

DÉBORA CARLA CHONG E SILVA

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO,
HISTOPATOLÓGICO E
IMUNOHISTOQUÍMICO DAS
INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS EM
NECRÓPSIAS PEDIÁTRICAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Lúcia de Noronha

Co-orientadora: Dra. Sônia Mara Raboni

**CURITIBA
2005**

*Aos meus pais, Jeso e Genoveva,
que me ensinaram a não desistir
frente aos obstáculos.*

*Ao meu esposo Chong, pelo apoio
incondicional nesta jornada, e a
minha filha Carolina, razão de toda
minha vida.*

Descobrir como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar aonde quer que seja, não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso antes de mais nada, querer.

Amir KlimK

AGRADECIMENTOS

Á **Prof.^a Dra. Lúcia de Noronha**, pela orientação clara e constante e pelo empenho e credibilidade dedicados a realização deste trabalho e deste sonho.

Á **Dra. Sônia Mara Raboni**, médica do laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela paciência e desprendimento com que me recebeu no laboratório, transmitindo-me os conhecimentos necessários para a realização da imunohistoquímica.

Á **Prof.^a Dra. Vanete Thomaz Soccol**, Coordenadora do Curso de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Ao Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles, Vice-Coordenador do Curso de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná e Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Ao Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho, pelos constantes ensinamentos que guiaram meus passos no caminho da ciência e da pesquisa.

Á **Prof.^a Dra. Eliane Mara Cesário Maluf**, pelas importantes sugestões no desenvolvimento deste projeto.

Às bioquímicas **Luine R. V. Tsuchiya** e **Meri Bordignon Nogueira**, do laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio e compreensão.

Á técnica **Luciane A. Pereira**, do Laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio cuidadoso na execução do material para imunohistoquímica.

Aos técnicos **Sidnei, Maurício, Sueli , Lucilene e Julie**, do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela atenção e colaboração na seleção e no preparo do material deste estudo.

À residente **Dra. Ana Cristina Lira Sobral** do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio na escolha do material histológico.

Às biólogas **Maria Iolanda Neves Sanchez e Audrei Behrens de Oliveira Viana**, pelas importantes sugestões na técnica de imunohistoquímica.

Às acadêmicas de medicina **Daniele Margarita Marani, Flávia Kuroda e Karla Abujamra**, pelo importante auxílio na compilação bibliográfica.

À **Ângela da M. S. Martins** pela realização do estudo estatístico.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS QUADROS, GRÁFICOS E TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
LISTA DE ANEXOS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 A MORBIDADE E MORTALIDADE POR DOENÇA RESPIRATÓRIA NO BRASIL E NO MUNDO.....	5
3.1.1 Aspectos epidemiológicos de morbidade por doença respiratória em países desenvolvidos.....	5
3.1.2 Aspectos epidemiológicos de morbidade por doença respiratória em países em desenvolvimento.....	11
3.1.3 Aspectos epidemiológicos de mortalidade por doença respiratória em países desenvolvidos.....	18
3.1.4 Aspectos epidemiológicos de mortalidade por doença respiratória em países em desenvolvimento.....	19
3.2 A FISIOPATOLOGIA DAS DOENÇAS RESPIRATÓRIAS AGUDAS E A RELAÇÃO COM MORBIDADE E MORTALIDADE EM CRIANÇAS	24
3.2.1 Patogênese dos vírus respiratórios.....	24
3.2.2 Patogênese das bactérias no trato respiratório	26
3.2.3 Concomitância de vírus e bactérias.....	28

