ANGELA ESPOSITO FERRONATO

**Identificação de vírus respiratórios em lactentes
internados com suspeita clínica de coqueluche**

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

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Elisabete Vieira

**SÃO PAULO
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ferronato, Angela Esposito
Identificação de vírus respiratórios em lactentes
internados com suspeita clínica de coqueluche /
Angela Esposito Ferronato. -- São Paulo, 2017.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.
Orientadora: Sandra Elisabete Vieira.

Descritores: 1.Coqueluche 2.Bordetella pertussis
3.Vírus 4.Sinais e sintomas 5.Codeteção

USP/FM/DBD-431/17

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar. Mas
o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

Madre Teresa de Calcutá

“Aos meus filhos, Giovanni e Roberta, ao meu esposo Roberto, ao meu pai Adolfo (in memoriam) e à minha mãe, Anisia, com muito amor”.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Sandra Elisabete Vieira, pela dedicação a este trabalho, carinho, paciência e confiança.

Ao Prof. Dr. Alexandre Ferraro, pela ajuda na elaboração e análise estatística desta tese.

Ao Dr. Sérgio Lébeis Nascimento, que me mostrou o verdadeiro prazer em ensinar pediatria, meu mestre e amigo de sempre.

Ao Prof. Dr. Alfredo Elias Gilio, Diretor da Divisão de Pediatria do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, pelo incentivo e confiança.

A todos os meus colegas de trabalho do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, principalmente às amigas Dra. Denise Swei Lo e Dra. Débora Moraes Cardoso e ao colega e amigo Dr. Maki Hirose.

A toda equipe de enfermagem do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, pelo incentivo e carinho.

À Daniela Leite, pesquisadora científica, coordenadora do Laboratório de Referência Nacional para Pertussis do Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais (NDEI), Centro de Bacteriologia - Instituto Adolfo Lutz, pela realização dos exames de PCR e auxiliar na elaboração desta tese.

Às minhas amigas Dra. Ana Paula Ferrer e Dra. Maria Inês Nantes, pelo carinho e amizade durante minha caminhada.

De maneira especial aos meus filhos, Giovanni e Roberta, que fazem a vida valer cada minuto e que me ensinaram que podemos fazer muito, mesmo com pouco tempo.

Ao Roberto Ferronato, meu companheiro, esposo e amigo pelo carinho e incentivo.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de quadros	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Lista de gráficos	
Resumo	
Abstract	

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos Históricos da Coqueluche	3
1.2	Aspectos Microbiológicos da Coqueluche	5
1.3	Mecanismos de Patogenicidade da Coqueluche	6
1.4	Epidemiologia da Coqueluche	8
1.5	Aspectos Clínicos, Diagnósticos, Manejo e Diagnósticos Diferenciais da Coqueluche	20
1.5.1	Manifestações clínicas da coqueluche	20
1.5.2	Diagnóstico etiológico na coqueluche	21
1.5.3	Definição de caso suspeito e confirmado de coqueluche pelo Ministério da Saúde	23
1.5.3.1	Definição de caso suspeito de coqueluche pelo Ministério da Saúde	23
1.5.1.2	Definição de caso confirmado de coqueluche pelo Ministério da Saúde	24
1.5.4	Manejo do paciente com suspeita clínica de coqueluche	26
1.5.5	Vigilância epidemiológica	29
1.5.6	Diagnósticos diferenciais de coqueluche	31
1.6	Infecções por Vírus Respiratório que Podem Mimetizar a Coqueluche	33
1.7	Identificação Etiológica dos Pacientes com Suspeita de Coqueluche no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP)	35
1.8	Justificativa do Estudo	37
1.9	Hipóteses	38
2	OBJETIVOS	39
2.1	Objetivo Geral	40
2.2	Objetivos Específicos	40
3	MÉTODOS	41
3.1	Delineamento do Estudo	44
3.2	Procedimentos Laboratoriais Realizados na Identificação de Vírus Respiratórios por Imunofluorescência Indireta	45

3.3	Procedimentos Laboratoriais Realizados para a Identificação de <i>Bordetella pertussis</i> Por Meio de Cultura de Aspirado de Nasofaringe	45
3.4	Procedimentos Laboratoriais Realizados para Identificação de <i>Bordetella pertussis</i> em Secreção de Nasofaringe por PCR em Tempo Real	46
3.5	Análise Estatística	48
3.6	Considerações Éticas	49
4	RESULTADOS	50
5	DISCUSSÃO	60
5.1	Limitações do Estudo	71
6	CONCLUSÕES	73
7	ANEXOS	76
8	REFERÊNCIAS	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACIP	- <i>Advsory Committe Immunizations Practices</i>
ACT	- Toxina adenilato ciclase
AMP	- Monofosfato cíclico de adenosina
BP	- <i>Bordetella pertussis</i>
BP(+)	<i>Bordetella pertussis</i> identificada
BP+VR	- Codetecção de <i>Bordetella pertussis</i> e vírus respiratório
Bvg	- <i>Bordetella</i> virulence gene
BvgA	- <i>Berdetella</i> virulence gene A
BvgS	- <i>Berdetella</i> virulence gene S
CDC	- <i>Centers of Disease Control and Prevention</i>
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
CT	- Citotoxina traqueal
CTAI	- Comitê Técnico Assessor em Imunizações
CVE	- Centro de Vigilância Epidemiológica
DATASUS	- Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DCP	- Divisão de Clínica Pediátrica
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DP	- Desvio padrão
DTP	- Vacina contra difteria, tétano e pertussis (tríplice bacteriana)
DTP+Hib	- Vacina contra difteria, tétano, pertussis e <i>Haemophilus influenzae</i> (quadrivalente)
DTP+Hib+Hep	- Vacina contra difteria, tétano, pertussis, <i>Haemophilus influenzae</i> e Hepatite B (pentavalente)
DTPa	- Vacina contra difteria, tétano e pertussis acelular
dTpa	- Vacina contra difteria, tétano e pertussis acelular para adultos
DTPw	- Vacina contra difteria, tétano e pertussis com células inteiras
ECDC	- <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
ECMO	- Oxigenação por membrana extracorpórea
EUA	- Estados Unidos da América
FHA	- Hemaglutinina filamentosa

FIM	- Fímbria
GPI	- Global Pertussis Initiative
HLT	- Toxina termo-lábil ou dermonecrótica
HU-USP	- Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
IAL	- Instituto Adolfo Lutz
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFD	- Imunofluorescência direta
IFI	- Imunofluorescência indireta
MD	- Média
NO	- Óxido nítrico
OMS	- Organização Mundial da Saúde
OR	- Razão de chances (<i>Odds Ratio</i>)
PCR	- Reação de cadeia de polimerase
PCR-TR	- Reação de cadeia de polimerase em tempo real
PRN	- Pertactina
ptxS1	- Toxina pertussis - Subunidade 1
RL	- <i>Regan-Lowe</i>
RT_PCR	- <i>Reverse transcriptase</i> - Reação de Cadeia de Polimerase
RU	- Reino Unido
SINAN	- Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SP	- São Paulo
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TP	- Toxina Pertussis
USP	- Universidade de São Paulo
UTI	- Unidade de terapia intensiva
UTIP	- Unidade de terapia intensiva pediátrica
VPM	- Ventilação pulmonar mecânica
VPMI	- Ventilação pulmonar mecânica invasiva
VR (+)	- Pesquisa viral positiva para qualquer vírus
VSR	- Vírus sincicial respiratório

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Cobertura vacinal das gestantes com dTpa nas diferentes regiões do Brasil no ano de 2015 e 2016.....	15
Quadro 2 - Antibiótico recomendado para tratamento da coqueluche	27
Quadro 3 - Distribuição dos casos suspeitos de BP por ano	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas dos 59 pacientes estudados	53
Tabela 2 - Características laboratoriais e evolutivas dos 59 pacientes estudados	54
Tabela 3 - Características clínicas e demográficas dos pacientes com agente único identificado.....	55
Tabela 4 - Características laboratoriais e evolutivas dos pacientes com agente único identificado.....	56
Tabela 5 - Análise bivariada da associação de características clínicas, demográficas e evolutiva com a identificação de BP e de VR	56
Tabela 6 - Análises multivariadas das associações entre características clínicas, demográficas e evolutiva dos pacientes com identificação de BP e de VR	57
Tabela 7 - Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN das características clínicas para identificação de <i>Bordetella pertussis</i>	57
Tabela 8 - Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN das características clínicas para identificação de vírus respiratórios	57
Tabela 9 - Análise descritiva das características clínicas, demográficas, laboratoriais e evolutivas dos pacientes com codetecção de BP e VR	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Linha do tempo com aspectos históricos da coqueluche de 1640 a 2003.....	4
Figura 2 - Incidência mundial da coqueluche segundo a Organização Mundial da Saúde.....	8
Figura 3 - Coeficiente de incidência por Coqueluche e cobertura vacinal com (DTP e DTP+HIB), Brasil, 1990 a 2016*	10
Figura 4 - Número de casos confirmados de coqueluche no Brasil entre 2007-2014.....	11
Figura 5 - Óbito por coqueluche no Brasil de 2007-2014.....	11
Figura 6 - Variação do número de casos de coqueluche na Europa de 2010 - 2014.....	16
Figura 7 - Incidência da coqueluche nos EUA entre 1990-2015 por faixa etária	17
Figura 8 - Distribuição de casos confirmados de coqueluche, segundo ano de início dos sintomas e faixa etária no estado de São Paulo, 2010 a 2016.....	18
Figura 9 - Distribuição de casos de óbito por coqueluche, segundo ano de início dos sintomas e faixa etária no estado de São Paulo, 2010 a 2016	18
Figura 10 - Positividade dos métodos diagnósticos para coqueluche conforme evolução da doença.....	22
Figura 11 - Período de transmissibilidade da coqueluche.....	29
Figura 12 - Relação entre os casos notificados, casos positivos para <i>Bordetella pertussis</i> e vírus respiratório de 2009 a 2016	36
Figura 13 - Sazonalidade de <i>Bordetella pertussis</i> no HU-USP de 2009 a 2016	37

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Resultado da pesquisa etiológica nos 59 pacientes estudados	54
Gráfico 2 -	Vírus identificados em secreção de nasofaringe dos pacientes estudados.....	54
Gráfico 3 -	Variação do número de casos segundo o mês da realização da pesquisa etiológica de todos os pacientes estudados, dos BP+ e VR+.....	59

RESUMO

Ferronato AE. *Identificação de vírus respiratórios em lactentes internados com suspeita clínica de coqueluche* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: a coqueluche é uma doença causada pela *Bordetella pertussis* (BP), sendo mais frequente e grave em lactentes menores de um ano de idade. Com a introdução da vacina, houve redução na incidência mundial da doença, porém nos últimos 10 anos observa-se uma recrudescência. Pode apresentar-se de forma menos característica em lactentes, especialmente antes do final do esquema vacinal para o primeiro ano de vida. O quadro clínico, nesses pacientes, pode ser semelhante ao das infecções por vírus respiratórios (VR) que são os agentes etiológicos mais frequentes nas infecções de vias aéreas, nessa faixa etária. São necessários estudos que avaliem a importância da pesquisa de VR em lactentes com suspeita clínica de coqueluche. **Objetivos:** em lactentes com suspeita de coqueluche: identificar as prevalências de BP, VR e codeteções; analisar e comparar as características clínicas e a evolução, segundo a etiologia identificada e analisar o impacto do diagnóstico etiológico sobre o uso de macrolídeos. **Métodos:** estudo de coorte prospectivo, com crianças menores de um ano de idade, hospitalizadas com suspeita clínica de coqueluche entre junho de 2014 e junho de 2016 e submetidas à pesquisa etiológica para identificação de BP (“swab” de nasofaringe para cultura e/ou PCR) e pesquisa de VR (aspirado de nasofaringe para imunofluorescência indireta). Dados clínicos, demográficos e evolutivos foram coletados com o preenchimento de protocolo clínico-laboratorial padronizado. **Resultados:** no período de estudo foram analisados 59 lactentes. Em 18 (30,5%) houve identificação de BP, em 23 (39%) de algum vírus respiratório. Em quatro (7%), houve codeteção de BP e algum VR. O vírus mais frequentemente identificado foi o VSR (73%). As características com maior sensibilidade para o diagnóstico de infecção por BP foram tosse seguida de cianose e ser filho de mãe não vacinada com dTpa. Sibilos e desconforto respiratório apresentaram alta sensibilidade para a identificação de VR. Na análise bivariada apresentaram maior chance de infecção por BP: menor idade (OR = 1,86), ausência de febre (OR = 4,9), não ser vacinado para coqueluche (OR = 4,4), leucocitose superior a 20.000/mm³ (OR = 5,4), linfocitose superior a 10.000/mm³ (OR =

4,0) e de infecção por VR: sibilos (OR = 4,33). Após o ajuste para confundidores, os maiores preditores para BP de forma independente foram: ausência de sibilos (OR = 5,7) e leucocitose superior a 20.000/mm³ (OR = 5,38). O número de pacientes com codeteção não permitiu a análise comparativa de gravidade com aqueles com agente único. Em apenas um paciente o resultado da pesquisa viral positiva resultou em suspensão de macrolídeo. **Conclusão:** além da BP, os VR também foram etiologias frequentes nos lactentes com suspeita clínica de coqueluche, além de casos de codeteção de BP e VR. Foram identificadas características clínicas/laboratoriais sugestivas, porém não patognomônicas das etiologias identificadas o que corrobora a necessidade da pesquisa etiológica para VR, nessa situação clínica.

Descritores: coqueluche; *Bordetella pertussis*; vírus; sinais e sintomas; codeteção

ABSTRACT

Ferronato AE. *Identification of respiratory viruses in hospitalized infants with suspected clinical pertussis* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Introduction: Pertussis is a disease caused by *Bordetella pertussis* (BP), being more frequent and severe in infants less than one year old. After vaccine introduction, there was a reduction in the global incidence of the disease, but in the last ten years there was a resurgence. It may present less characteristically in infants, especially before the end of the vaccine scheme for the first year of life. The clinical picture in these patients may be similar to that of respiratory virus infections (RV), which are the most frequent etiologic agents in airway infections in this age group. Studies is necessary to evaluate the importance of RV research in infants with clinical suspicion of pertussis. **Objectives:** In infants with suspected pertussis: identify the prevalence of BP, VR and codetections; analyze and compare the clinical characteristics and evolution according to the identified etiology and analyze the impact of the etiological diagnosis on the use of macrolides. **Methods:** A prospective cohort study with children under one year of age hospitalized with suspected clinical pertussis between June 2014 and June 2016 and submitted to etiological research to identify BP (nasopharynx swab for culture and/or PCR) and VR (nasopharyngeal aspirate for indirect immunofluorescence). Clinical, demographic and evolution data were collected with the completion of a standardized clinical-laboratory protocol. **Results:** During the study period, 59 infants were analyzed. In 18 (30.5%) there was identification of BP, in 23 (39%) of some respiratory virus. In four (7%), there was BP detection and some RV. The virus most frequently identified was RSV (73%). The characteristics with greater sensitivity for the diagnosis of BP infection were cough followed by cyanosis and the mother's non-vaccinated dTpa. Wheezing and respiratory distress presented high sensitivity for RV identification. In the bivariate analysis they presented a greater chance of BP infection: lower age (OR = 1.86), absence of fever (OR = 4.9), not being vaccinated for pertussis (OR = 4.4), leukocytosis higher than 20,000/mm³ (OR = 5.4), lymphocytosis greater than 10,000/mm³ (OR = 4.0) and RV infection: wheezing (OR = 4.33). After adjustment for confounders, the largest predictors for BP independently were: no wheezing

(OR = 5.7) and leukocytosis higher than 20,000/mm³ (OR = 5.38). The number of patients with codetection did not allow the comparative analysis of severity with those with single agent. In only one patient, the result of positive viral research resulted in macrolide suspension. Conclusion: In addition to BP, RVs were also frequent etiologies in infants with clinical suspicion of whooping cough, as well as cases of BP and VR codetection. Clinical/laboratory characteristics suggestive, but not pathognomonic, of the identified etiologies have been identified, which corroborates the need for etiological research for RV in this clinical situation.

Descriptors: whooping cough; *Bordetella pertussis*; virus; signs and symptoms; codetection

1 INTRODUÇÃO

A coqueluche, também conhecida como tosse comprida, é uma doença infecciosa aguda, causada pela bactéria *Bordetella pertussis* (BP), que acomete o trato respiratório e tem como principal característica clínica a presença de tosse seca paroxística de forte intensidade¹⁻².

A coqueluche é altamente contagiosa, de rápida transmissão infectando 80%-90% dos comunicantes não imunizados. É atualmente uma das doenças imunopreveníveis de maior incidência no mundo, podendo acometer indivíduos de qualquer faixa etária, porém é mais frequente e grave em lactentes que não completaram a série de vacinação preconizada para o primeiro ano de vida. Cerca de 9% dos pacientes acometidos desenvolvem doença grave com necessidade de hospitalização, especialmente durante o primeiro semestre de vida. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a coqueluche é uma das 10 causas mais comuns de morte por doença infecciosa no mundo. Ocorrem mais de 350.000 óbitos anualmente, principalmente de lactentes jovens que não completaram a imunização¹⁻⁴. Nos Estados Unidos da América (EUA), estima-se que mais da metade das crianças menores de um ano infectadas com a BP necessitem de internação e que entre elas, uma em cada cem destas morrem devido à coqueluche⁵⁻⁶.

1.1 Aspectos Históricos da Coqueluche

A primeira descrição da doença ocorreu em 1640, quando Guillermo de Baillou relatou as manifestações clínicas da doença que causava tosse convulsiva nos pacientes, conhecida como “quinta” ou “Quintana” e foi responsável por uma grande epidemia que ocorreu em Paris em 1578⁷. Estima-se que a origem da BP tenha sido na África ou Índia e a entrada da mesma no continente Europeu tenha ocorrido por volta de 1400⁸. Somente em 1906 Jules Bordet e Octave Gengou identificaram a *Bordetella pertussis* como agente causador da coqueluche, que havia sido inicialmente denominada *Haemophilus pertussis*⁹.

