

Marina Buarque de Almeida

**Avaliação das infecções
respiratórias virais em pacientes
com fibrose cística**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Pediatria

Orientador: Dr. Luiz Vicente Ribeiro Ferreira da Silva Filho

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Almeida, Marina Buarque de
Avaliação das infecções respiratórias virais em pacientes com fibrose cística /
Marina Buarque de Almeida. -- São Paulo, 2010.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Pediatria.
Área de concentração: Pediatria.
Orientador: Luiz Vicente Ribeiro Ferreira da Silva Filho.

Descritores: 1.Fibrose cística 2.Biologia Molecular 3.Rhinovirus 4.Vírus
sincicial respiratório 5.Vírus da Influenza 6.Bocavirus humano 7.Infecções por
paramyxoviridae 8.Metapneumovirus

USP/FM/SBD-024/10

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e sigla

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Considerações Gerais.....	02
1.2 Genética e Incidência da FC.....	02
1.3 Importância da Infecção Bacteriana na FC.....	03
1.4 Infecções Virais na FC.....	04
1.4.1 Prevalência das Infecções Virais.....	04
1.4.2 Repercussões das Infecções Virais na FC.....	04
1.5 Diagnóstico da Infecção Viral.....	06
1.6 Justificativa.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivos Gerais.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15

3 MÉTODOS	16
3.1 Casuística.....	17
3.2 Métodos.....	17
3.2.1 Critérios de inclusão e exclusão.....	18
3.2.2 Delineamento do estudo.....	18
3.2.3 Protocolo clínico (Coleta de dados).....	18
3.2.3.1 Oximetria de pulso.....	19
3.2.3.2 Testes de função pulmonar.....	19
3.2.3.3 Coleta de amostras clínicas.....	20
3.2.3.3.1 Amostras de sangue.....	20
3.2.3.3.2 Coleta de escarro ou esfregaço de orofaringe.....	21
3.2.3.3.3 Coleta de lavado nasal.....	21
3.3 Diagnóstico de infecções bacterianas.....	23
3.4 Diagnóstico das infecções virais.....	23
3.4.1 Processamento inicial das amostras.....	23
3.4.2 Técnica de imunofluorescência.....	24
3.4.3 Métodos de biologia molecular.....	26
3.4.3.1 Extração de DNA e RNS das amostras clínicas.....	26
3.4.3.2 Síntese de cDNA (RT-PCR).....	26
3.4.3.3 Reação da cadeia de polimerase (PCR).....	26
3.4.3.4 Escolha das sondas iniciadoras (<i>primers</i>).....	26
3.4.3.5 Métodos de PCR e RT-PCR em uma placa.....	29
3.4.3.6 Controles para todas as etapas do método.....	30
3.4.3.7 Revelação dos produtos no seqüenciador automatizado.....	31
3.4.3.8 Diagnóstico das infecções por rinovírus e enterovírus.....	33
3.4.3.9 Sequenciamento de amplicómeros para verificação de discrepâncias e confirmação de identidade.....	35
3.5 Controle de coletas e registro de dados.....	36
3.6 Análise estatística.....	36
4 RESULTADOS	37
4.1 Coletas e avaliações clínicas.....	38
4.1.1 Dados demográficos.....	38
4.1.2 Tipo de consulta, tipo de coleta e situação clínica.....	39

4.1.3	Avaliação funcional.....	41
4.1.4	Sintomas por ocasião da coleta.....	42
4.2	Resultados de culturas.....	43
4.3	Resultados de virologia.....	45
4.3.1	Imunofluorescência indireta.....	45
4.3.2	Métodos moleculares.....	45
4.3.2.1	Infecções virais e idade.....	48
4.3.2.2	Infecções virais e sazonalidade.....	50
4.3.2.3	Persistência viral.....	54
4.3.3	Impacto clínico das infecções virais.....	54
4.3.4	Infecções virais e principais desfechos.....	54
4.3.4.1	Infecções por rinovírus e principais desfechos.....	55
4.3.4.2	Infecções por outros vírus e principais desfechos.....	57
5	DISCUSSÃO.....	58
6	CONCLUSÕES.....	70
7	ANEXOS.....	72
8	REFERÊNCIAS.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Adeno	Adenovírus
Flu A	Vírus influenza A
Flu B	Vírus influenza B
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CVF	Capacidade vital forçada
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EEG	Equação de estimação generalizadas
FC	Fibrose cística
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC	Hospital das Clínicas
ICr	Instituto da Criança
IMTSP	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
NASBA	<i>Nucleic acid sequence based amplification</i>
OR	<i>odds ratio</i>

