Information



















Threshold	0,04882
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	N/A
Standard Curve (2)	N/A
Start normalising from cycle	11
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 95°C, 3 min 0 secs	
Cycling (45 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 15 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Green][1][1])

Quantitation data for Cycling A.Green



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1		cp	Positive Control	40,02			
2		26828	Unknown	40,43			
3		26578	Unknown				
4		26261	Unknown				
5		26676	Unknown				
6		27078	Unknown				
7		26894	Unknown				
8		26572	Unknown				
9		u1303	Unknown				
10		26774	Unknown				
11		u85498	Unknown				
12		27210	Unknown				
13		u86920	Unknown				
14		26262	Unknown				
15		26496	Unknown				
16		u91595	Unknown				
17		u73734	Unknown				
18		26401	Unknown				
19		26479	Unknown				
20		26223	Unknown				
21		27022	Unknown	28,66			
22		27389	Unknown				
23		b26095	Unknown				
24		26751	Unknown	15,22			
25		26777	Unknown	34,22			
26		26076	Unknown				
27		u80751	Unknown				
28		26313	Unknown				
29		26673	Unknown				
30		26621	Unknown				
31		26620	Unknown				
32		26770	Unknown				
33		26576	Unknown	40,12			
34		26619	Unknown				
35		26700	Unknown	31,05			
36		26719	Unknown				

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

Quantitation Report

Experiment Information

Run Name	Bocavirus 2009-04-14 (1)
Run Start	14-04-2009 15:28:53
Run Finish	14-04-2009 16:59:21
Operator	Sérgio
Notes	Bocavirus
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.87
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	5,33

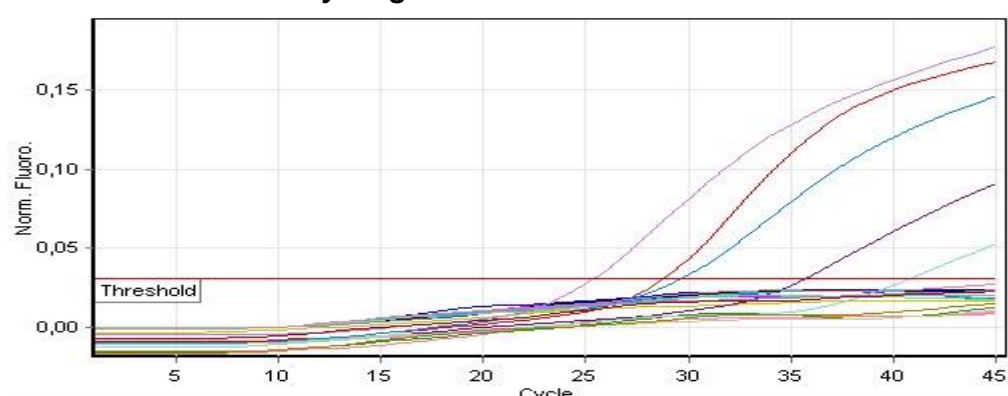
Quantitation Information

Threshold	0,03098
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	N/A
Standard Curve (2)	N/A
Start normalising from cycle	11
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 95°C, 3 min 0 secs	
Cycling (45 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 15 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A([Green][1][1])

Quantitation data for Cycling A.Green



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1		cp	Positive Control	28,87			
2		27075	Unknown				
3		u1120	Unknown				
4		u53184	Unknown	35,79			
5		u73318	Unknown				
6		26369	Unknown	29,66			
7		26267	Unknown				
8		26466	Unknown				
9		26749	Unknown				
10		26546	Unknown				
11		26301	Unknown				
12		u73628	Unknown				
13		u51698	Unknown				
14		26036	Unknown				
15		26303	Unknown	40,88			
16		26576	Unknown				
17		26902	Unknown				
18		u51689	Unknown	25,42			
19		26841	Unknown				
20		26577	Unknown				
21		27018	Unknown				

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

Quantitation Report

Experiment Information

Run Name	Bocavirus 2009-06-09 (1)
Run Start	09-06-2009 8:45:38
Run Finish	09-06-2009 10:26:23
Operator	Sérgio
Notes	Bocavirus
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.87
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	4,

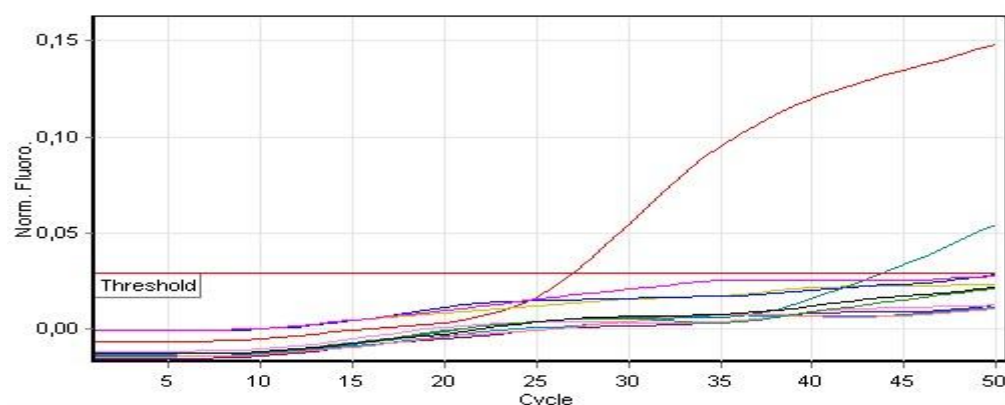
Quantitation Information














Threshold	0,02902
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	N/A
Standard Curve (2)	N/A
Start normalising from cycle	11
Noise Slope Correction	No
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1

Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 95°C, 3 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 15 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A[[Green]][1][1])

Quantitation data for Cycling A.Green



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1		cp	Positive Control	27,00			
2		u40205	Unknown				
3		u51499	Unknown				
4		u33308	Unknown				
5		u64019	Unknown				
6		u2490	Unknown				
7		23127	Unknown	43,77			
8		23608	Unknown				
9		22950	Unknown				
10		23577	Unknown				
11		23405	Unknown				
12		24323	Unknown				
13		22349	Unknown				

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.