

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA DAS DOENÇAS INFECCIOSAS**

FLÁVIO ROCHA DA SILVA

TÍTULO

**O IMPACTO DA COQUELUCHE NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. ESTUDO
EPIDEMIOLÓGICO E PERCEPÇÃO DA BIOSSEGURANÇA. CONTRIBUINDO
PARA ANÁLISE DA RE-EMERGÊNCIA NO BRASIL.**

RIO DE JANEIRO

2013

O Impacto da Coqueluche no Estado do Rio de Janeiro. Estudo Epidemiológico e Percepção da Biossegurança. Contribuindo Para Análise da Re-emergência no Brasil.

FLÁVIO ROCHA DA SILVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, para obtenção do grau de Doutor em Ciências. Área de concentração Biossegurança da Saúde.

Orientador: Dr. Mauro Célio de Almeida Marzochi

Co-orientadora: Dra. Marli Brito M. Albuquerque Navarro

RIO DE JANEIRO

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S586 Silva, Flávio Rocha da

O Impacto da coqueluche no estado do Rio de Janeiro. Estudo epidemiológico e percepção da biossegurança. Contribuindo para análise da re-emergência no Brasil / Flávio Rocha Silva. – Rio de Janeiro, 2013.

v, 86 f. : il.; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, 2013.

Bibliografia: f. 78-81

1. Biossegurança 2. Coqueluche 3. Rio de Janeiro 4. Inovação tecnológica. 5. Profissionais de saúde I. Título.

CDD 614.543

FLÁVIO ROCHA DA SILVA**O Impacto da Coqueluche no Estado do Rio de Janeiro. Estudo Epidemiológico e Percepção da Biossegurança. Contribuindo Para Análise da Re-emergência no Brasil.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, para obtenção do grau de Doutor em Ciências. Área de concentração Biossegurança da Saúde.

Orientadores: Prof. Dr. Mauro Célio de Almeida Marzochi

Profa. Dra. Marli Brito M. Albuquerque Navarro

Aprovado: 18/09/2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Geraldo R. Garcia Armôa
Doutor em Ciências
Instituto Oswaldo Cruz

Profa. Dra. Luciana Reis Malheiros
Doutora em Ciências
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Harrison Magdinier Gomes
Doutor em Ciências
Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Bernardo Elias Soares
Doutor em Ciências
Escola Nacional de Saúde Pública

Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho
Doutor em Ciências
Escola Politécnico Joaquim Venâncio

AGRADECIMENTO

- A todas as instituições de saúde que colaboraram para a realização desse trabalho.
- A todos os profissionais que contribuíram para o sucesso dos fóruns e simpósios itinerantes de ciência e saúde.
- Aos meus orientadores pela dedicação, paciência e amizade.
- A minha esposa Patrícia e filhos: Gabriel, Daniel e Pedro, pelo amor, compreensão e carinho em todos os momentos.
- Ao meu pai Erly e mãe Neuza pela formação ética .
- As equipes do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto Oswaldo Cruz e do Núcleo de Biossegurança da Escola Nacional de Saúde Pública pelo apoio e colaboração.
- Ao Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas por permitir o desenvolvimento desse trabalho.
- A Deus causa primária de todas as coisas, pela sua luz e me permitir o crescimento moral e espiritual.

Silva, F.R. **O Impacto da Coqueluche no Estado do Rio de Janeiro. Estudo Epidemiológico e Percepção da Biossegurança. Contribuindo Para Análise da Re-emergência no Brasil.** Rio de Janeiro, 2013. 86 f. Dissertação [Doutorado em Pesquisa Clínica das Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

RESUMO

A coqueluche é uma doença respiratória, causada pela bactéria *Bordetella pertussis*. Atualmente, estima-se a ocorrência anual de 50 milhões de casos e mais de 300 mil mortes anuais em todo mundo. A transmissão ocorre, principalmente, pelo contato direto de uma pessoa doente com uma pessoa suscetível, através de gotículas de secreção da orofaringe eliminada por tosse ou espirro. O estudo realizado objetivou a caracterização da coqueluche como doença re-emergente, visando a análise epidemiológica da doença no Estado do Rio de Janeiro, valorizando também a percepção da Biossegurança pelos profissionais da área da saúde. Os resultados alcançados revelaram indicadores da ressurgência da doença no Brasil. As análises foram objeto de reflexões propostas em quatro artigos científicos, que explicitaram as metodologias utilizadas, os resultados encontrados e as discussões pertinentes à pesquisa. Os artigos intitulam-se: (1) An overview of reemerging Pertussis and evidence of resurgence in Brazil, (2); A re-emergência da coqueluche; Da rotina dos atendimentos ao imperativo da Biossegurança (3); Fórum itinerante de ciência e saúde. Programa de capacitação para as doenças negligenciadas e re-emergentes e (4) Identification of linear B epitopes of pertactin of *Bordetella pertussis* induced by immunization with whole and acellular vaccine.

Palavras chaves: 1. Biossegurança 2. Coqueluche 3. Rio de Janeiro 4. Inovação tecnológica. 5. Profissionais de Saúde

Silva, F.R. **The impact of whooping cough in the state of Rio de Janeiro : Epidemiologic study and biosafety perception survey defining its re-emergence in Brazil** Rio de Janeiro, 2013. 86 p. Dissertation /Thesis [Doctoral Programme in Clinical Research of Infectious Diseases] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas /Evandro Chagas Clinical Research Institute

ABSTRACT

Whooping cough is a respiratory disease caused by the bacteria *Bordetella pertussis*. Today there is an estimate of fifty million cases a year and about three hundred thousand deaths worldwide. Transmission takes place mainly through direct contact of a sick to a susceptible person and spreads by oropharynx fluid droplets released by coughing or sneezing. The present study aimed at defining whooping cough as a re-emergent disease, taking the epidemiologic analysis of the disease in the state of Rio de Janeiro as base and also surveying perception and compliance to biosafety procedures among health workers. Results obtained strongly indicated resurgence of the disease in Brazil and data has been presented in scientific paper format , into four propositions that discussed methodology used, main results and thoughts pertaining to the investigation: The papers are entitled (1) An overview of re-emerging *pertussis* and evidence of resurgence in Brazil, (2) Re-emergence of whooping cough : from routine clinical evaluation to the demand of biosafety, (3) Mobile fora for science and health : a capacity-building program for neglected and re-emergent diseases and (4) Identification of linear B epitopes of pertactin of *Bordetella pertussis* induced by immunization with whole and acellular vaccine.

Key-Words : 1. Biosafety 2. Whooping cough /*pertussis* 3. Rio de Janeiro 4. Technologic innovation 5. Health workers

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVO GERAL	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
ASPECTOS ÉTICOS	12
ARTIGOS COM RESULTADOS DOS OBJETIVOS ALCANÇADOS	12
Artigo I: An overview of reemerging Pertussis and evidence of resurgence in Brazil.	13
Artigo II: A re-emergência da coqueluche. Da rotina dos atendimentos ao imperativo da biossegurança .	26
Artigo III: Fórum itinerante de ciência e saúde. Programa de capacitação para as doenças negligenciadas e re-emergentes.	38
Artigo IV: Identification of linear B epitopes of pertactin of <i>Bordetella pertussis</i> induced by immunization with whole and acellular vaccine.	52
DISCUSSÃO	74
CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICE (Questionário)	82
ANEXO (Prêmiação)	86

1) INTRODUÇÃO

1.1- Epidemiologia

A coqueluche é uma doença infecciosa aguda, sendo o agente etiológico a bactéria *Bordetella pertussis*, um cocobacilo, gram-negativo, imóvel e aeróbico. (HEWLETT, E.L. 1995; CDC 2013).

Estima-se que cerca de 50 milhões de casos e com 300 mil óbitos podem ocorrer a cada ano no mundo e a letalidade em crianças pode aproximar-se de 4%. Mundialmente, a coqueluche é a terceira causa de morte entre as doenças imunopreveníveis. (IVANOFF, B.; ROBERTSON, S.E. 1997; KERR, J. R.; MATTHEWS, R. C. 2000; WHO, 2013).

Atualmente verifica-se um crescimento acentuado da doença em diversos países, merecendo destaque na Argentina, Austrália, Canadá, Estados Unidos, Japão, Índia, Rússia e Suíça. Em 2010, o Center for Disease Control and Prevention (CDC/ATLANTA/EUA) registrou 27.550 casos de coqueluche, sendo 9.146 casos notificados na Califórnia (EUA), incluindo dez óbitos em bebês menores de três meses. Em 2011, a incidência permaneceu alta, com 2.462 casos relatados até setembro, apresentando uma taxa de 6,2 casos por 100 mil habitantes, sendo 8,8% (162) de hospitalizações e a maioria ocorreu em crianças menores de seis meses de idade (127;78%).(CDC, 2012).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em países que apresentaram uma cobertura vacinal superior a 90% para todas as doses da vacina DTP, ocorreu aumento considerável de casos no ano de 2011: Austrália 34.285 casos, Índia 38.493 casos, Japão 5.406 casos e Rússia 4.795 casos (TAN,T.; TRINDADE, E.; SKOWRONSKI, D. 2005; HANS et. al. 2007; WHO, 2013).