pb	pares de bases
PCR	reação da cadeia de polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PIV	vírus parainfluenza
RNA	ácido ribonucléico
RT-PCR	PCR em tempo real (<i>real time PCR</i>)
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
URF	Unidades relativas de fluorescência
USP	Universidade de São Paulo
VEF1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
VEF1/CVF	Índice de Tiffeneau
VSR	Vírus sincicial respiratório

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fluxo de consultas, avaliações funcionais e coletas dos pacientes durante o estudo.....022
- Figura 2** - Representação esquemática da preparação das placas para reação da cadeia de polimerase para identificação de 11 vírus respiratórios.....029
- Figura 3** - Representação do plasmídeo contendo todas as seqüências alvo.....031
- Figura 4** - Pool formado a partir de uma linha da placa para corrida eletroforética capilar em seqüenciador de DNA.....032
- Figura 5** - Imagem dos resultados de uma amostra de amplificação de controle positivo no Software FragmentAnalysis (GE Healthcare)-picos das diferentes ampliações.....033
- Figura 6** - Distribuição do número de pacientes por idade da população estudada.....039
- Figura 7** - Diagnóstico de exacerbação respiratória em relação ao tipo de consulta.....040
- Figura 8** - Distribuição do total de vírus identificados.....047
- Figura 9** - Box-plot da distribuição de idade dos grupos vírus negativo e vírus positivo, representando intervalos interquartis, mediana e limites máximo e mínimo das idades representados pelas linhas externas ao quadro.....049
- Figura 10** - Box-plot da distribuição de idade dos grupos VSR negativo e VSR positivo, representando intervalos interquartis, mediana e limites máximo e mínimo das idades representados pelas linhas externas ao quadro.....049

Figura 11 - Box-plot da distribuição de idade dos grupos entero negativo e entero positivo, representando intervalos interquartis, mediana e limites máximo e mínimo das idades representados pelas linhas externas ao quadro.....	050
Figura 12 - Distribuição da coleta de amostras e positividade (identificação de pelo menos um vírus) ao longo do Período do estudo.....	051
Figura 13 - Distribuição sazonal do rinovírus ao longo do estudo.....	051
Figura 14 - Distribuição sazonal do enterovírus ao longo do estudo.....	052
Figura 15 - Distribuição sazonal do bocavírus ao longo do estudo.....	052
Figura 16 - Distribuição sazonal do coronavírus ao longo do estudo.....	053
Figura 17 - Distribuição sazonal do VSR ao longo do estudo.....	053
Figura 18 - Distribuição dos subtipos de rinovírus identificados.....	056

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Dados demográficos e características gerais dos pacientes.....039
- Tabela 2** – Situação funcional dos pacientes avaliada por espirometria.....041
- Tabela 3** - Saturação arterial de oxigênio medida por oximetria de pulso.....042
- Tabela 4** - Sintomas dos últimos cinco dias relatados no questionário clínico042
- Tabela 5** - prevalência de sinais e/ou sintomas utilizados na definição de exacerbação da doença respiratória.....043
- Tabela 6** - Distribuição das bactérias identificadas nas culturas bacterianas das 404 amostras.....044
- Tabela 7** - Vírus respiratórios identificados em amostras de nasofaringe de pacientes portadores de fibrose cística.....046
- Tabela 8** - Co-infecções virais identificadas em 26 amostras de nasofaringe de pacientes portadores de fibrose cística.....048
- Tabela 9** - Associação entre os sintomas relatados nos cinco dias precedendo a consulta e identificação viral.....055
- Tabela 10** - Associação entre o diagnóstico de exacerbação da doença respiratória e a identificação de rinovírus e os subtipos de rinovírus nas amostras de nasofaringe.....056
- Tabela 11** - Associação entre o diagnóstico de exacerbação da doença respiratória e a identificação de vírus nas amostras de nasofaringe.....057

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