3.2.4	Reinfecção	28
3.2.5	Respostas imunológicas aos patógenos respiratórios.....	29
3.2.6	Alterações não imunológicas	30
3.3	MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DAS INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS	31
3.3.1	Estudo anatomopatológico	31
3.3.2	Métodos laboratoriais.....	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	BANCOS DE DADOS.....	39
4.1.1	Descrição do Banco de Necrópsias Pediátricas (BNP/SAP – HC/UFPR	39
4.1.2	Descrição do Banco de Dados para Infecções Respiratórias Graves (BIRG/SAP - HC/UFPR, n=761, ano 1960-2000	44
4.2	CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E PESQUISA DA SAZONALIDADE DOS CASOS DO BIRG/SAP	44
4.2.1	Classificação histopatológica dos casos	44
4.2.2	Pesquisa da sazonalidade dos casos	45
4.3	SELEÇÃO DO MATERIAL PARA IMUNOHISTOQUÍMICA	46
4.3.1	Seleção das Lâminas	46
4.3.2	Seleção dos blocos histológicos.....	46
4.4	REALIZAÇÃO DE PROVAS IMUNOHISTOQUÍMICAS	47
4.4.1	Materiais utilizados	47
4.4.2	ETAPA 1- Padronização da técnica de imunoperoxidase para pesquisa de antígenos virais em material parafinado.....	48
4.4.3	ETAPA 2 - Prova do funcionamento do protocolo padronizado.....	49
4.4.4	ETAPA 3-Contra-prova do funcionamento do protocolo	50
4.4.5	Metodologia Estatística	58
4.4.6	Fluxograma do Método	59
5	RESULTADOS	60
5.1	EPIDEMIOLÓGICOS	60

5.1.1 Amostra estudada.....	60
5.1.2 Distribuição do sexo na amostra estudada.....	61
5.1.3 Distribuição da idade na amostra estudada.....	62
5.1.4 Doença de base e causa da morte.....	63
5.1.5 Sazonalidade dos óbitos da amostra estudada	64
5.1.6 Padrões histológicos da amostra estudada.....	66
5.2 MORFOLÓGICOS.....	67
5.2.1 Comparação dos padrões histopatológicos com características demográficas a sazonalidade.....	67
5.3. Resultados da imunohistoquímica	72
6 DISCUSSÃO.....	75
6.1 Discussão do material.....	75
6.2 Discussão do método.....	77
6.3 Discussão dos resultados	82
6.3.1 Prevalência de doenças respiratórias graves na população estudada.....	82
6.3.2 Características demográficas da população estudada.....	83
6.3.3 Fatores de risco ou das doenças de base.....	84
6.3.4 Causa da morte.....	86
6.3.5 Sazonalidade	86
6.3.6 Padrões histopatológicos	87
6.3.7 Padrões histopatológicos comparados com características demográficas e sazonalidade.....	89
6.3.8 Pesquisas de antígenos virais.....	90
6.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	92
7 CONCLUSÕES.....	93
8 REFERÊNCIAS.....	94

LISTA DE QUADROS, FIGURAS, TABELAS, FOTOGRAFIAS E GRÁFICOS.

QUADRO 1 - VÍRUS QUE ACOMETEM O TRATO RESPIRATÓRIO	26
QUADRO 2 - PRINCIPAIS CAUSAS DE COLORAÇÃO INESPECÍFICA EM IMUNOHISTOQUÍMICA	38
FIGURA 1 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO MÉTODO PADRONIZADO.....	49
FIGURA 2 – CRIAÇÃO DO BIRG/SAP A PARTIR DO BNP/SAP – HC/UFPR, ANO 1960-2000	60
TABELA 1 - DOENÇA DE BASE E CAUSA DA MORTE DA AMOSTRA ESTUDADA.....	63
TABELA 2 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA IMUNOHISTOQUÍMICA COM AS VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS	73
TABELA 3 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA IMUNOHISTOQUÍMICA COM OS PADRÕES HISTOPATOLÓGICOS.....	74
FOTO 1- PNEUMONITE INTERSTICIAL - PADRÃO OURO DE POSITIVIDADE – ÁREA COM INCLUSÕES VIRAIS - HE	51
FOTO 2- PNEUMONITE INTERSTICIAL – PADRÃO OURO DE POSITIVIDADE – EPITÉLIO BRÔNQUICO - CONTROLE NEGATIVO DA IMUNOPEROXIDASE.....	52
FOTO 3- PNEUMONITE INTERSTICIAL – PADRÃO OURO DE POSITIVIDADE – EPITÉLIO BRÔNQUICO – IMUNOPEROXIDASE	53
FOTO 4- PNEUMONITE INTERSTICIAL – PADRÃO OURO DE POSITIVIDADE – IMUNOFLORESCÊNCIA POSITIVA PARA ADENOVÍRUS	54