No Brasil, são notificados em média 2 mil casos por ano (Ministério da Saúde, 2013; Trevizan & Coutinho, 2008) e as crianças com menos de um ano de idade, pertencem ao grupo que apresenta taxa de incidência e letalidade mais acentuadas. (TREVIZAN, S.; COUTINHO, S.E.D. 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Algumas hipóteses apontadas para explicar o ressurgimento da doença são: (a) a perda gradual da imunidade adquirida por meio da vacina, (b) mudança genética da bactéria, (c) o aumento do número de portadores assintomáticos e seleção de variantes resistentes à vacina, (d) combinação de outros fatores como uso de novos métodos diagnósticos e melhoria dos sistemas

de vigilâncias epidemiológicas (MOOI et. al. 2001; BAMBERGER, E.S.; SRUGO, I. 2008; TREVIZAN, S.; COUTINHO, S.E.D. 2008).

A transmissão da coqueluche ocorre, principalmente, pelo contato direto de uma pessoa doente com uma pessoa suscetível, através de gotículas de secreção da orofaringe, eliminada por tosse, espirro ou ao falar. Também pode ocorrer transmissão por objetos contaminados com secreções do doente (WENDELBOE et. al., 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Em populações sem cobertura vacinal, a coqueluche apresenta-se como um dos maiores problemas de saúde pública, principalmente em crianças com idade até cinco anos. O microorganismo pode ser isolado em 25% dos casos em adultos com sete ou mais dias de tosse, mesmo com uma forma mais branda da doença. (MARGARET M. et. al. 2007). Atualmente os principais reservatórios e fontes de transmissão de *Bordetella pertussis* têm sido os adolescentes e os adultos, provavelmente devido à perda da imunidade adquirida. (BISGARD et. al., 2004; WHO, 2013).

1.2 Dinâmica da doença

Na era pré-vacinal, o período que vai das pesquisas referentes ao isolamento da *Bordetella pertussis*,(BORDET, J.; GENGOU, O.; 1907) até a elaboração de políticas amplas de imunização dirigida a população infantil, verificava-se que a incidência anual da coqueluche na Inglaterra e nos países nórdicos era de 200 a 1000 casos por 100 mil indivíduos (IVANOFF, B.; ROBERTSON, S.E. 1997). Louis Sauer, Kendrick e Eldering desenvolveram os primeiros imunizantes contra coqueluche (pertussis). Em 1942, Kendrick descobriu que sua vacina funcionava melhor na presença dos toxóides diftérico e tetânico, já que os três componentes agiam como adjuvantes entre si. Combinou-os, então, para formar a vacina DPT ou tríplice bacteriana – a primeira a imunizar contra mais de um microorganismo. Em grande parte dos países desenvolvidos, os programas de imunização destinaram maior atenção à população infantil, considerando a de maior susceptibilidade a faixa etária abaixo de um ano de idade. Em geral, os programas ganharam maior evidência na década de 1950, objetivando diminuir de forma significativa a incidência da doença. Durante a década de 70, entretanto, uma série de críticas à vacina DTP celular determinou um declínio na cobertura vacinal na Inglaterra, Suécia e Japão (MOOI, et. al., 2001). Nesses países, a incidência da coqueluche aumentou rapidamente, alcançando mais de 100 casos por 100 mil indivíduos. Por outro lado, países que mantiveram a taxa de cobertura vacinal acima de 90%, para as três doses da vacina DTP, notificaram menos de 10 casos por 100 mil indivíduos (IVANOFF, B.; ROBERTSON, S. 1997).

Enfatiza-se assim que a distribuição etária dos casos foi modificada após a introdução da vacinação em massa de crianças. Na era pré-vacinal, o valor da incidência ocorria em menores de seis anos de idade (EDWARDS et. al., 1999). Por outro lado, a era pós-vacinal caracterizou-se por uma alta proporção de casos em menores de seis meses, ou seja, crianças ainda não vacinadas (FARIZO et. al., 1990). Nas décadas de 1980 e 1990, diversos estudos demonstraram um aumento do número de casos entre adolescentes e adultos e recentemente vários países têm notificado o aumento do número de casos da doença em diversas faixas etárias (HALASA, N. B.; EDWARDS, K. M. 2004; BARMBERGER, E.S.; SRUGO, I. 2008; WHO, 2013).

O estudo de LIPHAUS et. al. 2008, baseado na análise de notificações, observa que a doença pode apresentar variações cíclicas em sua incidência e as epidemias ocorrem entre 3 a 5 anos. Afirma ainda que a coqueluche é considerada uma doença re-emergente nos países desenvolvidos, em todas as faixas etárias. Este contexto que explicita a circulação da doença deve orientar a elaboração de estratégias de vigilância epidemiológica.

1.3 Dados da Vigilância Epidemiológica

Avalia-se que as estratégias relativas à vigilância epidemiológica devem considerar como caso suspeito todas as pessoas que, sem outra causa aparente e independente do estado vacinal e idade, apresentarem por um período de, pelo menos duas semanas tosse seca, com pelo menos uma das seguintes manifestações: tosse paroxística, guincho inspiratório, vômito pós-tosse. Observa-se igualmente como dado relevante da vigilância epidemiológica pessoas que apresentam tais sintomas com antecedentes de contato prévio com pacientes portadores de coqueluche. Destaca-se que a confirmação dos casos tem como critério a cultura positiva para *Bordetella pertussis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Tal meio de confirmação afirma a eficácia do diagnóstico e orienta as medidas de controle em relação à fonte de infecção.

Diante de qualquer suspeita de doença infecciosa de alta transmissibilidade, as medidas de prevenção baseiam-se inicialmente nas “precauções padrão” que se definem como procedimentos extensivos a todos os pacientes. Devem ser iniciados no momento do atendimento (independentemente do diagnóstico de entrada) e mantidos durante todo o período de hospitalização, para impedir que a equipe hospitalar tenha contato com membranas mucosas, pele não íntegra, sangue, todos os fluidos corpóreos, secreções e excreções (com exceção do suor) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Entre as medidas de precaução estão incluídas a lavagem da mão, uso de máscaras, luvas, óculos de proteção, proteção facial e aventais, sempre que houver a possibilidade de

contatos anteriormente descritos. As precauções respiratórias contra gotículas e aerossóis são indicadas para impedir a transmissão do agente infeccioso, que podem ser geradas pela tosse, espirros, fala ou durante a realização de certos procedimentos com aspiração, entubação e broncoscopia. Essas gotículas podem se depositar na conjuntiva e membrana do nariz ou boca de pessoa suscetível (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A vigilância epidemiológica deve, portanto valorizar a eficácia do diagnóstico clínico, capacitando o profissional de saúde, em especial, os médicos para identificação das manifestações clínicas da doença e seu período de maior transmissibilidade como período mais relacionado ao fenômeno da ressurgência.

A ressurgência da doença está associada também à especificidade do ciclo de seu agente patogênico, *B. pertussis* que é um agente exclusivamente do homem e causa um quadro de infecção respiratória severa designada “tosse convulsiva”, que favorece sua alta transmissibilidade. O período de incubação é de 7 a 14 dias e a transmissão da-se por contato direto, por intermédio de secreção da nasofaringe. A transmissão inicia-se no fim do período de incubação, estendendo-se até a primeira semana da fase catarral (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2000; CDC, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Os primeiros sintomas geralmente aparecem de 7-10 dias após a infecção e os sinais e sintomas variam com a idade, condição vacinal e tempo decorrido desde a última dose da vacina. (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2000; WENDELBOE, et. al. 2007; CDC, 2013).

O fator que favorece a ressurgência associa-se igualmente à evolução da doença, considerando as fases: catarral, paroxística e convalescença. O período de maior transmissibilidade ocorre na fase catarral, estando nesta fase o maior potencial de dispersão do patógeno. Sublinha-se como período altamente preocupante da evolução da doença, seu estágio mais avançado, quando ocorrerem repetidas crises respiratórias devido à tosse constante. Algumas vezes, o paciente faz um enorme esforço para respirar, o que pode levar a uma parada da glote, e conseqüentemente, complicações no sistema nervoso central, podendo o paciente ir a óbito (OLSON, L. 1995; DAS, P. 2002; WHO, 2013).

1.4- Diagnóstico laboratorial como fator de controle da ressurgência.

Aponta-se como desafio do controle da doença, as dificuldades apresentadas no diagnóstico laboratorial, considerando que o “padrão ouro” para o diagnóstico é o isolamento da *Bordetella pertussis* da nasofaringe. No entanto, o crescimento de *Bordetella pertussis* é muito lento e exige cultura em meio específico e em muitos laboratórios à identificação não é bem

sucedida. (WATANABE, M.; CONNELLY, B.; WEISS A. 2006; BARMBERGER, E.S.; SRUGO, I. 2008; CDC, 2013).