A primeira vacina de células inteiras foi produzida por Thorvald Madsen, em 1926, na Dinamarca, composta por uma suspensão de *B. pertussis*, provando assim, que a doença era imunoprevenível¹⁰. Posteriormente, Pearl Kendrick combinou a vacina de células inteiras para pertussis juntamente com a vacina para diphteria e tetátano, dando origem à vacina DTPw (Diphteria, Tétano, Pertússis de células inteiras)¹⁰.

Essa vacina, a tríplice bacteriana, passou a ser aplicada em programas de vacinação a partir dos anos 1950, fazendo com que o número de casos de coqueluche diminuísse de maneira significativa no mundo^{11,12}.

No Brasil, a vacinação contra a coqueluche, teve início com a vacina Tríplice Bacteriana, DTPw em 1968³.

A vacina de células inteiras ou vacina celular (Pw) é considerada muito reatogênica, com descrição de vários efeitos colaterais que vão desde irritação local, febre, crises convulsivas e alterações neurológicas¹³.

Na tentativa de reduzir estes efeitos colaterais, a partir da década de 1980 foram elaboradas as vacinas acelulares, compostas por diferentes fatores de virulência da BP, sendo a toxina pertussis (TP) o único componente comum a todas as versões. A vacina acelular foi introduzida inicialmente no Japão e por ser menos reatogênica, foi gradativamente substituindo a vacina de células inteiras em vários outros países^{4,10,14-16}.

Com o avanço dos estudos das estruturas moleculares das bactérias, em 2003 o genoma da BP foi totalmente sequenciado por Parkhill *et al.*¹⁷, representando um grande avanço na compreensão da fisiopatologia e epidemiologia da doença^{12,17}. A Figura 1 mostra a evolução histórica da coqueluche na linha do tempo.

DPTw (tríplice bacteriana com pertussis de células inteiras).

Fonte: Cone⁷; Octave⁹; Baker e Katz¹⁰; Guiso¹²; Bordet e Sato *et al.*¹⁴; McCormick e Czachor¹⁵; Cherry¹⁶; Parkhill *et al.*¹⁷

Figura 1 - Linha do tempo com aspectos históricos da coqueluche de 1640 a 2003

1.2 Aspectos Microbiológicos da Coqueluche

A *Bordetella pertussis*, pertence ao gênero *Bordetella sp*, grupo de bactérias Gram-negativas, estritamente aeróbias, que apresentam similaridade entre si. Foram descritas as seguintes espécies associadas ao Gênero *Bordetella*: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii* e *B. trematum*. A *B. pertussis* é restrita aos seres humanos. A *B. parapertussis* pode infectar seres humanos de maneira menos frequente, causando quadros clínicos semelhantes ao da coqueluche, porém com menor gravidade, são também associadas à infecção em carneiros. A *B. bronchiseptica* é rara nos seres humanos, sendo frequente em animais como os cães, macacos, coelhos, suínos e cavalos. As *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* e *B. holmesii*, causam doença respiratória que envolvem destruição do epitélio ciliar com morte destas células em seres humanos e outros mamíferos. As demais espécies que compõem o gênero *Bordetella*, não provocam doença respiratória e podem ser identificadas em animais e muito raramente causam doença em pacientes imunodeprimidos^{4,18}.

Os principais fatores de virulência da BP podem ser classificados em adesinas e toxinas. As adesinas são a hemaglutinina filamentosa (FHA), a pertactina (PRN), e duas adesinas fimbrias (FIM2 e FIM3) e as toxinas são a toxina pertussis, citotoxina traqueal (CT), toxina dermonecrótica ou toxina termo-lábil (HLT) e toxina adenilato ciclase (ACT), além do lipopolissacáride da parede^{4,18}.

A vacina acelular contra pertussis licenciada em alguns países é composta de cinco componentes antigênicos: hemaglutinina filamentosa (FHA), fímbrias 2 e 3, pertactina e toxina pertussis inativada. Outra formulação é feita com três componentes: pertactina, HFA e toxina pertussis inativada, sendo a apresentação licenciada no Brasil¹⁹.

1.3 Mecanismos de Patogenicidade da Coqueluche

Atualmente, com o avanço em biologia molecular, foi possível caracterizar parcialmente, os componentes patogênicos da bactéria^{12,17}.

A transmissão ocorre de pessoa para pessoa por meio de gotículas respiratórias contaminadas com a bactéria, sendo altamente contagiosa¹⁸.

As lesões orgânicas são causadas pelas toxinas liberadas pela BP após a adesão da mesma, não ocorrendo invasão da submucosa ou corrente sanguínea na maioria das vezes. O evento inicial é a adesão da bactéria no epitélio respiratório, principalmente nas células ciliadas. Sete proteínas participam facilitando este processo: FIM, TP, FHA e PRN. Existe a redundância funcional destas proteínas, sendo que a perda de uma delas pode ocorrer sem alterar a adesão, explicando porque a imunização pode não prevenir a colonização^{1,4,12}.

O escape da resposta imune é facilitado especialmente pela toxina adenilato ciclase. Esta toxina entra nos neutrófilos aumentando a produção de monofosfato cíclico de adenosina (AMP) cíclico, inibindo a fagocitose e a atividade de células *natural Killer*^{1,4,8}.

A destruição das células ciliadas do epitélio respiratório se deve principalmente pela ação da citotoxina traqueal e em menor grau pela adenilato ciclase. Os efeitos citopáticos são específicos sobre as células ciliadas, produzindo destruição de *tight junctions*, edema mitocondrial e destruição das células ciliadas. Esta grande destruição epitelial pode ser devido à produção de interleucinas 1- α , estimulada diretamente pela CT em células não ciliadas produtoras de muco que estimularia a expressão de óxido nítrico sintetase. O óxido nítrico (NO) levaria a dano em células ciliadas. A principal toxina produzida pela BP é a TP, ou pertussinógeno, que é responsável pelas alterações sistêmicas associadas à infecção como a leucocitose, hipoglicemia (aumento de insulina) e sensibilização à histamina. Tem um papel importante na promoção de infecção nas vias respiratórias por supressão e modulação da resposta imune e inflamatória do hospedeiro. Outros efeitos da TP é o bloqueio de receptores α -2 adrenérgico e os receptores dopaminérgicos, responsáveis em parte pela resistência a catecolaminas observada nos casos graves. É responsável pelo aumento de leucócitos com aumento periférico de neutrófilos e linfócitos^{1,4}.

Esses fatores de virulência não estão expressos durante todas as fases da infecção. A expressão desses fatores é controlada por um sistema chamado *Bordetella virulence gene* (bvg). Esse sistema de transdução de sinais é composto por partes (*Bordetella virulence gene A*) *BvgA* e (*Bordetella virulence gene S*) *BvgS*. O *BvgS* é um sensor transmembrana, composto por quatro segmentos, no qual se autofosforila e modula a ativação do *BvgA*. A *BvgA* quando fosforila se liga ao ácido

desoxirribonucleico (DNA) e é capaz de promover ou inibir a transcrição de determinados genes. Por meio desse sistema, pelo menos três fases fenotípicas da BP podem ser identificadas em resposta as mudanças ambientais, com a regulação de expressão de seus fatores de virulência^{4,20}.

1.4 Epidemiologia da Coqueluche

Após a introdução da vacina de células inteiras na década de 1930, houve uma redução significativa do número de casos de coqueluche no mundo, com redução do número de mortes pela doença. Após esta redução, a incidência da coqueluche manteve-se endêmica com surtos epidêmicos em vários países. Com a introdução da vacina acelular, não houve nova redução na incidência da doença^{11,12}. A Figura 2. Mostra a representação gráfica com a incidência mundial de coqueluche pela OMS.

Fonte: WHO¹¹

Figura 2 - Incidência mundial da coqueluche segundo a Organização Mundial da Saúde

O Programa Nacional de Imunização (PNI) teve início no Brasil em 1973 e houve grande sucesso na cobertura vacinal em todo país. No início da década de 1980, foram notificados mais de 40 mil casos anuais de coqueluche, com um coeficiente de incidência superior a 30 casos/100.000 habitantes. A partir de 1983 foi iniciada a vacinação sistemática para coqueluche, com redução acentuada da incidência da doença no país. Em 1990 foram notificados 15.329 casos e a partir de 1996 o número de casos anuais não ultrapassou 2000 casos por ano com um coeficiente de incidência em torno de 1/100.000 habitantes por ano³.

A vacinação contra pertussis é realizada, atualmente, com a utilização de vacinas com células inteiras (Pw), sendo um dos componentes da vacina Pentavalente que pelo PNI é indicada a partir dos dois meses e repetida aos quatro e aos seis meses de idade. As doses de reforços são realizadas com a vacina tríplice bacteriana (DPTw) aos 15 meses e entre os quatro e cinco anos de idade. A taxa de cobertura vacinal tem permanecido elevada, em aproximadamente 80% para crianças de um a 12 anos de idade (Figura 3)²¹⁻²³.

Devido ao aumento do risco de causar efeitos colaterais de maior gravidade a vacina de células inteiras é contraindicada após os sete anos de idade. O aparecimento dos efeitos colaterais graves também contraindica as próximas doses com Pw em qualquer idade. Para esses pacientes, recomenda-se a vacina acelular (Pa)²⁴. Muitas clínicas particulares disponibilizam a vacina acelular (Pa) com a finalidade de evitar tais efeitos já na primeira dose¹⁹.

Fonte: CGDT/DEVEP/SVS/MS Em 2013, 2014 e 2015 - vacina pentavalente
 CGPNI/DEVEP/SVS/MS
 População: IBGE/DATASUS
 * dados sujeitos à revisão²²

Figura 3 - Coeficiente de incidência por Coqueluche e cobertura vacinal com (DTP e DTP+HIB), Brasil, 1990 a 2016*

Mais recentemente, tem se observado uma variação na incidência de coqueluche no país. Segundo dados registrados no Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), em 2012 foram notificados 15.428 casos suspeitos de coqueluche, desses 4.453 (28,9%) foram confirmados, representando um aumento de 97% em relação ao mesmo período de 2011, quando foram confirmados 2.258 casos. Entre menores de um ano de idade, dos 2.924 casos em 2012, 85% ocorreram durante o primeiro semestre de vida^{3,25}.

Em 2014 foram confirmados 8.702 casos de coqueluche, sendo 5.162 em menores de um ano com 130 mortes²⁶. As Figuras 4 e 5 mostram este aumento na incidência da doença e óbito por coqueluche.

Fonte: Ministério da saúde/SVS- Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net²⁶

Figura 4 - Número de casos confirmados de coqueluche no Brasil entre 2007-2014

Fonte: Ministério da saúde/SVS- Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net²⁶

Figura 5 - Óbito por coqueluche no Brasil de 2007-2014

De fato, o aumento acentuado na incidência dos casos de coqueluche, nos últimos 10 anos, tem sido observado em diversos países desenvolvidos da Europa, assim como nos Estados Unidos e no Japão^{6,8,11}. Em 2010, foram registrados 27.550 casos de coqueluche nos Estados Unidos da América (CDC/Atlanta/EUA), já em 2012 foi registrado um aumento significativo, sendo notificado mais de 41.000 casos²⁷.

Houve um aumento da notificação de casos também entre adolescentes e adultos, que tendem a permanecer como reservatórios da

bactéria, podendo transmitir a doença. Estes comumente apresentam sintomas inespecíficos de doença do trato respiratório, caracterizados principalmente por tosse prolongada, dificultando o diagnóstico^{1,28}.

Vários fatores podem estar relacionados ao aumento na incidência da coqueluche no mundo, destacando-se cinco principais hipóteses^{12,19,29-31}.

- a) Aumento no reconhecimento da doença, por ser mais discutida e ter aumentado a notificação. Em 2001 foi criado o “Global Pertussis Initiative” (GPI) com mais de 30 membros de 16 países com a finalidade de estudar e identificar estratégias para controle da coqueluche no mundo^{30,32-35}.
- b) Melhora na sensibilidade dos exames laboratoriais disponíveis para o diagnóstico, como a utilização de técnicas moleculares [reação de cadeia de polimerase (PCR)] para identificação da *Bordetella* por vários países e a utilização de sorologia para adultos e adolescentes³⁶⁻³⁸.
- c) A eficácia das vacinas, tanto a de células inteiras, como a acelular é de aproximadamente 80% e diminui com o passar do tempo, pois não conferem imunidade duradora, porém a vacina acelular confere imunidade por menor tempo, podendo ter menor eficácia e não prevenir a colonização das vias aéreas segundo alguns autores^{2,19,39-41}.
- d) Evolução genotípica da BP com aparecimento de variantes que diferenciam as BP da era pré e pós-vacinal, também pode ser responsável por quadros clínicos de maior gravidade e menor

proteção conferida pela vacina tanto as formulações de células inteiras como as acelulares. Essa evolução pode ter sido influenciada pelas vacinas utilizadas^{12,19,42,43}.

Após o aumento na incidência mundial de coqueluche, várias estratégias foram propostas e realizada por diferentes países para controle da doença. As estratégias têm a finalidade de reduzir a incidência da coqueluche principalmente nos primeiros meses de vida, onde a doença tende a ser mais grave e fatal^{2,34}.

A vacinação de todos os contatos próximos ao recém-nascido, como as puérperas, os familiares, cuidadores e profissionais de saúde, conhecida como estratégia “cocoon” ou “cocooning” (casulo), tem a finalidade de impedir que as pessoas que têm contato próximo com o recém-nascido se contamine e transmitam a doença, sendo que em 75% dos casos de coqueluche a fonte de contato é algum membro da família, principalmente os pais⁴⁴. Essa estratégia foi recomendada e implantada com sucesso em vários países em todo o mundo, como nos Estados Unidos (2006), Austrália (2006) e França (2007)⁴⁵⁻⁴⁷.

A vacinação das gestantes com a finalidade de proteger o recém-nascido com a passagem de anticorpos por via transplacentária é a estratégia que tem se mostrado mais promissora e eficaz. Essa estratégia foi aprovada pela Organização Mundial da Saúde, especialistas do *Advsory Committe Immunizations Practices* (ACIP) - EUA, do *American College of Obstetricians and Gynecologist*, da *American Academy of Pediatrics* dos EUA e do Comitê Técnico Assessor em Imunizações (CTAI) do Programa

Nacional de Imunização (PNI). A recomendação dessas instituições é a vacinação de todas as gestantes com o componente pertussis (acelular), a partir da 27^a até a 36^a semana de gestação e deve ser repetida nas próximas gestações, com a finalidade de reduzir a morbidade e a mortalidade em crianças menores de seis meses^{19,48-51}. Estudos anteriores mostraram que os altos títulos de anticorpos produzidos pela mãe após a vacinação, atravessam a barreira placentária e podem ser detectados em nível sérico capaz de garantir proteção no recém-nascido até três meses após o parto⁵². Um ponto de controvérsia é se o alto nível de anticorpos, que atravessam a placenta nas mães vacinadas não reduziria a eficácia da vacina realizada no período pós-natal e qual a relevância clínica desse fato^{52,53}.

A vacinação de gestantes é, atualmente, utilizada como estratégia para reduzir a incidência de coqueluche na Costa Rica, México, Paraguai, Argentina, Chile, Uruguai, Estados Unidos, Alemanha, França, Holanda, Reino Unido e Austrália^{19,53}. Para proteção do RN, além da vacinação para gestantes é importante a vacinação de profissionais de saúde (médicos anestesistas, ginecologistas, neonatologistas, obstetras e pediatras, enfermeiros, técnicos de enfermagem) que trabalhem em maternidades e unidades de internações neonatais. Essa rotina também é utilizada na Bélgica, Austrália, Estados Unidos, Reino Unido e outros¹⁹.

O Reino Unido implantou o programa de vacinação com vacina contra difteria, tétano e pertussis acelular para adultos (dTpa) em gestantes em outubro de 2012, nos anos posteriores, houve acentuada queda de casos e

de hospitalizações por coqueluche em lactentes. Estudo nesse país, também mostrou que a proteção estimada até três meses de vida para essa doença foi de 91%, quando a vacina é aplicada até 28 dias antes do parto⁵⁴.

No Brasil a vacinação para gestantes tem sido recomendada pelo Ministério da Saúde a partir de outubro de 2014. A recomendação inicial foi de uma dose de dTpa entre a 27ª e a 36ª semana de gestação. Em 2017 as novas recomendações ampliaram esse período para entre a 20ª e 36ª semana, devendo ser repetida a cada gestação. Se a mãe não receber a vacina nesse período, ela poderá ser vacinada, junto com familiares e comunicantes do recém-nascido (estratégia casulo) até 40 dias após o parto^{50,55}. Também há recomendação de vacinação para todos os profissionais de saúde que têm contato com recém-nascidos e lactentes⁵⁰.

No Brasil a taxa de cobertura vacinal da gestante em 2015 foi de 40,36%, sendo diferente nas diversas regiões do país. O Quadro 1 mostra a cobertura vacinal de dTpa em gestante, nas diferentes regiões do país⁵⁶.

Quadro 1 - Cobertura vacinal das gestantes com dTpa nas diferentes regiões do Brasil no ano de 2015 e 2016

Região	Cobertura vacinal das gestantes	
	2015	2016
Norte	23,85%	28,30%
Nordeste	41,37%	36,28%
Sudeste	50,72%	32,37%
Sul	26,03%	30,00%
Centro Oeste	31,74%	45,70%
Total	40,36%	33,81%

Fonte: Brasil⁵⁶

No estado de São Paulo, no ano de 2015 a taxa de cobertura vacinal foi de 61,11%, em 2016 foi de apenas 26%. Na cidade de São Paulo as taxas, nos anos de 2015 e 2016 foram respectivamente 69 e 31,39%⁵⁷.

No Reino Unido cerca de 70% das gestantes são vacinadas e a recomendação é que as gestantes recebam a vacina acelular entre a 16ª e 32ª semana de gestação, pois os anticorpos produzidos pela mãe atinge um pico em duas semanas após a vacina. Este intervalo seria o ideal para maximizar a passagem de anticorpos para o recém-nascido⁵⁸.

