

Elaine Regina Baptista Caccia

Investigação da infecção pelo Bocavirus Humano
em pacientes de diferentes grupos de risco

São Paulo

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Elaine Regina Baptista Caccia

Investigação da infecção pelo Bocavirus Humano em pacientes de diferentes grupos de risco

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dra. Nancy Junqueira Bellei

Co-orientador: Emerson Carraro

Financiamento: FAPESP 2008/50352-2 CNPq e CAPES

São Paulo

2010

Caccia, Elaine Regina Baptista

Investigação da infecção pelo Bocavirus Humano em pacientes de diferentes grupos de risco./ Elaine Regina Baptista Caccia - - São Paulo, 2010. xvii, 65f.

Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Infectologia.

Human bocavirus infection investigation among patients from different risk groups.

1. Bocavirus Humano (HBoV) 2.Gripe e resfriado 3. Viroses Respiratórias

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
INFECTOLOGIA

Chefe do Departamento: _____

Coordenador do Curso de Pós-graduação: _____

Elaine Regina Baptista Caccia

**INVESTIGAÇÃO DA INFECÇÃO PELO BOCAVIRUS HUMANO EM PACIENTES DE
DIFERENTES GRUPOS DE RISCO**

Presidente da banca:

Prof^a. Dra. **Profa. Dra. Nancy Cristina Junqueira Bellei**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Francisco Hernandes Granato

Instituição: UNIFESP

Assinatura: _____

Prof^a. Dra. Maria Cecília Araripi Sucupira

Instituição: UNIFESP

Assinatura: _____

Dr. Luis José Proença Modena

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Saber viver

*Não sei... Se a vida é curta
Ou longa demais pra nós,
Mas sei que nada do que vivemos
Tem sentido, se não tocamos o coração das pessoas.*

Muitas vezes basta ser:

*Colo que acolhe,
Braço que envolve,
Palavra que conforta,
Silêncio que respeita,
Alegria que contagia,
Lágrima que corre,
Olhar que acaricia,
Desejo que sacia,
Amor que promove.*

*E isso não é coisa de outro mundo,
É o que dá sentido à vida.
É o que faz com que ela
Não seja nem curta,
Nem longa demais,
Mas que seja intensa,
Verdadeira, pura... Enquanto durar*

Cora Coralina

Às minhas Famílias...

Caccia, Caccia Leal, Leal e a da Virologia

Os meus sinceros agradecimentos:

À Prof^ª. Dra. Nancy Bellei, pela oportunidade de aprendizado, pela criteriosa orientação, enorme paciência e por estar sempre disponível, sempre por perto.

Ao Prof. Dr. Celso Granato, pela oportunidade em aprender mais sobre o mundo da virologia, pelas conversas, conselhos e experiências sobre tudo que envolve a ciência.

Ao Prof. Dr. Emerson Carraro, por sempre acreditar em mim, pelas ótimas orientações e esclarecimentos e disposição em sempre ajudar, se não fosse ele, nada disso teria acontecido.

Ao Ari, ou Aripuanã, como gosta de ser chamado, pela ajuda de simplesmente tudo! Dos cálculos aos seqüenciamentos realizados nessa tese.

À mulherada do nosso laboratório, que agora somos muitas (Ellen, Diane, Jú, Lú, Tati, Elaine, Cláris, Thais, Andréia, Giovana, Bianca, Sandra, Janete) cada uma, com suas manias...Todas são muito especiais!

Aos Profs. e pessoal do Laboratório da Imunologia por compartilhar o espaço do laboratório, sempre com muita paciência.

Aos Profs. e pessoal do Laboratório da Retrovirologia por ceder espaço para realizarmos alguns experimentos, principalmente no início dos estudos e o no momento do seqüenciamento.

À todos os membros da banca examinadora, pela análise do “boneco” e pelas contribuições que enriqueceram muito esse trabalho.

Aos pacientes, fundamentais para a realização deste estudo.

Ao Dr. Eurico Arruda pela contribuição do controle positivo do vírus.

Este estudo foi suportado pelo Estado de São Paulo Fundação de Apoio a pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP 2008/50352-2) e pelo Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e Capes.

Sumário

Dedicatória	III
Agradecimentos	IV
Apoio Financeiro	V
Sumário	VI
Listas	VIII
Resumo	XII
Abstract	XIII
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Espectro Clínico	10
1.2. Infecções respiratórias	11
1.3. Co-infecções	12
1.4. Diagnóstico Laboratorial	12
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS	16
3.1. Gerais	16
3.2. Específicos	16
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	17
4.1. Locais de realização do estudo	18
4.2. Critério de Inclusão	18
4.3. Seleção das amostras clínicas coletadas	18
4.4. Detecção de outros vírus respiratórios	20
4.5. Extração de ácido nucléico das amostras	21
4.6. Padronização da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	22
4.6.1. Gradiente de temperatura	22
4.6.2. Gradiente de Concentração de Cloreto de Magnésio	23
4.7. Visualização dos produtos amplificados	23
4.8. Seqüenciamento de nucleotídeo	23

4.9. Análise dos resultados	24
5. RESULTADOS	25
5.1. Características gerais dos pacientes analisados	25
5.2. Avaliação da sensibilidade da PCR para detecção de HBoV	29
5.3. Detecção de HBoV na população estudada	26
5.3.1. Ocorrência de amostras positivas de 2001 – 2008	29
5.3.1.1. Co-infecção	29
5.3.1.2. Seqüenciamento de nucleotídeos	31
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÕES	42
8. REFERÊNCIAS	43
9. ANEXOS	55

Lista de ilustrações

Figura 1 - Mapa genômico do HBoV.

Figura 2 - Representação geográfica dos estudos epidemiológicos em crianças e adultos, no Brasil, associado a representação gráfica da detecção do HBoV.

Figura 3 – Representação geográfica dos estudos epidemiológicos em crianças e adultos no mundo, associado a representação gráfica da detecção do HBoV.

Figura 4 – Delineamento utilizado no estudo.

Figura 5 – Detecção das diluições do cDNA clonado de HBoV em gel de agarose.

Lista de tabelas

Tabela 1. Detalhamento dos estudos conduzidos no Brasil da figura 2.

Tabela 2. Características gerais dos 534 pacientes estudados.

Tabela 3. Todas as populações.

Tabela 4. Sintomas de todos os 534 participantes.

Tabela 5. Dados demográficos e clínicos de pacientes infectados pelo HBoV.

Anexos

- 8.1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – UNIFESP.
- 8.2. Termo de Consentimento Livre Esclarecido de pacientes pediátricos com Cardiopatia Congênita e sem fatores de risco.
- 8.3. Termo de Consentimento Livre Esclarecido de pacientes adultos e Profissionais de Saúde.
- 8.4. Termo de Consentimento Livre Esclarecido de pacientes adultos Transplantados Renais.
- 8.5. Questionário para dados demográficos e dados clínicos dos envolvidos na pesquisa das crianças do Pronto Atendimento e crianças da creche.
- 8.6. Questionário para dados demográficos e dados clínicos dos envolvidos na pesquisa das crianças da Cardiopatia Congênita.
- 8.7. Questionário para dados demográficos e dados clínicos dos envolvidos na pesquisa dos Profissionais de Saúde.
- 8.8. Questionário para dados demográficos e dados clínicos dos envolvidos na pesquisa dos pacientes Transplantados de Medula Óssea.
- 8.9. Questionário para dados demográficos e dados clínicos dos envolvidos na pesquisa dos adultos do Pronto Atendimento e Transplantados Renais.
- 9.0. Co-morbidades mencionadas espontaneamente pelos participantes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Lista de abreviaturas e siglas

- BPV** – Parvovírus bovino
CDC – Centro de Controle de Doenças
CnMV – Vírus Canino pequeno
DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica
FLU – Vírus *Influenza*
FLU A – Vírus *Influenza A*
FLU B – Vírus *Influenza B*
HAdV – Adenovírus
HBoV – Bocavirus humano
HSP – Hospital São Paulo
HMPV - Metapneumovirus Humano
HPIV – Vírus parainfluenza
HRSV – Vírus sincicial respiratório Humano
HRV – Rinovírus humano
ITRS – Infecção do trato respiratório Superior
Kb – Kilobases
NASF – Núcleo de assistência ao funcionário
Pb – Pares de base
PM – Peso molecular
TMO – Transplantado de medula óssea

Resumo

O Bocavírus Humano (HBoV) é um parvovírus recentemente descoberto em isolados de secreções respiratórias humanas. Pesquisado em todo o mundo, sua detecção é muito variável de 1,3% a 19%. Há poucos estudos no Hemisfério Sul, particularmente no Brasil, sendo que a maioria relata maior incidência em crianças. Assim, investigamos crianças e adultos com infecção respiratória aguda e diferentes grupos de risco para doenças respiratórias em amostras de swabs, lavados e aspirados nasofaríngeos coletados de pacientes com sintomas de infecção aguda do trato respiratório. Quinhentos e trinta e quatro amostras provenientes de sete diferentes grupos de risco, entre 2001 e 2008 foram investigadas para presença de DNA HBoV através da amostra de PCR de acordo com o protocolo de Allander, et al. 2005. Em geral, 3% das crianças (8/264) e 0,4% dos adultos (1/270) foram positivos: 2,4% (3/127) das crianças da creche 4,8% (5/103) das crianças com cardiopatia congênita, 0,9% adultos transplantados de medula óssea (1/112), mas nenhum dos profissionais de saúde (83), adultos transplantados renais (31) e pacientes do pronto atendimento (44 adultos e 34 crianças). Três crianças da cardiopatia congênita apresentaram infecção leve, e 4 dos 7 pacientes co-infectados com Rinovírus apresentaram dispnéia e chiado. Os sintomas mais comumente observados foram coriza, tosse, febre que foram observados geralmente em mais de 50% dos casos positivos para HBoV. Estes dados sugerem que a infecção por HBoV em adultos mesmo em imunodeprimidos não é relevante e a elevada taxa de co-infecção observada em crianças aponta a necessidade de melhor avaliação do papel do HBoV na patogênese entre pacientes co-infectados.

Abstract

The Human Bocavirus (HBoV) is a recently discovered parvovirus isolate from human respiratory secretions. Published reports pointed to detection rates from 1.3% to 19%. Limited data is available from Southern hemisphere circulation and, particularly in Brazil, there are some reports with a high incidence in children. We investigated samples from children and adults and other risk groups for respiratory diseases with acute respiratory infection. Five hundred thirty four samples collected from seven different risk groups between 2001 and 2008 were investigated for DNA HBoV by in house PCR adapted from Allander (2005). In general, 3% of children (8/264) and 0.4% of adults (1/270) were HBoV positive: 2.4% (3/127) of children from day care, 4.8% (5/103) of children with congenital heart disease, 0.9% of adult bone marrow transplant (1/112), but none of the health care workers (83), adult renal transplantation patients (31) and community patients in the emergency department (44 adults and 34 children). Commonly observed symptoms were runny nose, cough and fever which were usually observed in more than 50% of cases positive for HBoV. The three children with heart disease had mild infection but four co-infected patients with Rhinovirus had dyspnea and wheezing. These data suggest that HBoV infection among adults, including immunocompromised patients is not relevant. Children co-infection is highly observed and this fact highlights the need for better assessment of the HBoV role in the pathogenesis of symptomatic patients.

1. Introdução

As infecções do trato respiratório superior (ITRS) de etiologia viral estão entre as infecções mais comuns em crianças e adultos, ocorrendo cerca de 3–8 vezes por ano em lactentes e crianças. Estudos realizados nos Estados Unidos relatam ocorrência de 2-4 episódios de infecção respiratória em cada adulto ao ano. De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), dentre as 4 milhões de crianças nascidas nos Estados Unidos em 2003 estima-se que ocorreram de 12-13 milhões de episódios de ITRS entre crianças de 1 e 2 anos.⁽¹⁾

Os quadros de ITRS geralmente cursam como doença auto-limitada, mas podem resultar em complicações, como otite média aguda, bronquite pós-viral e pneumonia, ou até exacerbar condições pré-existentes, com a exacerbação da asma e da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC).⁽²⁾ Essas complicações ocorrem principalmente nas pessoas consideradas como grupos de risco: indivíduos menores de 5 anos e maiores de 60 anos, gestantes, pacientes cardiopatas e com doenças pulmonares crônicas, portadores de insuficiência renal, distúrbios metabólicos e hemoglobinopatias são mais susceptíveis, além do transplantado que pode perder o enxerto e/ou morrer.^(3,4)

Além do impacto clínico, já relatado, há importante perda econômica associada às doenças respiratórias virais. Em crianças, associam-se os custos dos exames radiológicos e laboratoriais em um serviço público de saúde, ou também sua ausência na escola, que prejudica o seu desenvolvimento educacional, e o absenteísmo no trabalho dos pais para cuidar da mesma.⁽⁵⁾ Durante a pandemia de Influenza H1N1 em

2009 um estudo realizado pelo CDC (2010) demonstrou taxa de absenteísmo entre escolares do Havaí em torno de 10% antes da confirmação do primeiro caso e se elevou para 35% durante as duas semanas após a notificação da doença.⁽¹⁾

Os sintomas clínicos da maioria das viroses respiratórias são muito semelhantes, tornando difícil sua investigação etiológica sem um método laboratorial eficiente. Atualmente, a investigação laboratorial de infecções respiratórias agudas com detecção viral identifica um agente etiológico em torno de 60% dos casos.⁽⁶⁻⁹⁾

Essa parcela de pacientes sintomáticos sem etiologia definida é o fator determinante para uma contínua procura por novos patógenos. Nesse sentido, pesquisadores da Suécia, através de técnicas modernas de biologia molecular, descreveram 7 (3,1%) casos de crianças hospitalizadas sem etiologia conhecida previamente com sequências de DNA semelhantes ao vírus que não infectavam a espécie humana e o denominaram Bocavírus Humano.⁽¹⁰⁾

O **Bocavírus humano** (HBoV) é um vírus da família Parvoviridae, subfamília Parvovirinae e gênero Bocavirus.⁽¹¹⁾ A família Parvoviridae é composta por duas subfamílias: a Densovirinae que possui vírus que infectam invertebrados e a Parvovirinae que infecta vertebrados. Esta última sub-família é dividida em 5 gêneros, denominados Parvovirus, Eritrovirus, Dependovirus, Amdovirus e Bocavirus.⁽¹¹⁾