A detecção baseada na técnica de PCR é mais rápida e apresenta um grau maior de sensibilidade em relação ao isolamento e cultivo do microorganismo. Entretanto, o número de microorganismos diminui consideravelmente com a evolução da doença e com a utilização de antibiótico e isso reduz a sensibilidade do PCR, e também da cultura com o tempo. (WATANABE, M.; CONNELLY, B.; WEISS A. 2006; BARMBERGER, E.S.; SRUGO, I. 2008; CDC, 2013). Os métodos sorológicos podem também ser utilizados para o diagnóstico da doença, segundo a Organização Mundial de Saúde, a técnica de Elisa pode ser utilizada para confirmação e monitoramento epidemiológico da doença. Os testes de Elisa são baseados principalmente na detecção de anticorpos das classes IgA e IgG, principalmente para toxina pertussis (PT) ou hemaglutinina filamentosa (FHA). Entretanto, PT e FHA fazem parte da composição das vacinas acelulares e altos níveis de anticorpos são detectados após a vacinação, dificultando assim, o sorodiagnóstico em indivíduos vacinados. Notadamente, os anticorpos para FHA não são específicos para *B. pertussis*, pois ocorrem também com outras espécies de *Bordetella*. Estes anticorpos também podem apresentar reações cruzadas em epítomos de outras bactérias incluindo *H. influenza* e *M. pneumoniae*. (WATANABE, M.; CONNELLY, B.; WEISS A. 2006; BARMBERGER, E.S.; SRUGO, I. 2008; CDC, 2013).

1.5-Recursos para o controle da ressurgência. Inovação tecnológica e vacinas de coqueluche

A primeira avaliação de eficácia da vacina contra a coqueluche constituída por bactéria morta foi efetuada por Madsen em 1933. Em 1942, Kendrick e colaboradores publicaram os resultados dos estudos de campo realizados com a associação da vacina antipertussis e toxóide diftérico precipitado pelo alume. Na década de 1940, a vacina antipertussis passou a ser utilizada em grande escala na população, obtendo acentuada diminuição da morbimortalidade da doença nos anos posteriores (EDWARDS et. al.,1999; CDC, 2006).

Na década de 1940, a vacina antipertussis foi associada à composição da vacina DTP, englobando assim, uma combinação de células inteiras de *B. pertussis* inativada, com toxóides diftéricos e tetânicos. A suspensão bacteriana é produzida utilizando uma cepa padrão de *B. pertussis* e após o cultivo final, a suspensão é inativada pela exposição ao calor e são acrescentadas de timerosal e formalina como preservativos (EDWARDS et al.,1999; CDC, 2011).

A vacina celular é eficiente. Entretanto, vários efeitos adversos da vacina têm sido associados à suspensão inativada de *B. pertussis*. Dentre os principais efeitos indesejáveis mais frequentes, esta a febre, mudança de comportamento (irritabilidade) e reações locais. A encefalopatia e as sequelas neurológicas permanentes ocorrem aproximadamente na proporção de 1 em 310.000 imunizações (EDWARDS et. al., 1999; CDC, 2006; MARGARET et. al., 2007).

Devido aos efeitos adversos da vacina celular, estudos têm sido desenvolvidos para o aperfeiçoamento de vacinas acelulares, capazes de induzir uma boa resposta imunológica, sem causar efeitos colaterais graves. A vacina DTP acelular (DTPa) é preparada com componentes antigênicos de *pertussis* tornados atóxicos por tratamento químico ou por técnicas moleculares. Na sua maioria, a vacina acelular para fração pertussis, contém cinco imunógenos que são: hemaglutinina, pertactina, fímbrias sorotipo 2 e 3 e toxina pertussis destoxificada, sendo este o componente em maior concentração (BERNARD et. al., 2000; MARGARET et. al.; 2007; CDC, 2011; CHERRY, J.D.,2012).

Existem atualmente inúmeras formulações de vacinas DTP acelulares no mercado. Todas contêm toxina pertussis inativada, com adição de um ou mais componentes antigênicos (PIROFSKI et. al, 1998; CROWCROFT & BRITO, 2002). Estudos demonstraram que as vacinas acelulares são eficazes e menos reatogênicas do que as celulares, sendo assim adotadas na rotina em vários países da Europa, EUA e no Japão. (BAMBERGER & SRUGO; 2008; CHERRY, J.D., 2012).

A imunização com a DTPa é recomendada devido aos baixos números de efeitos secundários, embora algumas crianças possam apresentar febre ligeira, vermelhidão, dor e inchaço na região onde a injeção foi administrada. O esquema vacinal da vacina tríplice acelular é o mesmo que a vacina tríplice celular, aplicando-se o mesmo número de doses, com os mesmos intervalos programados para esta vacina, ou seja, três doses nos primeiros meses de vida, uma dose de reforço aos quinze meses e outra dose entre os quatro e seis anos de idade. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

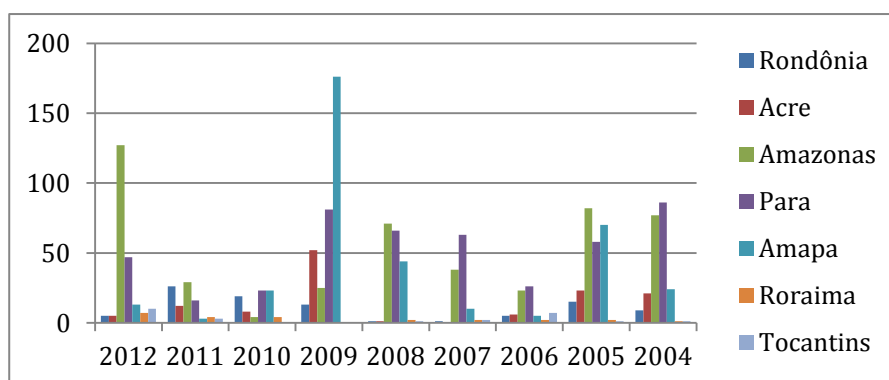
Os eventos adversos locais e sistêmicos (leves) provocados pelas vacinas acelulares são os mesmos das vacinas celulares, porém com menor frequência e intensidade. Eventos adversos moderados a graves, como temperatura axilar maior ou igual à 40°C, convulsões febris, choro com 3 horas ou mais de duração e episódios hipotônico-hiporresponsivos têm sido observados

mais raramente após a vacinação com DTP acelular, com menor frequência que a DTP celular (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; MARGARET et. al.; 2007).

A partir da implantação do Programa Nacional de Imunização (PNI) em 1983, o índice da doença diminuiu em todo o território nacional, porém atualmente vem se observando um aumento da doença em alguns Estados brasileiros. No Brasil, não existem estudos que possibilitem responder inequivocamente se há ou não a re-eremergência da *pertussis*, considerando especialmente a dimensão territorial do país, assim como, as variações socioeconômicas, climáticas, culturais e de infraestrutura relativa ao acesso ao sistema de saúde pública e aos sistemas de notificação, como aspectos relevantes da realidade nacional que implicam nos resultados das análises sobre o comportamento epidemiológico da doença. Contudo, algumas hipóteses podem ser levantadas. Uma delas refere-se à possibilidade de que a doença esteja de fato ressurgindo no Brasil, de forma dispersa, não claramente perceptível ou não diagnosticada, embora, nos últimos anos alguns estados tenham relatado um aumento significativo no número de casos caracterizando contextos de ressurgência.

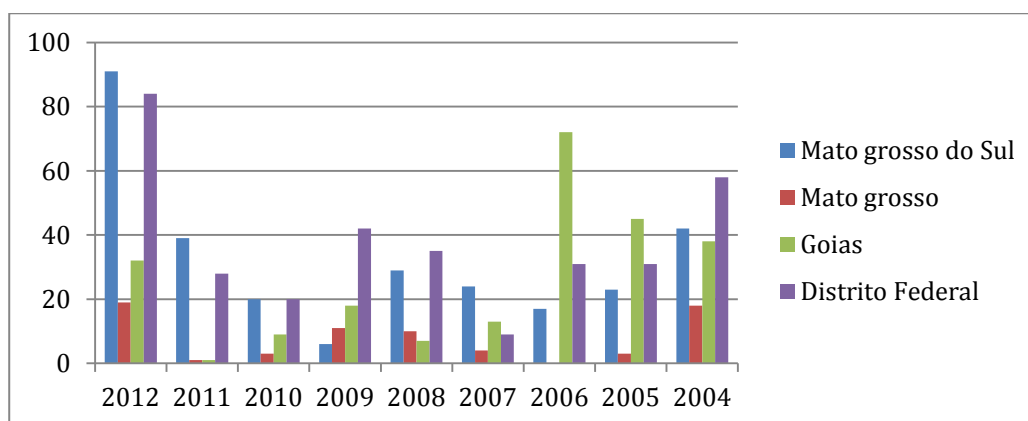
Na região Norte nos últimos anos, os Estados do Amazonas e Pará apresentaram índices superiores a 40 casos notificados, com destaque para o Estado da Amazonas no ano de 2012 com 127 casos notificados, bem superior ao ano de 2011 em que foram notificados 29 casos (SINAN, 2013). (gráfico I).