Na Europa, dados publicados na *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) mostram uma tendência a queda na incidência da doença, após o ano de 2012, mas ainda com taxas elevadas em relação aos anos anteriores a 2010 (Figura 6)⁵⁹.

Relatório dos países: Áustria, Chipre, República Checa, Dinamarca, Estónia, Finlândia, França, Grécia, Hungria, Irlanda, Itália, Letónia, Lituânia, Malta, Países Baixos, Noruega, Polónia, Portugal, Roménia, Eslováquia, Eslovénia, Espanha, Suécia, Reino Unido.

Fonte: European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2015. Pertussis. Stockholm: ECDC; 2016⁵⁹

Figura 6 - Variação do número de casos de coqueluche na Europa de 2010 - 2014

Nos Estados Unidos, levantamento do *Centers of Disease Control and Prevention* (CDC), até 2015, ainda mostra elevada incidência de coqueluche (Figura 7)⁶⁰.

Fonte: CDC, Notifiable Disease Surveillance system and Supplemental Pertussis Surveillance System⁶⁰

Figura 7 - Incidência da coqueluche nos EUA entre 1990-2015 por faixa etária

Dados nacionais mostram que o ano de 2013 e 2014 foram os anos de maior incidência da coqueluche com tendência a queda nos anos seguintes (Figura 3)⁶¹.

No estado de São Paulo, dados da vigilância epidemiológica também mostram uma tendência a queda do número de casos a partir de 2015, após um aumento significativo do número de casos confirmados e óbitos por coqueluche até o ano de 2014, principalmente em menores de um ano de idade (Figura 8 e 9)⁶².

Fonte: SINANW/SINANNET/SIM/DDTR/CVE/CCD/SES-SP⁶²

Figura 8 - Distribuição de casos confirmados de coqueluche, segundo ano de início dos sintomas e faixa etária no estado de São Paulo, 2010 a 2016

Fonte: SINANW/SINANNET/SIM/DDTR/CVE/CCD/SES-SP⁶²

Figura 9 - Distribuição de casos de óbito por coqueluche, segundo ano de início dos sintomas e faixa etária no estado de São Paulo, 2010 a 2016

As maiores taxas de letalidade da coqueluche se concentram nos menores de um ano de idade, principalmente menores de dois meses que ainda não receberam nenhuma dose da vacina. No ano de 2015 no Brasil, a coqueluche apresentou uma letalidade de 0,9, porém em menores de dois meses a letalidade foi de 1,7⁶¹.

É no estado de São Paulo que se concentra o maior número de casos notificados de coqueluche. Em 2012 foram confirmados 1.912 casos, com 26 mortes, representando um aumento de quase oito vezes o número de mortes que ocorreram nos anos anteriores. Todas as mortes foram em menores de seis meses^{19,62}.

A redução significativa do número de casos em 2015 e a mesma tendência vista em 2016, pode ter sofrido o impacto do início da vacinação para gestantes implantada pelo governo brasileiro a partir de outubro de 2014⁵⁰. A taxa de cobertura vacinal de gestante com dTpa é diferente nas diversas regiões do país, não podendo ser considerada o único fator responsável por esta tendência de queda na incidência de coqueluche. A história natural da infecção pela *Bordetella pertussis* e o surgimento de variantes genóticas da bactéria também podem ter contribuído para as tais variações^{1,12,17-19,42}. Trabalho nacional mostrou que a BP que circula atualmente no Brasil é genotipicamente diferente da BP que circulava antes da era da pré-vacina⁶³.

1.5 Aspectos Clínicos, Diagnósticos, Manejo e Diagnósticos Diferenciais da Coqueluche

1.5.1 Manifestações clínicas da coqueluche

Na forma clássica, após o período de incubação que varia de sete a 10 dias, a coqueluche é caracterizada por três estágios: **catarral ou prodrômico**, com duração média de uma a duas semanas, **paroxístico** de uma a seis semanas e de **convalescência** que pode durar de duas semanas a vários meses. A fase prodrômica é caracterizada por sintomas inespecíficos de tosse, coriza e febre que, quando presente, é baixa. Na fase paroxística a tosse torna-se mais frequente com aparecimento da tosse paroxística que pode ser acompanhada de guincho inspiratório e, frequentemente, de vômitos e cianose o que é característico desta fase^{1,3,4}. Na fase de convalescência a tosse fica menos intensa e o número de acessos também diminui, podendo se intensificar se houver nova infecção respiratória por outro agente, como os vírus respiratórios. Nos lactentes jovens, a sintomatologia pode não ser tão característica, podendo mimetizar outras doenças respiratórias como as infecções por vírus respiratórios^{1-4,64}.

Nos neonatos e lactentes com vacinação incompleta, o quadro clínico tende a ser mais grave, com elevadas taxas de complicações e mortalidade de aproximadamente 1%^{1,4}. A complicação mais frequente é a pneumonia, que é associada à falência respiratória, hiperleucocitose e hipertensão pulmonar. A maioria dos casos fatais de coqueluche ocorre em menores de um ano. Estudos mostraram que a presença de leucocitose acima de 100.000 mm³ e a presença de crise convulsiva, tem correlação com evolução grave da coqueluche⁶⁵.

Em pacientes maiores, imunizados a doença pode se apresentar de forma subclínica e variada, podendo apresenta-se até de maneira assintomática. Estudos de soroprevalência mostram que ocorrem muitos mais casos do que os notificados^{38,66}.

1.5.2 Diagnóstico etiológico na coqueluche

O diagnóstico etiológico da infecção por *Bordetella pertussis* pode ser feito pela identificação da bactéria em cultura, por métodos sorológicos, identificação de antígenos bacterianos por testes de imunofluorescência e métodos moleculares^{1-4,67}.

A positividade de cada método varia conforme a sensibilidade e o período de evolução da doença, sendo a cultura e os métodos moleculares positivos entre a primeira e segunda semana de doença. Os métodos sorológicos positivam mais tardiamente e permanecem positivos por mais tempo (Figura 10)⁶⁷.

A identificação de antígenos bacterianos não é utilizada de rotina, para diagnóstico de coqueluche, na maioria dos serviços e apresentam resultados variados quanto a sensibilidade e especificidade^{4,2,36,68}.

Estudo nacional mostrou a importância dos testes sorológicos na identificação da doença em adolescentes e adultos, que apresentam quadro clínico menos típico e em fase mais tardia da doença³⁸.

Fonte: van der Zee A, et al. Clin. Microbiol. Rev. 2015;28:1005-1026⁶⁷

Figura 10 - Positividade dos métodos diagnósticos para coqueluche conforme evolução da doença

O isolamento por cultura é considerado padrão ouro para o diagnóstico de coqueluche. A secreção é obtida por *swab* ou aspirado de secreção de nasofaringe, sendo transportada em meio de transporte e posteriormente colocada em cultura específica³. A especificidade da cultura é alta, porém a sensibilidade depende de vários fatores relacionados ao laboratório, paciente e aspectos microbiológicos, assim a sensibilidade é variável, especialmente na população com quadro clínico atípico³⁶. Os testes moleculares, como o da reação da cadeia de polimerase, são muito adequados para identificar a *Bordetella*, mesmo em pacientes pouco sintomáticos (atípico) e podem permanecer positivo mesmo após início de antibióticos. Estes testes têm sido empregados como alternativa muito promissora pela alta sensibilidade, especificidade e rapidez de detecção, entretanto é uma técnica mais cara que não permite distinguir entre organismos mortos ou viáveis^{37,68}.

1.5.3 Definição de caso suspeito e confirmado de coqueluche pelo Ministério da Saúde

Em 2014 o Ministério da Saúde revisou as definições de caso suspeito e confirmado de coqueluche⁶⁹.

1.5.3.1 Definição de caso suspeito de coqueluche pelo Ministério da Saúde

a) **para menores de seis meses de idade:** todo indivíduo que, independente do estado vacinal, apresente **tosse de qualquer tipo há 10 dias ou mais**, associada a um ou mais dos seguintes sinais e sintomas:

- tosse paroxística (tosse súbita, incontrolável, com cinco a 10 tossidas rápidas e curtas, em uma única expiração);
- guincho inspiratório;
- vômito pós-tosse;
- cianose;
- apneia;
- engasgo.

b) **Para maior ou igual a seis meses de idade:** todo indivíduo que, independente do estado vacinal, apresente **tosse de qualquer tipo há 14 dias ou mais**, associada a um ou mais dos seguintes sinais e sintomas:

- tosse paroxística;
- guincho inspiratório;
- vômitos pós-tosse.

c) todo indivíduo com **tosse por qualquer período** que apresente história de contato próximo com caso confirmado de coqueluche pelo critério laboratorial.

Em situações específicas onde houver forte suspeita clínica da doença, deve ser realizada a coleta de *swab* de nasofaringe e tratamento adequado, mesmo quando não estiverem presentes todos os critérios descritos para a definição de caso suspeito⁶⁹.

1.5.1.2 Definição de caso confirmado de coqueluche pelo Ministério da Saúde

a) **Critério laboratorial:** caso suspeito com isolamento da BP em cultura ou identificação por PCR em tempo real (PCR-TR).

b) **Critério clínico-epidemiológico:** caso suspeito com contato com caso confirmado por critério laboratorial.

c) **Critério clínico:**

Para menores de seis meses de idade: todo indivíduo que, independente do estado vacinal, apresente **tosse de qualquer tipo há 10 dias ou mais**, associada a um ou mais dos seguintes sinais e sintomas:

- tosse paroxística (tosse súbita, incontrolável, com cinco a 10 tossidas rápidas e curtas, em uma única expiração);
- guincho inspiratório;
- vômito pós-tosse;
- cianose;
- apneia;
- engasgo.

Para maior ou igual a seis meses de idade: todo indivíduo que, independente do estado vacinal, apresente **tosse de qualquer tipo há 14 dias ou mais**, associada a um ou mais dos seguintes sinais e sintomas:

- tosse paroxística;
- guincho inspiratório;
- vômitos pós-tosse.

Ao se confirmar ou descartar o caso de coqueluche pelo critério clínico, deve-se analisar, concomitantemente à sintomatologia, a idade, a situação vacinal, o período da tosse associado ao de transmissibilidade (21 dias), o resultado de hemograma, e demais informações disponíveis. Essas variáveis não são excludentes entre si. O hemograma é um exame complementar indicativo, mas não determinante na confirmação ou descarte dos casos suspeitos de coqueluche, pois a situação vacinal pode influenciar no seu resultado⁶⁹.

É considerado **caso descartado** todo caso suspeito que não se enquadre em nenhuma das situações descritas para caso confirmado⁶⁹.

A relação entre casos suspeitos e confirmados por critério laboratorial varia segundo o local e os métodos laboratoriais utilizados⁷⁰⁻⁷². A implementação de técnica molecular para a confirmação diagnóstica por critério laboratorial, passou a ser rotina no Instituto Adolfo Lutz (IAL) a partir do final de 2009^{37,69}. Entre 2009 e 2011 a porcentagem de confirmação por critério laboratorial, entre os casos notificados como suspeitos, no município de São Paulo variou de 25%-33%⁷².

1.5.4 Manejo do paciente com suspeita clínica de coqueluche

A coqueluche no Brasil é uma doença de notificação compulsória e todo caso suspeito deve ser notificado com o preenchimento da folha do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e coletado material (*swab* de nasofaringe) para pesquisa etiológica com cultura e quando possível o PCR também, que para o estado de São Paulo é realizado, desde 2009 no Instituto Adolfo Lutz. Recomenda-se a realização de radiografia de tórax e coleta de hemograma no qual, na segunda semana de doença pode ser identificada a presença de leucocitose acima de 20.000/mm³ e linfocitose acima de 10.000/mm³ que é característico da doença^{3,25,72}.

A hospitalização é recomendada para os pacientes com maior risco de evolução grave e complicações, como os lactentes menores de três meses de idade, pacientes que apresentem paroxismos severos, antecedência de prematuridade, lactentes com doença de base e episódios de cianose e/ou apneia^{73,74}.

O tratamento baseia-se em medidas de suporte como o repouso para evitar os acessos de tosse, suporte com oxigênio pois durante os acessos podem ocorrer hipoxemias severas, hidratação (oral, por sonda ou parenteral) e para os casos graves com insuficiência respiratória, monitorização e suporte ventilatório em Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP)⁷⁴.

Nenhuma medicação tem eficácia e/ou segurança para ser utilizada no controle dos acessos de tosse⁷⁵.

O tratamento específico é realizado com a utilização de antibióticos, que quando iniciados no período catarral podem reduzir o tempo e a gravidade dos sintomas, porém na grande maioria das vezes o diagnóstico só é feito na fase paroxística, tendo indicação somente para reduzir o tempo de eliminação da BP para o meio e evitar novos casos. Todo paciente hospitalizado com suspeita de coqueluche deve permanecer em isolamento respiratório por gotículas até completar cinco dias de tratamento com macrolídeo. A sensibilidade da BP aos macrolídeos continua elevada no nosso meio, sendo a medicação de escolha a azitromicina, pela facilidade posológica e maior número de estudos que comprovam a eficácia ^{73,74,77}. O Quadro 2 mostra as opções terapêuticas.

Quadro 2 - Antibiótico recomendado para tratamento da coqueluche

Grupo etário	Antimicrobiano recomendado			Alternativa
	Azitromicina	Eritromicina	Claritromicina	Sulfametoxazol (SMZ) Trimetropina (TMP)
< 1 mês	10mg/kg/dia DUD, por 5 dias	40-50 mg/kg/dia 6/6 horas, por 14 dias	Não recomendado	Contraindicado em < 2 meses
1-5 meses	10mg/kg/dia DUD, por 5 dias	40-50 mg/kg/dia 6/6 horas, por 14 dias	15 mg/kg/dia 12/12 horas, por 7 dias	40 mg/kg/dia 12/12 horas, por 14 dias
> 6 meses e crianças	1º dia - 10 mg/kg 2º - 5º dia - 5 mg/kg	40-50 mg/kg/dia 6/6 horas, por 14 dias	15 mg/kg/dia 12/12 horas, por 7 dias	40 mg/kg/dia 12/12 horas, por 14 dias
Adultos	1º dia - 500 mg 2º - 5º dia - 250 mg	2g / dia 6/6 horas, por 14 dias	1g/ dia 12/12 horas, por 7 dias	1.600 mg/dia 12/12 horas, por 14 dias

DUD = Única dose diária
Fonte: Winter *et al.*⁷⁷

Em alguns pacientes a coqueluche pode apresentar-se com uma evolução clínica mais grave, caracterizada por rápida evolução com insuficiência respiratória, taquicardia sinusal, hiperleucocitose, hipoxemia progressiva, hipertensão pulmonar (HP), choque cardiogênico e instabilidade cardiovascular. Foram descritos alguns fatores que podem estar relacionados com esta evolução: baixa idade (menores de seis meses, principalmente os menores de dois meses de idade não vacinados), presença de imagem de condensação à radiografia de tórax à admissão hospitalar (pneumonia) e hiperleucocitose (leucócitos $> 100.000 \text{ mm}^3$)⁷⁷. A exata fisiopatologia desta forma clínica não é totalmente esclarecida, mas há participação evidente da toxina pertussis, responsável por várias alterações na fisiopatologia da doença e nesta forma clínica pode levar a alteração nos vasos sanguíneos pulmonares. A hiperleucocitose está associada à formação de trombos leucocitários nos vasos pulmonares, sendo um fator relevante, porém não único, no desenvolvimento da HP. Habitualmente o paciente evolui rapidamente para insuficiência respiratória e falência miocárdica aguda⁶⁵. O reconhecimento precoce desta evolução grave é importante e o paciente deve ser tratado em uma Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica. O tratamento fundamental é de suporte com monitorização invasiva, suporte ventilatório (Ventilação Pulmonar Mecânica Invasiva) e hemodinâmico (ressuscitação fluida e medicações vasoativas). Tratamento para reduzir a HP pode ser realizado com a utilização do óxido nítrico e vasodilatadores pulmonares. Estudos com a utilização de Oxigenação por Membrana Extracorpórea (ECMO) em pacientes com coqueluche grave, mostraram que a mortalidade destes pacientes foi superior à dos pacientes com outra patologia submetidos ao ECMO^{65,77-80}.

A terapia de leucorredução pode ser realizada nos pacientes com hiperleucocitose ($> 100.000 \text{ mm}^3$) e que apresentem evolução rápida com insuficiência respiratória e pode ser realizada com a utilização de exangüíneo-transfusão e leucoférese. A redução do número de leucócitos reduziria a formação dos trombos leucocitários reduzindo a HP nestes pacientes. Estudo comparando a taxa de mortalidade de uma série de pacientes com coqueluche grave, pacientes que só utilizaram ECMO e pacientes nos quais foi associada terapia de leucorredução, a taxa de mortalidade foi 10% inferior⁷⁹⁻⁸².

1.5.5 Vigilância epidemiológica

Na infecção por BP é considerado comunicante o indivíduo que foi exposto ao caso índice de coqueluche entre o início da fase catarral até três semanas após a fase de paroxismo (período de transmissibilidade) e que tenha tido uma proximidade de um metro de distância por período superior a uma hora (Figura 11)⁴.

Fonte: Kilgore *et al.*⁴

Figura 11 - Período de transmissibilidade da coqueluche

Quando indicada a quimioprofilaxia deve ser realizada com o mesmo esquema de antibiótico preconizado para o tratamento ^{4,69,81}.

As indicações de quimioprofilaxia, segundo o Ministério da Saúde são⁸¹:

- a) Com idade menor que um ano, independentemente da situação vacinal e período de tosse.
- b) Com idade de um a sete anos, não vacinados ou situação vacinal desconhecida ou que tenham recebido menos de quatro doses da vacina DTP+ *Haemophilus influenzae* (Hib) (Tetravalente), DTP+Hib+ (hepatite B) Hep (Pentavalente) e DTP.
- c) Com mais de sete anos, que tiveram contato com um caso suspeito de coqueluche, se:
 - tiveram contato com o caso índice no período de 21 dias que precederam o início dos sintomas do caso até três semanas após o início da fase paroxística; ou,
 - tiverem contato com um comunicante vulnerável no mesmo domicílio.
- d) Que trabalham em serviços de saúde ou diretamente com crianças.