O gênero Bocavírus é formado por vírus com genomas de aproximadamente 5 Kilobases (Kb), que possuem uma terceira região promotora em seu genoma. Esse gênero é composto por apenas três espécies, o vírus do Minuto Canino (CnMV), o Parvovírus Bovino (BPV) e o Bocavírus humano (HBoV), alvo desse estudo. O HBoV tem seu nome originário dos outros dois constituintes do mesmo gênero, o Parvovírus **bo**vino (BPV) e o vírus do minuto **ca**nino (CnMV).⁽¹¹⁾ Este último foi relatado pela primeira vez em 1967 em amostras de fezes de cães e inicialmente pensava-se não

causar infecção, conforme descrito por Binn¹ em 1970, citado por Harrison, 1992.⁽¹²⁾ O CnMV e o BPV provocam doenças no trato gastrointestinal e respiratório, além de serem responsáveis por problemas reprodutivos; afetam principalmente animais muito jovens, de 1 a 5 semanas de vida.⁽¹²⁾ Os sinais mais comuns são diarreia grave, vômitos, dispnéia, problemas embrionários no feto e aborto.⁽¹²⁾ Posteriormente, estudos revelaram que estes sintomas muitas vezes eram associados a co-infecção com outros vírus.⁽¹¹⁾ O Dependovirus, que é associado ao Adenovírus (HAdV) não é patogênico e por isso, pouco estudado e o Erythrovirus causa doença em humanos e tem suas características conhecidas. Recentemente descoberto, o Parvovírus humano 4, possui poucos estudos sobre ele.⁽¹²⁾

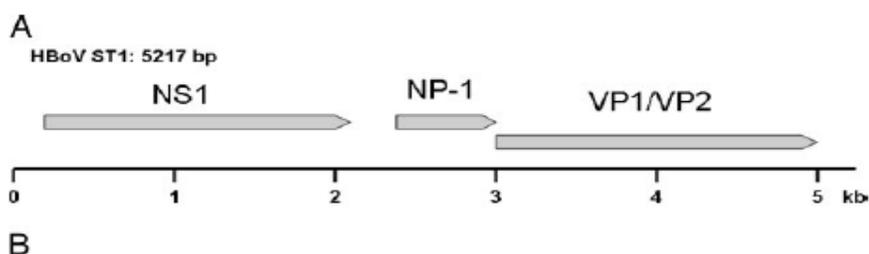
O HBoV é um vírus composto de fita simples de DNA, não envelopado, icosaédrico, podendo ser de polaridade negativa ou positiva. O genoma completo tem aproximadamente 5Kb, com seqüências palindrômicas e apresenta em suas extremidades estruturas que formam “*hairpins*”, relevantes para a replicação viral, pois possibilita à extremidade 3'-OH livre, necessária para a ligação da DNA polimerase celular, o início da replicação.⁽¹³⁾ Nesse momento o “*hairpin*” formado na extremidade direita é clivado por uma endonuclease viral, muito provavelmente NS1, o que fornece um novo sítio 3'-OH livre na fita filha para se iniciar uma nova fita, ocorrendo neste momento a reformação das estruturas em “*hairpin*” nessa extremidade do genoma. Com o avanço da DNA polimerase, a fita original se abre e se alonga, servindo novamente como molde para outra fita filha até que a enzima alcance a estrutura em “*hairpin*” da região 3'; Os produtos dessa clivagem serão o molde para reinício da replicação ou são encapsidados para a formação de novos vírus.⁽¹⁴⁾ Seu genoma

¹ Binn LN, Lazar EC, Eddy GA, et al.: 1970, Recovery and characterization of a minute virus of canines. Infect Immunity 1:503-508. apud Lenn R. Harrison, Eloise L. Styer, Alfred R. Pursell, Leland E.

possuem duas ORFs que codificam proteínas não-estruturais (NS1 e NP1), e uma ORF intermediária que codifica duas proteínas do capsídeo (VP1 e VP2), conforme visualizado na figura 1, ele funciona como iniciador da replicação viral.⁽¹⁰⁾

A região do genoma que possui maior similaridade entre os Bocavírus é a NP1, sugerindo ser uma região bem conservada, apesar do desconhecimento da sua função.⁽¹⁰⁾ Até o momento, dois genótipos foram descritos dentro da espécie Bocavírus Humano: Stockholm 1 (ST1) e Stockholm 2 (ST2)^(10,15), apesar de ainda não ser classificado com novas espécies pelo Comitê Internacional de Taxonomia e Classificação dos Vírus.

Figura 1. Mapa genômico do HBoV.⁽¹⁰⁾



Até o momento não há conhecimento de como as proteínas estruturais formam o capsídeo viral e a estrutura do HBoV. Apenas sabe-se que o capsídeo é composto por proteínas estruturais (VP1 e VP2) que formam um capsídeo icosaédrico com 18 a 26nm de diâmetro. A proteína VP1 possui peso molecular de 80.000 a 86.000Da, enquanto que VP2 possuem peso molecular de 60.000 a 75.000Da. Além das proteínas do capsídeo, o genoma de HBoV codifica duas proteínas não estruturais a NS1 e NP1 de 75.000 e 28.000Da, respectivamente, mas sem funções conhecidas para HBoV.⁽¹⁰⁾ Mas acredita-se que a NS1 seja importante para a replicação do vírus,

Carmichael, Jerome C. Nietfeld. Fatal disease in nursing puppies associated with minute virus of canine. J Vet Diagn Invest.1992;.4: 19-22

pois em outros Parvovírus ele está envolvido na ligação e hidrólise de nucleotídeo trifosfato e com atividade de helicase ⁽¹¹⁾ e a NP1 acredita-se que sua função seja na replicação viral e na montagem dos vírions.⁽¹⁰⁾ O ciclo replicativo do HBoV ainda é desconhecido, por isso faz-se uma comparação com outros vírus da mesma família: os Parvovírus se ligam a um ou mais receptores presentes na membrana da célula hospedeira e esta ligação pode ocorrer por diferentes receptores (dependendo do vírus).⁽¹⁰⁾

Todos os Parvovírus precisam alcançar o núcleo e esperar que a célula hospedeira entre em fase S do ciclo celular para duplicar seu DNA.⁽¹⁵⁾ Por isso, os membros dessa família se replicam mais eficientemente em células que possuam um alto “*turnover*” replicativo, como células dos epitélios digestivo e respiratório e células precursoras na medula óssea. Muitas proteínas envolvidas na replicação do DNA celular também participam na replicação do genoma viral.⁽¹⁵⁾ Quando o vírus chega ao núcleo, o genoma viral, constituído de DNA de fita simples é liberado.⁽¹⁵⁻¹⁶⁾

Em todo o mundo, os estudos realizados apontam para taxas de detecção do HBoV bem variáveis, como mostra figura 2, como extremos temos o trabalho de Miron et al., que detectou 0,6% de HBoV e a maior positividade foi descrita por Allander et.al., que descreveu esse vírus em 19% sendo ambos estudos realizados em crianças com infecção respiratória aguda.^(17,18) Os sintomas relacionados são os de uma gripe comum, podendo evoluir para pneumonia e até óbito.^(19, 20)

A maioria dos estudos que investigaram esse vírus em imunossuprimidos pesquisou em pacientes hospitalizados.^(21,22) Um estudo com crianças com leucemia apresentando febre e chiado detectou durante seis meses episódios recorrentes de febre associados à presença do HBoV, sugerindo reativação do vírus.⁽²³⁾

As crianças hospitalizadas com infecção no trato respiratório inferior são as que apresentam as maiores taxas de detecção do HBoV (acima de 14%).^(17,24-28) Por outro lado, estudo com crianças da comunidade, revelou menor freqüência quando comparada com crianças hospitalizadas.⁽²⁹⁾

Os poucos estudos que investigam o vírus na população adulta têm demonstrado freqüência baixa, com exceção dos adultos que apresentam alguma comorbidade ou são hospitalizados e essa freqüência pode variar de 0,7%⁽³⁰⁾ a 1,4%.⁽³¹⁾

Um estudo realizado no Canadá, Logtin et al., detectou uma grande diferença de positividade comparando crianças hospitalizadas e adultos com bronquiolite ou pneumonia, nesse estudo as coletas foram realizadas no período de inverno, obtendo uma positividade de 13,8% e 0,8% respectivamente.⁽³²⁾

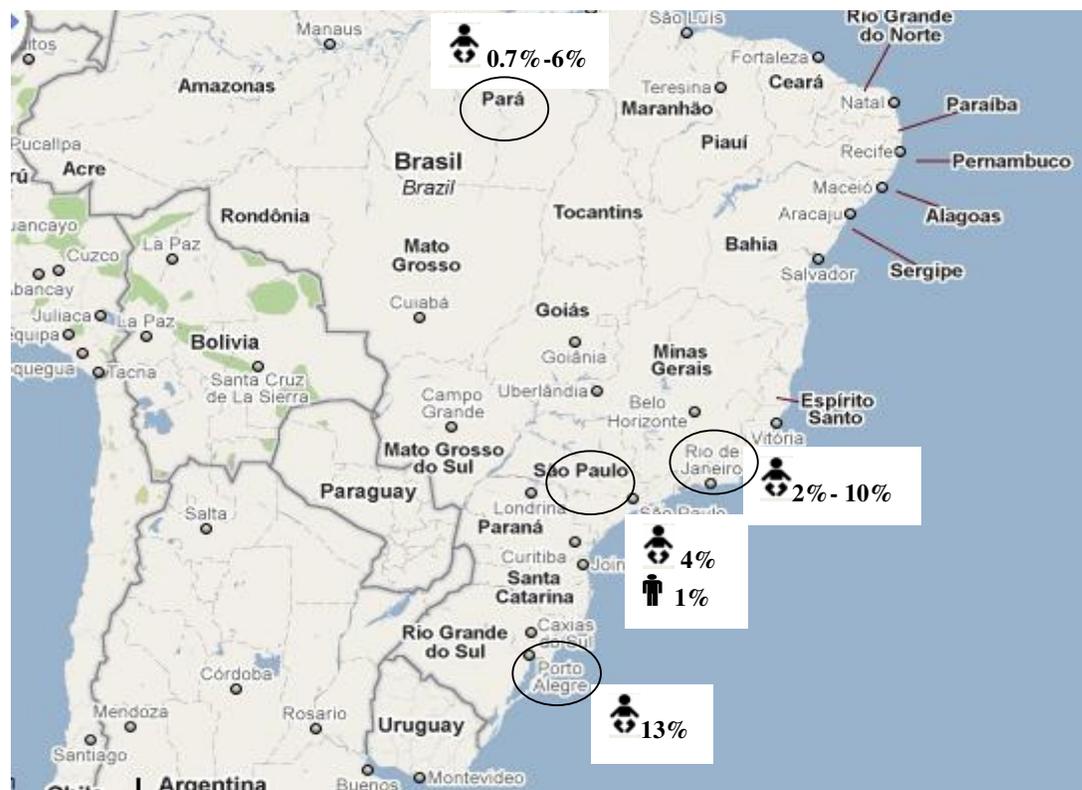
Figura 2. Representação geográfica de alguns estudos epidemiológicos em crianças e adultos no mundo, associado à representação gráfica da detecção do HBoV.



 coletas em crianças
  coletas em adultos

Como visualizado na figura 2, na América do Norte existem estudos com crianças com uma frequência de 1%.⁽³⁰⁾ a 13%.⁽³²⁾ de detecção do HBoV e em adultos sua frequência é menor de 1%.⁽³¹⁾ Na América do Sul a frequência do HBoV também variou de 0.7%.⁽³³⁾ à 13%.⁽³⁴⁾ entre estudos realizados com crianças e quando incluído adultos a detecção foi de 1%.⁽³⁵⁾ Na Europa, onde se realizam a maioria dos estudos, a frequência do HBoV variou de 1%.⁽¹⁸⁾ a 19%.⁽³⁶⁾ Nos países asiáticos existem muitos estudos com crianças, apresentando uma positividade de 2%.⁽³⁷⁾ até 13%.⁽³⁸⁾ No Continente Africano, um dos poucos estudos relatam a presença do vírus em 5% das crianças com chiado.⁽³⁹⁾ Na Austrália, um estudo coordenado por Sloots et al. detectaram 5% do HBoV em crianças hospitalizadas.⁽⁴⁰⁾

Figura 3. Representação geográfica dos estudos epidemiológicos em crianças e adultos no Brasil, associado à representação gráfica da detecção do HBoV.



 coletas em crianças  coletas em adultos

No Brasil alguns estudos realizados estão distribuídos no mapa da figura 3 e detalhados na tabela 1. Albuquerque et al. descreveu dois estudos de detecção de HBoV: um trata dos sintomas de infecção associado ao HBoV em vírus respiratórios causando principalmente febre, coriza, tosse, chiado e pneumonia com positividade de 9,2%.⁽⁴¹⁾ No outro estudo pesquisaram 705 amostras fecais de crianças com gastroenterite, onde o HBoV-DNA era presente em 2%, dentre eles haviam pacientes com co-infecção por Rotavírus, Adenovírus e Norovírus.⁽⁴²⁾ Dois estudos realizados em Belém do Pará, pesquisou o vírus em crianças, Souza et al. pesquisaram em crianças hospitalizadas e detectaram 6% do vírus e descreveu 2 casos de co-infecção tendo como principais sintomas: obstrução nasal, coriza, tosse, febre e dispnéia ⁽⁴³⁾ e em

estudo recente Silva et al. detectou 0.7% do patógeno em crianças menores de dois anos.⁽³³⁾ Em Ribeirão Preto, interior de São Paulo, um estudo com crianças menores de 5 anos de idade e hospitalizadas, obteve 10,5% de positividade através da técnica de PCR e, dentre elas, 81% apresentaram co-infecção.⁽²⁷⁾ e em outro estudo, Modena et al. procuraram o patógeno em 1338 amostras, sendo em sua maioria crianças menores de 5 anos, encontraram 4,8% do vírus e 1% em pacientes maiores de 5 anos foram positivos para HBoV.⁽³⁵⁾ Em recente trabalho brasileiro relatando Bocavírus, Pilger et al. encontraram 13,2% do vírus, através da técnica de PCR em Tempo Real, em crianças menores de dois anos e sua maior prevalência ocorreu em julho.⁽³⁴⁾

Tabela1. Detalhamento dos estudos em trato respiratório, conduzidos no Brasil, da figura 2.

Autor/ano	Local	População	Técnica	HBoV	coinfecção[◇]	Sintomas	Sazonalidade
Silva/2010	Belém	Crianças	PCR “in house”	0,76%	RSV	Tosse, coriza, tosse, obstrução nasal	Tempo com menos chuvas
Souza/2009	Salvador	Crianças Hospitalizadas	PCR “in house”	6,1%	RSV e enterovirus, HRV	Obstrução nasal, coriza, tosse, febre e dispnéia	Inverno
Albuquerque/2009	Rio de Janeiro	Crianças	PCR “in house”	9,2%	RSV, HMPV, HCoV-HRU1, HCoV-NL63, HCoV-OC43; HAdV, FluA, HRV	Febre, coriza, tosse, nariz tapado, chiado, bronquiolite e pneumonia	-
Gagliardi/ 2009	Ribeirão Preto	Crianças Hospitalizadas	PCR “in house”	10%	RSV, HMPV, HCoV, HAdV, HPIV, HRV	Chiado, asma, bronquiolite e pneumonia	Outono
Modena/2009	Ribeirão Preto	Crianças e adultos	PCR tempo Real	4,8%	RSV, HAdV, HRV, HMPV, HPIV, HCoV, Flu, Enterovirus	Tosse, febre dispnéia, coriza chiado, obstrução nasal, diarreia, espirro, asma, pneumonia, bronquiolite.	Exceto dezembro e janeiro
Pilger/2009	Porto Alegre	Crianças	PCR tempo Real	13,2%	hMPV, FluA, FluB PIV, RSV, HRV,	Chiado	Inverno

Rinovirus(HRV), adenovirus(HAdV), Vírus Sincial Respiratório (RSV), Vírus Influenza A (FluA), Vírus Influenza B (FluB), Vírus Parainfluenza(PIV), Metapneumovirus(hMPV), Coronavírus(HCoV).