Gráfico I- Casos de coqueluche notificado na Região Norte



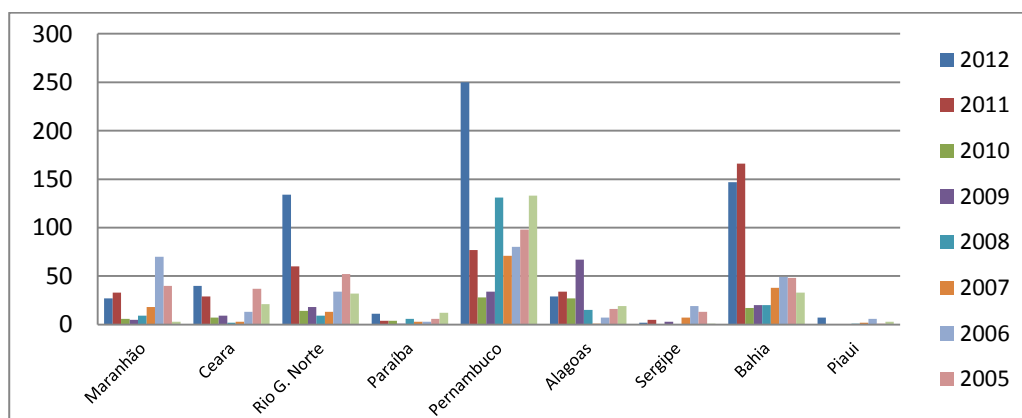
Fonte: Sinan/SVS/MS -2013

Na região Centro-Oeste todos os Estados apresentaram aumento nas notificações no ano de 2012, Distrito Federal (84 casos/2012 e 28 casos/2011), Mato Grosso do Sul (91 casos/2012 e 39 casos/ 2011), Goiás (32 casos/2012 e 01 caso/2011), Mato Grosso (19 casos/2012 e 01 caso/ 2011 (SINAN, 2013). (gráfico II).

Gráfico II- Casos de coqueluche notificado na região Centro-Oeste

Fonte: Sinan/SVS/MS -2013

Na região Nordeste, o Estado de Pernambuco no ano de 2012 apresentou aumento no índice de notificação em relação ao ano de 2011, com 250 casos em 2012, 77 casos em 2011; e 28 casos no ano 2010. Todavia, o Estado da Bahia despertou atenção para o significativo aumento de notificações nos últimos dois anos, 147 casos em 2012 e 166 casos em 2011 quando comparado com os 17 casos notificados em 2010. O Rio Grande do Norte apresentou também índice considerável no aumento de casos da doença, 134 casos em 2012, 60 casos em 2011 e 14 notificações em 2010(SINAN,2013) .(gráfico III)

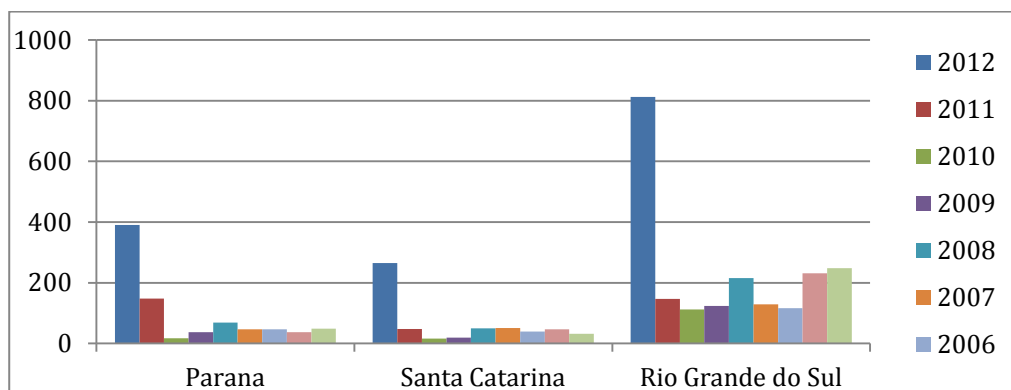
Gráfico III- Casos de coqueluche notificado na Região Nordeste

Fonte: Sinan/SVS/MS -2013

Na região Sul, o Rio Grande do Sul vem registrando com maior regularidade índices sempre acima de 100 casos no período de 2004 a 2009, bem superior aos demais Estados da região, porém, nos dois últimos anos, as notificações aumentaram de 147 casos em 2011 para 813 casos em 2012. Os demais Estados também apresentaram aumento de notificações no ano 2012.

O Estado de Santa Catarina com 265 casos notificados em 2012, bem superiores aos 48 casos em 2011. O Estado do Paraná saltou para 391 casos em 2012 em relação aos 148 casos no ano de 2011(SINAN, 2013). (gráfico IV)

Gráfico IV- Casos de coqueluche notificado na Região Sul

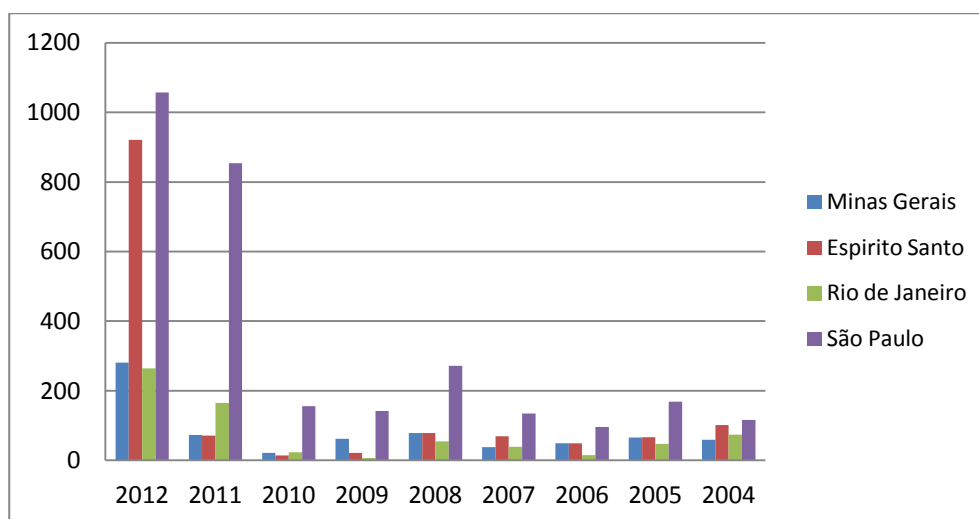


Fonte: Sinan/SVS/MS -2013

Na região Sudeste, o Estado de São Paulo apresentou consideráveis índices de aumento entre o período de 2010 a 2012. Registraram-se 156 casos em 2010, 854 casos em 2011 e 1057 casos em 2012. O Estado do Rio de Janeiro no mesmo período apresentou 264 casos notificados no ano de 2012, 165 casos em 2011 e 23 casos em 2010 (SINAN, 2013). (Gráfico V)

Os municípios que apresentaram os maiores índices foram: Campos de Goytacases (07 casos em 2012/ 08 casos em 2011/ 01 caso em 2010), Duque de Caxias (20 casos em 2012/ 04 casos 2011 /01 caso em 2010), Rio de Janeiro (127 casos em 2012/ 79 casos em 2011/ 16 casos em 2010), Itaboraí (10 casos em 2012/ 02 casos 2011), Itaperuna (03 casos em 2012/ 01 casos em 2011), Niterói (20 casos em 2012/ 01 caso em 2011), Nova Iguaçu (08 casos em 2012/ 01 caso em 2011), Petrópolis (01 caso em 2012/ 03 casos 2011), Teresópolis (4 casos em 2011), Volta Redonda (03 casos em 2012/ 01 caso em 2011) e Nova Friburgo (06 casos em 2012/ 01 caso em 2011) (SINAN, 2013).

Municípios que tiveram notificações somente em 2012: Angra dos Reis (05 casos), Araruama (01 caso), Bom Jesus do Itabapoana (02 casos), Cachoeiras de Macacu (07 casos), Itaocara (01 caso), Itatiaia (01 caso), Macaé (11 casos), Magé (01 caso), Natividade (05 casos), Nilópolis (01 caso), São Fidélis (01 caso), São Francisco de Itabapoana (02 casos), São Gonçalo (13 casos), São João da Barra (01 caso), São João de Meriti (01 caso), Três Rios (04 casos), Varre-Sai (01 caso) e Vassouras (01 caso) (SINAN, 2013).

Gráfico V- Casos de coqueluche notificado na Região Sudeste

Fonte: Sinan/SVS/MS -2013

A faixa etária com maior incidência nos últimos anos em todo território nacional foi que incluiu crianças abaixo de um ano idade, porém verifica-se um crescente aumento em todas os perfis: menor de 1 ano com 1.667 casos (2011) para 2.924(2012), 1 a 4 anos 208 (2011) para 721(2012), 5 a 9 anos 80 casos (2011) para 307(2012), 15 a 19 anos 42 casos (2011) para 77 (2012) e 20 a 29 anos 67 casos em (2011) para 95 em (2012). As faixas etárias de 30 a 50 anos também apresentaram aumento significativo (SINAN,2013). (Tabela1).