Os grupos de comunicantes mais vulneráveis ao adoecimento por coqueluche são:

- e) Recém-nascidos de mãe com sintomas respiratórios.

- f) Crianças com menos de um ano, com menos de três doses de vacina Penta, Tetravalente ou DTP.
- g) Crianças com menos de 10 anos, não imunizadas ou com imunização incompleta (menos de três doses de vacina Penta, Tetra ou DTP).
- h) Mulheres no último trimestre de gestação.
- i) Indivíduos com comprometimento imunológico.
- j) Indivíduos com doenças crônicas graves.

A quimioprofilaxia também é recomendada para os portadores assintomáticos que são todos os indivíduos que não apresentam sinais e sintomas sugestivos de doença, mas que tiveram isolamento da BP em secreção de nasofaringe por cultura ou identificação pelo PCR em tempo real, pois a presença da bactéria na nasofaringe humana favorece a disseminação da doença a outros indivíduos vulneráveis⁸¹.

1.5.6 Diagnósticos diferenciais de coqueluche

Outras etiologias, infecciosas ou não, podem mimetizar o quadro clínico provocado pela BP principalmente no primeiro ano de vida. Alguns autores utilizam o termo de “síndrome coqueluchoide” para se referir a esta síndrome clínica. Em 1964, o adenovírus tipo 2 foi relacionado a síndrome coqueluchoide e Martínez *et al.*⁸², em 1966, também identificaram adenovírus tipo cinco em pacientes com suspeita de coqueluche⁸²⁻⁸⁵.

Os agentes mais relacionados à síndrome coqueluchoide são:

Bactérias:

- *Bordetella parapertisis*;
- *Bordetella bronchiseptica*;
- *Haemophilus influenzae*;
- *Moraxella catarrhalis*;
- *Mycoplasma pneumoniae*;
- *Chlamydia trachomatis*;
- *Ureaplasma urealyticum*;
- *Pneumocystis carinii*.

Vírus:

- Adenovírus;
- Vírus Influenzae A e B;
- Vírus parainfluenzae 1-4;
- Vírus Sincicial respiratório (VSR);
- Rinovírus;
- Citomegalovírus;
- e outros.

Não infecciosas:

- doença do refluxo gastresofágico;
- aspiração de corpo estranho;
- crise de sibilância.

1.6 Infecções por Vírus Respiratório que Podem Mimetizar a Coqueluche

Dentre as possíveis etiologias, destacam-se as infecções por vírus respiratórios, que representam a principal etiologia das doenças respiratórias agudas na infância e se apresentam frequentemente como crises de sibilância, bronquiolite e pneumonia^{86,87}.

A presença de tosse, de diferentes características, é muito frequente nas doenças de etiologia viral e pode sugerir a suspeita clínica de coqueluche⁸².

Os principais vírus respiratórios que acometem os lactentes são o Vírus Sincicial Respiratório, Parainfluenza vírus 1, 2 e 3, Metapneumovirus, Rhinovirus, vírus Influenza A e B, Adenovirus e ainda o Bocavirus humano e Coronavirus^{86,87}.

O diagnóstico etiológico tem se tornado cada vez mais relevante nas infecções do aparelho respiratório inferior nos lactentes. Estudo anterior mostrou que a identificação de agentes virais, como o VSR pode direcionar o tratamento e reduzir a prescrição desnecessária de medicamentos, principalmente de antibióticos, nessa condição clínica⁸⁸.

Os métodos de identificação de antígenos virais podem ser realizados por técnica de imunofluorescência direta (IFD) e indireta (IFI), técnicas que apresentam resultado rápido e não são exames dispendiosos. Para o VSR, a sensibilidade e especificidade da pesquisa por imunofluorescência são comparáveis as obtidas pela técnica de RT_PCR (*reverse transcriptase_PCR*), atualmente considerada padrão ouro^{86,89-91}.

Em estudos realizados para identificação etiológica em pacientes com clínica de infecção viral, como a bronquiolite a identificação de BP em secreção de nasofaringe foi variada. Alguns estudos mostram identificação de mais de 10% de BP na suspeita clínica de infecção viral e outros estudos mostraram que a identificação é bastante infrequente⁹²⁻⁹⁶.

Os estudos que realizaram a pesquisa de vírus respiratórios em pacientes com suspeita clínica de coqueluche são poucos na literatura. Nesses a identificação viral foi frequente principalmente de VSR⁹⁷⁻⁹⁸.

Tanto nos estudos realizados com pacientes com suspeita clínica de infecção viral como a bronquiolite, quanto nos pacientes com suspeita clínica de coqueluche a presença de codeteção entre vírus respiratório (VR) e *Bordetella pertussis* é descrita^{94,99,100}

Para esses pacientes alguns autores sugerem uma alta incidência de codeteção entre os VR e a *B. pertussis*, enquanto outros relatam que essa incidência é baixa e não representativa. Não há consenso se essa codeteção pode estar associada a maior gravidade ou maior risco de morte^{92-94,96, 101-103}.

Estudo realizado na Itália com 53 lactentes menores de seis meses, com clínica de coqueluche e BP positivo, que teve o objetivo de comparar pacientes que apresentavam a identificação apenas de BP dos pacientes que apresentaram codeteção com algum vírus respiratório (VR), mostrou que não houve diferença estatística comparando os escores clínicos, assim como na evolução e tempo de internação. Foi observado que os pacientes apenas com BP eram mais jovens e que os que apresentavam infecção viral em codeteção tinham maior número de contatos domiciliares¹⁰⁴.

Em estudo anterior, os autores do presente estudo mostraram, em análise retrospectiva, que 21% das crianças com suspeita de coqueluche hospitalizadas em uma enfermaria geral de pediatria apresentavam infecção por vírus sincicial respiratório e 44% infecção por BP. Nesse estudo houve três casos de codetecção de VR e BP, sendo que o baixo número de casos não possibilitou a análise clínica comparativa entre as diferentes etiologias¹⁰⁵.

1.7 Identificação Etiológica dos Pacientes com Suspeita de Coqueluche no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP)

A partir de 2009 a realização de PCR-TR em *swab* de nasofaringe para diagnóstico de coqueluche passou a ser realizado no Instituto Adolfo Lutz para todos os pacientes com suspeita clínica de coqueluche do HU-USP. Entre janeiro de 2009 a julho de 2016 foram notificados 330 pacientes com suspeita clínica de coqueluche, onde 278 eram menores de um ano de idade (84,2%). O exame de PCR foi positivo em 68 pacientes (20,6%), pesquisa de vírus respiratório em aspirado de nasofaringe foi positiva em 74 pacientes (22,4%) e codetecção observada em sete pacientes. O Quadro 3 e a Figura 12, mostram a distribuição dos casos suspeitos de coqueluche desde 2009 e a positividade do PCR e pesquisa viral nesses pacientes.

Quadro 3 - Distribuição dos casos suspeitos de BP por ano

Ano	Número de casos notificados	BP+	VR+
2009	6	1	1
2010	10	2	3
2011	44	8	8
2012	45	10	14
2013	62	14	8
2014	98	27	18
2015	44	4	15
2016	20	1	8

BP+ (pacientes com PCR positivo para BP); VR+ (imunofluorescência positiva para vírus respiratório).

BP+ (pacientes com PCR positivo para BP); VR+ (imunofluorescência positiva para vírus respiratório)

Figura 12 - Relação entre os casos notificados, casos positivos para *Bordetella pertussis* e vírus respiratório de 2009 a 2016

O número de casos suspeitos e confirmados de coqueluche aumentou de forma progressiva desde 2009, com um pico em 2014, reduzindo de maneira expressiva em 2015 e 2016. Entre 2013 e 2014 houve um predomínio da identificação de BP nos casos suspeitos de coqueluche, após 2014 houve uma inversão, com predomínio de identificação de VR.

A maior incidência de BP ocorreu entre os meses de outubro a março. Essa sazonalidade é mostrada na Figura 13.

BP+ = Pacientes com PCR positivo para *Bordetella pertussis*

Figura 13 - Sazonalidade de *Bordetella pertussis* no HU-USP de 2009 a 2016

1.8 Justificativa do Estudo

As infecções respiratórias agudas são frequentes na infância, sendo a principal causa de internação nos lactentes. A coqueluche pode apresentar-se de forma menos característica nessa faixa etária, especialmente antes do final do esquema vacinal para o primeiro ano de vida. O quadro clínico, nesses pacientes, pode ser semelhante ao das infecções por vírus respiratórios que são os agentes etiológicos mais frequentes nas infecções de vias aéreas nos lactentes. Os resultados do presente estudo podem contribuir para adequar as abordagens diagnósticas e terapêuticas no lactente com suspeita clínica de coqueluche. Na literatura não há dados conclusivos sobre o impacto da pesquisa viral nos lactentes com suspeita clínica de coqueluche.

1.9 Hipóteses

Em lactentes com suspeita de coqueluche durante o primeiro ano de vida:

- a) A prevalência de infecções por vírus respiratório é alta.
- b) O quadro clínico/laboratorial não diferencia a infecção por BP da infecção por VR e da codetecção desses agentes etiológicos.
- c) A codetecção de vírus respiratório e BP está associada a maior gravidade na evolução clínica de lactentes com suspeita clínica de coqueluche, quando comparada a infecção por BP como agente único.
- d) A associação da pesquisa de vírus respiratórios à pesquisa de BP pode implicar em alterações de conduta clínica no lactente com suspeita clínica de coqueluche.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar e comparar as características clínicas e laboratoriais e a evolução de lactentes hospitalizados inicialmente com suspeita de coqueluche, segundo a etiologia identificada pela pesquisa de BP e de VR e o impacto do diagnóstico etiológico sobre a conduta terapêutica.

2.2 Objetivos Específicos

Em lactentes hospitalizados com suspeita clínica de coqueluche à admissão:

- a) Analisar a prevalência de infecções por BP, e suas características clínicas, demográficas, laboratoriais e evolutivas.
- b) Analisar a prevalência de identificação de vírus respiratórios em secreção de nasofaringe e suas características clínicas, demográficas, laboratoriais e evolutivas.
- c) Analisar a prevalência de codeteção de *B. pertussis* e vírus respiratórios e suas características clínicas, demográficas, laboratoriais e evolutivas.
- d) Comparar as manifestações clínicas, laboratoriais e evolutivas dos pacientes com infecção única por BP, com infecção única por vírus respiratórios e com codeteção de BP e VR e o impacto do resultado da pesquisa etiológica sobre a conduta.

3 MÉTODOS

Foi realizado um estudo de coorte prospectivo, com seleção de todos os lactentes menores de um ano de idade internados na Divisão de Clínica Pediátrica (DPC) do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, com suspeita clínica de coqueluche de 1 de junho de 2014 a 30 de junho de 2016.

O serviço prestado pelo HU-USP é regionalizado com atendimento de nível secundário à comunidade local e aos funcionários da Universidade e seus familiares, sendo essa população de aproximadamente 400.000 habitantes. A DCP é responsável pela assistência aos pacientes menores de 15 anos. Na Enfermaria de Pediatria são internadas aproximadamente 1.700 crianças por ano.

Segundo a rotina de atendimento do serviço, todas as crianças internadas por doença aguda do aparelho respiratório inferior com idade inferior a um ano são submetidas à coleta de aspirado de secreção de nasofaringe para identificação de vírus respiratórios à admissão, realizada por imunofluorescência indireta (IFI) no laboratório de análises clínicas do HU-USP. Todos os pacientes com suspeita clínica de coqueluche são notificados com preenchimento da ficha do SINAN e submetidos, à admissão, a radiografia de tórax, coleta de hemograma e *swab* de nasofaringe para identificação de BP, realizada no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, por meio de cultura e técnicas moleculares (PCR-TR).

a) Critérios de inclusão:

Lactentes, com idade entre 28 dias e um ano, hospitalizados com suspeita clínica de coqueluche segundo critérios de definição pelo Ministério da Saúde de 2014^{69,81}.

a.1) **Para menores de seis meses de idade:** todo indivíduo que, independente do estado vacinal, apresente **tosse de qualquer tipo há 10 dias ou mais**, associada a um ou mais dos seguintes sinais e sintomas:

- tosse paroxística (tosse súbita, incontrolável, com cinco a 10 tossidas rápidas e curtas, em uma única expiração);
- guincho inspiratório;
- vômito pós-tosse;
- cianose;
- apneia;
- engasgo.

a.2) **Para maior ou igual a seis meses de idade:** todo indivíduo que, independente do estado vacinal, apresente **tosse de qualquer tipo há 14 dias ou mais**, associada a um ou mais dos seguintes sinais e sintomas:

- tosse paroxística;
- guincho inspiratório;
- vômitos pós-tosse.

a.3) Todo indivíduo com **tosse por qualquer período** que apresente história de contato próximo com caso confirmado de coqueluche pelo critério laboratorial.

a.4) Em situações específicas onde houver forte suspeita clínica da doença, mesmo quando não estiver presente todos os critérios descritos para a definição de caso suspeito^{69,81}.

b) Critérios de exclusão:

- Uso de macrolídeos nas duas semanas que antecederam a internação por mais de três dias consecutivos.
- Diagnóstico prévio de coqueluche, confirmado por critério laboratorial.

3.1 Delineamento do Estudo

Os pacientes foram incluídos no estudo após esclarecimento aos pais ou responsáveis legais e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A). Os dados clínicos e demográficos foram coletados por meio do preenchimento de protocolo clínico padronizado à admissão (Anexo B).

Exames coletados à admissão:

- a) Uma amostra de aspirado de nasofaringe para pesquisa de vírus através de imunofluorescência indireta e *swab* de nasofaringe para pesquisa de *Bordetella pertussis* (PCR-TR e cultura).
- b) De 2 mL a 5 mL de sangue periférico para:
 - Dosagem de proteína C reativa.
 - Hemograma completo.
 - Hemocultura aeróbia periférica.
- c) Radiografia de tórax (incidência *pósterio anterior*).

3.2 Procedimentos Laboratoriais Realizados na Identificação de Vírus Respiratórios por Imunofluorescência Indireta

Para a realização de IFI foi utilizado o *Kit* “Light Diagnostic™, Chemicon International Inc, Temecula, USA” padronizado para identificação de sete vírus respiratórios (VSR, adenovírus, influeza A e B, parainfluenza 1, 2 e 3). Segundo esse método, as amostras de aspirado de nasofaringe são fixadas e incubadas com anticorpo monoclonal antiviral de rato, em lâmina de vidro. Na presença do antígeno viral específico é formado um complexo estável com anticorpo. Após a etapa de lavagem o conjugado anti-IgG de rato (ligado a isocianato de fluoresceína) é adicionado ligando-se ao complexo antígeno-anticorpo. Qualquer reagente não ligado é removido por lavagens e a amostra é visualizada através de um microscópio de fluorescência (Axiolab, Carl Zeiss, Alemanha) com aumento de 400X. Uma reação positiva é caracterizada por uma fluorescência verde brilhante, observada em pelo menos três células. As células não infectadas apresentam-se vermelhas devido ao corante do contraste azul de Evans⁸⁹.

3.3 Procedimentos Laboratoriais Realizados para a Identificação de *Bordetella pertussis* Por Meio de Cultura de Aspirado de Nasofaringe

O material coletado de nasofaringe através de um *swab* padronizado é introduzido cerca de 3 mm no meio de transporte *Regan-Lowe* (RL) semissólido, suplementado com 10% de sangue desfibrinado, estéril de carneiro ou cavalo e cefalexina (concentração final de 40 ug/mL). O material foi encaminhado ao IAL à temperatura ambiente, ao abrigo da luz em até 24 horas após a coleta.

As amostras foram cultivadas no mesmo dia da coleta em meio de RL sólido com 10% de sangue de carneiro ou cavalo e 40 µg/mL de cefalexina. As placas foram incubadas a 35°C - 37°C, sob umidade elevada por um período de até 10 dias. Colônias sugestivas de pertencerem ao gênero *Bordetella* foram confirmados pela coloração de Gram, testes bioquímicos e caracterização antigênica descritos previamente¹⁰⁶.

3.4 Procedimentos Laboratoriais Realizados para Identificação de *Bordetella pertussis* em Secreção de Nasofaringe por PCR em Tempo Real

O mesmo *swab* utilizado para a cultura foi utilizado para realização da PCR em tempo real. Após a realização da cultura, os *swabs* foram transferidos para um tubo de ensaio estéril seco, e mantidos em freezer a -20°C para posterior extração, purificação e concentração do DNA bacteriano. O procedimento de PCR-TR utilizado foi o descrito por Leite *et al.*³⁷.

Extração do DNA: A extração do DNA do material coletado pelo *swab* de nasofaringe, foi realizada empregando-se o kit comercial QIAamp Mini Kit da Qiagen (Chattlesworth, CA, EUA) ou o equipamento MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I (Roche AppliedScience, Indianapolis, IN), seguindo as instruções sugeridas pelo fabricante, diluído em 100 µL de água ou do tampão adequado, provido no kit¹⁰⁷.

Em todas etapas de extração do material clínico foi realizada também a extração de um *swab* estéril como controle de resultados falso-positivos decorrentes de contaminações cruzadas, pois essa amostra deve apresentar obrigatoriamente resultado negativo na reação.

Amplificação do DNA: As reações de amplificação do material genômico foram realizadas em termociclador LightCycler®480 Software release1.5.0 SP3 - Roche® utilizando o sistema TaqMan® para detecção do produto de amplificação.

Para a amplificação dos dois genes alvos *ptxS1* (GenBank acesso nº AJ920066) e o segmento de inserção *IS481* (GenBank acesso nº M22031) foram utilizados os iniciadores 442L15 e 402U16 para o alvo *ptxS1* e os iniciadores 894L24 e 852U18 para o alvo segmento de inserção *IS481*. Para a detecção dos produtos foram utilizadas as sondas 419U22P e 871U22P respectivamente.

As sondas são marcadas na posição 5' com 6-carboxyfluorescein (FAM) e na posição 3' com Black Hole Quencher 1 (BHQ1).

As reações da PCR foram preparadas utilizando o reagente TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), contendo nucleotídeos, tampão, UNG, AmpliTaq®, de acordo com instruções do fabricante.