1.1. Espectro Clínico

Após a descrição do HBoV como agente causador de doença respiratória e devido à similaridade com o vírus BPV que causa diarreia em bezerros, começou-se a procura por este agente em crianças com diarreia aguda. Vários estudos relatam a presença do HBoV em crianças com infecção no trato intestinal, além dos sintomas de infecção respiratória, causando comumente vômitos, dor abdominal e diarreia. ^(43,44-49) Outros estudos detectaram a presença do HBoV em pacientes com inflamação das adenóides e tonsilas. ^(41,50,51) Um estudo pesquisou o vírus em saliva de crianças com até 11 anos de idade sintomáticos e assintomáticos. ⁽⁵²⁾ Por último estudos relataram a presença do vírus também em meio ambiente, em água de rio ⁽⁵³⁾ e em amostra de esgoto selecionadas de 12 cidades dos Estados Unidos. ⁽⁵⁴⁾

Estudos de detecção de HBoV em pacientes previamente saudáveis tem sido descrito que os sintomas duram de 1 a 2 semanas ^(19,55), com excreção viral de até três semanas após a sua detecção inicial. ⁽⁵⁶⁾ Contudo vários estudos envolvendo pacientes imunossuprimidos descreveram detecção de HBoV por períodos superiores a 2 meses. ^(22,24,57) A implicação da excreção prolongada desse vírus reside na maior possibilidade de transmissão hospitalar, uma vez que esses pacientes passam por longos períodos de internação. A transmissão nosocomial pelo HBoV já foi descrita, os dois casos de infecção por vírus ocorreu em unidade de terapia intensiva neonatal. ⁽⁵⁸⁾

1.2 Infecções respiratórias

A maioria dos estudos realizados com HBoV relatam infecções no trato respiratório superior ^(58,59) e eventualmente em trato respiratório inferior. ^(18,60-63) Os sintomas relacionados à infecção em trato respiratório superior ocasionados pelo HBoV são principalmente coriza, tosse ^(18,36,42) e febre ^(59,64,65) com menor frequência a dor de garganta, cefaléia ⁽⁶⁶⁾ e otites. ^(67,68) Em infecção no trato respiratório inferior são

comumente relatados episódios de dispnéia, asma, cianose ^(28,69), bronquiolite ^(18,70,71), pneumonia ^(72,39) e chiado. ^(19,39)

1.3 Co-infecções

O desenvolvimento de infecções respiratórias principalmente em trato respiratório inferior predispõe o paciente à infecções secundárias e à outros patógenos.⁽⁷³⁾ Muitos estudos relatam, altas taxas de co-infecções, com RSV, PIV, hMPV, HCoV, variando de 18% a 90% de frequência.^(21,74) As crianças são as que, dentre os estudos apresentam as maiores taxas de co-infecções com o HBoV, acima de 66%.^(29,30,59,74)

Na Coréia, foram registrados os dois maiores índices de co-infecção com outros patógenos, onde 83% dessas co-infecções eram pacientes com pneumonia e 90% em pacientes com sintomas no trato respiratório superior ⁽⁵⁹⁾, apresentando associação do HBoV com Vírus Sincial Respiratório e Parainfluenza Vírus. Além disso, muitos estudos alertam que, dentre as co-infecções virais relatadas, o HBoV é um dos patógenos mais freqüentes.^(75,76)

1.4. Diagnóstico Laboratorial

Desde que o HBoV foi descrito inicialmente por métodos de detecção de genes, a grande maioria dos estudos utilizam a mesma técnica para diagnosticar o HBoV em seus pacientes. A técnica amplamente empregada para tal finalidade envolve a amplificação específica de genes virais pela reação em cadeia da polimerase. Os genes NP1 e NS1 do HBoV são os principais alvos dessa amplificação, utilizados principalmente devido a serem consideradas regiões genéticas mais conservadas entre os HBoV.

Dentre as variações técnicas possíveis tem se empregado a PCR convencional como reação *in house* ^(77,28) e, mais recentemente, a PCR em tempo real. ^(72,78)

Para investigação de quadro de Infecção no trato respiratório, as amostras coletadas em pacientes envolvem *swab* ^(42,65), lavado ⁽⁷⁹⁾ e/ou aspirado nasofaríngeo. ^(35,80)

Variações no tipo de amostras também são encontradas em alguns estudos como: saliva ⁽⁵¹⁾, fezes, sangue ⁽⁷⁹⁾, amostras de tecidos, tonsillas e adenóides. ^(50,51,40)

Menos frequentemente, alguns estudos utilizaram outras metodologias diagnósticas para detecção de anticorpos em estudos soro-epidemiológico para identificar infecção aguda causada pelo vírus ⁽⁸¹⁾, ou para verificar antecedente epidemiológico em determinada população. ⁽⁸²⁾

2. Justificativa

Estudos epidemiológicos são muito importantes, sejam eles globais ou regionais. Recentemente os vírus de síndromes gripais demonstraram sua relevância com a descoberta do novo vírus Influenza H1N1 que acometeu um grande número de pessoas. As informações obtidas por meio das investigações são úteis para a saúde pública, na profilaxia e no desenvolvimento de vacinas. Pouco se sabe sobre a biologia do HBoV, incluindo sua variabilidade, vias de transmissão, sítios replicativos e mecanismos de patogenicidade, pois é um vírus recentemente descrito e por isso toda e qualquer informação sobre ele é muito relevante para seu entendimento e diagnóstico. Além disso, a pesquisa em diferentes grupos para se detectar o HBoV é um avanço para esclarecer a etiologia do vírus em diferentes pacientes, cada um com diferentes perfis de imunodepressão ou presença de co-morbidades, são dados inéditos na literatura.

Este estudo permitiu também contribuir para a elucidação de um padrão de ocorrência deste vírus na cidade de São Paulo, até então inexistente na maioria das populações avaliadas, além de demonstrar quais as características clínicas são mais freqüentes observadas nos pacientes com testes positivos. A ocorrência de HBoV entre adultos e crianças na população brasileira tem sido pouco investigada. No Brasil, apenas cinco estudos descreveram ocorrência de HBoV investigando casos de gastroenterites e sintomas respiratórios em crianças.^(27,33-35,40-43)

Em adultos além da ocorrência do vírus aparentemente ser menor, as populações de pacientes imunossuprimidos tem sido pouco estudado. A inclusão de

mais de uma população de transplantados (medula óssea e rim), possibilita um aprofundamento do entendimento do papel desse vírus em pacientes com comprometimento imunológico.

A expansão no diagnóstico das síndromes respiratórias no Laboratório de Virologia da Universidade Federal de São Paulo está inserida em linhas de pesquisa em vírus, na investigação de aspectos epidemiológicos, clínicos e de diagnósticos da infecção por estes agentes em diferentes populações, incluindo imunocompetentes e imunodeprimidos, viabilizando a assistência médica destes pacientes.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

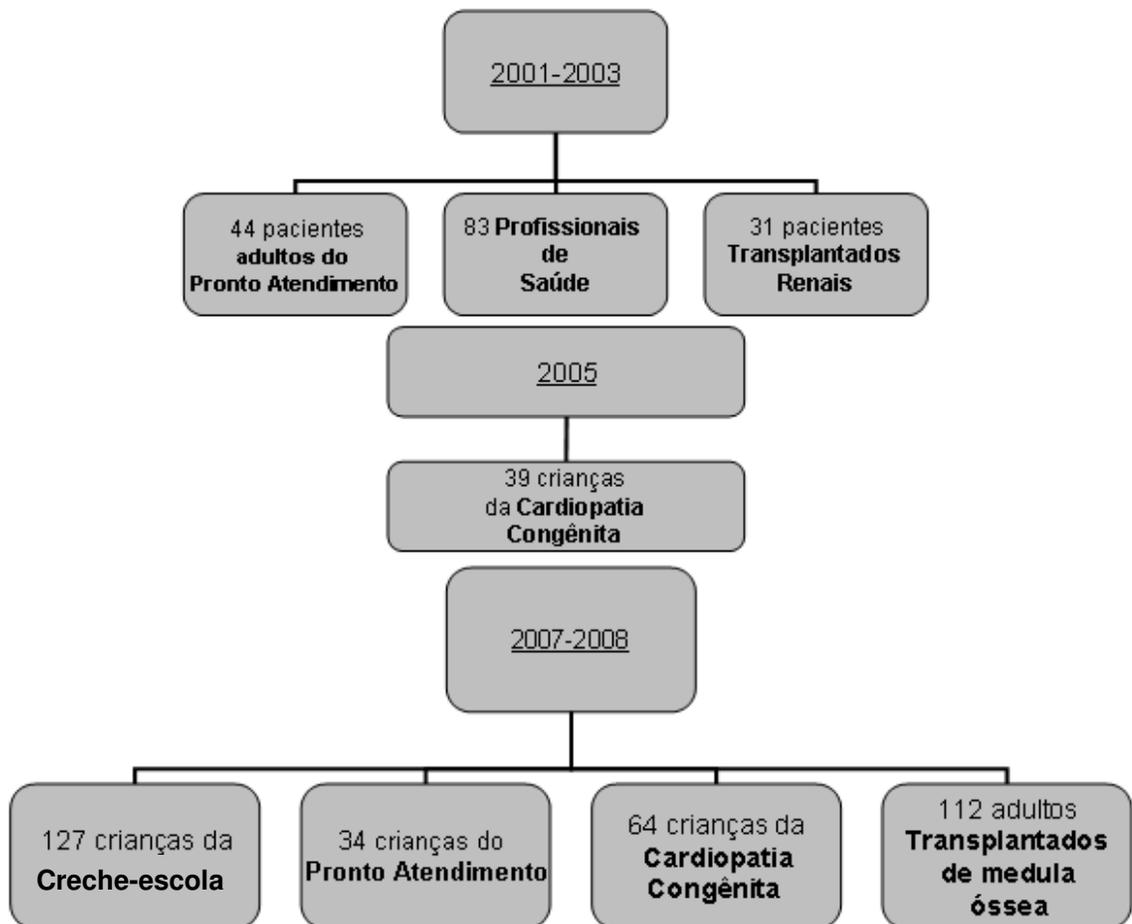
O objetivo desse estudo foi investigar a ocorrência do Bocavírus humano em amostras de pacientes com infecção respiratória aguda de diferentes grupos de risco no período de 2001-2008.

3.2. Objetivos Específicos

- Investigar a freqüência em diferentes faixas etárias em pacientes ambulatoriais e internados;
- Determinar a freqüência do HBoV em adultos de diferentes grupos de risco e imunodeprimidos;
- Avaliar a freqüência do vírus em crianças de creche, do Pronto Atendimento e em Cardiopatas;
- Avaliar a freqüência e aspectos sazonais de HBoV em pacientes durante os anos de 2001 a 2008 no Hospital São Paulo.

4. Casuística e Métodos

Figura 4. Delineamento do estudo



4.1.1. Locais de realização do estudo

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia da Disciplina de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Os outros locais envolvidos no estudo foram: Hospital São Paulo, Núcleo de Assistência ao Funcionário (NASF) e Ambulatório de Transplante Renal (unidade associada ao Hospital do Rim e Hipertensão). Crianças da creche-escola, filhos dos funcionários do HSP.

4.2. Critério de Inclusão

O paciente com infecção respiratória aguda de provável etiologia viral, definida como até 7 dias entre o início dos sintomas e o momento da coleta.

4.3. Seleção das amostras clínicas coletadas

Para o presente estudo foram incluídas 534 amostras clínicas de 7 diferentes grupos de risco, como demonstra na figura 4, avaliados entre 2001 e 2008, coletadas de 264 crianças e 270 adultos, com idade variando de 22 dias a 83 anos (mediana de 21 anos) de idade. Após coletadas, as amostras foram enviadas imediatamente ao Laboratório de Virologia Clínica da Universidade Federal de São Paulo para rotina de investigação de vírus respiratório.

As amostras foram provenientes de 7 grupos distintos:

- Pronto Atendimento

Neste grupo foram incluídos pacientes de todas as idades atendidos na triagem do Pronto-Atendimento do Hospital São Paulo. A coleta foi realizada durante 3 dias por

semana e se concentrou nos meses de Junho a Setembro (meses mais frios) de 2001 a 2003 adultos e de Junho a Novembro 2008 crianças.

- Creche e escola

Neste grupo foram incluídos crianças, filhos de funcionários do Hospital São Paulo. A coleta foi realizada durante 3 dias por semana no período de fevereiro de 2008 à dezembro 2008.

- Ambulatório de Cardiopatia Congênita

Neste grupo foram incluídos pacientes do ambulatório de Cardiopatia Congênita da Disciplina da Cardiologia que possui atendimento de urgência e de rotina aos pacientes. As amostras foram coletadas em dois períodos distintos, fevereiro à setembro de 2005 e fevereiro à dezembro 2008.

- Transplantados Renais – (Tx Renal)

Neste grupo foram incluídos pacientes do ambulatório de Transplante Renal, que possui atendimento de urgência e de rotina aos pacientes, as amostras foram coletadas nos períodos de julho à setembro de 2002 e maio à setembro de 2003.

- Profissionais de Saúde – (NASF)

Neste grupo foram incluídos os funcionários do complexo UNIFESP – Hospital São Paulo diretamente envolvido na assistência aos pacientes, além de pessoas envolvidas nos setores administrativos, da manutenção, pesquisadores e docentes. As amostras foram coletadas a partir de junho de 2001, no Núcleo de Assistência à Saúde do Funcionário.

- Transplantados de Medula Óssea – (TMO)

Neste grupo foram incluídos pacientes do serviço de transplante de medula óssea do Departamento de Hematologia do Hospital São Paulo que possui

atendimento de urgência e de rotina aos pacientes. As amostras foram coletadas no período de março a dezembro de 2008.

O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UNIFESP de acordo com o Processo UNIFESP-HSP 0471/08 e os pacientes assinaram termo de livre consentimento e esclarecimento (anexo 8.2 a 8.4), após receberem informações sobre o estudo.