Tabela I - Casos de coqueluche por faixa etária no período de 2011 e 2012

Fx Etária (13)	2011				2012			
	Casos	Incidência	Óbito	Coef. De Mortalidade	Casos	Incidência	Óbito	Coef. De Mortalidade
Menor 1 ano	1687	61,6	54	1,97	2924	105,9	74	2,68
1 a 4 anos	208	1,9	1	0,01	721	6,4	0	0,00
5 a 9 anos	80	0,5	0	0,00	307	2,0	0	0,00
10 a 14 anos	71	0,4	0	0,00	181	1,0	0	0,00
15 a 19 anos	42	0,2	0	0,00	77	0,4	0	0,00
20 a 29 anos	67	0,2	0	0,00	95	0,3	0	0,00
30 a 39 anos	46	0,2	0	0,00	88	0,3	0	0,00
40 a 49 anos	35	0,1	1	0,00	39	0,2	0	0,00
50 a 59 anos	9	0,0	0	0,00	12	0,1	0	0,00
60 a 69 anos	8	0,1	0	0,00	8	0,1	0	0,00
70 a 79 anos	1	0,0	0	0,00	0	0,0	0	0,00
80 anos e mais	0	0,0	0	0,00	1	0,0	0	0,00
Total	2254	1,2	56	0,03	4453	2,3	74	0,04

Fonte: Sinan/UVRI/CGDT/DEVEP/SVS/MS

Em relação ao total de casos confirmados de coqueluche entre menores de um ano de idade (2.924) em 2012, observa-se que 85% (2.478/2.924) ocorreu entre menores de seis meses de idade. Ressalta-se que a imunidade conferida ao indivíduo é adquirida pela doença ou ao receber a vacinação completa (três doses da DTP + Hib mais dois reforços da DTP). No entanto, a eficácia da vacina varia entre 70 e 80%, após o esquema básico e não é vitalícia. Os menores de seis meses de idade, grupo etário mais atingido em todos os anos avaliados, foram os mais suscetíveis à doença, uma vez que não receberam o esquema básico completo da vacinação (pelo menos três doses da DTP), conforme preconizado no calendário de vacinação da criança do Ministério da Saúde.

Coloca-se como questão a capacitação do atendimento médico e os recursos necessários para realizar o diagnóstico preciso da doença. É pertinente perguntar: os profissionais de saúde estão atentos para o ressurgimento da coqueluche em nosso país? Considera-se também como variável para o estudo da ressurgência da doença, o crescente aumento da notificação correta, fato que pode estar relacionado a qualificação perceptiva para tal agravamento.

A coqueluche não pode ser considerada uma doença apenas a ser observada pelo campo da pediatria, ela deve merecer atenção de outras especialidades médicas, principalmente dos profissionais que atuam no campo clínico, pois podemos observar segundo a tabela I o aumento de casos nas faixas etárias acima dos 30 anos, antes não perceptíveis: 30 a 39 anos 46 casos (2011) e 88 (2012), 40 a 49 anos 35 casos (2011) e 39 (2012), 50 a 59 anos 9 casos (2011) e 12 casos (2012) (SINAN, 2013).

Propusemos como objeto de estudo, caracterizar a coqueluche como doença re-emergente no Estado do Rio de Janeiro, visando análise epidemiológica na percepção da Biossegurança em instituições públicas de saúde.

2) OBJETIVOS:

2.1- Objetivo geral:

Caracterizar a coqueluche como doença re-emergente no Estado do Rio de Janeiro, visando análise epidemiológica na percepção da Biossegurança em instituições públicas de saúde.

2.2- Objetivos específicos:

- Identificar os principais fatores que contribuíram para a baixa notificação da doença em unidade de saúde pública no Estado do Rio de Janeiro nos últimos anos.
- Avaliar os procedimentos de Biossegurança nas unidades de saúde e profissionais envolvidos, que tenham contato direto com o paciente suspeito ou confirmado da doença.
- Capacitar e sensibilizar os profissionais, estudantes da área de saúde e líderes comunitários para as doenças emergentes, re-emergentes e negligenciadas no Estado do Rio de Janeiro e regiões adjacentes.
- Inovar tecnologicamente, através da caracterização dos principais epítomos da pertactina da *Bordetella pertussis* induzida pelas vacinas DTP e DTPa do Programa Nacional de Imunização (PNI).

3) ASPECTOS ÉTICOS:

Parecer favorável 32/2009 pela Comissão de Ética de Pesquisa do Hospital Naval Marcílio Dias- Marinha do Brasil.

Parecer favorável 053/2010 pela Comissão de Ética de Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/ Fiocruz.

4) Artigos como resultados dos objetivos alcançados:

Artigo I: An overview of reemerging Pertussis and evidence of resurgence in Brazil.

Artigo II: A re-emergência da coqueluche. Da rotina dos atendimentos ao imperativo da Biossegurança.

Artigo III: Fórum itinerante de ciência e saúde. Programa de capacitação para as doenças negligenciadas e re-emergentes.

Artigo IV: Identification of linear B epitopes of pertactin of *Bordetella pertussis* induced by immunization with whole and acellular vaccine.

Artigo I

An Overview of Reemerging Pertussis and Evidence of Resurgence in Brazil.

Authors: Flávio Rocha da Silva¹(flavio.rocha@ioc.fiocruz.br) , Marli Brito M. de Albuquerque Navarro²(mnavarro@fiocruz.br), Luiz André Lucas T. Pinto³(luizandretp@gmail.com)e Salvatore Giovanni De Simone³(dsimone@ioc.fiocruz.br)

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, Brazil.¹

Núcleo de Biossegurança-Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, Brazil.²

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Inovação em Doenças Negligenciadas ((INCT-IDN)/Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde (CDTS), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, Brazil. ³

ABSTRACT:

About two thousand cases of pertussis are reported in Brazil each year. Children under one year old belong to the group with highest incidence and lethality rates. The disease is becoming frequent in Brazil; however the state of Rio de Janeiro has been showing low reporting figures in relation to other states in the Southeast region. This research work aimed to evaluate difficulties faced by medical teams when confirming suspect cases of pertussis in healthcare units throughout the state of Rio de Janeiro as well as use available data to confirm pertussis diagnosis within last two years. Epidemiological surveys were conducted among medical personnel from healthcare units who presented the main drawbacks on confirming suspect cases. Results show that lack of laboratory diagnosis, poor differential diagnosis, low knowledge on the disease and lack of clinical experience are, among other factors, relevant to the low reporting rates in the region.

Keywords: pertussis, reemerging disease, medical diagnosis, public health, Rio de Janeiro, prevention.

Introduction:

Reemergence of pertussis is a widely studied and verified issue in developing countries. Analyses of factors that point to the resurgence phenomenon become importantly complex since even in countries with extensive immunization coverage the disease is still being reported. There have also been changes to its epidemiological profile, translating into an increase in disease incidence among teenagers and young adults, especially after the period between 1980 and 1990.(1,13)

Studies have demonstrated that France and the United States have been investing significantly in studies about the disease's fresh outbreak in the last 30 years. Such studies emphasize the perspective of complexity involved in analyses of increasing cases, when they point out the following as determinant and relevant: quality of case reporting, clinical examination and laboratory testing; decreased immunization coverage; relative efficacy of vaccines; gradual loss of immunity (approximately 10 years after the last dose is administered); genetic changes to bacteria with natural selection of variants that resist the vaccine and increase in asymptomatic carriers. For the reality of developed countries, it is also considered that there might be other factors responsible for this resurgence of the disease, such as use of new diagnostic methods and improved epidemiological surveillance systems (*1, 2, 12,13 e14*).

We emphasize the possibility of a global dimension to this resurgence, with specific different factors and contexts in developed countries and in developing countries. We notice, above all, the vaccination scenario which has been historically different in terms of prevention policies adopted by countries. This shows that disease understanding and control are not grounded in the criterion of universality based on immunization's absolute value. When the triple vaccine was adopted by countries that organized extensive vaccination strategies, it was believed that this resource would be able to promote efficient progressive control over the disease. However, in global terms we highlight that the reemergence of pertussis is a significantly relevant public health issue. Additionally, in poor countries pertussis is an important cause of child morbidity and mortality, aggravated by malnutrition and the incidence of bronchopneumonia.

Pertussis is potentially dangerous. It is an acute, highly contagious infectious disease transmitted by a bacterium initially called *Haemophilus pertussis* and later called *Bordetella pertussis* - from the Latin *per* (intense) and *tussis* (cough).

Contagion occurs by propagation of nasopharyngeal droplets when a sick individual coughs, sneezes and speaks. It requires close contact, less than 1 meter, such as in homes, work and study environments. Children are a frequent source of infection for adults and vice-versa. It should be noted that until 1940 it was the greatest cause of child mortality worldwide (2, 5, 11,12).