As ciclagens foram realizadas no aparelho LightCycler®480 (Roche) como se segue: um ciclo de 2 min a 50°C; ativação da enzima por 10 min a 95°C; e 45 ciclos de 15 seg a 95°C e 1 min a 57°C cada. A coleta de dados foi realizada na fase de extensão a 57°C.

3.5 Análise Estatística

Após a descrição das características dos pacientes selecionados para o estudo, os pacientes foram divididos em três grupos para análise comparativa: grupo VR+ (com identificação apenas de VR), grupo BP+ (com identificação apenas de BP) e grupo codetecção (BP+VR). As variáveis categóricas foram descritas em proporções; as variáveis contínuas paramétricas descritas em média e desvio padrão. Para o estudo da associação entre as variáveis categóricas foi utilizado o teste do qui-quadrado e *test t*. Para as variáveis numéricas sem distribuição normal foi utilizado teste de Kruskal Wallis.

Foram realizadas análises bivariadas das associações entre as características clínicas, demográficas e evolutivas dos pacientes BP e VR. Foram realizadas análises multivariadas que incluíram as variáveis que apresentaram $p \leq 0,20$ na análise bivariada.

Para as características com maior prevalência nos pacientes com BP foram também calculados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), assim como para as características dos pacientes com VR.

Nas análises comparativas, o nível de significância “p” foi considerado estatisticamente significativo quando menor do que 5% ($p < 0,05$) e o intervalo de confiança de 95%.

3.6 Considerações Éticas

O estudo está inscrito e aprovado na Plataforma Brasil, no comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário (HU-USP) registro CEP-HU/USP:1383/14, na CEP da Faculdade de Medicina da USP (Registro online número 11.470) e na CEP do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (Anexo C). Todos os participantes ou responsáveis assinaram o TCLE. Após serem reconhecidos como elegíveis para o estudo pelo pesquisador, os responsáveis pelos menores foram esclarecidos sobre os objetivos do estudo e os procedimentos a serem realizados, assim como sobre os demais itens constantes do TCLE (Anexo A).

Todos os casos foram notificados, com o preenchimento do Sistema de Informação de Agravos de Notificação, conforme rotina do serviço.

4 RESULTADOS

No período do estudo, de 1 de junho de 2014 a 30 de junho de 2016, foram notificados como suspeita de coqueluche 95 pacientes independentemente da idade. Durante esse período 69 pacientes preencheram os critérios de inclusão. Foram excluídos dois pacientes que haviam feito uso macrolídeo por três dias antes do diagnóstico e houve oito perdas (em quatro pacientes não foi possível a coleta de *swab* de nasofaringe e em quatro não foi coletada a pesquisa de vírus respiratório).

Assim, foram analisados 59 pacientes, menores de um ano, com suspeita clínica de coqueluche que foram internados na enfermaria geral de pediatria do HU-USP (Figura 14). O resumo das características clínicas, demográficas, laboratoriais e evolutivas destes pacientes está nas Tabelas 1, 2 e 3.

*BP = *Bordetella pertussis*

**VR = vírus respiratório

***PCR = polymerase chain reaction

**** IFI = imunofluorescência indireta

Figura 14 - Fluxograma dos pacientes selecionados para o estudo

Dentre os 59 casos estudados, houve um discreto predomínio do sexo masculino. A idade média foi de 100 dias de vida (desvio padrão de 62,7), com mais de $\frac{3}{4}$ dos lactentes abaixo de quatro meses de idade.

Alguns agentes etiológicos foram identificados em 37 crianças, vírus respiratório como agente único em 19, BP como agente único em 14 e codetecção de vírus e BP em quatro (Gráfico 1).

O vírus mais frequentemente identificado foi o VSR, representando 73% dos vírus identificados, como mostra o Gráfico 2. No primeiro ano de estudo, 32% dos pacientes apresentavam PCR e/ou cultura positiva para BP e 27% VR. Durante o segundo ano de estudo, a positividade para BP caiu para 6% enquanto que para vírus aumentou para 47%.

Os pacientes, com um único agente etiológico identificado, foram divididos em dois grupos: BP(+), com resultado positivo para *Bordetella pertussis* e VR(+) com resultado positivo para pesquisa de vírus respiratório. Foram comparadas as características clínicas, laboratoriais, demográficas e evolutivas (Tabelas 3 e 4).

Dentre os 19 pacientes com identificação de VR como agente único, em apenas um paciente este resultado implicou na retirada do antibiótico (macrolídeos), impossibilitando outras análises.

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas dos 59 pacientes estudados

Características	
Sexo	N (%)
Feminino	25(42,3)
Masculino	34(57,6)
Idade	N (%)
1-2 meses	16 (27,1%)
2-4 meses	29 (49,1%)
4-6 meses	09 (15,2%)
6 meses - 1 ano	05 (8,4%)
Característica dos acessos de tosse	N (%)
Seguido de cianose	48(81,3)
Seguido de vômito	44(74,5)
Seguido de guincho inspiratório	20(33,8)
Seguido de apneia	19(32,2)
Alterações clínicas admissionais	
Desconforto respiratório	45(76,2)
Sibilos à ausculta pulmonar	28(47,4)
Febre relatada ou aferida	24(40,6)
Anorexia	15(25,4)
Oximetria de pulso < 95%	28(47,4)
Antecedentes pessoais	
Vacinação para coqueluche em dia	35(59,3)
Nenhuma dose de vacina coqueluche	24(40,6)
Vacinação materna para coqueluche	10(16,9)
Contato com tossidor	14(23,7)
Contato com fumante	22(37,2)
Aleitamento materno exclusivo	43(72,8)
Frequentador de creche	03(5,0)
	(MD/DP)
Nº pessoas no domicílio	(04/1,3)
Nº irmãos	(01/1,3)

n = número; % = porcentagem; MD = média; DP = desvio padrão

Tabela 2 - Características laboratoriais e evolutivas dos 59 pacientes estudados

Características	N (%)
Exames laboratoriais	
Leucócitos >20.000 cel/mm ³	16(27,5)
Linfócitos > 10.000 cel/mm ³	19(32,7)
Evolução clínica	
Interação em Unidade de Terapia Intensiva	15(25,4)
Ventilação pulmonar mecânica invasiva	12(20,3)
Hidratação parenteral	09(15,2)
Dieta por sonda nasointestinal	10(16,9)
Uso de oxigênio	47(79,6)
Beta agonista inalatório	15(25,4)
Corticosteroide parenteral	06(10,1)
Macrolídeo	57(96,6)
	(MD /DP)
Tempo de oxigênio em dias	(04/4,7)
Tempo de internação em dias	(06/5,9)
Oximetria de pulso à admissão	(92/06)

n = número; % = porcentagem; MD = média; DP = desvio padrão

Gráfico 1 - Resultado da pesquisa etiológica nos 59 pacientes estudados

Gráfico 2 - Vírus identificados em secreção de nasofaringe dos pacientes estudados

As análises bivariadas das associações entre características clínicas, demográficas e evolutiva dos pacientes com BP e VR estão apresentadas na Tabela 5. As análises multivariadas que incluíram as variáveis que apresentaram $p \leq 0,20$ na análise bivariada estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 3 - Características clínicas e demográficas dos pacientes com agente único identificado

Características	BP (14)	VR (19)	Valor de p*
Sexo			
	N (%)		
Feminino	5 (35,7)	11(57,8)	0,2163
Masculino	9 (64,2)	8 (42,1)	
(MD/DP)			
Idade em dias	(68,5/30,5)	(99,3/35,4)	0,0120
Tempo de tosse até o diagnóstico (dias)	(7,3/4,6)	(10,3/07,0)	0,1609
Característica dos acessos de tosse			
	N (%)		
Seguido de cianose	14(100)	12 (63,1)	0,0115
Seguido de vômito	12 (85,7)	13 (68,4)	0,2710
Seguido de guincho inspiratório	4 (28,5)	5 (26,3)	0,8996
Seguido de apneia	5 (35,7)	6 (31,5)	0,8116
Alterações clínicas na admissão			
Desconforto respiratório	9 (64,2)	17 (89,5)	0,0895
Sibilos à ausculta pulmonar	2 (14,2)	15 (78,9)	0,0003
Febre relatada ou aferida	2 (14,2)	11 (57,8)	0,0136
Anorexia	4 (28,5)	6 (31,5)	0,8544
Oximetria de pulso < 95%	4 (28,5)	12 (63,1)	0,0502
Antecedentes pessoais			
Vacinação para coqueluche em dia	4 (28,5)	14 (73,6)	0,0116
Nenhuma dose de vacina coqueluche	10 (71,4)	5 (26,3)	0,0115
Vacinação materna para coqueluche	0	6 (31,5)	0,0236
Contato com tossidor	3 (21,4)	4 (21,0)	1,0000
Contato com fumante	4 (28,5)	9 (47,3)	0,2760
Aleitamento materno	12(85,7)	15 (78,9)	0,6181
Frequentedor de creche	0	1 (5,2)	0,4032
(Mediana/intervalo interquartil)			
Nº pessoas no domicílio	(4/3,75-5)	(4/4-5)	0,8986**
Nº irmãos	(1/0-2)	(1,5/1-3)	0,1451**

BP+ = *Bordetella pertussis* positivo, VR + = vírus respiratório positivo, n = número; % = porcentagem; PCR = *polymerase chain reaction*; "p" = nível de significância; MD = média; DP = desvio padrão

* teste do qui quadrado (χ^2)

** teste de Kruskal Wallis

Tabela 4 - Características laboratoriais e evolutivas dos pacientes com agente único identificado

Características	BP (14)	VR (19)	Valor de p*
Exames laboratoriais			
	N (%)		
Leucócitos >20.000 mm ³	07(50%)	04(21%)	0,0854
Linfócitos > 10.000 mm ³	08 (57%)	04(21%)	0,0363
Evolução clínica			
	N (%)		
Interação em UTIP	04 (28,5)	06 (31,5)	0,8544
Ventilação pulmonar mecânica invasiva	04 (28,5)	05 (26,3)	0,8996
Hidratação parenteral	02 (14,2)	03 (15,7)	0,9368
Dieta por sonda nasoenteral	02 (14,2)	04 (21,0)	0,6107
Oxigenoterapia	09 (64,2)	18 (94,7)	0,0316
Beta agonista inalatório	01 (7,1)	07 (36,8)	0,0566
Corticosteroide parenteral	00	03 (15,7)	0,1355
Macrolídeo	14 (100)	18 (94,7)	0,3583
Suspensão de macrolídeos	00	01(5,2%)	0,3936
	(MD/DP)		
Oxigenoterapia (dias)	(05,3/5,9)	(04,5/3,9)	0,4792
Tempo de internação (dias)	(07,8/7,8)	(06,3/4,8)	0,6069
Oximetria de pulso à entrada (%)	(93,6/6,5)	(91/6,9)	0,3513

BP+ = *Bordetella pertussis* positivo, VR + = vírus respiratório positivo, n = número; % = porcentagem, PCR = *polymerase chain reaction*; "p" = nível de significância; MD = média; DP = desvio padrão

* teste do qui quadrado (χ^2)

Tabela 5 - Análise bivariada da associação de características clínicas, demográficas e evolutiva com a identificação de BP e de VR

Características clínicas	Categoria	BP		VR	
		OR	IC95%	OR	IC95%
Sexo	Masculino	1,00		1,00	
	Feminino	0,57	0,18-1,84	1,89	0,64- 5,52
Idade (em quartis)	Quanto mais novo	1,86	1,07-3,24**	0,76	0,47-1,22
Número de irmãos (em tercís)	Quanto mais irmãos	0,86	0,44-1,71	1,97	1,04-3,72**
Nº pessoas no domicílio (em quartis)	Quanto mais pessoas	1,02	0,58-1,77	1,08	0,64-1,81
Cianose	Sim	!	!	1,97	1,04-3,72**
Cansaço	Sim	0,58	0,16-2,13	4,4	0,87-22,17
Febre	Não	4,90	1,22-19,66**	0,42	0,14-1,24
Oximetria de pulso < 90%	Sim	0,74	0,20-2,75	1,40	0,43-4,52
Sibilos	Sim	0,14	0,03-0,55**	5,33	1,66-17,12**
Vacinação ausente/atrasada	Sim	4,43	1,33-14,72**	0,42	0,13-1,32
Vacinação materna	Sim	!	!	3,00	0,74-12,17
Leucócitos > 20.000/mm ³	Sim	5,46	1,56-19,12**	0,98	0,30-3,20
Linfócitos > 10.000/mm ³	Sim	4,00	1,20-13,36**	0,52	0,16-1,74
Necessitou de O ₂	Sim	1,82	0,34-9,61	2,86	0,55-14,91

OR= *odds ratio* (razão de chances); IC95% = intervalo de 95% de confiança; BP = *Bordetella pertussis*, VR = vírus respiratório

** = $p < 0,05$; ! = não houve variação na associação exposição-desfecho

Os valores de valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) para as características com maior prevalência nos pacientes com BP e para pacientes com VR estão apresentados na Tabela 7 e 8.

Tabela 6 - Análises multivariadas das associações entre características clínicas, demográficas e evolutiva dos pacientes com identificação de BP e de VR

Características clínicas	Categoria	OR	IC95%
BP			
Idade (em quartis)	Quanto mais novo	1,95	0,74-5,16
Ausência de sibilos	Sim	5,70	1,22-26,61 **
Leucócitos > 20.000/mm ³	Sim	5,38	1,08-26,80 **
Vacinação ausente	Sim	1,74	0,19-16,32
VR			
Número de irmãos (em tercis)	Quanto mais irmãos	1,41	0,69-2,89
Presença de sibilos	Sim	4,17	1,17-14,77**

OR = odds ratio (razão de chances); IC95% = intervalo de 95% de confiança

BP = *Bordetella pertussis*, VR = vírus respiratório

** = $p < 0,05$

Tabela 7 - Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN das características clínicas para identificação de *Bordetella pertussis*

Características	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Tosse seguida de cianose	0,66	0,36	0,53	1
Ausência de sibilos à ausculta	0,44	0,78	0,75	0,88
Ausência de febre	0,52	0,57	0,60	0,84
Mãe não vacinada	0,70	0,31	0,51	1
Nenhuma dose de vacina	0,41	0,73	0,66	0,77

VPP = valor preditivo positivo, VPN = valor preditivo negativo

Tabela 8 - Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN das características clínicas para identificação de vírus respiratórios

Características	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Tosse seguida de cianose	0,63	0	0,46	0
Presença de sibilos à ausculta	0,78	0,85	0,88	0,75
Presença de febre	0,57	0,85	0,85	0,60
Desconforto respiratório	0,89	0,35	0,65	0,71

VPP = valor preditivo positivo, VPN = valor preditivo negativo

A codeteccção foi observada em quatro pacientes estudados, um dos pacientes não teve coletado o exame de hemograma. As principais características clínicas, demográficas e evolutivas estão representadas na Tabela 9.

Todos os pacientes com codeteccção apresentavam tosse em salva seguida de cianose, somente um paciente apresentou febre na história clínica e outro paciente, sibilos à ausculta pulmonar. Nenhum paciente apresentou guincho inspiratório. Somente um paciente não havia recebido vacina contra coqueluche, pois tinha menos que dois meses de vida e nenhuma das mães recebera vacina acelular durante a gestação.

Devido ao número de pacientes com codeteccção, não foram possíveis as análises comparativas com os demais grupos (BP+ e VR+).

Tabela 9 - Análise descritiva das características clínicas, demográficas, laboratoriais e evolutivas dos pacientes com codeteccção de BP e VR

Características	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4
Idade	1 mês e 26 dias	3 meses e 4 dias	3 meses e 8 dias	8 meses e 28 dias
Sexo	M	M	M	F
Tempo de tosse até o diagnóstico em dias	6	30	21	14
Vírus identificado	VSR	Para 3	Adenovírus	Para 3
Leucócitos *	22.400	-	80.831	14.400
Linfócitos *	6.720	-	50.923	9.200
Necessidade de UTI	Sim	Não	Sim	Não
Necessidade de VPM	Sim	Não	Sim	Não
Tempo de internação em dias	22	2	18	1

* Número de células em mm³; UTI = Unidade de Terapia Intensiva; VPM = ventilação pulmonar mecânica

VSR = vírus sincicial respiratório; Para3 = vírus parainfluenza 3, M = masculino; F = feminino

O Gráfico 3 mostra a variação do número de casos segundo o mês da realização da pesquisa etiológica de todos os pacientes estudados, dos BP+ e VR+.

Gráfico 3 - Variação do número de casos segundo o mês da realização da pesquisa etiológica de todos os pacientes estudados, dos BP+ e VR+

5 DISCUSSÃO

O estudo da etiologia da infecção em lactentes com suspeita de coqueluche mostrou que além da BP, os vírus respiratórios também ocorrem como agentes únicos e em codetecção com a BP.

No presente estudo, a prevalência de VR foi discretamente maior que a de BP. A proporção de casos de coqueluche confirmados laboratorialmente (30,5%) foi semelhante aos dados nacionais divulgados pelo SINAM que apontam 28,9% de positividade em 2012, o que sugere que a casuística estudada representa, em termos etiológicos, a população de menores de um ano com suspeita de coqueluche¹⁰⁸. No Hospital Universitário da Universidade de São Paulo entre 2009 e 2016, a positividade do exame de PCR para os casos suspeitos de coqueluche em menores de um ano de idade, foi de 23,2%.

O presente estudo abrangeu dois anos consecutivos. Durante o primeiro ano de estudo o Ministério da Saúde do Brasil passou a recomendar a vacina dTpa para as gestantes que pode ter sido um dos fatores que contribuíram para a redução na incidência de coqueluche no país⁵⁰. No segundo ano de estudo houve uma incidência reduzida na identificação de BP, com maior identificação de VR.