No momento da coleta foi aplicado um questionário para obtenção de dados epidemiológicos e clínicos considerados relevantes para o estudo (anexo 8.5 a 8.9). Em relação ao quadro clínico, foram investigados: o tempo de início do quadro respiratório; a presença de febre, sintomas respiratórios e gerais, diarreia e a presença de co-morbidades como cardiopatias, pneumopatias, hipertensão arterial e diabetes. Também foi investigada a imunização prévia para o vírus *Influenza*, presença de exames radiológicos e terapia medicamentosa, número de irmãos e ocupações dos pais.

Quanto aos possíveis fatores de risco para a infecção, foram investigados o contato com crianças menores de 5 anos nas 7 populações e, na população de profissionais da saúde, também foi avaliado o contato com pacientes, definido como qualquer procedimento direto que possibilitasse a transmissão de infecções respiratórias.

No momento do questionário, alguns participantes, ou responsáveis pelos participantes mencionavam espontaneamente co-morbidades que não estavam incluídas nas perguntas do questionário aplicado (anexo 9).

4.4. Detecção de outros vírus respiratórios

Para cada paciente incluído no estudo foi coletada uma amostra de swab, lavado ou aspirado nasal e enviada imediatamente ao Laboratório de Virologia Clínica da UNIFESP.

Todas as amostras foram incluídas retrospectivamente para a detecção de Influenza A e B (Flu A e B), parainfluenza tipos 1-3 (PIV1-3), adenovírus (HAdV) e Vírus Sincicial Respiratório (RSV) pela técnica de imunofluorescência direta, conforme descrito previamente.⁽⁸³⁾

Das amostras coletadas de adultos recrutados do período de 2001-2003 foram selecionadas somente aquelas com resultado negativo para Flu A e B, PIV1-3, HAdV, RSV, Metapneumovírus (hMPV), Rinovírus (HRV), Enterovírus, 229E e OC43 e, detectados conforme descrito anteriormente.⁽⁸⁴⁾

A partir de 2005, todas as amostras foram testadas para HBoV, inclusive as previamente positivas para Flu A e B, PIV 1-3, HAdV e RSV. Posteriormente, todas as amostras positivas para HBoV (2001-2008) foram também avaliadas quanto à co-infecção com Rinovírus humano e Metapneumovírus, segundo metodologias descritas anteriormente.⁽⁸⁴⁾

4.5. Extração de ácido nucléico das amostras

O DNA foi extraído diretamente de uma alíquota de cada amostra separada anteriormente para a PCR utilizando o “Kit QIAmp DNA Blood Mini Kit” (Quiagen®, E.U.A.) seguindo as recomendações do fabricante e, após a extração, o material foi estocado em freezer -80°C.

4.6. Padronização da reação de PCR

A reação de amplificação dos genes de HBoV foi realizada utilizando os *primers* 188F (5`- GAG CTC TGT AAG TAC TAT TAC -3`) e 542R (5`- CTC TGT GTT GAC TGA ATA CAG -3`) de acordo com o protocolo do autor.⁽¹⁰⁾ Para sua otimização foram realizadas sucessivas etapas de detecção a partir de diluições seriadas do cDNA clonado em plasmídeo pCRII-TOPOXL (Invitrogen[®], EUA), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

As amostras foram submetidas à amplificação da região conservada no gene que codifica a nucleoproteína 1 (NP1, nucleotídeos 2281-2634). Para a reação de PCR foram utilizados os *primers*: 542R e 188F, em volume final de 50µL, contendo 5µL de tampão 10X para o PCR, utilizando o Kit “Gotaq Green Master Mix” (Promega[®], EUA), seguindo as recomendações do fabricante. As condições de ciclagem para essa reação foram: 5 min. a 94°C, seguido de 40 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 54°C e 1 min. a 72°C, com extensão final de 72°C por 5 min. Em todas as reações foi utilizado um controle negativo composto de água Milli-Q auto-clavada substituindo o ácido nucléico e um controle positivo HBoV já descrito.

4.6.1 Gradiente de temperatura

Foi realizado um ensaio de gradiente de temperatura com o objetivo de encontrar a melhor temperatura de anelamento dos *primers*. Esse ensaio foi realizado no aparelho de termociclador “Mastercycler” (Eppendorf[®], Alemanha) de PCR gradiente, variando a temperatura entre 53 °C e 59,4 °C, e encontrou-se a temperatura ideal de 54°C para anelamento dos *primers*.

4.6.2. Gradiente de Concentração de Cloreto de Magnésio

Foi realizado um ensaio para determinar a concentração ótima de Cloreto de Magnésio, as concentrações variaram de 2,0mM até 4,5mM. A melhor concentração desse reagente foi 3,5mM.

4.7. Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese de reação em gel de agarose 1,5% (Sigma Aldrich[®], EUA) preparada em tampão 1x TBE (Tampão Tris-Borato-EDTA) e corado com Brometo de Etídio (Invitrogen[®], EUA). O tamanho esperado dos produtos amplificados para as amostras positivas de 354 pb foi comparado com padrão de 100 pares de bases (Invitrogen[®], EUA) e posteriormente fotografados sob transluminador ultra-violeta.

Todos os procedimentos que envolveram a amplificação de DNA foram submetidos a rígidos procedimentos para evitar contaminação, incluindo a realização de controles negativos redundantes e adição de DNA em salas diferentes da utilizada para a preparação das misturas das reações, em três ambientes separados fisicamente.

4.8. Seqüenciamento de nucleotídeo

Todas as amostras positivas tiveram seu produto de PCR purificados após corrida eletroforética através do kit “Charge Switch PCR Clean-up Kit” (GE Healthcare[®], Reino Unido). A seguir, as amostras foram submetidas à reação de seqüenciamento utilizando o mesmo par de *primers* das reações de detecção e o kit “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems[®], EUA). As reações de seqüenciamento foram realizadas conforme determinação do fabricante, utilizando os

“primers” (188F ou 542R), com temperatura de anelamento de 50°C (maiores detalhes contidos no item 3.6). A separação eletroforética e a obtenção dos eletroferogramas foram realizadas através de um seqüenciador automático de DNA (ABI Prism 3130XL DNA, Applied Biosystems[®], EUA).

As sequências obtidas das amostras foram analisadas pelo programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e submetidas para publicação no Genbank.

4.9. Análise dos resultados

A frequência de ocorrência do HBoV em diferentes grupos de risco, bem como as demais variáveis relacionadas à cada grupo foram avaliadas em software Excel versão 2007 do pacote de software Microsoft Office.

A análise realizada por método de Fisher (*Fisher's exact test*) entre as crianças do Pronto Atendimento e crianças da Cardiopatia Congênita não apresentou resultado significativo $P = 0.4721$. Entretanto, o grupo dos adultos e crianças, o resultado foi significativo com $P = 0.0375$.

.

5. Resultados

5.1. Características gerais dos pacientes analisados.

A tabela 2 apresenta as características gerais dos pacientes estudados. Durante o período de estudo, 534 amostras de *swabs*, lavado ou aspirado nasofaríngeo com Infecção no trato respiratório foram investigadas quanto à presença de HBoV.

De todas as amostras coletadas, 260 foram provenientes do gênero masculino e 274 do gênero feminino. A idade dos pacientes variou de 22 dias a 83 anos com média de idade de 21 anos e mediana de 13 anos, destes eram 21% transplantados de medula, 19% cardiopatas, 15% profissionais de saúde, 8% adultos do pronto atendimento e os grupos das crianças do Pronto Atendimento e dos adultos transplantados renais, ambos com 6% de participantes cada.

O tempo de início do quadro clínico no momento da coleta foi de 1 a 5 dias, porém a maioria das amostras (76%) foram coletadas com até 5 dias de sintomas e mediana de 3 dias. Oito pacientes apresentaram um período mais prolongado, de 10 a 60 dias de sintomas e em 26 (4,8%) dos questionários esta informação não foi registrada.

Tabela 2. Características gerais dos 534 pacientes estudados.

Características	Pacientes (%)	média	Mediana
Gênero			
♂	260 (48,6)	-	-
♀	274 (51,3)	-	-
nºsoma	534	-	-
Idade (anos)			
	22dias a 83 anos	21,7	13
Populações			
Crianças Pronto Atendimento	34 (6,3)	-	-
Crianças Creche	124 (23,7)	-	-
Cardiopatas	103 (19,2)	-	-
Adultos Pronto Atendimento	44 (8,2)	-	-
Transplantados renais	31 (5,8)	-	-
NASF	83 (15,5)	-	-
Transplantados de medula óssea	112 (20,9)	-	-
Tempo de sintomas (dias)			
	0 a 90	4,69	3
Menos de 5 dias *	389 (76,5)	-	-
Sintomas			
	N(%)		
Febre	259(48,5)	-	-
Tosse	424(79,4)	-	-
Coriza	360 (67,4)	-	-
Dor de garganta	112(41,4)	-	-
Cefaléia	159(42,6)	-	-
Mialgia	141(37,8)	-	-
Calafrio	79 (29,2)	-	-
Chiado	118(44,6)	-	-
Dispneia	130(34,5)	-	-
Cianose	21(7,9)	-	-
Risco			
	N(%)		
Prematuridade	23(8,71)	-	-
Tabagismo	35(22,1)	-	-
Contato com criança < 5anos	87(32,2)	-	-
Contato com sintomáticos	164(43,6)	-	-
Contato com pacientes	32(38,5)	-	-
Vacina	120(22,4)	-	-

Os sintomas de febre, tosse e coriza foram avaliados em todas as populações e obteve-se 48%, 79% e 67%, respectivamente.

Os sintomas de dor de garganta e calafrio foram avaliados nos grupos: adultos do pronto atendimento e transplantados renais, os profissionais de saúde e nos transplantados de medula óssea, totalizando 270 questionários cada.

O sintoma de cefaléia foi avaliado nos seguintes grupos: crianças da cardiopatia congênita, adultos do pronto atendimento e transplantados renais, os trabalhadores de saúde e nos transplantados de medula óssea, totalizando 373 questionários.

O sintoma de Mialgia foi avaliado nos seguintes grupos: crianças da cardiopatia congênita, adultos do pronto atendimento e transplantados renais, os trabalhadores de saúde e nos transplantados de medula óssea, totalizando 373 questionários.

Os sintomas de chiado e cianose foram avaliados nos grupos das crianças do pronto atendimento, da creche e da cardiopatia congênita, totalizando 264 questionários.

O sintoma de dispnéia foi avaliado nos grupos das crianças do pronto atendimento, da creche, da cardiopatia congênita e dos transplantados de medula óssea, totalizando 376 questionários.

O dado de tabagismo foi incluído na população dos adultos dos transplantados renais, do pronto atendimento e dos trabalhadores da saúde, onde 35(22%) dos participantes fumavam.

A informação de prematuridade foi avaliada nos grupos das crianças do pronto atendimento, da creche e da cardiopatia congênita, totalizando 264 questionários, obtendo a informação que 23(8%) das crianças nasceram prematuras.

Dentre as amostras coletadas foram totalizadas 7 grupos de riscos de origens diferentes e cada um com suas particularidades, conforme demonstradas na tabela 3.

Tabela 3. Todas as populações.

Populações	Crianças PA	Crianças Creche	Crianças cardiopatas	Adultos PA	Adultos renais	Tx Trabalhador de saúde	Tx medula
Nº pacientes	34	127	103	44	31	83	112
Tempo de sintomas (dias)∅	Variação 0 - 20 Media 4,69 Mediana 4	1 a 12 2,93 3	0 a 30 6,09 5	1 a 14 3,59 3	1 a 60 10,32 6	1 a 14 3,35 3	0 a 90 5,3 3
Até 5 dias	21 (72,4)	113 (92,6)	57 (60,4)	36 (81,8)	14(45,2)	75 (90,4)	73 (70)
TOTAL	29(100)	122(100)	96 (100)	44(100)	31(100)	83(100)	103(100)
Prematuridade	9(26,4)	8(6,2)	6(5,8)	-	-	-	-
Tabagismo	-	-	-	9(20,4)	4(12,9)	22(26,5)	-
Contato com sintomáticos	13(38,2)	56(44,0)	60(58,2)	-	-	-	35(31,25)
Contato com criança < 5 anos	-	-	-	16(36,3)	11(35,4)	32(38,5)	28(25)
Contato com pacientes* vacina§	-	-	-	-	-	32(38,5)	-
Ano	29(100)	43(100)	0	2(66,6)	3(5)	15(62,5)	28(100)

Legenda

- Pergunta não incluída no questionário

0 Resposta negativa incluída no questionário

§ Vacinados contra Vírus Influenza.

Tabela 4. Sintomas de todas as populações.

Populações	Crianças PA	Crianças Creche	Crianças cardiopatas	Adultos PA	Adultos renais	Tx Trabalhador de saúde	Tx medula
Clínica:							
Febre	13(38,2)	65(51,18)	34 (33)	34(77,2)	9 (29,0)	52(62,6)	52(46,4)
Tosse	28(82,3)	116(91,3)	91(88,3)	34(77,2)	24 (77,4)	61(73,4)	70(62,5)
Coriza	24(70,5)	114(89,7)	31(30,09)	31(70,4)	26 (83,8)	71(85,5)	63(56,2)
Garg	-	-	-	28(63,6)	12 (38,7)	56(67,4)	16(14,2)
Cefaléia	-	-	30 (29,12)	33 (75)	17 (54,8)	63(75,9)	16(14,2)
Mialgia	-	-	15 (14,56)	30(68,1)	15 (48,3)	68(81,9)	13(11,6)
Calafrio	-	-	-	23(52,2)	8 (25,0)	43(51,8)	5(4,4)
Chiado	29(85,2)	58(45,6)	31(30,0)	-	-	-	-
Dispneia	29(85,2)	43(33,8)	30 (29,1)	-	-	-	28(2)
Cianose	3(8,8)	3(2,3)	15 (14,5)	-	-	-	-
Diarréia	7(20,5)	11(8,6)	7(6,7)	-	-	-	2(1,7)

Legenda

- Pergunta não incluída no questionário

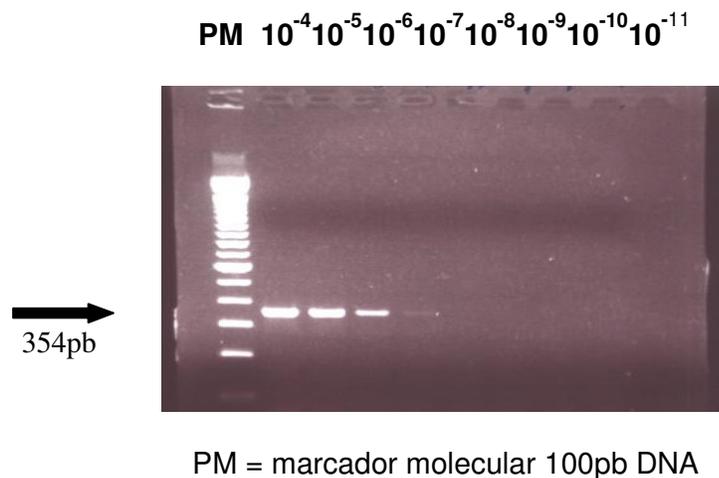
0 Resposta negativa incluída no questionário

§ Vacinados contra Vírus Influenza.