Adults and teenagers can get infected and have the typical disease; others may remain oligosymptomatic and a significant group may develop an unapparent infection. Therefore, it has been considered one of the factors that influence the persistence of this disease in communities with extensive immunization coverage . In a study with 664 teenagers and adults who showed signs of the disease, Senzilet *et al* (2001) report that 77% of the surveyed group had been immunized for pertussis and 6.5% (22.8% in patients over 50 years old) categorically reported having had the disease when they were children.

The World Health Organization (WHO) estimates that in 2008 1.5 million children died of diseases that could have been prevented by routine immunization. This represents 17% of total mortality among children younger than 5 (5,11,12).

Although it is an immunopreventable disease, the WHO revealed that in 2010 global occurrence of pertussis reached 91,689 cases, with over 195 thousand deaths; this represents 13% of immunopreventable diseases that affect children (5, 12, 14).

Epidemiological studies conducted in France in the 1990's decade showed increasing contagion among teenagers and adults and that the incidence of pertussis remained high in Europe: 12.2/100,000 inhabitants, although common sense has "vulgarized" pertussis as a children's disease. Further studies found that immunization coverage varied widely across the European continent: According to data obtained at the time the incidence of pertussis was significant in France, Holland, Denmark and Great Britain. Germany had low immunization coverage and was reinitiating vaccination across the board in 1991; in Italy immunization was still very low. Great Britain experienced two epidemics (1978-1982) and since then it has resumed active vaccination. Sweden implemented an extensive vaccination program in the 1960's; this policy was suspended in 1979 for fear of side effects and because they verified the vaccine was relatively inefficient in that country. In Russia vaccination was inconsistent. In countries where coverage was extensive, such as France, the same resurgence was observed as in the United States, that is, incidence was significant among young adults. This favored the

contamination of babies who had not been immunized at all or who had not been fully immunized. Studies found that in France and the USA pertussis peak distributions according to age were in opposite extremes, that is, before 6 months or after 20 years of age, indicating the need for a new epidemiological outlook on the disease (5,7, 12, 14).

A report about pertussis' profile in the United States between 1997 and 2000 summarized that the increase in this disease in the 1980's decade continued throughout the 1990's. Compared with data from 1994-1996, the disease's incidence rate increased among teenagers and adults, 62% and 60% respectively; and among children younger than 1 it increased by 11%. However, incidence fell by 8% among children aged 1 to 4 and remained stable among children aged 5-9. Such increases may reflect a change in disease reporting or real increase in incidence. In 1995 the criterion for reporting pertussis changed in two ways: use of PCR as a method for diagnostic confirmation and more detailed collection of data about disease occurrence, which provided for more precise epidemiological analyses. "Despite vaccination effectiveness, pertussis still occurs in the United States across all age groups. The disease remains more significant among children younger than 1, who also have higher complication and death rates. Considering there are still high vaccination rates among pre-school children, prevention efforts should focus on treating pertussis cases in order to prevent greater disease communication, by using antimicrobial prophylaxis in cases of contacts aiming to minimize the exposure of children younger than 1 to older children and adults with cough diseases" (2,12,14).

Still regarding the North American reality, more recent data confirm the aggravation of pertussis, which shows a new epidemiological pattern. Between 2004 and 2005 there was "a boom of this disease in the United States with 25,827 cases. In those two years case reporting for people aged 10 to 19 years old grew 15.6 times in relation to 1990. Among individuals older than 20, this increase was 16.7 higher. In 2008 the disease receded, but even so it infected 13,278 people. Approximately half of infected individuals were teenagers and adults. Incidence among children between five and nine years old increased significantly. It totaled 20% of reported cases, as opposed to 13% in 2007 and 10% in 2006. In 2010, according to the Centers for Disease Control and Prevention of the North American government (CDC), the number of cases increased significantly in several regions. In California, where over two thousand cases and eight deaths among babies were recorded, incidence increased over seven times in relation to the same period in 2000 (3,12, 13,14). Relevant information about the disease's profile in Latin America showing its reemergence is being published by publications targeting practicing medical professionals, especially in the field of pediatrics. The *Correio da Sociedade Argentina de Pediatria* (2004) states that "in Argentina the epidemiological surveillance system has detected in the

second semester of 2003 an increase in the incidence of pertussis in several parts of the country, especially in the south of the Buenos Aires province, in Corrientes, Entre Rios and Formosa; children affected the most were those under a year old and secondly the group aged 2-4” (4,5,7,14 15).

A study about changes in Chile’s epidemiological profile used information processed by the Expanded Immunization Program (PAI) managed by its Ministry of Health and found out that the only disease detected by the Program which recorded significant increase in the 1990’s decade was pertussis (59 cases in 1990, 361 in 1995 and 3,551 in 2000) (6. 9, 10).

TREVIZAN and COUTINHO (2008) used 2002 data from the Ministry of Health about the prevention and control situation of transmissible diseases in Brazil to state that throughout that period an average of 2 thousand annual pertussis cases had been reported; higher lethality was found among children younger than one year old and this incidence was even higher among children younger than six months. In summary, the general picture shows an increase in pertussis cases in global terms and, according to Bricks (2010), “in the last five years ‘whooping cough’ cases have tripled in Latin America, according to a WHO and Unicef report. In the state of São Paulo alone the number of confirmed cases rose by 33% between 2006 and 2009. In 2006 there were 96 confirmed cases, as opposed to 128 in 2009” (2,4,5,6,11,12,15).

After the implementation of the National Immunization Program (PNI) in 1983 the disease rate decreased throughout the country, especially due to extensive immunization coverage for all three doses (5, 15).

However, even with average coverage of 95% in all municipalities, the incidence of this disease has been increasing in some Brazilian states (5,15).

In Brazil there are no studies that allow answering beyond a reasonable doubt whether pertussis is reemerging or not, especially considering the country’s continental size as well as socioeconomic, climate, cultural and infrastructure variations with respect to access to the public healthcare system and disease reporting systems. Such are relevant aspects of Brazilian reality that affect results of analyses about the disease's epidemiological profile. However, a few hypotheses may be suggested. One of them is related to the possibility that the disease is indeed imperceptibly reemerging in Brazil, although in the last few years a few states have reported significant increases in the number of cases (4, 5, 15).

In the North region in the last, the states of Amazonas and Pará showed rates above 70 reported cases (6,8).

In the Middle West region the Federal District has been showing progressive increase in case reports in relation to the other states, even when compared with the state of Goiás, which reported over 70 cases in 2004 (6,8).

In the Northeast reporting rates for the state of Pernambuco were significant. However, the state of Alagoas drew attention to its significant increase in cases in the last few years, 60 cases in 2009, 27 cases in 2010 and 30 cases in 2011 (8,9). The state of Bahia also stands out; in 2011 more cases were reported, 17 cases in 2010 and 126 cases in 2011 (6,8).

In the South region Rio Grande do Sul has been regularly recording rates that are always above 100 cases from 2004 to 2009, much higher than the other states in the region. However in the first quarter of 2012 the state of Paraná saw a sharp increase in confirmed cases, approximately 114 cases (6,8).

In the Southeast region the state of São Paulo had significant rates from 2008 to 2011. 271 cases were recorded in 2008, 142 cases in 2009, 183 cases in 2010, 893 cases in 2011 and 123 cases in the first quarter of 2012 (8,10).

The number of cases increased in the state of Rio de Janeiro in the last few years, especially between 2010 and 2011 (8,11).

The municipalities with the highest rates were: Campos de Goytacases (8 cases 2011/ 1 case 2010), Duque de Caxias (4 cases 2011/1 case 2010), Rio de Janeiro (79 cases 2011/16 cases in 2010), in addition to new cases in the following municipalities: Itaboraí (2 cases), Itaperuna (1 case), Niterói (1 case), Nova Iguaçu (1 case), Paracambi (1 case), Petrópolis (3 cases), Teresópolis (4 cases), Volta Redonda (1 case) and Nova Friburgo (1 case) (8,11).

This study aims to determine the main difficulties faced by healthcare professionals when diagnosing reemerging diseases, especially pertussis.

Methodology

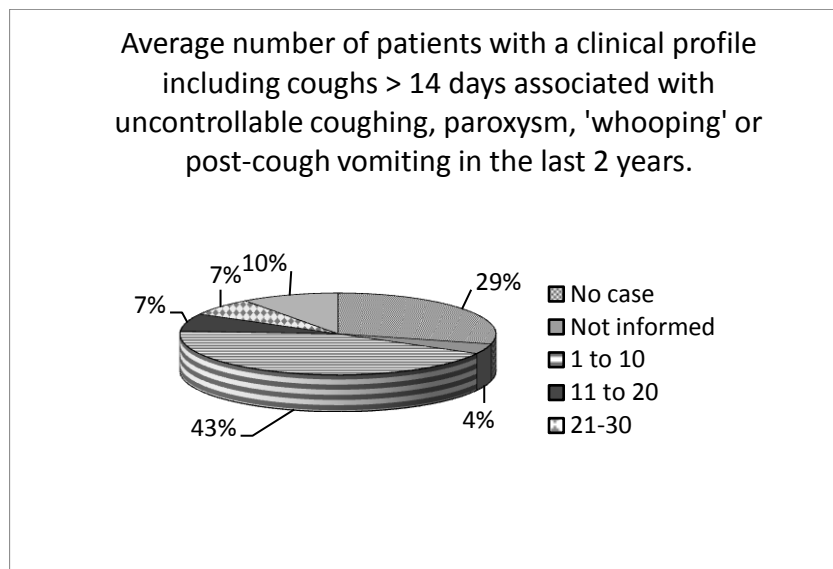
We carried out qualitative research by conducting a survey which involved physicians from several healthcare units, three of them public and two military, in the state of Rio de Janeiro in 2010 and 2012, all operating in the following areas: outpatient care, pediatrics, infectology and pulmonology. Questionnaires were administered in the medical staff (185 medical) in healthcare facilities.