A confirmação laboratorial da coqueluche mostra-se variável, em estudos anteriormente realizados. Segundo van den Brink *et al.*⁹⁷, em estudo

prospectivo, multicêntrico em pacientes menores de 12 anos com infecção aguda do trato respiratório, de 49 crianças com suspeita de coqueluche 14% apresentaram confirmação por PCR. Estudo nacional mostrou que em Porto Alegre, em 222 pacientes com suspeita clínica de coqueluche entre 2011 e 2013 submetidos ao diagnóstico molecular (PCR *in-house*), o diagnóstico foi confirmado por PCR em 161 (72,5%). Houve um predomínio em menores de um ano de idade (60,9%)⁹⁸. Na Argentina, em levantamento de casos suspeitos de coqueluche, a positividade por PCR foi de 38%¹⁰⁹.

Também há relatos de positividade mais baixa. Estudo prospectivo de coorte, multicêntrico, conduzido de 2007-2009, na Holanda, mostrou que entre os pacientes com doença respiratória aguda, onde a coqueluche foi suspeitada, o exame foi positivo em 9,1% no primeiro ano de estudo em 14,3% no segundo ano. Nesse mesmo estudo, a identificação de VR nos pacientes com suspeita clínica de coqueluche foi de 83%. Houve codetecção em 11 de 14 pacientes com BP identificada, no grupo de pacientes com suspeita de coqueluche 6/49 (12%) e entre os sem suspeita de coqueluche 5/257 (1,9%), apresentaram a detecção de BP e VR⁹⁷.

No presente estudo, a pesquisa de VR mostrou-se importante não só como instrumento para o diagnóstico diferencial dos casos notificados com suspeita de coqueluche, mas também pela possibilidade da coexistência dos vírus respiratórios com a BP.

O vírus mais identificado foi o VSR, sendo obtido em 73% dos pacientes com VR positivo. No primeiro ano do estudo, quando incidência de coqueluche foi maior a identificação de vírus respiratório nos pacientes com

suspeita de coqueluche foi de 27%. No segundo ano do estudo, houve uma redução na incidência da coqueluche e a identificação de VR nestes pacientes foi de 47%.

As infecções por BP e VR podem apresentar quadro clínico semelhante¹¹⁰. A maioria dos estudos pesquisam ambas etiologias em pacientes com bronquiolite ou diagnóstico de infecção do aparelho respiratório inferior, o que os diferencia do presente estudo que aborda pacientes com suspeita de coqueluche^{92-94,99}.

Não há consenso quanto à incidência de BP nos pacientes com clínica de bronquiolite com VR identificado, enquanto alguns autores relatam uma alta frequência outros relatam uma incidência baixa e esporádica^{92,95,96,100}.

Nuolivirta *et al.*⁹² observaram, na Finlândia, em estudo realizado com secreção de nasofaringe de pacientes menores de seis meses com clínica de bronquiolite, hospitalizados antes de 2004, que de 142 pacientes 12 apresentaram PCR positivo para BP (8,5%). Estudos mais recentes mostraram uma incidência baixa de BP em pacientes com clínica de bronquiolite⁹⁹⁻⁹⁶. Estudo prospectivo de coorte, realizado nos Estados Unidos, por Piedra *et al.*⁹⁶, em 2015 com 2207 lactentes menores de dois anos hospitalizados por bronquiolite, em 2068 foi identificado pelo menos um agente infeccioso, sendo em apenas quatro identificado a BP (0,2%), sendo que em três houve a identificação de algum VR em codetecção. Na Finlândia, entre 2008 e 2010, estudo realizado com 196 lactentes menores de seis meses internados por bronquiolite, não se observou a identificação da BP⁹⁵.

Vittucci *et al.*⁶⁴, em estudo com pacientes menores de três meses de idade que internaram por doença respiratória aguda, relata que de 215 pacientes, 53 (24,7%) apresentaram PCR positivo para BP. Coqueluche foi a hipótese diagnóstica em 22 pacientes, destes 16 (72,7%) foram positivos para BP e seis negativos. Dos negativos cinco apresentaram pesquisa de VR positiva sendo os mais frequentes o VSR e Rinovírus. A codeteção foi observada em 18 pacientes (34%) de 53 com BP+.

Os estudos que pesquisam VR em pacientes com diagnóstico clínico de coqueluche são poucos na literatura, a incidência destes vírus é variável, tanto como agente único como em codeteção. Estudo Holandês mostrou que em pacientes com suspeita de coqueluche a identificação de VR foi frequente, 83,4%, sendo 14,3% como agente único e em 69,3% em codeteção⁹⁷. Vittucci *et al.*⁶⁴ observaram a identificação de algum VR em 23% das crianças com suspeita de coqueluche e PCR negativo para BP, esse mesmo estudo identificou 20% de codeteção nos pacientes com sintomas respiratórios agudo.

Vários estudos têm demonstrado a presença dos dois agentes tanto na suspeita de coqueluche quanto em pacientes que a apresentam sintomas respiratórios baixos sem a suspeita de coqueluche^{64,97}. A primeira descrição de infecção simultânea de BP e VR (VSR) ocorreu há mais de 30 anos¹¹³.

Nos países onde foram observadas elevadas taxas de incidência da coqueluche, houve uma maior descrição de codeteção de VR e BP em pacientes com clínica de infecção viral, onde não havia sido feita a suspeita de coqueluche^{92,99,100,112-113}.

A relação entre a presença dos dois agentes e evolução com maior gravidade ainda não foi esclarecida. Em vários estudos não houve diferença entre as características demográficas e evolutivas dos pacientes com um agente e os que apresentaram codetecção⁶⁴.

Trabalho realizado no Chile, em pacientes com suspeita clínica de coqueluche, onde foi feita investigação de infecção por VSR concomitante, não foram observadas diferenças nas variáveis demográficas ou evolutivas nos pacientes com codetecção dos pacientes com um único agente identificado¹⁰³.

Bellettini *et al.*⁹⁸, descreveram em pacientes com coqueluche, 21,4% de coinfeção com outros agentes (VR e outras bactérias), 72,7% tinham seis meses de idade ou menos. Os coinfectados apresentaram maior tempo de internação hospitalar ($p=0,009$) e mais atelectasias na radiografia de tórax (OR 3,3; IC 95% 1,1-9,5; $p = 0,023$).

No presente estudo, a codetecção foi observada em quatro pacientes com suspeita clínica de coqueluche (5,1%), sendo identificada em 22,2% (4/18) dos pacientes com BP positivo, e em 12,5% (4/32) dos pacientes com VR.

Em estudo retrospectivo anterior realizado no mesmo serviço, os autores relatam que em 25 pacientes com BP identificada por PCR, três apresentaram VR identificado por IFI em codetecção, sendo que um paciente evoluiu com insuficiência respiratória severa e óbito. O pequeno número de pacientes com codetecção não permitiu a comparação evolutiva com os pacientes que tiveram um único agente identificado¹⁰⁵.

Frassanito *et al.*¹⁰⁴, em um estudo realizado na Itália com 53 lactentes menores de três meses de idade com PCR positivo para BP, observaram taxa de coinfeção com VR de 47%. Não observaram diferença entre os dados demográficos, escores clínicos de gravidade, tempo de internação, alterações laboratoriais e radiológicas. Os pacientes com BP como agente único eram mais jovens, e tinham sido menos amamentados. Os pacientes em coinfeção apresentavam um número maior de pessoas no domicílio.

Da mesma forma do observado para os pacientes com BP como agente único, na codetecção nenhuma criança era filha de mãe vacinada com dTpa durante a gestação.

O pequeno número de pacientes que apresentaram a identificação dos dois agentes em codetecção no presente estudo, não possibilitou a comparação de todos os dados demográficos e evolutivos. Novos estudos são necessários para esclarecer a relevância clínica dessas codetecções.

Dentre os lactentes com infecção por BP, algumas características destacaram-se como preditores de diagnóstico. A presença de tosse seguida de cianose e ausência de vacinação materna com a vacina dTpa durante a gestação apresentaram os maiores índices de sensibilidade, porém com baixa especificidade. Esses resultados conferiram a essas características um alto poder de predição para excluir o diagnóstico, porém o valor preditivo positivo foi reduzido.

A leucocitose maior que 20.000/mm³ (OR 5,46; CI 95% 1,56-19,12; $p < 0,05$) e a linfocitose superior a 10.000/mm³ (OR 4; CI 95% 1,20-13,36; $p < 0,05$) no hemograma periférico aumentaram a chance do diagnóstico de BP

e, após os ajustes para confundidores, a presença de leucocitose superior a $20.000/\text{mm}^3$ (OR 5,4 CI 95% 1,08-26,8 $p < 0,05$) e a ausência de sibilos à ausculta pulmonar (OR 5,7; CI 95% 1,08-26,8 $p < 0,05$) mostraram-se preditores do diagnóstico de maneira independente.

Os valores preditivos negativos foram melhores para afastar o diagnóstico de BP quando comparados à infecção por VR. Nos pacientes que apresentaram infecção por VR, as características de maior sensibilidade foram o desconforto respiratório e a presença de sibilos a ausculta pulmonar, porém também se mostraram pouco específicos e, portanto, com alto valor preditivo negativo e valor preditivo positivo reduzido.

Os resultados do presente estudo estão em acordo com dados da literatura que apontam que outras infecções respiratórias podem mimetizar a coqueluche.

Por outro lado, a coqueluche pode apresenta-se de forma menos típica, principalmente nos lactentes muito jovens e nas crianças parcialmente imunizadas^{64,99,100}.

Estudos de soroprevalência mostram que ocorrem muito mais casos do que os casos que são notificados, confirmando a existência de formas clínicas variadas e subclínicas^{38,114}.

A tosse paroxística caracteriza uma das fases da doença, porém pode não estar presente na coqueluche, assim como pode ser manifestação de infecções virais, mimetizando a coqueluche. Em estudo realizado na Holanda com descrição de pacientes com suspeita clínica de coqueluche, a tosse paroxística foi capaz de predizer o diagnóstico de coqueluche em apenas 10%-15% dos pacientes⁹⁷.

No presente estudo a tosse seguida de cianose foi a característica mais associada à suspeita clínica de coqueluche, sendo descrita em 100% dos pacientes com BP positiva.

Na Argentina, na suspeita clínica de coqueluche, quando comparados com os casos negativos observaram que a tosse paroxística, contato de paciente com coqueluche e leucocitose > 20.000 foram associados ao PCR positivo para BP, enquanto que febre e antecedente de doença pulmonar neonatal foram associados ao PCR negativo¹⁰⁹.

Em Porto alegre, estudo retrospectivo de pacientes com suspeita de coqueluche a tosse paroxística foi observada em 15,5% dos pacientes e vômitos pós-tosse em 37,9%. Na análise multivariada a presença de cianose (OR 8,0; CI 95% 1,8-36,3; $p = 0,007$) e linfocitose $> 10.000/\text{mL}$ (OR 10,0 CI 95% 1,8-54,5; $p = 0,008$) foram preditores independente de coqueluche para menores de seis meses de idade. Na análise multivariada nenhuma variável foi associada à coqueluche em maiores de seis meses⁹⁸. Estudo espanhol, retrospectivo, caso controle, com casos confirmados de coqueluche por identificação de BP por PCR, comparados com pacientes com VSR identificado, mostrou que o quadro clínico é muito semelhante principalmente em menores de dois meses. Destaca-se como diferença a presença de cianose na BP, vômitos e tiragens nos pacientes com VSR¹¹⁵.

A idade e o estado vacinal são importantes aspectos a serem ponderados. Considera-se paciente completamente imunizado aquele que tenha recebido três doses de vacina para coqueluche e o reforço. No Brasil a vacina anti-pertussis é realizada aos dois, quatro, e seis meses, com reforço

aos 15 meses. Neste estudo 50% dos lactentes com BP+ tinham menos de dois meses de idade e 78,5% menos de três meses. Tanto a vacina de células inteiras (Pw) quanto as formulações acelulares (Pa, pa) não conferem imunidade plena¹¹⁶.

Assim sendo, a coqueluche predomina em lactentes menores de um ano de idade, principalmente em crianças que não receberam nenhuma dose de vacina. No presente estudo, a suspeita de coqueluche foi mais frequente em menores de seis meses (91,4%), 76,2% dos pacientes selecionados eram menores de quatro meses e nos casos confirmados 85,7% eram menores de quatro meses. Dos pacientes com suspeita de coqueluche, 40,6% não haviam recebido nenhuma dose da vacina enquanto que isso ocorreu em 71,1% dos casos confirmados. Apesar disso, mesmo em pacientes vacinados a coqueluche é um diagnóstico que deve ser suspeitado, pois 28,5% dos pacientes com BP positiva, no presente estudo, haviam recebido vacina para coqueluche.

A vacinação materna também foi relevante uma vez que nenhuma criança, filha de mãe vacinada para coqueluche durante a gestação apresentou PCR positivo para BP.

A vacinação de gestantes com dTpa passou a ser recomendada pelo Ministério da Saúde em outubro de 2014, porém as taxas de cobertura vacinal são variadas nas diversas regiões do país⁵⁶. Após o pico de incidência de coqueluche de 2014 observada no Brasil, onde foram registrados 8595 casos confirmados, com 127 óbitos, observou-se uma queda evidente no número de casos nos anos seguintes, em 2015 para

3.061 casos e 35 óbitos por coqueluche notificados²⁶. A queda no número de casos e no número de óbitos não podem ser atribuídos somente à vacinação das gestantes, vários outros fatores, como mudança temporal na circulação da bactéria, cobertura vacinal dos lactentes, diferenças demográficas, podem influenciar essa tendência^{29,117-118}.

Outro aspecto a ser considerado é a sazonalidade das infecções respiratórias. As infecções virais são responsáveis pela grande maioria das doenças respiratória agudas na infância e também pelas doenças de vias aéreas inferiores que levam o paciente a internação hospitalar¹¹⁹.

O VSR foi identificado em 73% dos pacientes com infecção viral. É o principal agente da bronquiolite viral aguda, que apresenta uma sazonalidade bem marcada, com pico de incidência entre os meses de março a junho⁸⁸. A coqueluche predomina nos meses quentes do ano¹²⁰. No HU-USP entre 2009 e 2016 foi observado um pico da incidência de casos de coqueluche entre os meses de novembro a março, semelhante ao observado na literatura¹²¹. Nos pacientes analisados nesse estudo, pode-se também observar uma maior incidência de vírus respiratórios nos meses de outono e inverno e a coqueluche nos meses mais quentes do ano.

Trabalho realizado no Chile, em pacientes com suspeita clínica de coqueluche, no qual foi feita investigação de infecção por VSR concomitante, observou-se que no período de sazonalidade do vírus, de 34 casos de coqueluche com BP identificado, 17 apresentaram o VSR em codetecção (50%). A codetecção foi mais observada no período de maior incidência de infecções virais¹⁰³.

No presente estudo, a positividade da pesquisa viral não apresentou impacto na interrupção do uso de macrolídeos. Em apenas um paciente que apresentou pesquisa viral positiva houve a retirada do antibiótico. Esse resultado difere de estudo anteriormente realizado pelos autores no qual, em pacientes com bronquiolite viral aguda, a pesquisa viral positiva influencia na redução do uso desnecessário de antibióticos, assim como em estudo retrospectivo, realizado em 2013, com 67 lactentes menores de um ano com suspeita clínica de coqueluche no qual, a pesquisa viral positiva resultou em suspensão em 40% dos casos ^{88,105}. Novos estudos são necessários para esclarecer a influência da pesquisa viral sobre o uso de macrolídeos na suspeita de coqueluche. É possível que a demora no resultado do exame de PCR, a gravidade da doença nos lactentes e o risco de pacientes que se apresentam em codeteção tenham papel nas tomadas de decisão.

5.1 Limitações do Estudo

A identificação de vírus respiratórios em secreção de nasofaringe foi realizada por imunofluorescência indireta, que identifica sete vírus e apresenta sensibilidade menor que as técnicas moleculares. A utilização dessa técnica pode ter influenciado no número de pacientes sem agente etiológico identificado e no pequeno número de pacientes identificados em codeteção, comparado com os estudos que utilizaram as técnicas moleculares. A identificação mais frequente de VSR pode ter minimizado esse viés, pois a IFI tem melhor sensibilidade para a identificação do VSR⁸⁹.

Os quatro pacientes com codetecção representaram 7% dos pacientes com identificação de agente etiológico. O pequeno número de pacientes em codetecção também não permitiu a comparação das características clínicas, demográficas e evolutiva destes pacientes com os de agente único.

Os resultados observados neste estudo, relacionados à mudança de conduta, podem ter sido influenciados pelo tempo de demora em se obter o resultado do exame de PCR-RT realizado pelo IAL, que no período do estudo foi de até sete dias úteis.

6 CONCLUSÕES

Em lactentes hospitalizados com suspeita clínica de coqueluche à admissão:

a) A prevalência de infecções por vírus respiratórios foi relevante e discretamente superior à prevalência de BP.

b) Diferenciar clinicamente os pacientes com BP dos com VR permanece um desafio, pois as características identificadas não são exclusivas de cada etiologia. A confirmação laboratorial do diagnóstico de coqueluche foi associada a menor idade, tosse seguida de cianose, ausência de imunização contra BP, linfocitose e leucocitose. A tosse paroxística seguida de cianose e ser filho de mãe não vacinada representaram as características de maior sensibilidade e VPN, porém com baixa especificidade e VPP.

- Os pacientes com VR apresentaram com maior frequência sibilos à ausculta pulmonar, desconforto respiratório, febre na história clínica, vacinação em dia para coqueluche, ser filho de mãe que recebeu vacina contra coqueluche durante a gestação e ter feito uso de oxigênio contínuo durante a internação. As características com os maiores valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN foram: presença de sibilos à ausculta pulmonar e cansaço respiratório.

c) Devido ao número de casos não foi possível analisar a associação entre codetecção e gravidade.

d) A pesquisa viral não apresentou impacto sobre o uso de macrolídeos.