5.2. Avaliação da sensibilidade da PCR para detecção de HBoV

Após a padronização da PCR foi determinada sua sensibilidade pela capacidade de detecção de diluições do controle positivo, variando de 10^{-4} a 10^{-10} (Figura 5), onde é possível observar um limite de detecção de até 10^{-7} . Essa diluição do controle clonado corresponde ao limite de detecção de 400 cópias do plasmídeo/reacção.

Figura.5: Detecção das diluições do cDNA clonado de HBoV em gel de agarose



5.3. Detecção de HBoV na população estudada

Das 534 amostras de trato respiratório, nove foram positivas na detecção de DNA de HBoV (1,7%) no gel de agarose (Tabela 3). No geral, 3% das crianças (8/264) e 0,4% dos adultos (1/270) tinham infecção pelo HBoV: 2,4% (3/127) das crianças da Creche, 4,8% (5/103) das crianças da Cardiopatia Congênita e 0,9% dos pacientes adultos Transplantados de Medula Óssea (1/112). Nenhum caso positivo de HBoV foi encontrado entre os pacientes do Pronto Atendimento (44 adultos e 34 crianças), Profissionais de Saúde (83) ou pacientes adultos Transplantados Renais (31).

5.3.1. Ocorrência de amostras positivas de 2001 - 2008

Dos 9 pacientes positivos, 5(55%) eram do sexo masculino e 4(44%) sexo feminino, a idade variou de 7 meses a 22 anos. As amostras colhidas variaram de 1 dia a 7 dias de sintomas iniciais (mediana de 3 dias), onde todos os pacientes positivos (100%) tiveram amostras colhidas no prazo de 5 dias dos sintomas iniciais . Com 1 dia de sintomas foi colhida a amostras de apenas 1(11%) participante, a maioria, 3(33%) deles estavam no segundo dia de sintomas quando participou da coleta, no terceiro dia 2(22%) foram positivos, com quatro dias de sintomas 1(11%) foi participante e com 5 dias de sintomas 2(22%) foram coletados.

Devido ao pequeno número de casos positivos e a ocorrência esporádica, não foi possível avaliar a concentração da frequência em determinado mês ou ano desse vírus.

O paciente do transplante de medula óssea infectado por HBoV apresentou somente tosse e coriza. Dentre as crianças da cardiopatia congênita, febre e tosse foram referidas em três casos (60%), sendo uma com dispnéia (20%) e outro caso com relato de cianose (20%).

Dentre as crianças da creche, todos tinham tosse e coriza, 2 (66%) tiveram febre, 2 (66%) chiado e uma delas também apresentou dispnéia. Dois pacientes que foram infectados HBoV estavam juntos na mesma sala do berçário.

Nenhum dos pacientes infectados com HBoV necessitou de internação ou terapia de suporte.

Tabela 5: Dados demográficos e clínicos de pacientes infectados HBoV

Grupo	Idade	Gênero	Coleta	Tempo ^{&}	HRV	hMPV	Sintomas
Cardiopatas	4 meses	masculino	17/03/05	4	sim	não	Febre, coriza, tosse e dispnéia
Cardiopatas	1 ano	masculino	14/04/05	1	não	não	Febre, coriza, tosse e cianose
Cardiopatas	1 ano	Feminino	19/07/05	5	sim	não	Coriza, tosse
Cardiopatas	2 anos	Feminino	29/04/08	2	sim	não	Febre, coriza
Cardiopatas	4 anos	masculino	06/05/08	2	sim	não	Coriza
Creche	3 anos	masculino	03/06/08	3	sim	não	Febre coriza, tosse, dispnéia e chiado
*Creche	10 meses	Feminino	10/06/08	3	sim	não	Coriza, tosse, chiado
*Creche	7 meses	Feminino	13/06/08	5	sim	não	Febre, coriza, tosse
TMO	22 anos	masculino	01/10/08	2	não	sim	Coriza, tosse

Abreviaturas

Cardiopatas: Crianças da cardiopatia congênita;

Creche: crianças da creche-escola;

TMO: adultos hospitalizados transplantados de medula-óssea;

&Tempo de início dos sintomas, em dias.

5.3.1.1. Co-infecção

Dos nove pacientes positivos, sete crianças apresentaram co-infecção com o Rinovírus, sendo quatro cardiopatas e três crianças da creche-escola e um paciente adulto TMO apresentou co-infecção com Metapneumovírus.

Os dados clínicos dos pacientes infectados com HBoV e co-infecções com outros vírus respiratórios estão apresentados na Tabela 5.

5.3.1.2. Seqüenciamento de nucleotídeos

Das nove amostras positivas, foi possível determinar a sequência nucleotídica de oito amostras. As sequências obtidas das amostras do estudo demonstraram 99.7%

de homologia com as sequências disponíveis no “GenBank” avaliadas pelo “Blast” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e algumas já foram depositadas: GQ244405.1; GQ244406.1; GQ244407.1; GQ244408.1.

6. Discussão

Nosso estudo objetivou a avaliação de Infecções por Bocavírus humano em pacientes de diferentes grupos, de faixas etárias e condições de risco, para analisar a frequência e as características clínicas da infecção, dado que a literatura descreve uma ampla taxa de positividade 1.4% até 19%.^(65,18)

Para a identificação da infecção por Bocavírus humano, as amostras foram submetidas à reação da PCR para a amplificação da região conservada do gene que codifica a nucleoproteína 1 viral (NP-1, nucleotídeos 2281-2634). Os iniciadores moleculares utilizados neste estudo correspondem aos descritos por Allander (2005) quando da descrição inicial da primeira detecção do Bocavírus causando infecção respiratória em humanos.⁽¹⁰⁾ A escolha desta região viral para a amplificação genômica deve-se ao fato do gene NP-1 ser amplamente aplicado nos diversos estudos envolvendo o HBoV e este gene não é encontrado nos outros representantes da família Parvoviridae, sendo exclusivo do gênero Bocavirus.⁽¹⁰⁾

Todas as amostras coletadas foram avaliadas inicialmente através da técnica de imunofluorescência direta para a detecção de antígenos de sete vírus respiratórios: vírus Influenza A e B, Parainfluenza tipos 1-3, Adenovírus e Vírus Sincicial Respiratório e todas as amostras positivas para Bocavírus humanas também avaliadas por técnicas moleculares para a detecção do genoma do Rinovírus e Metapneumovírus.

Realizamos os primeiros testes de PCR para detecção de HBoV nas amostras coletadas de adultos entre 2001 e 2003 que foram negativas para os demais vírus investigados por imunofluorescência, considerando que co-infecções dificultariam as

associações clinico-etiológicas.⁽⁵⁶⁾ Como era suposto, não obtivemos amostras positivas para HBoV e investigamos, então, a presença de HBoV em todas as amostras coletadas de adultos e crianças a partir de 2005, inclusive naquelas previamente positivas para outros vírus respiratórios. Eventualmente a ocorrência de Bocavirus poderia ser um agente facilitador da infecção por outro vírus respiratório ou vice-versa.⁽⁸⁶⁾

A decisão de inclusão das amostras de crianças de creche em nosso estudo, foi devido à coleta desses pacientes, abranger o ano de 2008 inteiro, com coleta de dados completa e seguimento pós-infecção e nos grupos das crianças e dos adultos do Pronto Atendimento são importantes a investigação do HBoV, pois refletem quais os vírus que estão circulando na comunidade.

Esse estudo detectou DNA de HBoV em nove pacientes (1,7%): 3 detectadas em 2005 e 6 detectadas em 2008, sendo só uma amostra com infecção por HBoV isolada. Esta frequência está dentro da taxa de detecção encontrada na literatura.^(42,52,87)

Assim como para outras viroses, alguns estudos relatam a maior prevalência do HBoV no período de inverno^(17,88), mas resultados muito variáveis são relatados a respeito de sazonalidade da infecção por HBoV.^(88,89) Quanto à variação de frequência a cada ano, pesquisado por sete anos estudo realizado por Maggi et al., notaram que a frequência do HBoV permaneceu a mesma (4,5%) exceto no período de 2000-2002, que não identificou o patógeno.⁽⁹⁰⁾ Em estudo brasileiro, Modena et al., detectaram 10% em 2005, 3% em 2006 e 2% em 2007 e dentre esses anos houve uma distribuição bem variável do HBoV, apenas em 2005 no mês de abril, sua detecção foi maior, simultaneamente com o Vírus Sincial Respiratório e em todos os anos, nos meses de dezembro e janeiro o vírus não foi detectado.⁽³⁵⁾ Desta forma é de supor que não haja

sazonalidade regular. Nesse sentido, não foi possível identificar um período sazonal em nossos resultados, mesmo com investigação sistemática por um ano (2008). Apesar de não ter avaliado dois anos consecutivos, nosso estudo abrangeu anos anteriores (2001-2003 e 2005) em diferentes populações, portanto, se houvesse uma sazonalidade provavelmente nós detectaríamos.

Analisando esses resultados por grupo estudado, obtivemos 3% das crianças (8/264) e 0,4% dos adultos (1/270) infectados pelo HBoV: 2,4% (3/127) das crianças da creche-escola, 4,8% (5/103) das crianças com cardiopatia congênita e 0,9% dos pacientes adultos transplantados de medula óssea (1/112). Nenhum caso positivo de HBoV foi encontrado entre os pacientes do pronto-atendimento (44 adultos e 34 crianças), profissionais de saúde (83) ou pacientes adultos transplantados renais (31).

No estudo de Longtin et al., 2008 à detecção entre crianças e adultos foi bem diferente (13,8% e 0,8%) à semelhança de nosso estudo (3% e 0,4%), embora o autor tenha obtido uma frequência mais considerável dentre as crianças do que taxa que encontramos.⁽⁴¹⁾ Porém, dentre as crianças com cardiopatia congênita, essa diferença foi maior (4,8%) principalmente se comparada com os adultos de grupos de maior risco, os adultos transplantados renais e de medula óssea (0 e 0,9%), respectivamente.

Em nosso estudo foram consideradas crianças os pacientes até 12 anos de idade, dentre elas a maioria eram menores de 5 anos (75%). Assim como em muitos dos estudos, as crianças foram as que apresentaram a maior detecção do HBoV.^(10,33,88) Na avaliação na creche-escola a frequência de 2,4% de HBoV dentre as positivas concentrou-se em menores de 1 ano de idade sugerindo que a aquisição do vírus aconteça precocemente. Um estudo sorológico (anticorpos classe IgM contra HBoV) apresentou evidências desse contato com o vírus nas fases iniciais da vida com

soropositividade para anticorpos contra o HBoV atingindo 98% de positividade na idade pré escolar.⁽⁶²⁾

Modena et al., concluíram que o HBoV diminui constantemente em relação à idade: 24% das crianças menores de 2 anos, 14% dos 2-4 anos, 5% dos 5-9 anos e 0% de pessoas com 10 anos. No Brasil, estudo recente, avaliou as diferenças de positivities de acordo com a idade da criança e também confirmou que a positividade do vírus é inversamente proporcional à idade das crianças: 4,6% de positividade geral e 5,1% em menores de 7 meses, 4,8% menores de 5 anos e 1,1% maiores de 5 anos de idade.⁽³⁵⁾

Estudos internacionais relatam que as maiores positivities na detecção do HBoV ocorrem em crianças que apresentam comorbidades ou são hospitalizadas.⁽⁹¹⁾ Dois estudos franceses apresentaram essa maior freqüência do HBoV,^(8,69) um estudo encontrou 12,5% de HBoV em crianças hospitalizadas com bronquiolite e o segundo estudo descreveu 13% de infecções por este patógeno em crianças asmáticas hospitalizadas.

Estudo realizado no Brasil no mesmo período, utilizando a PCR, detectou 6% do DNA-HBoV em crianças menores de dois meses de idade e hospitalizadas e, dentre as positivas, a maioria apresentou sintomas de obstrução nasal, febre, tosse e dispnéia; apenas uma apresentou infiltrado pulmonar.⁽³⁵⁾

Os nossos resultados corroboram os dados da literatura, pois as crianças com cardiopatia congênita, com idade variando de 4 meses a 4 anos, embora não hospitalizadas, também apresentaram uma maior taxa de positividade (4,8% ou 5/103),⁽³⁵⁾ quando comparadas com as crianças dos outros grupos: pronto atendimento e creche-escola. Apesar de ser o grupo que apresentou a maior taxa de detecção pelo HBoV os sintomas foram semelhantes aos das crianças da creche-escola, pois ambos

os grupos apresentavam sintomas de tosse, coriza, febre, dispnéia e cianose ou chiado. Embora esses sintomas possam ser indicativos de possível infecção no trato respiratório inferior, nenhuma necessitou de hospitalização.

Considerando as vias de transmissão dos vírus respiratórios e o perfil de exposição dos profissionais de saúde, estudos demonstram que eles são um importante veículo de transmissão de agentes infecciosos, principalmente em ambientes hospitalares onde há o contato direto ao paciente.^(84,94) Dessa forma, pesquisamos o vírus também no grupo de profissionais de saúde do Hospital São Paulo, apesar de não encontrarmos nenhum destes infectado por HBoV. Contudo, a literatura já demonstrou exemplo de transmissão nosocomial por este vírus,⁽⁹²⁾ documentando dois casos de transmissão na unidade de terapia intensiva neonatal. Em nosso estudo também foi possível documentar a transmissão entre duas crianças de uma mesma sala de aula da creche-escola que adquiriram o vírus com a diferença de um dia de início dos sintomas.

Apesar do grande número de estudos recentemente publicados, há falta de informação sobre o papel desse patógeno na etiologia das infecções respiratórias agudas em adultos de diferentes grupos de risco. Em estudo italiano, a detecção do HBoV foi de 1,4%.⁽³⁰⁾ Um estudo brasileiro detectou apenas dois pacientes adultos infectados pelo HBoV (1,1%), sendo um paciente com 17 anos e outro com 62 anos de idade e apenas sintomas leves quando comparado com as crianças do mesmo estudo.⁽³⁵⁾ Em nosso trabalho encontramos resultados semelhantes, detectando apenas um adulto positivo para HBoV. Todos estes dados parecem fortalecer a hipótese de que o HBoV não cause infecção respiratória importante em pacientes adultos, mesmo que em nosso estudo tenham sido incluídos pacientes com diversas

co-morbidades, como hipertensão, diabetes, cardiopatia, além dos grupos de paciente imunossuprimidos, como os transplantados de medula.