Results

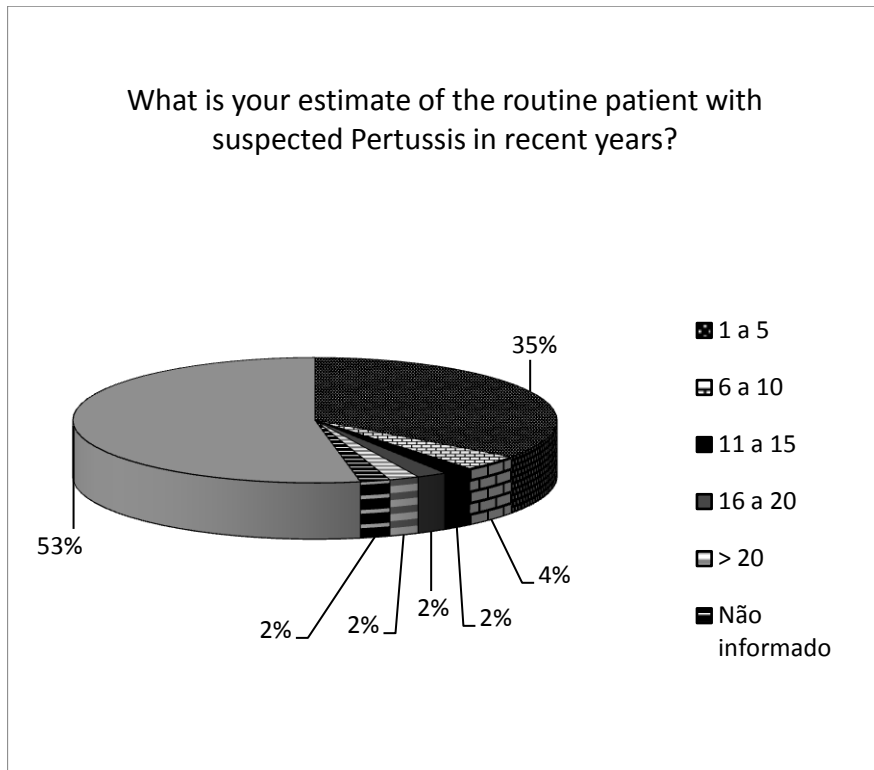
The medical team that took part in this research was made of residents (15%), physicians with 1-5 years of clinical experience (29%), physicians with 6-10 years of clinical experience (29%) and over 10 years of clinical experience (39%), and physicians who did not provide that information (5%). This medical team covered several specialties, from general practitioners (41%), infectologists (24%), pediatricians (21%), pneumologists (7%) and others who did not inform their specialty (7%).

We identified 43% of patients who received care in studied healthcare units in the last two years showing the classic clinical profile of the disease. Although the number of patients who received care has ranged from 1 to 10, 10% of those units had 30 patients or more (Graph 1).

Graph 1



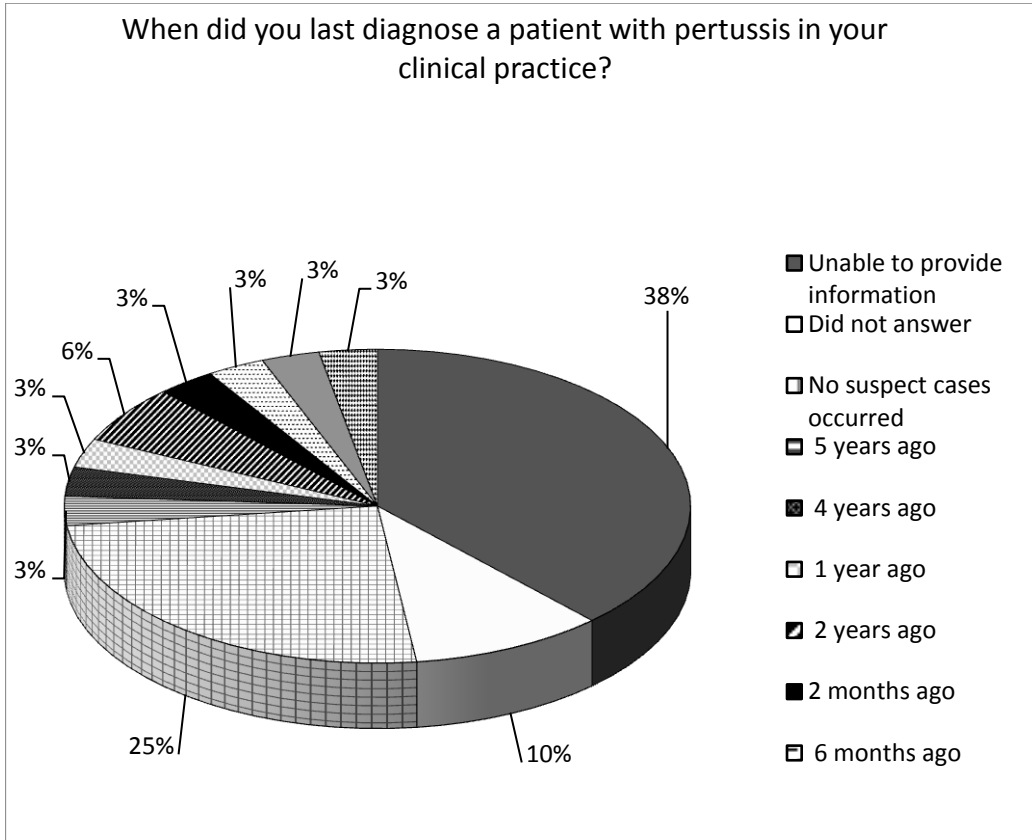
Based in information about the number of patients with pertussis in the same period, we verified that only 53% of professionals reported not having treated any suspected cases of the disease; 35% reported 1-5 cases diagnosed within that period; 4% reported 6-10 treated cases; and 6% reported treating over 11 cases (Graph 2).

Graph 2

In cases where patients were confirmed to have pertussis, we analyzed the procedure adopted by healthcare units to avoid disease communication to other patients: 38% reported that patients with suspected pertussis are isolated in rooms with air flow filtering systems; 28% isolated patients in rooms with no air flow filtering system; 16% did not isolate patients; 14% did not provide that information; 8% reported that their healthcare unit does not isolate patients; and 1% isolate patients in infirmaries.

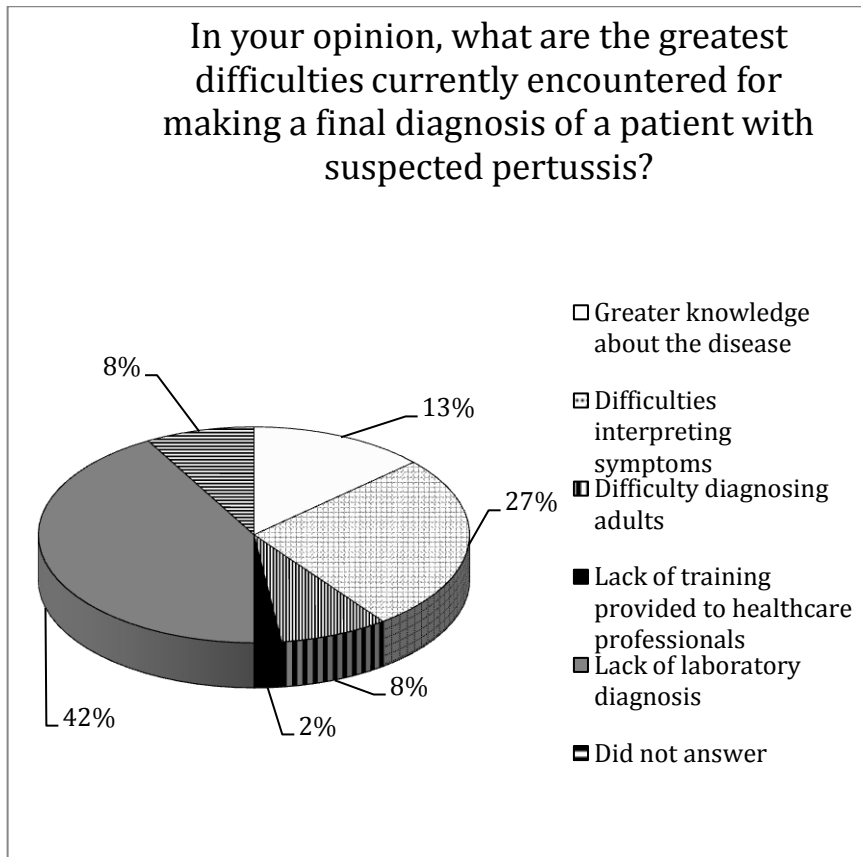
With respect to the last diagnosis of the disease in their clinical routine, 38% were unable to provide information; 25% stated there had been no suspect cases; and 27% informed they had diagnosed patients in several periods, that is, over weeks, months or years (Graph 3).