7 ANEXOS

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA USP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:idade:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : **“Identificação de Vírus Respiratórios em lactentes internados com suspeita clínica de coqueluche”**PESQUISADOR : **Profa. Dra. Sandra Elisabete Vieira**CARGO/FUNÇÃO: **Professor Doutor da Faculdade de Medicina da USP- Departamento de Pediatria**INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **57724**UNIDADE DO HCFMUSP: **Departamento de Pediatria**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐RISCO MÉDIO ☐RISCO BAIXO ☐RISCO MAIOR ☐4. DURAÇÃO DA PESQUISA : **1 (um) ANO**

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do responsável legal:

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Sua criança foi convidada a participar de uma pesquisa sobre coqueluche (tosse comprida), uma doença que acomete um grande número de crianças. A tosse comprida é causada por uma bactéria chamada *Bordetella pertussis*. Esta doença pode ser prevenida com a vacina, porém a criança só se torna protegida da doença após completar o esquema de vacinação para coqueluche, o que ocorre por volta de 1 ano de idade. Antes disso a criança ainda tem algum risco de adquirir a doença, que pode ser grave principalmente nos bebês muito jovens. Este termo de consentimento contém informações que ajudarão você a decidir sobre a participação da sua criança. Leia este documento cuidadosamente e fique à vontade para decidir se deseja ou não que sua criança participe deste estudo. Pergunte ao médico qualquer dúvida que você possa ter. Se você concordar com a participação de sua criança no estudo, deverá assinar este documento na última página.

Veja abaixo algumas informações que poderá ajudar sua decisão:

1. Sobre este estudo:

Sua criança apresenta suspeita clínica de coqueluche, no entanto ela pode também ter uma infecção causada por vírus respiratórios. Para esclarecer a causa da doença será coletada secreção respiratória e exames de sangue da criança. Para esse estudo pedimos sua autorização para utilizar os resultados dos exames de seu filho (a), pois pretendemos analisar quais as principais causas dessa doença e como podemos melhorar o tratamento das crianças.

2. O que você e sua criança precisarão fazer?

O médico responsável fará algumas perguntas sobre a saúde do seu filho para preencher o questionário do estudo. Isso levará cerca de 10 minutos. Será coletada uma pequena quantidade de sangue periférico (utilizada uma agulha fina para sangue da mão ou do braço) e de secreção da nasofaringe (nariz) que será utilizada para identificação de vírus e da bactéria causadora da tosse comprida. Esses exames são necessários para o tratamento de seu filho(a), portanto serão coletados, mesmo que ele não participe do estudo. Se participar do estudo os resultados serão analisados juntamente com os de outras crianças internadas. Não haverá ministração de nenhuma medicação ou vacina de estudo para sua criança e a não haverá necessidade de tempo adicional de permanência no hospital se sua criança participar do estudo. Você não terá despesas com relação ao estudo (exames do estudo), mas também não receberá pagamento pela sua participação.

3. Desconfortos e riscos esperados:

Não estão previstos eventos indesejáveis (ruins) com sua criança devido aos procedimentos deste estudo, além daqueles relacionados apenas à coleta de sangue habitual com agulha descartável, coleta de secreção de nasofaringe e radiografia de tórax.

4. Benefícios que poderão ser obtidos:

Os resultados desses exames poderão auxiliar na identificação de vírus nas crianças com suspeita clínica de coqueluche, auxiliando assim no tratamento da mesma. As informações que forem adquiridas com o estudo poderão também ajudar outras crianças no futuro.

5. Utilização do material biológico:

Todo material biológico coletado de sua criança será utilizado apenas neste estudo e somente para os exames de laboratório descritos no próprio protocolo. Este material não será utilizado em outros estudos ou para outros fins.

6. Opções caso não participe do estudo:

Caso você decida que sua criança não participará ou deixará de participar desse estudo a qualquer momento, basta avisar o médico. Se sua criança sair do estudo (seja qual for o motivo) ele/ela não perderá nenhum benefício, tratamento médico ou direitos legais aos quais tenha direito, porém o médico do estudo poderá continuar a usar as informações e o material biológico (exames) que já foram coletados antes dela deixar o estudo, mas apenas para o objetivo de se identificar a causa da doença e, se necessário, iniciar o tratamento o mais rápido possível.

7. Informações sobre a privacidade da minha criança:

Se você concordar com a participação dele (a) neste estudo, as informações sobre a saúde dele/dela serão mantidas de maneira confidencial. Apenas a equipe do estudo e de profissionais responsáveis pelo tratamento terão acesso às informações de sua criança. Se não concordar com isso, você pode escolher não assinar este termo.

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do responsável legal:

ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas, **Dra. Angela Esposito Ferronato e Dra. Sandra E. Vieira**, que podem ser encontradas no endereço Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – telefone: (11) 3091-9409. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) –Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire – 2º andar–tel:3061-8004, FAX:3061-8004 E-mail: cep.fm@usp.br** ou CEP-HU/USP: Av. Prof. Lineu Pestes, 2565 - Cidade Universitária - CEP: 05508-000 - São Paulo - SP - Telefone: (11) 3091-9457 - Fax:(11)3091-9479-E-mail:cep@hu.usp.br.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento da minha filha na Instituição;

2. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, e não será divulgada a identificação de nenhum paciente;

3. É garantido o seu direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

4. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação;

5. Os pesquisadores comprometem-se a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, sobre o estudo: **“Identificação de Vírus Respiratórios em lactentes internados com suspeita clínica de coqueluche”**.

Eu discuti com a **Profa. Dra. Sandra Elisabete Vieira** 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.

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do paciente/representante legal

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 ____ / ____ / ____

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do responsável legal:

Anexo B - Protocolo clínico padronizado à admissão

PROTOCOLO DE ADMISSÃO E EVOLUÇÃO:

Nome: _____ Matrícula: _____

Idade: _____ Data admissão: _____

Data de nascimento: _____ Data da alta: _____

Sintomas apresentados à admissão:

- a) tosse: () 1. sim () 2. não duração: ____
- b) tosse com vômitos: () 1. sim () 2. não
- c) tosse com apneia: () 1. sim () 2. não
- d) tosse com guincho: () 1. sim () 2. não
- e) tosse com cianose: () 1. sim () 2. não
- f) cansaço: () 1. sim () 2. não
- g) febre: () 1. sim () 2. não duração: ____
- h) anorexia: () 1. sim () 2. não
- i) conjuntivite: () 1. sim () 2. não
- k) outros: _____

Quadro clínico inicial:

Estado geral	
FR/FC	
Perfusão	
Dispneia/grau	
Cianose	
Nível de consciência	
Saturação de O ₂	
Ausculta pulmonar	
Temperatura	
outros	

Antecedente:

Idade da mãe: _____ idade do pai: _____ renda familiar em SM: _____

Condições de habitação: _____

Idade gestacional, dados do parto e gestação: _____

Doenças prévias: _____

Amamentação /tempo: _____

Frequenta creche: _____

nº irmãos e idade: _____

nº de pessoas no domicílio: _____

Contato com tossidores: _____

Fumante passivo: _____

Comorbidades: _____

Vacinação: DPT = 1ª dose () 2ª dose () 3ª dose ()

Resultados de exames admissionais:

Exames	Data da coleta	Resultados:
HMG		
HMC		
IFI - vírus		
BP		
Rx tórax:		

Evolução:

Medicações prescritas e tempo de uso:

	Medicação	Tempo de uso em dias
Broncodilatador		
Corticoide sistêmico		
Antibióticos		
Oxigênio (via de administração)		
Hidratação parenteral		
Outros.		

Complicações infecciosas / data do diagnóstico (dias após internação)

☐ _____

Necessidade de internação em UTI: () 1. sim () 2. não; tempo de UTI _____

Necessidade de VPM: () 1. sim () 2. não; indicação de VPM: _____ tempo de VPM _____

Tempo total de internação: _____

Diagnóstico de alta e destino: _____

Resultados de outros exames: _____

Anexo C - Aprovação do Comitê de Ética

São Paulo, 28 de julho de 2014.

Il^{mo}(a). S^{ra}(a).

Dra. Sandra Elisabete Vieira
Faculdade de Medicina
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "Identificação de vírus respiratórios em lactentes internados com suspeita clínica de coqueluche"

Pesquisador(a) responsável: Dra. Sandra Elisabete Vieira

Pesquisadora executante: Angela Esposito Ferronato

CAAE: 31507614.6.0000.0065

Registro CEP-HU/USP: 1383/14

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 25 de julho de 2014, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios parciais e final, de acordo com a Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, inciso XI.2, letra "d".

O primeiro relatório está previsto para 26 de janeiro de 2015.

Atenciosamente,

Dr. Mauricio Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CONSELHO TÉCNICO CIENTÍFICO – CTC / IAL

São Paulo, 07 de abril de 2014.

Projeto: CTC 71 E / 2013

Identificação de vírus respiratórios em lactentes internados com suspeita clínica de coqueluche.

Coordenação: Angela Esposito Ferronato - HU/USP (aluna de doutorado) e
Dra. Sandra E. Vieira – FMUSP (orientador)

Responsável no IAL: PqC Daniela Leite (IAL)

Prezado(s) Coordenador(es),

Comunicamos que o projeto foi aprovado quanto ao Mérito Científico pelo Conselho Técnico Científico do IAL em 01 de abril de 2014, com Ciência da Direção Geral e cadastro provisório N° CTC-IAL 71 E / 2013 .

O cadastro definitivo será realizado após o envio, pelo coordenador do projeto, do(s) parecer(es) do(s) Comitês de Ética- CEP/IAL e/ou CEUA, quanto pertinente.

Atenciosamente,

MARIA DO CARMO SAMPAIO TAVARES TIMENETSKY
PRESIDENTE DO CTC/IAL

1ª Via: Coordenador ✓
2ª Via: Diretor de Centro
3ª Via: CEP
4ª Via: CTC

8 REFERÊNCIAS

1. Kerr JR, Matthews RC. Bordetella pertussis infection: pathogenesis, diagnosis, management, and the role of protective immunity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19(2):77-88.
2. Nieves DJ, Heininger U. Bordetella pertussis. *Microbiol Spectr*. 2016;4(3).
3. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof Alexandre Vranjac” (CVE). Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória. Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, SP, Brasil. *Informe Técnico Coqueluche: atualização da situação epidemiológica*. 2011. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-respiratoria/doc/2011/if11_coqueluche.pdf>. Acesso em: 23 set. 2016.
4. Kilgore PE, Salim AM, Zervos MJ, Schmitt HJ. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clin Microb Rev*. 2016;29(3):449-86.
5. Tanaka M, Vitek CR, Pascual FB, Bisgard KM, Tate JE, Murphy TV. Trends in pertussis among infants in the United States, 1980-1999. *JAMA*. 2003;290(22):2968-75.
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Pertussis (whooping cough)*. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/pertussis/about/complications.html>>. Acesso em: 23 abr. 2016.
7. Cone TC Jr. Whooping cough is first described as a disease sui generis by Baillou in 1640. *Pediatrics*. 1970;46(4):522.

8. Hegerle N, Guiso N. Epidemiology of whooping cough & typing of *Bordetella pertussis*. *Future Microbiol.* 2013;8(11):1391-403.
9. Bordet J, Octave G. Le microbe de la coqueluche. *Ann Inst Pasteur.* 1906;20:731-41.
10. Baker JP, Katz SL. Childhood vaccine development: an overview. *Pediatr Res.* 2004;55(2):347-56.
11. World Health Organization (WHO). Global Health Observatory data repository. *Pertussis. Reported cases by WHO region.* 2017. Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.1520_43>. Acesso em: 20 jul. 2017.
12. Guiso, N. *Bordetella pertussis*: Why is it still circulating? *J Infect.* 2014;68(Suppl 1):S119-24.
13. Cherry JD. Pertussis: the trials and tribulations of old and new pertussis vaccines. *Vaccine.* 1992;10(14):1033-8.
14. Sato Y, Kimura M, Fukumi H. Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet.* 1984;1(8369):122-6.
15. McCormick CM, Czachor JS. Pertussis infections and vaccinations in Bolivia, Brazil and Mexico from 1980 to 2009. *Travel Med Infect Dis.* 2013;11(3):146-51.
16. Cherry JD. Historical review of pertussis and the classical vaccine. *J Infect Dis.* 1996;174(Suppl 3):S259-63.

17. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MT, Churcher CM, Bentley SD, Mungall KL, Cerdeño-Tárraga AM, Temple L, James K, Harris B, Quail MA, Achtman M, Atkin R, Baker S, Basham D, Bason N, Cherevach I, Chillingworth T, Collins M, Cronin A, Davis P, Doggett J, Feltwell T, Goble A, Hamlin N, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, Leather S, Moule S, Norberczak H, O'Neil S, Ormond D, Price C, Rabinowitsch E, Rutter S, Sanders M, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Unwin L, Whitehead S, Barrell BG, Maskell DJ. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet.* 2003 ;35(1):32-40.
18. Matoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(2):326-82.
19. Bricks LF. Pertussis: new vaccination strategies to prevent an old disease. *J Health Biol Sci.* 2013;1(2):73-83.
20. Merkel TJ, Boucher PE, Stibitz S, Grippe VK. Analysis of *bvgR* expression in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 2003;185(23):6902-12.
21. Temporão JG. O Programa Nacional de Imunizações (PNI): origens e desenvolvimento. *Hist Cienc Saude-Manguinhos.* 2003;10(Suppl 2):601-17.
22. Brasil. Portal da Saúde. Ministério da Saúde. *Situação epidemiológica - dados*. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/635-secretaria-svs/vigilancia-d-e-a-a-z/coqueluche/11196-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

23. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da coqueluche, Brasil, 2015. *Boletim epidemiológico*. 2016;47(32):1-9. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/imagens/pdf/2016/setembro/15/2016-025---Coqueluche-publica---o.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2017.
24. Cody CL, Baraff LJ, Cherry JD, Marcy SM, Manclark CR. Nature and rates of adverse reactions associated with DTP and DT immunizations in infants and children. *Pediatrics*. 1981 Nov;68(5):650-60.
25. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Alerta sobre a situação epidemiológica da coqueluche no Brasil*. Brasília-DF. Brasil. 2013. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portal/saude/noticia/9243/785/ministerio-da-saude-alerta-sobre-a-situacao-epidemiologica-da-coqueluche-no-brasil.html>>. Acesso em: 23 jun. 2016.
26. Brasil. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. *Informação de Saúde (TABNET). Epidemiológica e morbidade. Coqueluche*. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29889951&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinannet/cnv/coque>>. Acesso em: 20 jul. 2017.
27. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). *Provisional Pertussis Surveillance Report. Notice to Readers: Provisional 2012 Reports of Notifiable Disease. January 4, 2013/61(52)*. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/pertussis/downloads/Provisional-Pertussis-Surveillance-Report.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2016.
28. Mink CM, Cherry JD, Christenson P, Lewis K, Pineda E, Shlian D, Dawson JA, Blumberg DA. A search for Bordetella pertussis infection in university students. *Clin Infect Dis*. 1992;14(2):464-71.
29. Choi YH, Campbell H, Amirthalingam G, van Hoek AJ, Miller E. Investigating the pertussis resurgence in England and Wales, and options for future control. *BMC Med*. 2016;14(1):121.

30. Cherry JD, Grimprel E, Guiso N, Heininger U, Mertsola J. Defining pertussis epidemiology: clinical, microbiologic and serologic perspectives. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(5 Suppl):S25-34.
31. Sealey KL, Belcher T, Preston A. Bordetella pertussis epidemiology and evolution in the light of pertussis resurgence. *Infect Genet Evol*. 2016;40:136-43.
32. Cherry JD, Tan T, Wirsing von König CH, Forsyth KD, Thisyakorn U, Greenberg D, Johnson D, Marchant C, Plotkin S. Clinical definitions of pertussis: Summary of a Global Pertussis Initiative roundtable meeting, February 2011. *Clin Infect Dis*. 2012;54(12):1756-64.
33. Forsyth KD, Campins-Martí M, Caro J, Cherry JD, Greenberg D, Guiso N, Heininger U, Schellekens J, Tan T, von König CH, Plotkin S; Global Pertussis Initiative. New pertussis vaccination strategies beyond infancy: recommendations by the global pertussis initiative. *Clin Infect Dis*. 2004;39(12):1802-9.
34. Amirthalingam G. Strategies to control pertussis in infants. *Arch Dis Child*. 2013;98(7):552-5.
35. Campins M, Moreno-Pérez D, Gil-de Miguel A, González-Romo F, Moraga-Llop FA, Arístegui-Fernández J, Goncé-Mellgren A, Bayas JM, Salleras-Sanmartí L. Whooping cough in Spain. Current epidemiology, prevention and control strategies. Recommendations by the Pertussis Working Group. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(4):240-53.
36. Zouari A, Smaoui H, Kechrid A. The diagnosis of pertussis: which method to choose? *Crit Rev Microbiol*. 2012;38(2):111-21.
37. Leite D, Blanco RM, Melo LCV, Fiorio CE, Martins LM, Vaz TMI, Fernandes AS, Sacchi CT. Implementation and assessment of the use of real-time pcr in routine diagnosis for bordetella pertussis detection in Brazil. *Arch Pediatr Infect Dis*. 2013;1(5):196-202.

38. Vaz-de-Lima LR, Martin MD, Pawloski LC, Leite D, Rocha KC, de Brito CA, Vaz TM, Martins LM, Alvarenga DP, Ribeiro AF, Carvalhanas TR, Nakasaki RM, Oliveira SS, Waldman EA, Tondella ML; Clinical and Epidemiological Team Work of Hospital Sentinels of the City of São Paulo. Serodiagnosis as adjunct assay for pertussis infection in São Paulo, Brazil. *Clin Vaccine Immunol*. 2014;21(5):636-40.
39. McGirr A, Fisman DN. Duration of pertussis immunity after DTaP immunization: a meta-analysis. *Pediatrics*. 2015;135(2):331-43.
40. Tozzi AE, Pandolfi E, Celentano LP, Massari M, Salmaso S, Ciofi degli Atti ML; EUVAC-NET Study Group. Comparison of pertussis surveillance systems in Europe. *Vaccine*. 2007;25(2):291-7.
41. Warfel JM1, Zimmerman LI, Merkel TJ. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(2):787-92.
42. He Q1. Evolution of *Bordetella pertussis*. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35(8):915-7.
43. Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, Cassiday PK, Chiang CS, Dalby T, Fry NK, Gaillard ME, van Gent M, Guiso N, Hallander HO, Harvill ET, He Q, van der Heide HG, Heuvelman K, Hozbor DF, Kamachi K, Karataev GI, Lan R, Lutyńska A, Maharjan RP, Mertsola J, Miyamura T, Octavia S, Preston A, Quail MA, Sintchenko V, Stefanelli P, Tondella ML, Tsang RS, Xu Y, Yao SM, Zhang S, Parkhill J, Mooi FR. Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *MBio*. 2014;5(2):e01074.
44. Berezin EN, de Moraes JC, Leite D, Carvalhanas TR, Yu AL, Blanco RM, Rodrigues M, Almeida FJ, Bricks LF. Sources of pertussis infection in young babies from São Paulo State, Brazil. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33(12):1289-91.