No grupo dos transplantados de medula óssea, um paciente foi positivo: adulto de 23 anos, com sintomas de tosse e coriza. O paciente era portador de Linfoma de Hodgkin tipo esclerose-nodular, com asma e recorrentes infecções respiratórias. No momento da coleta do lavado nasofaríngeo o paciente não estava internado, mas ainda tinha doença ativa e estava realizando acompanhamento no ambulatório de transplante. O paciente não tinha contato com crianças menores de 5 anos, mas tinha parentes com sintomas respiratórios no momento da coleta.

Em estudo italiano, Costa et al., avaliaram pacientes com diferentes tipos de transplante descreveram poucos casos de infecção: um transplantado de pulmão, um transplantado de fígado, nenhum transplantado de rim e coração, e dois casos em transplantados de medula óssea, contudo resultando frequência de 16% de detecção do HBoV.⁽⁹³⁾ Até o momento, não há estudos brasileiros publicados incluindo todos estes grupos de risco.

Quanto aos transplantados renais, o presente estudo não observou nenhum caso positivo. Um estudo analisou 153 lavados broncoalveolares e não obteve nenhuma positividade para o HBoV, mesmo tendo descrito maior detecção de patógenos virais e bacterianos em pacientes transplantados de pulmão quando comparados com o grupo de não transplantados.^(94,95)

Existem estudos que associam a infecção por HBoV em imunossuprimidos a um maior comprometimento no trato respiratório inferior e prolongamento dos sintomas. Em estudo com 51 crianças com leucemia apresentando febre e chiado o HBoV foi detectado em 5,6% dos casos e a recorrência desses episódios de febre associado a presença do HBoV por períodos de até 6 meses, sugerindo reativação viral.⁽²⁴⁾ Ainda,

estudo com transplantado de medula óssea relata que o HBoV não ficou restrito somente ao trato respiratório, mas causou também diarreia após 21 dias de início dos sintomas, mesmo já cessado os sintomas respiratórios.⁽⁹⁰⁾

Em geral, um dos critérios de inclusão para participar da maioria dos estudos de infecção de via respiratória é a apresentação de sintomas em até 7 dias ⁽²³⁾ mas, quando analisamos sobre o item “tempo de sintomas”, estudos demonstram que a possibilidade de se ultrapassar esses 7 dias é grande, principalmente tratando-se de pacientes muitos jovens (menores de 5 anos de idade) e idosos ou pacientes que apresentam alguma co-morbidade.

Alguns estudos relatam pacientes que excretaram o vírus por até três semanas após a sua detecção inicial ⁽⁵⁶⁾ e em pacientes imunossuprimidos esses sintomas podem durar muitos meses, como já descrito anteriormente.^(24,22)

Em nosso estudo também utilizamos o critério de até 7 dias de sintomas, pois poderíamos estar diante de infecções secundárias e eventualmente não detectar o vírus ou realizar associações clínicas imprecisas. A maioria das amostras (76%) foram coletadas antes de 5 dias de sintomas, com mediana de 3 dias. Apenas oito pacientes apresentaram um período mais prolongado, de 10 a 60 dias de sintomas.

A apresentação clínica da infecção do HBoV em crianças, foi similar aos encontrados em outros estudos, incluindo o Brasil. No estudo realizado com crianças muito jovens (até 2 meses de idade) e hospitalizadas, os autores descreveram sintomas semelhantes aos pacientes do presente estudo, com febre, coriza, tosse, dispnéia e chiado.⁽³⁵⁾ Autores sugerem que a infecção por HBoV seja um importante patógeno respiratórios no país, resultando em importantes infecções sintomáticas com febre, tosse, coriza e chiado entre as crianças menores de cinco anos.⁽⁴²⁾

O único paciente adulto infectado por HBoV em nosso estudo foi o transplantado de medula óssea, que apresentou tosse e coriza, além dos sintomas crônicos já descritos. Nas crianças com cardiopatia congênita foi comum o achado de coriza, os sintomas de febre e tosse foram encontrados em três crianças, sendo que uma apresentou dispnéia e outra criança cianose. Todas as crianças da creche-escola tiveram como sintomas tosse e coriza, duas delas com febre, duas com chiado e uma criança com dispnéia.

Análises sobre a importância do HBoV são freqüentes, principalmente quando o vírus é encontrado em associação a outros patógenos. Outras viroses são comumente associadas a amostras respiratórias infectadas com HBoV. Em estudo coreano, Fry et al. registraram os dois maiores índices de co-infecção do HBoV com outros patógenos (83%) em pacientes com pneumonia e (90%) em pacientes com outros sintomas.⁽⁵²⁾

Estudo de Arnold et al. detectaram que as co-infecções mais comuns com o HBoV descritas envolvem o Rinovírus⁽³⁴⁾ e o Metapneumovirus⁽³⁸⁾. Apesar do pequeno número de amostras positivas para HBoV e as altas taxas de co-infecção com outros vírus respiratórios e HBoV, ainda é insuficiente para dizer que este vírus seja responsável por um grande impacto clínico deste agente.

Estudo realizado por Fry et al. detectaram HBoV em apenas 2% das crianças assintomáticas (grupo controle), enquanto que em crianças com pneumonia a freqüência desse vírus foi de 12%%.⁽⁶⁵⁾ Resultados semelhantes foram observados em estudo que relatou detecção de HBoV em 22 das 425 crianças com sintomas de IRA e nenhuma das 96 crianças assintomáticas.⁽⁸⁹⁾ Estudos relatam a importância do vírus quando se analisa os sintomáticos e assintomáticos sem co-infecção.⁽⁶⁶⁾ ou quando não se detecta o vírus em pacientes assintomáticos.^(19,89,91) Por outro lado, há trabalhos que mostram a importância do HBoV quando associados a outros vírus, Midulla et al.,

demonstraram que crianças com HBoV e co-infectadas com Vírus Sincial Respiratório tiveram sintomas de maior gravidade e mais tempo de hospitalização, quando comparadas com os mesmos vírus isoladamente.⁽⁹⁶⁾ Em trabalho publicado, das quatro crianças infectadas com HBoV, o único que apresentou sintomas mais graves (dispnéia) não apresentou co-infecção, suspeitando que o HBoV seja responsável pela gravidade do sintoma.⁽²³⁾ Outra avaliação relevante são os estudos que apresentam a carga viral do HBoV maior em pacientes sintomáticos.^(8,19,50)

A análise de seqüências de todas as amostras positivas confirmou que uma única estirpe do HBoV circulou durante os períodos estudados, sendo semelhante aos resultados descritos em vários estudos.^(60,97) Não há diferença das linhagens circulantes entre crianças e adultos, incluindo as duas crianças positivas para HBoV infectadas na mesma sala da creche.

7. Conclusão

Os dados do presente estudo sugerem a relevância do HBoV como um patógeno do trato respiratório de crianças sendo mais freqüente entre as crianças menores, co-infectadas com outras viroses e freqüentadoras de creche-escola onde a sua transmissão precoce pôde ser documentada.

O HBoV não parece ser um agente etiológico importante entre adultos imunocompetentes com infecções respiratórias agudas.

Os profissionais de saúde apesar da exposição nosocomial e/ ou contato com crianças não apresentaram freqüência diferente da população do pronto atendimento. Em nosso estudo não foi possível detectar um padrão de sazonalidade, para a infecção pelo HBoV, pois distribuída durante todo o ano sendo confirmado pelo seqüenciamento que todos os casos eram da mesma linhagem.

Clinicamente, a detecção entre os adultos com diferentes tipos de imunodepressão e crianças com cardiopatia não se correlacionou com maior impacto ou doença grave.

Assim, diante destes dados iniciais é necessário que outros trabalhos avaliem o impacto da infecção pelo Bocavírus, particularmente em pacientes com comorbidades e naqueles co-infectados para melhor entendimento do seu papel na patogenia das doenças respiratórias.

9. Referências

Conforme o “*International Committee of Medical Journal Editors*” (Vancouver Style).

1. CDC. Outbreak of 2009 pandemic influenza A (H1N1) at a school - Hawaii, MWR Morb Mortal Wkly Rep. 2010;58(51):1440-4.
2. Kim Y, Boeckh M, Englund JA. Community Respiratory Virus Infections in Immunocompromised Patients: Hematopoietic Stem Cell and Solid Organ Transplant Recipients, and Individuals with Human Immunodeficiency Virus Infection. *Semin Respir Crit Care Med*. 2007;28(2):222-42.
3. Stamboulian D, Bonvehí PE, Nacinovich FM, Cox N. Influenza. *Infect Dis. Clin North Am*. 2000;14(1):141-66.
4. Boeckh M. The challenge of respiratory virus infections in hematopoietic cell transplant recipients. *Br. J Haematol*. 2008;143(4):455-67.
5. Esposito S, Bosis S, Niesters HG, Tremolati E, Sabatini C, Porta A, et al. Impact of human bocavirus on children and their families. *J Clin Microbiol*. 2008;46(4):1337-42.
6. Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean-Lecherbonnier J, Pozzetto B, Ginevra C, Freymuth F. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J Virol Methods*. 2005;126(1-2):53-63.
7. Arden KE, McErlean P, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. Frequent detection of human rhinovirus, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *J Med Virol*. 2006;78(9):1232-40.

8. Jacques J, Moret H, Renois F, Leveque N, Motte J, Andreoletti L. Human Bocavirus quantitative DNA detection in French children hospitalized for acute bronchiolitis. *J Clin Virol.* 2008;43(2):142-7.
9. Chung JY, Han TH, Kim CK, Kim SW. Bocavirus infection in hospitalized children, South Korea. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(8):1254-6.
10. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(36):12891-6.
11. Manteufel J, Truyen U. Animal Bocaviruses: A Brief Review. *Intervirology.* 2008;51(5):328-34.
12. Zhi N, Mills IP, Lu J, Wong S, Filippone C, Brown KE. Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles for NS1, VP1, and the 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity. *J Virol.* 2006;80(12):5941-50.
13. Harrison, LR, Styer EL, Pursell A R, Carmichael LE, Nietfeld JC. Fatal disease in nursing puppies associated with minute virus of canines. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1992;(4):19–22.
14. Tattersall P, Ward DC. Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature.* 1976;263(5573):106-9.
15. Berns K, Parrish CR. Parvoviridae. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* Philadelphia, NY: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2437.
16. Ditt V, Viazov S, Tillmann R, Schildgen V, Schildgen O. Genotyping of human bocavirus using a restriction length polymorphism. *Virus Genes.* 2008; 36:67–69.

17. Miron D, Srugo I, Kra-Oz Z, Keness Y, Wolf D, Amirav I, Kassis I. Sole Pathogen in Acute Bronchiolitis: Is There a Role for Other Organisms Apart From Respiratory Syncytial Virus. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;(1)29:7-10.
18. Allander T, Jarthi T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinen P, Osterback R, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis.* 2007;44(7):904-10.
19. Ou SY, Lin GY, Wu Y, Lu XD, Lin CX, Zhou RB. Viral pathogens of acute lower respiratory tract infection in hospitalized children from East Guangdong of China. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2009; 11(3):203-6.
20. Zhang LL, Tang LY, Xie ZD, Tan XJ, Li CS, Cui AL, Ji YX, Xu ST, Mao NY, Xu WB, Shen KL. Human bocavirus in children suffering from acute lower respiratory tract infection in Beijing Children's Hospital. *Chin Med J (Engl).* 2008;121(17):1605-6.
21. Vries JJ, Bredius RG M, Van Rheenen PF, Smiers FJW, Schölvink EH, Vossen ACTM, Claas ECJ, Niesters HGM. Human bocavirus in an immunocompromised child presenting with severe diarrhea. *Clin Microbiol.* 2009;47(4):1241-3.
22. Monteny M, Niesters HGM, Moll HA, Beger MY. Human bocavirus in febrile children the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases.* 2007;13(1):180-182.
23. Koskenvuo M, Möttönen M, Rahiala J, Saarinen-Pihkala UM, Riikonen P, Waris M, et al. Respiratory viral infections in children with leukemia. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27(11):974-80.
24. Bonzel L, Tenenbaum T, Schrotten H, Schildgen O, Schweitzer-Krantz S, Adams O. Frequent detection of viral coinfection in children hospitalized with acute respiratory tract infection using a real-time polymerase chain reaction. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27(7):589-94.

25. Kaplan NM, Dove W, Abd-Eldayem SA, Abu-Zeid AF, Shamoon HE, Hart CA. Molecular epidemiology and disease severity of respiratory syncytial virus in relation to other potential pathogens in children hospitalized with acute respiratory infection in Jordan. *J Med Virol.* 2008;80(1):168-74.
26. Cilla G, Oñate E, Perez-Yarza EG, Montes M, Vicente D, Perez-Trallero E. Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: High rate of viral coinfection. *J Med Virol.* 2008;80(10):1843-9.
27. Gagliardi TB, Iwamoto MA, Paula FE, Proenca-Modena JL, Saranzo AM, Criado MF, et al. Human bocavirus respiratory infections in children. *Epidemiol Infect.* 2009;12:1-5.
28. Lahti E, Peltola V, Waris M, Virkki R, Rantakokko-Jalava K, Jalava J, Eerola E, Ruuskanen O. Induced sputum in the diagnosis of childhood community-acquired pneumonia. *Thorax.* 2009;64(3):252-7.
29. García-García ML, Calvo C, Pozo F, Pérez-Breña P, Quevedo S, Bracamonte T, Casas I. Human bocavirus detection in nasopharyngeal aspirates of children without clinical symptoms of respiratory infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27(4):358-60.
30. Chow BD, Esper FP. The human bocaviruses: a review and discussion of their role in infection. *Clin Lab Med.* 2009;29(4):695-713.
31. Gerna G, Piralla A, Campanini G, Marchi A, Stronati M, Rovida F. The human bocavirus role in acute respiratory tract infections of pediatric patients as defined by viral load quantification. *New Microbiol.* 2007;30(4):383-92.
32. Longtin J, Bastien M, Gilca R, et al. Human bocavirus infections in hospitalized children and adults. *Emerg Infect Dis* 2008;14:217–221.

33. Silva AK, Santos MC, Mello WA, Sousa RCM. 2010 Occurrence of Human Bocavirus associated with acute respiratory infections in children up to 2 years old in the City of Belém, Pará State, Brazil. *Rev Pan-Amaz Saude* 2010;1(1):87-92.
34. Pilger DA, Pereira FS, Georgiadis S, Santos P, Cantarelli V V. Detecção molecular de bocavírus humano e metapneumovirus humano associados à infecção respiratória aguda, Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS. 2009.88p.
35. Modena J L P. Infecções respiratórias por bocavirus humano: aspectos clínicos e moleculares. Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP. Ribeirão Preto/SP. 2009. 190p.
36. Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human Bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(5):848-50.
37. Yoshida LM, Suzuki M, Yamamoto T, Nguyen HA, Nguyen CD, Nguyen AT, Oishi K, Vu TD, Le TH, Le MQ, Yanai H, Kilgore PE, Dang DA, Ariyoshi K. Viral pathogens associated with acute respiratory infections in central vietnamese children. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(1):75-7.
38. Chung JY, Han TH, Kim JS, Kim SW, Park CG, Hwang ES. Th1 and Th2 cytokine levels in nasopharyngeal aspirates from children with human bocavirus bronchiolitis. *J Clin Virol*. 2008;43(2):223-5.
39. Smuts H, Workman L, Zar HJ. Role of human metapneumovirus, human coronavirus NL63 and human bocavirus in infants and young children with acute wheezing. *J Med Virol*. 2008;80(5):906-12.