FOTO 5- BRONCOPNEUMONIA - CASO ESTUDADO – CONTRA-PROVA DO PROTOCOLO - HE	55
FOTO 6- BRONCOPNEUMONIA - CASO ESTUDADO – CONTRA-PROVA DO PROTOCOLO – CONTROLO NEGATIVO DA IMUNOPEROXIDASE.....	56
FOTO 7- BRONCOPNEUMONIA - CASO ESTUDADO – CONTRA-PROVA DO PROTOCOLO –IMUNOPEROXIDASE	57
GRÁFICO 1 – DISTRIBUIÇÃO DO SEXO NA AMOSTRA ESTUDADA.....	61
GRÁFICO 2 – DISTRIBUIÇÃO DA IDADE NA AMOSTRA ESTUDADA.....	62
GRÁFICO 3 – SAZONALIDADE DOS ÓBITOS DA AMOSTRA ESTUDADA.....	64
GRÁFICO 4 – SAZONALIDADE DOS ÓBITOS DA AMOSTRA ESTUDADA – EM DÉCADAS	65
GRÁFICO 5 – DISTRIBUIÇÃO DOS PADRÕES HISTOLÓGICOS NA AMOSTRA ESTUDADA.....	66
GRÁFICO 6 – COMPARAÇÃO ENTRE OS PADRÕES HISTOLÓGICOS E O SEXO	67
GRÁFICO 7 – COMPARAÇÃO ENTRE OS PADRÕES HISTOLÓGICOS E A IDADE	68
GRÁFICO 8 – COMPARAÇÃO ENTRE OS PADRÕES HISTOLÓGICOS E A DOENÇA DE BASE	69
GRÁFICO 9 – COMPARAÇÃO ENTRE OS PADRÕES HISTOLÓGICOS E A CAUSA DA MORTE	70
GRÁFICO 10 – PADRÕES HISTOLÓGICOS E SAZONALIDADE NA AMOSTRA ESTUDADA.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BIRG – Banco de Infecções Respiratórias Graves
- BNP – Banco de Necrópsias Pediátricas
- BPN - Broncopneumonia
- CMV - Citomegalovírus
- DAB – 3,3’- diaminobenzidina tetrahydrochloride
- DNA –Ácido desoxiribonucleico
- DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica
- EIA - Enzimaimunoensaio
- EUA – Estados Unidos da América
- GECA – Gastroenterite aguda
- HC – Hospital de Clínicas
- HiB – *Haemophilus influenzae* tipo B
- IF – Imunofluorescência
- IG – Idade gestacional
- IL - Interleucina
- IRA – Insuficiência respiratória aguda
- IRI – Infecção respiratória inferior
- IRS - Infecção respiratória superior
- MHC – Molécula de histocompatibilidade
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- PCR – Reação da polimerase em cadeia
- PPA – Punção pulmonar aspirativa
- RNA – Ácido ribonucleico
- RT-PCR – Reação da polimerase em cadeia por transcriptase reversa
- SAP – Serviço de Anatomia Patológica
- UFPR – Universidade Federal do Paraná
- UNICEF – Fundo das Nações Unidas para a Infância
- VSR – Vírus sincicial respiratório

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	102
ANEXO 2 – GRÁFICOS BNP/SAP – HC/UFPR (n= 6362, ANO 1960-2000)	103
ANEXO 3 – PLANILHA DE DADOS DO BIRG/SAP – HC/UFPR (n= 761, ANO 1960-2000).....	110
ANEXO 5 – PROTOCOLO DETALHADO IMUNOHISTOQUÍMICA PADRONIZADO	128
ANEXO 6 – BULAS DOS MATERIAIS UTILIZADOS NA IMUNOHISTOQUÍMICA	131
<i>EnVISION+ SYSTEM-HRP</i>	131
<i>RESPIRATORY PANEL 1 (VIRAL SCREENING AND IDENTIFICATION KIT)</i>	134