45. Durand C, Flament E. Pertussis vaccination for parents: proposal and evaluation of two professional practices in a maternity hospital. *Arch Pediatr*. 2011;18(4):362-9.
46. Healy CM, Rench MA, Baker CJ. Implementation of cocooning against pertussis in a high-risk population. *Clin Infect Dis*. 2011;52(2):157-62.
47. Halperin BA, Morris A, Mackinnon-Cameron D, Mutch J, Langley JM, McNeil SA, Macdougall D, Halperin SA. Kinetics of the antibody response to tetanus-diphtheria-acellular pertussis vaccine in women of childbearing age and postpartum women. *Clin Infect Dis*. 2011;53(9):885-92.
48. Centers of Disease Control (CDC). Pregnancy and whooping cough. January 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/pertussis/pregnant/index.html>>. Acesso em: 30 set. 2016.
49. World Health Organization (WHO) Publication. Pertussis vaccines: WHO position paper - Recommendations. *Vaccine*. 2011;29(13):2355-6.
50. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações. Informe Técnico Implantação da vacina adsorvida difteria, tétano e coqueluche (pertussis acelular) tipo adulto-dTpa. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/junho/26/Informe-Tecnico-dTpa-2014.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2016.
51. Centers of Disease Control (CDC). Updated Recommendation for Use of tetanus toxoid, reduce diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccine (Tdap) in Pregnant Women – Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2012. Weekly. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2013;62(7):131-5.

52. Hardy-Fairbanks AJ, Pan SJ, Decker MD, Johnson DR, Greenberg DP, Kirkland KB, Talbot EA, Bernstein HH. Immune responses in infants whose mothers received Tdap vaccine during pregnancy. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(11):1257-60.
53. Munoz FM, Bond NH, Maccato M, Pinell P, Hammill HA, Swamy GK, Walter EB, Jackson LA, Englund JA, Edwards MS, Healy CM, Petrie CR, Ferreira J, Goll JB, Baker CJ. Safety and immunogenicity of tetanus diphtheria and acellular pertussis (Tdap) immunization during pregnancy in mothers and infants: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2014;311(17):1760-9.
54. Amirthalingam G, Andrews N, Campbell H, Ribeiro S, Kara E, Donegan K, Fry NK, Miller E, Ramsay M. Effectiveness of maternal pertussis vaccination in England: an observational study. *Lancet*. 2014;384(9953):1521-8.
55. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações. *Nota informativa sobre mudanças no calendário nacional de vacinação para o ano de 2017*. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/28/Nota-Informativa-384-Calendario-Nacional-de-Vacinacao-2017.pdf>>. Acesso em: 8 set. 2017.
56. Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS. *Imunizações-cobertura-Brasil. dTpa (gestantes)*. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/CGI/tabcgi.exe?pni/cnv/cpniuf.def>>. Acesso em: 8 jul. 2017.
57. Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS. *Imunizações-cobertura-São Paulo. dTpa (gestantes)*. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?pni/CNV/CPNISP.def>>. Acesso em: 8 jul. 2017.

58. Eberhardt CS, Blanchard-Rohner G, Lemaître B, Boukrid M, Combescure C, Othenin-Girard V, Chilin A, Petre J, de Tejada BM, Siegrist CA. Maternal immunization earlier in pregnancy maximizes antibody transfer and expected infant seropositivity against pertussis. *Clin Infect Dis*. 2016;62(7):829-36.
59. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *Trend and number of reported pertussis cases, EU/EEA, 2010–2014*. Disponível em: <<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/figure-5-trend-and-number-reported-pertussis-cases-eueea-2010-2014>>. Acesso em: 8 jul. 2017.
60. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Notifiable Disease Surveillance system and Supplemental Pertussis Surveillance System*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting.html>>. Acesso em: 10 jun. 2017.
61. Brasil. Ministério da Saúde. Informações de saúde. TABNET. *Agravos de notificação compulsória. Coqueluche*. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29889951&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defctohtm.exe?sinannet/cnv/coque>>. Acesso em: 27 jun. 2017.
62. São Paulo (estado). Secretaria da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) "Prof. Alexandre Vranjac". *Dados estatísticos. Coqueluche*. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-d-e-transmissao-respiratoria/coqueluche/dados/coqueluche_dados.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2017.
63. Andrade BG, Marin MF, Cambuy DD, Fonseca EL, Souza NF, Vicente AC. Complete genome sequence of a clinical Bordetella pertussis isolate from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(7):972-4.

64. Vittucci AC, Spuri Vennarucci V, Grandin A, Russo C, Lancella L, Tozze AE, Bartuli A. Pertussis in infants: an underestimated disease. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1):414.
65. Donoso A, Arriagada D, Cruces P, Diaz F. Severe pertussis: State of the art. *Rev Chilena Infectol.* 2012;29(3):290-306.
66. Barkoff AM, Gröndahl-Yli-Hannuksela K, He Q. Seroprevalence studies of pertussis: what have we learned from different immunized populations. *Pathog Dis.* 2015;73(7).
67. Van der Zee A, Shellekens JF, Mooi FR. Laboratory Diagnosis of Pertussis. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28:1005-1026.
68. São Paulo (estado). Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de controle de doenças. Instituto Adolfo Lutz. Centro de bacteriologia. *Protocolo: diagnóstico laboratorial da coqueluche.* Disponível em: <http://www.suvisa.ba.gov.br/sites/default/files/vigilancia_epidemiologica/imunopreveniveis/arquivo/2013/04/02/Manual%20de%20Diagn%C3%B3stico%20da%20Coqueluche202010%5B2%5D.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2016.
69. Brasil. Ministério da Saúde. *Nota informativa Nº 08, de 2014.* Disponível em: <http://portal.saude.pe.gov.br/sites/portal.saude.pe.gov.br/files/nota_informativa_3_vigilancia_epidemiologica_da_coqueluche.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2017.
70. Torres RS, Santos TZ, Torres RA, Pereira VV, Fávero LA, M Filho OR, Penkal ML, Araujo LS. Resurgence of pertussis at the age of vaccination: clinical, epidemiological, and molecular aspects. *J Pediatr (Rio J).* 2015;91(4):333-8.

71. Ghorbani GR, Zahraei SM, Moosazadeh M, Afshari M, Doosti F. Comparing Seasonal Pattern of Laboratory Confirmed Cases of Pertussis with Clinically Suspected Cases. *Osong Public Health Res Perspect.* 2016;7(2):131-7.
72. São Paulo (município). Secretaria Municipal de Saúde - SMS. Coordenação de Vigilância em Saúde - COVISA. Gerência do Centro de Controle de Doenças - CCD. *Alerta epidemiológico: coqueluche 2011*. Disponível em: <http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/chamadas/alerta_epidemiologico_-_coqueluche_1316542279.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2016.
73. Wood N, McIntyre P: Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatr Respir Rev.* 2008;9(3):201-11; quiz 211-2.
74. Cherry JD. Treatment of pertussis-2017. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2017 Jun 15.
75. Wang K, Bettiol S, Thompson MJ, Roberts NW, Perera R, Heneghan CJ, Harnden A. Symptomatic treatment of the cough in whooping cough. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;(9):CD003257.
76. Tiwari T, Murphy TV, Moran J; National Immunization Program, CDC. Recommended antimicrobial agents for the treatment and postexposure prophylaxis of pertussis: 2005 CDC Guidelines. *MMWR Recomm Rep.* 2005;54(RR-14):1-16.
77. Winter K, Zipprich J, Harriman K, Murray EL, Gornbein J, Hammer SJ, Yeganeh N, Adachi K, Cherry JD. Risk factors associated with infant deaths from pertussis: a case-control study. *Clin Infect Dis.* 2015;61(7):1099-106.

78. Halasa N, Barr F, Johnson J, Edwards K. Fatal pulmonary hypertension associated with pertussis in infants: does extracorporeal membrane oxygenation have a role? *Pediatrics*. 2003;112(6 Pt 1):1274-8.
79. Taffarel P, Jorro Barón F, Bonetto G. Update on leukoreduction therapies as alternatives for the treatment of severe pertussis. *Arch Argent Pediatr*. 2015;113(5):456-64.
80. Rowlands HE, Goldman AP, Harrington K, Karimova A, Brierley J, Cross N, Skellett S, Peters MJ. Impact of rapid leukodepletion on the outcome of severe clinical pertussis in young infants. *Pediatrics*. 2010;126(4):e816-27.
81. Brasil. Ministério da Saúde. *Novas recomendações para vigilância epidemiológica da coqueluche*. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/15/Coq-NI-Novas-Recomenda---es-02-06-2014-FINAL.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2017.
82. Martínez CD, Mendoza DV, Peraza GT, Carmenate MA, Morera AB Antonio. Síndrome coqueluchoide y tos ferina. *Rev Cubana Med Gen Integr*. 2012;28(4):725-34.
83. Sarbay H, Polat A, Mete E, Balci YI, Akin M. Pertussis-like syndrome associated with adenovirus presenting with hyperleukocytosis: case report. *North Clin Istanbul*. 2016;3(2):140-2.
84. Ferrer A, Calicó I, Manresa JM, Andreu A, Moraga F, Valle I. Microorganisms isolated in cases of pertussis-like syndrome. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2000;18(9):433-8.
85. Galles Pacareu C, Ferrer Marcelles A, Moraga Llop FA, Calico Bosch I, Fernández Pérez F. Pertussis syndrome: study of 74 cases. *An Esp Pediatr*. 1989;31(6):549-53.

86. Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma M FC, Kroes ACM, Claas ECJ. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol*. 2004;42(4):1564-9.
87. Kusel MMH, Klerk NH, Holt PG, Keadze T, Johnston SL, Sly PD. Role of respiratory viruses in acute upper and lower respiratory tract illness in the first year of life: a birth cohort study. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25(8):680-6.
88. Ferronato AE, Gilio AE, Ferraro AA, Paulis Md, Vieira SE. Etiological diagnosis reduces the use of antibiotics in infants with bronchiolitis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(9):1001-6.
89. Zheng X, Quianzon S, Mu Y, Katz BZ. Comparison of two new rapid antigen detection assays for respiratory syncytial virus with another assay and shell vial culture. *J Clin Virol*. 2004;31(2):130-3.
90. Henrickson KJ, Hall CB. Diagnostic assays for respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26(11 Suppl):S36-40.
91. Solomon HE, Grandien M, Avilla MM, Peterson CA, Weissenbacher MC. Comparison of three techniques for detection of respiratory viruses in nasopharyngeal aspirates from children with lower acute respiratory infections. *J Med Virol*. 1989;28(3):159-62.
92. Nuolivirta K, Koponen P, He Q, Halkosalo A, Korppi M, Vesikari T, Helminen M. Bordetella pertussis infection is common in nonvaccinated infants admitted for bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(11):1013-5.
93. Abu Raya BA, Bamberger E, Kassis I, Kugelman A, Srugo I, Miron D. Bordetella pertussis Infection Attenuates Clinical Course of Acute Bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(6):619-21.

94. Cosnes-Lambe C, Raymond J, Chalumeau M, Pons-Catalano C, Moulin F, de Suremain N, Reglier-Poupet H, Lebon P, Poyart C, Gendrel D. Pertussis and respiratory syncytial virus infections. *Eur J Pediatr*. 2008;167(9):1017-9.
95. Korppi M, Kivistö J, Koponen P, Lehtinen P, Remes S, Piippo-Savolainen E, Piedra PA, Espinola JA, Camargo CA Jr, Jartti T. Absence of bordetella pertussis among infant hospitalized for bronchiolitis in Finland, 2008-2010. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35(2):219-21.
96. Piedra PA, Mansbach JM, Jewell AM, Thakar SD, Grant CC, Sullivan AF, Espinola JA, Camargo CA Jr. Bordetella pertussis is an uncommon pathogen in children hospitalized with bronchiolitis during the winter season. *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34(6):566-70.
97. Van den Brink G, Wishaupt JO, Douma JC, Hartwig NG, Versteegh FG. Bordetella pertussis: an underreported pathogen in pediatric respiratory infections, a prospective cohort study. *BMC Infect Dis*. 2014;14:526.
98. Bellettini CV, de Oliveira AW, Tusset C, Baethgen LF, Amantéa SL, Motta F, Gasparotto A, Andreolla HF, Pasqualotto AC. Clinical, laboratorial and radiographic predictors of Bordetella pertussis infection. *Rev Paul Pediatr*. 2014;32(4):292-8.
99. Walsh PF, Kimmel L, Feola M, Tran T, Lim C, De Salvia L, Pusavat J, Michaelson S, Nguyen TA, Emery K, Mordechai E, Adelson ME. Prevalence of Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis in infants presenting to the emergency department with bronchiolitis. *J Emerg Med*. 2011;40(3):256-61.
100. Siberry GK, Paquette NR, Ross TI, Perl TM, Valsamakis A. Low prevalence of pertussis among children admitted with respiratory symptoms during respiratory syncytial virus season. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006;27(1):95-7.

101. Heininger U, Burckhardt MA. Bordetella pertussis and concomitant viral respiratory tract infections are rare in children with cough illness. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(8):640-4.
102. Crowcroft NS, Booy R, Harrison T, Spicer L, Britto J, Mok Q, Heath P, Murdoch I, Zambon M, George R, Miller E. Severe and unrecognised: pertussis in UK infants. *Arch Dis Child*. 2003;88(9):802-6.
103. Moreno Samos M, Amores Torres M, Pradillo Martín MC, Moreno-Pérez D, Cordon Martínez A, Urda Cardona A, Ramos Fernández JM. Incidence and severity of pertussis in infants with a respiratory syncytial virus infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33:476-9.
104. Frassanito A, Nenna R, Nicolai A, Pierangeli A, Tozzi AE, Stefanelli P, Carsetti R, Concato C, Schiavoni I, Midulla F; Pertussis study group. Infants hospitalized for Bordetella pertussis infection commonly have respiratory viral coinfections. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):492.
105. Ferronato AE, Gilio AE, Vieira SE, Respiratory viral infections in infants with clinically suspected pertussis. *J Pediatr (Rio J)*. 2013;89(6) 549-53.
106. Gonçalves CR, Vaz TM, Medeiros MI, Castro MT, Rocha MM, Melles CE, Irino K. Phenotypical and genotypical characterization of Bordetella pertussis strains isolated in São Paulo, Brazil, 1988-2002. *Rev Inst Med Trop*. 2007;49:123-5.
107. Tatti KM, Wu KH, Tondella ML, Cassiday PK, Cortese MM, Wilkins PP, Sanden GN. Development and evaluation of dual-target real-time polymerase chain reaction assays to detect Bordetella spp. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;61(3):264-72.
108. Brasil. Portal da Saúde. Ministério da Saúde alerta sobre situação epidemiológica da coqueluche no Brasil. 2013. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/profissional-e-gestor/vigilancia/links-vigilancia?start=105>>. Acesso em: 5 out. 2016.

109. Gentile A, Romanin VS, Juárez Mdel V, Lución MF, Marques Mde L, Mistchenko AS. Epidemiology of Bordetella pertussis in a children's hospital. *Arch Argent Pediatr*. 2014;112(1):26-32.
110. Tozzi AE, Ravà L, Ciofi degli Atti ML, Salmaso S; Progetto Pertosse Working Group. Clinical presentation of pertussis in unvaccinated and vaccinated children in the first six years of life. *Pediatrics*. 2003;112(5):1069-75.
111. Nelson WL, Hopkins RS, Roe MH, Glode MP. Simultaneous infection with Bordetella pertussis and respiratory syncytial virus in hospitalized children. *Pediatr Infect Dis*. 1986;5(5):540-4.
112. Pavic-Espinoza I, Bendeزú-Medina S, Herrera-Alzamora A, Weilg P, Pons MJ, Aguilar-Luis MA, Petrozzi-Helasvuo V, Del Valle Mendoza J. High prevalence of Bordetella pertussis in children under 5 years old hospitalized with acute respiratory infections in Lima, Peru. *BMC Infect Dis*. 2015;15:554.
113. Korppi M, Hiltunen J. Pertussis is common in nonvaccinated infants hospitalized for respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26(4):316-8.
114. De Melker HE¹, Versteegh FG, Schellekens JF, Teunis PF, Kretzschmar M. The incidence of Bordetella pertussis infections estimated in the population from a combination of serological surveys. *J Infect*. 2006;53(2):106-13.
115. Giménez-Sánchez F, Cobos-Carrascosa E, Sánchez-Forte M, López-Sánchez MÁ, González-Jiménez Y, Azor-Martínez E. Clinical and epidemiological differences between Bordetella pertussis and respiratory syncytial virus infections in infants: A matched case control study. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32(6):359-62.

116. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, 2016. 82-96. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_1ed_atual.pdf>. Acesso em: 20 set. 2017.
117. Cherry JD. The present and future control of pertussis. *Clin Infect Dis*. 2010;51(6):663-7.
118. Bouchez V, Guiso N. Bordetella pertussis, B. parapertussis, vaccines and cycles of whooping cough. *Pathog Dis*. 2015;73(7).
119. Thornton HV, Blair PS, Lovering AM, Muir P, Hay AD. Clinical presentation and microbiological diagnosis in paediatric respiratory tract infection: a systematic review. *Br J Gen Pract*. 2015;65(631):e69-81.
120. Kaczmarek MC, Ware RS, Nimmo GR, Robson JM, Lambert SB. Pertussis Seasonality Evident in Polymerase Chain Reaction and Serological Testing Data, Queensland, Australia. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2016;5(2):214-7.
121. Gryninger LCF. Estudo descritivo de série histórica da coqueluche no Brasil no período de 2006 a 2013. 2016. 130f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.