40. 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.
41. Albuquerque MC, Pena GP, Varella RB, Gallucci G, Erdman D, Santos N. Novel respiratory virus infections in children, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(5):806-8.
42. Albuquerque MC, Rocha LN, Benati FJ, Soares CC, Maranhão AG, Ramírez ML, Erdman D, Santos N. Human bocavirus infection in children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(11):1756-8.
43. Souza EL, Ramos JG, Proença-Módena JL, Diniz A, Carvalho G, Ciuffo I, Araújo-Neto CA, Andrade SC, Souza LS, Arruda E, Silva L. Human Bocavirus in Very Young Infants Hospitalized with Acute Respiratory Infection in Northeast Brazil. *J Trop Pediatr.* 2009.
44. Lee JI, Chung JY, Han TH, Song MO, Hwang ES. Detection of human bocavirus in children hospitalized because of acute gastroenteritis. *J Infect Dis.* 2007;196(7):994-7.
45. Vicente D, Cilla G, Montes M, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(4):636-7.
46. Arthur, J L, Higgins G D, Davidson G P, Givney R C, Ratcliff R M. A Novel Bocavirus Associated with Acute Gastroenteritis in Australian Children. *PLoS Pathog.* 2009 April; 5(4): e1000391.
47. Han TH, Kim CH, Park SH, Kim EJ, Chung JY, Hwang ES. Detection of human bocavirus-2 in children with acute gastroenteritis in South Korea. *Arch Virol.* 2009;154(12):1923-7.

48. Rasanen S, Lappalainen S, Kaikkonen S, Hamalainen M, Salminen M, Vesikari T. Mixed viral infections causing acute gastroenteritis in children in a waterborne outbreak. *Epidemiol Infect.* 2010;22:1-8.
49. Lu X, Gooding LR, Erdman DD. Human bocavirus in tonsillar lymphocytes. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1332-4.
50. Clément N, Battaglioli G, Jensen RL, Schnepf BC, Johnson PR, St. George K, et al. Prevalence of human bocavirus in human tonsils and adenoids. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(2):217-21.
51. Martin ET, Taylor J, Kuypers J, Magaret A, Wald A, Zerr D, Englund JA. Detection of bocavirus in saliva of children with and without respiratory illness. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47(12):4131-32.
52. Hamza IA, Jurzik L, Wilhelm M, Uberla, K. Detection and quantification of human bocavirus in river water. *J Gen Virol.* 2009;90: 2634-2637.
53. Blinkova O, Rosario K, Li L, Kapoor A, Slikas B, Bernardin F, Breitbart M, Delwart E. *J Clin Microbiol.* 2009;47(11):3507-13.
54. Regamey N, Frey U, Deffernez C, Latzin P, Kaiser L. Isolation of human bocavirus from Swiss infants with respiratory infections. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26(2):177-9.
55. Regamey N, Kaiser L, Roiha HL, Deffernez C, Kuehni CE, Latzin P, et al. Swiss Paediatric Respiratory Research Group. *Pediatr Infect Dis J.* 2008; 27(2):100-5.
56. Blessing K, Neske F, Herre U, Kreth HW, Weissbrich B. Prolonged detection of human bocavirus DNA in nasopharyngeal aspirates of children with respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28(11):1018-9.

57. Calvo C, Garcia-Garcia ML, Pozo F, Carvajal O, Perez-Brena P, Casas I. Clinical characteristics of human bocavirus infections compared with other respiratory viruses in Spanish children. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27(8):677-80.
58. Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF, Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis*. 2007;195(7):1038-45.
59. Lin F, Zeng A, Yang N, et al. Quantification of human bocavirus in lower respiratory tract infections in China. *Infect Agent Cancer*. 2007;2:3.
60. Kleines M, Scheithauer S, Rackowitz A, Ritter K, Hausler M. High prevalence of human bocavirus detected in young children with severe acute lower respiratory tract disease by use of a standard PCR protocol and a novel real-time PCR protocol. *J Clin Microbiol*. 2007;45(3):1032-4.
61. Don M, Söderlund-Venermo M, Valent F, Lahtinen A, Hedman L, Canciani M, Hedman K, Korppi M. Serologically verified human bocavirus pneumonia in children. *Pediatr Pulmonol*. 2010;45(2):120-6.
62. Oikawa J, Ogita J, Ishiwada N, Okada T, Endo R, Ishiguro N, Ubukata K, Kohno Y. Human Bocavirus DNA Detected in a Boy With Plastic Bronchitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(11):1035-1036.
63. Arnold, J. C., K. K. Singh, S. A. Spector, and M. H. Sawyer. 2006. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. *Clin. Infect. Dis*. 43: 283–288.
64. Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH. Undiagnosed respiratory viruses in children. *Pediatrics*. 2008;121(3):e631-7.

65. Bastien N, Chui N, Robinson JL, Lee BE, Dust K, Hart L, Li Y. Detection of human bocavirus in Canadian children in a 1-year study. *J Clin Microbiol.* 2007 Feb;45(2):610-3.
66. Beder LB, Hotomi M, Ogami M, Yamauchi K, Shimada J, Billal DS, Ishiguro N, Yamanaka N. *Eur J Pediatr.* 2009;168(11):1365-72.
67. Rezes S, Soderlund-Venermo M, Roivainen M, Kemppainen K, Sziklai I, Pitkaranta A. *J Clin Virol.* 2009;46(3):234-7.
68. Vallet C, Pons-Catalano C, Mandelcwaig A, Wang A, Raymond J, Lebon P, Gendrel D. *J Pediatr.* 2009;155(2):286-8.
69. Simon A, Groneck P, Kupfer B, Kaiser R, Plum G, Tillmann RL, et al. Detection of bocavirus DNA in nasopharyngeal aspirates of a child with bronchiolitis. *J Infect.* 2007;54(3):e125-7.
70. Terrosi C, Fabbiani M, Cellesi C, Cusi MG. Human bocavirus detection in an atopic child affected by pneumonia associated with wheezing. *J Clin Virol.* 2007;40(1):43-5.
71. Ringshausen FC, Tan AY, Allander T, Borg I, Arinir U, Kronsbein J, Hauptmeier BM, Schultze-Werninghaus G, Rohde G. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2009; 4:111-7.
72. Noah TL, Becker S. Chemokines in nasal secretions of normal adults experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Clin Immunol.* 2000; 97:43– 49.
73. Cristensen A, Nordbo SA, Krokstad S, Ronglien AG, Dollner H. Human bocavirus commonly involved in multiple viral airway infections. *J Clin Virol.* 2008;41(1):34-7.

74. Hengst M, Hausler M, Honnef D, Scheithauer S, Ritter K, Kleines M. [Human Bocavirus-infection (HBoV): an important cause of severe viral obstructive bronchitis in children]. *Klin Padiatr.* 2008;220(5):296-301.
75. Milder E, Arnold JC. Human metapneumovirus and human bocavirus in children. *Pediatr Res.* 2009;65(5Pt2):78R-83R.
76. Lau SK, Yip CC, Que TL, Lee RA, Au-Yeng RK, Zhou B, et al. Clinical and molecular epidemiology of human bocavirus in respiratory and fecal samples from children in Hong Kong. *J Infect Dis.* 2007;196(7):986-93.
77. Tozer SJ, Lambert SB, Whiley DM, Bialasiewicz S, Lyon MJ, Nissen MD, Sloots TP. Detection of human bocavirus in respiratory, fecal, and blood samples by real-time PCR. *J Med Virol.* 2009;81(3):488-93.
78. Caccia, E.R.B.; Watanabe, A.S.A; Carraro, E.; Silva, E.R.M.; Guatura, S.B.; Kamikawa, J.; Granato, C.F.H.; Bellei, N.C.J. Human Bocavirus investigation among adults and children with acute respiratory infections - epidemiological and clinical aspects [resumo 492]. *Rev. Virus Reviews & Research* 2009(supl 1. vol14) Apresentado no XX Encontro Nacional de Virologia; 2009 nov 1-4; Brasília, DF.
79. Song JR, Jin Y, Xie ZP, Gao HC, Xiao NG, Chen WX, Xu ZQ, Yan KL, Zhao Y, Hou YD, Duan ZJ. Novel human bocavirus in children with acute respiratory tract infection. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(2):324-7.
80. Kahn JS, Kesebir D, Cotmore SF, D'Abramo A Jr, Cosby C, Weibel C, Tattersall P. Seroepidemiology of human bocavirus defined using recombinant virus-like particles. *J Infect Dis.* 2008;198(1):41-50.

81. Karalar L, Lindner J, Schimanski S, Kertai M, Segerer H, Modrow S. Prevalence and clinical aspects of human bocavirus infection in children. *Clin Microbiol Infect.* 2009.
82. Cecchini S, Negrete A, Virag T, Graham BS, Cohen JI, Kotin RM. Evidence of prior exposure to human bocavirus as determined by a retrospective serological study of 404 serum samples from adults in the United States. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(5):597-604.
83. Bellei N, Carraro E, Perosa AH, Benfica D, Granato CF. Influenza and rhinovirus infections among health-care workers. *Respirology.* 2007 Jan;12(1):100-3.
84. Bellei N, Carraro E, Perosa A, Watanabe A, Arruda E, Granato C. Acute respiratory infection and influenza-like illness viral etiologies in brazilian adults. *Journal of Medical Virology.* 2008; 9999:1-5
85. Dina J, Vabret A, Gouarin S, Petitjean J, Lecoq J, Brouard J, Arion A, Lafay-Delaire F, Freymuth F. Detection of human bocavirus in hospitalised children. *J Paediatr Child Health.* 2009;45(3):149-53.
86. Schildgen O, Müller A, Allander T, Mackay IM, Völz S, Kupfer B, Simon A. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(2):291-304.
87. Manning, A., V. Russell, K. Eastick, G. H. Leadbetter, N. Hallam, K. Templeton, and P. Simmonds. 2006. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J. Infect. Dis.* 194: 1283–1290.
88. Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, et al. 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(9):1276-82.

89. Weissbrich B, Neske F, Schubert J, Tollmann F, Blath K, Blessing K, Kreth HW. Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *BMC Infect Dis.* 2006;6:109.
90. Maggi F, Andreoli E, Pifferi M, Meschi S, Rocchi J, Bendinelli M. Human bocavirus in Italian patients with respiratory diseases. *J Clin Virol.* 2007;38(4):321-5.
91. Zheng LS, Yuan XH, Xie ZP, Jin Y, Gao HC, Song JR, Zhang RF, Xu ZQ, Hou YD, Duan ZJ. Human bocavirus infection in young children with acute respiratory tract infection in Lanzhou, China. *Med Virol.* 2010;82(2):282-8.
92. Saloojee H, Steenhoff A. The health professional's role in preventing nosocomial infections *Post. grad. Med J.* 2001;77(903):16-9.
93. Costa C, Bergallo M, Cavallo R. Detection of Human Bocavirus in bronchoalveolar lavage from Italian adult patients. *J Clin Virol.* 2009;45(1):81-2.
94. Miyakis S, van Hal SJ, Barratt J, Stark D, Marriott D, Harkness J. Absence of human Bocavirus in bronchoalveolar lavage fluid of lung transplant patients. *Clin Virol.* 2009;44(2):179-80.
95. Schenk T, Strahm B, Kontny U, et al. Disseminated bocavirus infection after stem cell transplant. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1425.
96. Midulla F, Scagnolari C, Bonci E, Pierangeli A, Antonelli G, De Angelis D, Berardi R, Moretti C. Respiratory syncytial virus, human bocavirus and rhinovirus bronchiolitis in infants. *Arch Dis Child.* 2010;95(1):35-41.
97. Dijkman R, Koekkoek SM, Molenkamp R, Schildgen O, van der Hoek L. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells. *J Virol.* 2009;83(15):7739-48.



São Paulo, 18 de abril de 2008
CEP 0471/08

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) ELAINE REGINA BAPTISTA CACCIA

Co-Investigadores: Nancy Cristina Junqueira Bellei (orientadora)

Disciplina/Departamento: Doenças Infecciosas e Parasitárias/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Fapesp.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Infecção respiratória por bocavírus humano em crianças e adultos: aspectos epidemiológicos e clínicos"**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: ESTUDO CLÍNICO OBSERVACIONAL - TRANSVERSAL -.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: NÃO SE APLICA.

OBJETIVOS: Investigar aspectos epidemiológicos e dentre eles o perfil de circulação do Bocavírus humano em adultos e crianças da comunidade, apresentando infecções respiratórias agudas, durante períodos consecutivos..

RESUMO: Os pacientes incluídos neste estudo foram provenientes de estudos realizados anteriormente que investigaram a etiologia viral das infecções agudas respiratórias em adultos e crianças. Serão investigadas quanto à presença de Bocavírus humano, 160 amostras negativas coletadas de adultos para outros vírus respiratórios e 91 de crianças com cardiopatia congênita, indiferente do resultado anterior para outros vírus respiratórios. Durante os anos de 2001 a 2003 foram incluídos pacientes adultos maiores que apresentavam suspeita de infecção aguda respiratória e foram atendidos em diferentes locais de serviço de assistência do Complexo UNIFESP. De um total de 419 amostras coletadas 61,81% tiveram sua etiologia conhecida para um destes agentes (influenza, Rinovírus, Parainfluenza 1 e 2 Adenovírus, Metapneumovírus e Coronavírus) . As 160 amostras restantes serão investigadas quanto à presença de Bocavírus Humano..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Até o presente momento não há dados brasileiros publicados referentes à epidemiologia da infecção respiratória causada por HBoV, bem como a possível correlação clínica deste agente a síndromes respiratórias em diferentes faixas etárias e grupos de risco de nossa população..

MATERIAL E MÉTODO: ADEQUADAMENTE DESCRITOS.

TCLE: NÃO SE APLICA.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: PROJETO FINANCIADO POR FAPESP.