RESUMO

As infecções respiratórias agudas são responsáveis pelos altos índices de morbidade e mortalidade pediátricas em países em desenvolvimento. Os objetivos deste estudo foram: 1) estabelecer a prevalência das infecções respiratórias graves, comparando os dados encontrados com o Banco de Necrópsias Pediátricas do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná; 2) Estudar os dados epidemiológicos como sexo, idade, doença de base, causa da morte e sazonalidade, nesta população; 3) Estudar os padrões histopatológicos das pneumopatias desta população, classificando os achados em grupos anatomopatológicos distintos; 4) Pesquisar antígenos virais através da imunohistoquímica, estabelecendo a correlação entre a presença de vírus e o padrão histopatológico encontrado. Foram analisados 761 casos de necrópsias em crianças de 28 dias á 14 anos, do ano de 1960 a 2000, que compuseram o Banco de Infecções Respiratórias Graves (n= 761, ano 1960-2000). Dos casos avaliados, 77% apresentaram diagnóstico histopatológico de broncopneumonia, 15% de pneumonite intersticial e 6 % concomitância dos 2 padrões / padrões menos comuns. O sexo masculino foi o mais acometido nos 3 padrões estudados. Cinquenta e oito por cento das necrópsias ocorreram em crianças menores de um ano de idade, sendo que 89% da amostra total era de crianças menores de cinco anos de idade. As doenças de base mais frequentemente associadas aos quadros respiratórios foram gastroenterite aguda, desnutrição e malformações. As causas envolvidas diretamente na morte mais encontradas foram a sepsis associada ao padrão broncopneumonia e a insuficiência respiratória aguda associada ao padrão pneumonite intersticial. Não houve variação da sazonalidade dos óbitos quando avaliada globalmente nos 40 anos do estudo. Ao se analisar por décadas, nos anos 90, os óbitos foram significativamente mais freqüentes no 2° e 3° trimestres do ano. O padrão broncopneumonia foi o único que apresentou comportamento sazonal. Das necrópsias pediátricas avaliadas nas 4 décadas do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, a broncopneumonia foi o diagnóstico histopatológico mais encontrado, as crianças do sexo masculino e menores de 1 ano de idade as mais acometidas. A gastroenterite aguda e desnutrição as doenças de base mais associadas e sepsis e insuficiência respiratória aguda as causas da morte mais freqüentes. Presença de vírus foi comprovada em 43% do total testado, sendo que os resultados foram positivos em 35% das amostras testadas do padrão broncopneumonia e em 60% das pneumonites intersticiais testadas.

ABSTRACT

The acute respiratory infections are responsible for the high indices of children morbidity and mortality in developing countries. The objectives of this study had been: 1) To establish the prevalence of serious respiratory infections, comparing the data found with the Bank of Children Autopsies of the Service of Pathological Anatomy of the Hospital of Clinics of the Federal University of the Paraná; 2) Study the epidemiological data as sex, age, illness of base, cause of the death and seasons, in this population; 3) Study the histopathology standards of the lung disease of this population, classifying the findings in anatomic pathology different groups; 4) To search antigens you capsized through the immunohistochemical, establishing the correlation between the presence of virus and the found histopathology standard. Had been analyzed 761 cases of autopsies in children of 28 days to 14 years old, of the year of 1960 to the 2000, that they had composed the Bank of Serious Respiratory Infections (n=761, year 1960-2000). Of the evaluated cases, 77% had presented histopathology diagnosis of bronchopneumonia, 15% of interstitial pneumonitis and 6 % concurrence of the 2 standards/less common standards. The male sex was most often in the 3 studied standards. Fifty and eight percent of the autopsies had occurred in lesser children of 1 year of age, being that 89% of the total sample age of lesser children of 5 years of age. The base illnesses associates to the respiratory disease had more frequently been acute enteritis, malnutrition and malformations. The causes directly involved in the death more found had been the sepsis associated to the standard bronchopneumonia and the acute respiratory insufficiency associate to the standard interstitial pneumonitis. It did not have variation of the seasons of the deaths when evaluated globally in the 40 years of the study. To if analyzing per decades, in 90th, the deaths had been significantly more frequent in the 2nd e 3rd trimesters of the year. The standard bronchopneumonia was the only one that it presented seasonal behavior. Of the evaluated children autopsies in the 4 decades of the Service of Pathological Anatomy of the Hospital of Clinics of the Federal University of the Paraná, the bronchopneumonia was most found histopathology standard, children of the male sex and until 1 year of age most frequent. Acute enteritis and malnutrition the base illnesses more associates and sepsis and acute respiratory insufficiency the causes of the death most frequent. Presence of virus was proven in 43% of the tested samples, being that the results had been positive in 35% of the tested samples of the standard bronchopneumonia and in 60% of the tested interstitial pneumonitis.