CRONOGRAMA: 24 MESES.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

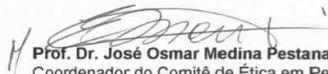


ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 18/4/2009 e 18/4/2010.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

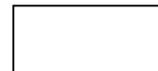
Atenciosamente,



Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

CEP 0471/08

8.2.Termo de consentimento livre e esclarecido



ESTUDO DE INFECÇÃO POR VÍRUS RESPIRATÓRIOS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM CARDIOPATIA CONGÊNITA E PACIENTES SEM FATORES DE RISCO PARA INFECÇÃO POR VÍRUS RESPIRATÓRIOS

O presente estudo tem como objetivo estudar a ocorrência de infecção respiratória causada por vírus respiratórios em crianças com cardiopatia congênita atendidas no Hospital São Paulo (HSP-UNIFESP) e crianças sem fatores de risco para infecção por vírus respiratórios (NASF-HSP-UNIFESP).

Para a realização deste estudo é necessária a utilização de secreção nasal das pessoas atendidas nos serviços de saúde para cardiopatas congênitos e crianças sem fatores de risco para infecção por vírus respiratórios. A coleta desse material é feita através de aspiração da secreção nasofaríngea com sonda ou swab nasal por enfermeiro, médico ou profissional da saúde devidamente treinado para tal procedimento.

Este estudo é considerado de risco mínimo para o paciente e a coleta é rápida, indolor e como descrito, realizada por profissional apto e não requer nenhum procedimento invasivo.

Todos os dados obtidos sobre os voluntários nesse estudo serão confidenciais e serão utilizados com fins estritamente científicos.

A participação nessa pesquisa é totalmente voluntária e a sua recusa não acarretará em qualquer prejuízo ou vantagem profissional nessa instituição, podendo o participante desligar-se do estudo em qualquer momento. As conclusões obtidas nesse estudo não serão utilizadas em outro trabalho sem o seu consentimento.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros indivíduos, não sendo divulgada a identificação de nenhum dos participantes. Se tiver interesse, poderá manter-se atualizado dos resultados obtidos junto aos pesquisadores.

Permitindo a realização de exames em suas amostras coletadas, você não será favorecido diretamente, pois trata-se de um estudo experimental, mas estará contribuindo para que outras pessoas possam futuramente ser beneficiadas.

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Janete Kamikawa, que pode ser encontrada no endereço: Rua Pedro de Toledo, 781, 15º andar, frente, ou pelo telefone (11) 5081-5391. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572, 1º andar, cj. 14, tel. 5571-1062, Fax 5539-7162, ou por meio do e-mail: cepunifesp@epm.br.

É garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo e continuidade de seu tratamento na instituição.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito dos dados que li ou que foram lidos para mim, descrevendo a presente investigação: “ESTUDO DE INFECÇÃO POR VÍRUS RESPIRATÓRIOS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM CARDIOPATIA CONGÊNITA E PACIENTES SEM FATORES DE RISCO PARA INFECÇÃO POR VÍRUS RESPIRATÓRIOS”. Eu discuti com os pesquisadores deste estudo sobre a minha decisão em participar do mesmo. Ficaram claros quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar do estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes, durante ou depois do mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

_____/_____/_____

*Assinatura da testemunha

_____/_____/_____

(*Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiências auditiva e/ou visual).

8.3. Termo de consentimento livre e esclarecido



“Ocorrência de Vírus Respiratórios em Adultos, profissionais de saúde sintomáticos e assintomáticos atendidos do Núcleo de Atendimento a Saúde do Funcionário (NASF) do complexo Hospital São Paulo/UNIFESP”

O presente estudo tem como objetivo estudar a ocorrência de infecção respiratória causada por Vírus Respiratórios Humanos em adultos, profissionais de saúde sintomáticos e assintomáticos do Núcleo de Atendimento a Saúde do Funcionário (NASF) do complexo Hospital São Paulo/UNIFESP.

Para a realização deste estudo é necessária a utilização de secreção nasal das pessoas atendidas no referido serviço de saúde. A coleta desse material é feita através de coleta da secreção nasofaríngea por profissional da área de saúde devidamente treinado para tal procedimento.

Este estudo é considerado de risco mínimo para o paciente e a coleta é rápida, indolor e como descrito, realizada por profissional apto e não requer nenhum procedimento invasivo.

Todos os dados obtidos sobre os voluntários nesse estudo serão confidenciais e serão utilizados com fins estritamente científicos.

A participação nessa pesquisa é totalmente voluntária e a sua recusa não acarretará em qualquer prejuízo ou vantagem profissional nessa instituição, podendo o participante desligar-se do estudo em qualquer momento. As conclusões obtidas nesse estudo não serão utilizadas em outro trabalho sem o seu consentimento.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros indivíduos, não sendo divulgada a identificação de nenhum dos participantes. Se tiver interesse, poderá manter-se atualizado dos resultados obtidos junto aos pesquisadores.

Permitindo a realização de exames em suas amostras coletadas, você não será favorecido diretamente, pois trata-se de um estudo experimental, mas estará contribuindo para que outras pessoas possam futuramente ser beneficiadas.

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Nancy Bellei, que pode ser encontrada no endereço: Rua Pedro de Toledo, 781, 15º andar, frente, ou pelo telefone (11) 5081-5391. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572, 1º andar, cj. 14, tel. 5571-1062, Fax 5539-7162, ou por meio do e-mail: cepunifesp@epm.br.

É garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo e continuidade de seu tratamento na instituição.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito dos dados que li ou que foram lidos para mim, descrevendo a presente investigação: “OCORRÊNCIA DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS EM ADULTOS , PROFISSIONAIS DE SAÚDE SINTOMÁTICOS E ASSINTOMÁTICOS DO SERVIÇO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO COMPLEXO HOSPITAL SÃO PAULO/UNIFESP”. Eu discuti com os pesquisadores deste estudo sobre a minha decisão em participar do mesmo. Ficaram claros quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar do estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes, durante ou depois do mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

_____/_____/_____

*Assinatura da testemunha

_____/_____/_____

(*Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiências auditiva e/ou visual.)

8.4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de adultos, transplantado Renal 2001-2005.

Termo de Consentimento livre e Esclarecido

INVESTIGAÇÃO DA METODOLOGIA LABORATORIAL DE DETECÇÃO DE INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA

O presente estudo tem como objetivo avaliar e comparar a contribuição dos diferentes procedimentos de diagnóstico de infecção por Influenza, bem como a frequência de outras etiologias virais em pacientes com síndrome gripal durante o período epidêmico para Influenza.

Para a realização do estudo é necessária a utilização de secreção nasal de pessoas com síndrome gripal. A coleta de secreção nasal é feita através de lavado nasal com 5ml de Ringer-lactato instilado em cada narina e coletada a seguir.

Esse estudo é considerado de mínimo risco para o paciente e a coleta será realizada por profissionais médicos. A coleta de lavado nasal é rápida, incolor e como descrito, não requer nenhum procedimento invasivo. O uso de Ringer-lactato intranasal não acarreta em nenhuma alteração fisiológica no paciente.

Todos os dados obtidos sobre os voluntários nesse estudo serão confidenciais e serão utilizados com fins estritamente científicos.

A participação nessa pesquisa é totalmente voluntária e sua recusa não acarretará em qualquer prejuízo ou vantagem profissional nessa instituição, podendo o participante desligar-se do estudo em qualquer momento que queira. As conclusões obtidas nesse estudo não serão utilizadas em outros trabalhos sem o seu conhecimento.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros indivíduos, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante. Se tiver interesse, poderá manter-se atualizado dos resultados obtidos em suas amostras junto aos pesquisadores.

Permitindo a realização de exames em suas amostras coletadas, você não será favorecido diretamente, pois trata-se de um estudo experimental, mas estará contribuindo para que outras pessoas possam futuramente ser beneficiadas.

Qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é Dra. Nancy C. J. Bellei que pode ser encontrado no endereço Pedro de Toledo, n 781, andar 15, ou pelo telefone: 5081-5394. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Rua Pedro de Toledo, 715 - 1º andar - 5576-4564, 5571-1062, FAX: 5539-7162.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Investigação da metodologia laboratorial de detecção de infecção pelo vírus Influenza". Eu discuti com o Dra. Nancy Bellei sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

8.5 Questionário clínico Crianças da Creche e Crianças do Pronto Atendimento

Data: ___/___/___

Ficha para atendimento médico

Pronto-atendimento

1ª participação no estudo: Sim Não

Paciente: Identificação

Nome: _____ RG: _____
 Data Nasc. _____ Idade: _____ Sexo: M F
 Telefone: () _____ Horário: _____
 Frequente: Escola Creche Berçário _____
 Paulistinha _____ Em casa .

Resp. pelo paciente:

Paciente: Quadro clínico atual

Prematuridade:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Peso atual: _____	Peso ao nascimento: _____		
Febre:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Dias: _____
Secreção nasal:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Dias: _____
Tosse:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Dias: _____
Dispnéia:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Dias: _____
Chiado:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Dias: _____
Cianose:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Dias: _____
Indicação de internação:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Diarréia	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Dias: _____
Vacinação Influenza	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Ano: _____
RX tórax:	Normal <input type="checkbox"/>	Hiper-expansão <input type="checkbox"/>	Infiltrado <input type="checkbox"/> Condensação <input type="checkbox"/>

Familiares

Profissional de saúde na família: Sim Não Contato direto com paciente S N
 Familiar com sintomas: Sim Não
 Irmãos: Sim Não Idade: _____
 Vacinação Influenza Sim Não Ano: _____

IMF CARDIO

Ficha para atendimento médico

--	--

Cardiopatia Congênita e vírus respiratório Data: ___/___/___

1ª participação no estudo: Sim Não**Paciente: Identificação**

Nome: _____	RG: _____
Data Nasc. _____	Idade: _____
Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F	
Telefone: () _____	Horário: _____
Frequente: <input type="checkbox"/> Escola <input type="checkbox"/> Creche <input type="checkbox"/> Berçário	
Procedência <input type="checkbox"/> ambulatório <input type="checkbox"/> Enfermaria	

Resp. pelo paciente:

Paciente: Quadro clínico atual

Prematuridade:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Peso atual: _____	Peso ao nascimento: _____		
Febre:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Dias: _____
Secreção nasal:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Dias: _____
Tosse:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Dias: _____
Dispnéia:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Dias: _____
Chiado:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Dias: _____
Cianose:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Dias: _____
Indicação de internação:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Diarréia	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Dias: _____
Vacinação Influenza	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Ano: _____
RX tórax:	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Hiper-expansão	<input type="checkbox"/> Infiltrado <input type="checkbox"/> Condensação

Paciente: Diagnóstico

 IVAS infecção vias aéreas superiores IVAS infecção vias aéreas inferiores**Familiares**

Profissional de saúde na família:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Contato direto com paciente S N
Familiar com sintomas:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Irmãos:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Idade: _____
Vacinação Influenza	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Ano: _____

8.7 Questionário clínico dos Profissionais de Saúde

ORIGEM :

Ficha de protocolo investigação síndrome gripal

número Paciente Data de coleta

idade Sexo

Cça <5 anos residência sim não

Início dos sintomas

febre sim não

Sintomas Respiratórios tosse Coriza/obstr Dor garg

Sintomas gerais: cefaléia mialgia calafrios

Doenças de base

Cardiopatía sim não

Pulmonar sim não

Diabetes sim não

Hipertensão sim não

Tabagismo sim não

Outros

Vacina sim não

Local de Trabalho:

Contato com direto com paciente sim não

8.8. Questionário clínico pacientes do Transplante de Medula Óssea.

Laboratório de Virologia – UNIFESP
Teste para Vírus Respiratórios



Nº RH LEITO DATA

NOME _____

ORIGEM Enfermaria Ambulatório

IDADE SEXO

TIPO DE AMOSTRA

LAVADO ASPIRADO OUTRO

CONTATO COM CRIANÇA SIM NÃO

CONTATO COM SINTOMATICOS SIM NÃO

DATA INÍCIO SINTOMAS : _____ / _____ / _____

FEBRE SIM NÃO

SINTOMAS RESPIRATÓRIOS: CORIZA/OBSTR.
TOSSE
DOR DE GARGANTA

SINTOMAS GERAIS: CEFALÉIA
MIALGIA
CALAFRIOS
DISPINÉIA

DOENÇA DE BASE:

HEMATOLÓGICO

QUAL? _____

NEUTROPENIA SIM NÃO

VACINA FLU SIM NÃO

TMO : NÃO SIM Autólogo
Alogênio

PULMONAR _____
DIABETES _____

TABAGISMO _____
CARDIOPATIA _____

HIPERTENSÃO _____
OUTROS _____

MÉDICO SOLICITANTE _____

8.9 Questionário clínico dos Transplantados renais e adultos do pronto atendimento

ORIGEM :

Ficha de protocolo investigação síndrome gripal

número Paciente Data de coleta

idade Sexo

Cça <5 anos residência sim não

Início dos sintomas

febre sim não

Sintomas Respiratórios tosse Coriza/obstr Dor garg

Sintomas gerais: cefaléia mialgia calafrios

Doenças de base

Cardiopatía sim não

Pulmonar sim não

Diabetes sim não

Hipertensão sim não

Tabagismo sim não

Outros

Vacina sim não

Tempo de transplante

9. Co-morbidades mencionadas espontaneamente pelos participantes do estudo.

As co-morbidades de hipertensão (27%) e a rinite alérgica (23%) foram as mais citadas pelos próprios participantes, principalmente no grupo dos profissionais de saúde.

Na população das crianças da cardiopatia, as pneumopatias também foram mencionadas por algumas mães(11), e a comorbidade mais freqüente foi especialmente a bronquiolite (27%).

Legenda

- **Pergunta não incluída no questionário.**

0 **Resposta negativa incluída no questionário**

Co-morbidade*:							
Bronquite	-	-	-	-	1	1	-
Bronquiolite	3	-	-	-	-	-	-
Pneumonia	2	-	-	-	-	-	-
Broncoespasmo	2	-	-	-	-	-	-
Asma	2	-	-	-	-	1	-
Broncodisplasia	1	-	-	-	-	-	-
Resfriado comum	1	-	-	-	-	-	-
Hipertensão	-	-	-	4	7	13	-
Sinusite	-	-	-	2	1	5	-
Rinite alérgica	-	-	-	2	-	10	-
Diabetes	-	-	-	-	-	1	-
Aids/pneumonia	-	-	-	1	-	-	-
Sinusite/rinite	-	-	-	-	-	3	-
Hipertensão e cardiopatia	-	-	-	1	1	1	-
Hipertensão/car/diab/pneumo	-	-	-	1	-	-	-
Hipertensão/ rinite	-	-	-	-	2	1	-
Hipertensão/sinusite	-	-	-	-	1	-	-
Hipertensao/bronquite	-	-	-	-	-	1	-
Hipertensão/Diabetes	-	-	-	-	-	2	-
Hipertensão/diab/Sinus/rinite	-	-	-	-	1	1	-
Diabetes/cardio	-	-	-	-	1	-	-
Diabetes/cardio/hipertensão	-	-	-	-	1	-	-
Diabetes/cardio/pneumo	-	-	-	-	-	1	-
Rinite/talasse	-	-	-	-	-	1	-

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)