Graph 3



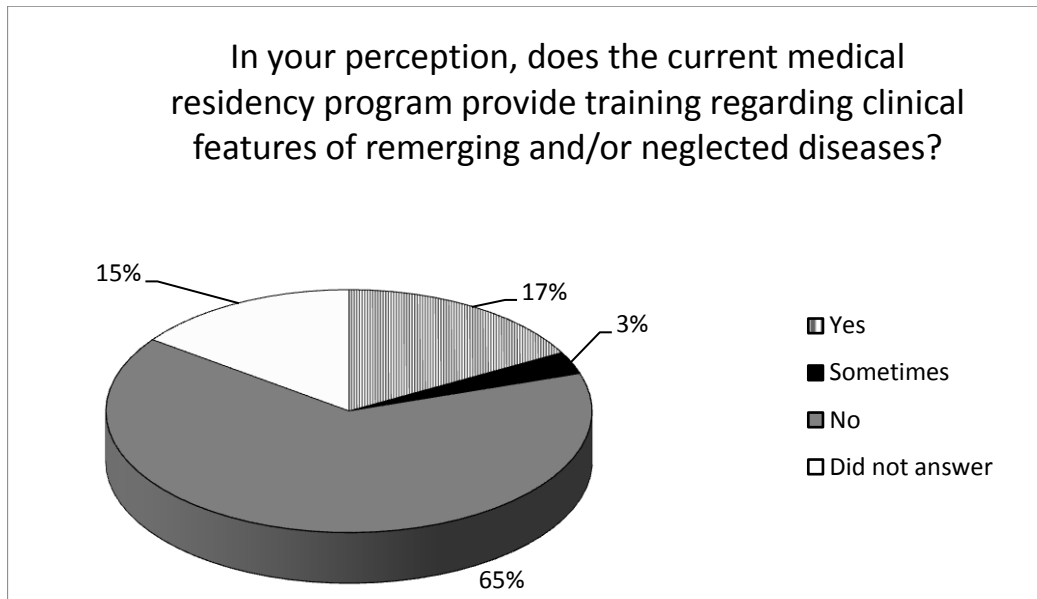
It should be noted that the greatest hurdle pointed out by physicians when making a diagnosis is lack of access to laboratory diagnosis as the main technique to confirm the disease (42%). Other factors were pointed out as equally important, such as assessing the patient’s clinical profile more precisely, interpreting symptoms correctly, which is not always accomplished (Graph 4).

Graph 4



The association between age group, greater clinical knowledge about the disease and performing laboratory tests to confirm pertussis in its initial stages were all pointed out as relevant factors for precise diagnosis.

Graph 5 shows the percentage of answers about difficulties found when making a diagnosis and clinical experience regarding reemerging and/or neglected diseases provided during professional training, that is, during medical residency. 65% of professionals stated that current residency programs lack that experience. Such results also demonstrate that it is necessary to place greater emphasis on the issue of reemerging and neglected diseases during academic education, since interviewed professionals are all doctors who have completed their education, as reported before, including those in their residency (15%) to those with over ten years' clinical experience (39%).

Graph 5

Discussion and conclusion

With respect to a continuing education program, 33% of respondents declared there is no such program in their healthcare unit; 14% reported it has not been implemented; and 36% reported that there is occasional professional training.

This study demonstrates that pertussis is under-reported in Rio de Janeiro, especially due to the lack of training provided to healthcare professionals to recognize the disease's clinical symptoms. This results in incorrect diagnosis, often due to lack of infrastructure for performing laboratory tests for confirmation.

Brazil lacks studies about the reemergence of pertussis which take into account all aspects related to our national reality and that might interfere with analyses about the epidemiological behavior of the disease, including the possibility that the disease is indeed imperceptibly reemerging in Brazil, aggravated by the fact that currently it can no longer be considered an exclusively pediatric disease. It requires greater perception from physicians and complex actions regarding diagnosis, surveillance, disease control and other specialties that are within the realm of public health so that, if necessary, people are ready to realign their action strategies.

With this challenge ahead we believe it is crucial to implement training programs about reemerging diseases, especially pertussis, targeting the daily work of healthcare professionals, considering the need to clarify diagnosis, treatment and also isolation of patients who have this

disease. As our study also showed, patients are often wrongly isolated from others or even when they return to their homes.

Acknowledgements

We would like to thank all professionals who helped us conduct our work, as well as their healthcare units.

References

1. American Academy of Pediatrics. Pertussis. In Pickering LK. ed. 2000 Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases. 25^a ed. ELK Grove Village IL. American Academy of Pediatrics 2000; 435-448.
2. Bisgard, K.M.; Pascual, F.B.; Ehresmann, K.R. et al. Infant pertussis: who was the source? *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23:985-89.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Morbidity and Mortality Weekly Report . Pertussis United States, 1997—2000. February 1, 2002 / 51(04);73-6 Atlanta, USA. [accessed 10/01/2012] .<http://www.cdc.gov/mmwr/index2002.htm>
4. Correo da Sociedad Argentina de Pediatría. Abril de 2004, AÑO 19, n• 1 . ¿Están aumentando las muertes por pertussis en los niños? ¿Qué podemos hacer para prevenirlas? *Comentario: Dra. Angela Gentile p 10*
5. Forsyth, K.D.; Wirsing von Konig, C.H.; Tan, T.; Caro, J.; Plotkin, S. Prevention of pertussis: recommendations derived from the second Global Pertussis Initiative roundtable meeting. *Vaccine* 2007; 25:2634-42
6. Ministério da Saúde. Situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21901
7. P. Bégué, Baron, S.; Grimprel, E. Epidémiologie de la coqueluche en Europe en 1995.. *Médecine et Maladies Infectieuses* Volume 25, Supplement 3, January 1995, Pages 1263-1267
8. Sistema Nacional de Agravos de Doenças. Ministério da Saúde. [accessed 4/4/2012] <http://dtr2012.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinanet/coqueluche/bases/coquebrnet.def>
9. Secretária da Saúde do Estado de Alagoas. [accessed 10/09/2011]. <http://www.saude.al.gov.br/vigilanciaepidemiologica>
10. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Epidemiológica. [accessado 10/05/2012]. http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/resp/coque_tab.htm

11. Secretaria Municipal da Saúde do Rio de Janeiro. [accessed 10/02/2012]. <http://www.rio.rj.gov.br/web/smsdc/exibeConteudo?article-id=1563892>
12. Trevisan, S.; Coutinho, S.E.D. Perfil epidemiológico da coqueluche no Rio Grande do Sul, Brasil: estudo da correlação entre incidência e cobertura vacinal. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 24(1); 93-102. 2008
13. Wendelboe, A.M.; Njamkepo, E.; Bourillon, A. et al. Transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26:293-99.
14. WHO-recommended surveillance standard of pertussis. [accessed 05/02/2012]. http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/pertussis_surveillance/en/index.html
15. Wolff, R. M. Cambios epidemiológicos en HTT enfermedades infecciosas en Chile durante HT década 1990-2000: 1990-2000. *Rev. Méd. Chile*, Santiago, v. 130, n. 4, abr. 2002 . Disponible en <[HTTP://www.scielo.cl/scielo.php](http://www.scielo.cl/scielo.php)>.

Artigo 2

A re-emergência da coqueluche. Da rotina dos atendimentos ao imperativo da Biossegurança.

The re-emergence of Pertussis. From routine healthcare to the need for biosafety actions

Autores: Flávio Rocha da Silva^{1e2}(flavio.rocha@ioc.fiocruz.br), Marli Brito M. de Albuquerque Navarro³(mnavarro@fiocruz.br), Bernardo Elias Correa Soares ³(labensp@gmail.com) e Salvatore Giovanni De Simone (dsimon@ioc.fiocruz.br)⁴

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.¹

Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, Brazil²

Núcleo de Biossegurança-Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.³

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Inovação em Doenças Negligenciadas ((INCT-IDN)/Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde (CDTS), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.⁴

Resumo:

Dados recentes mostram que no Brasil, foram notificados no ano de 2012, 15.428 casos suspeitos de coqueluche, destes 4.453 (28.9%) foram confirmados, representando um aumento de 97% em relação ao mesmo período de 2011, ano em que foram registrados 2.258 casos da doença. Sublinha-se que crianças com menos de um ano de idade, apresentam taxas de incidência e letalidade mais acentuadas.

O estudo estabeleceu como objetivo, identificar a conduta dos profissionais de saúde nas unidades de saúde do estado do Rio de Janeiro, diante do atendimento em pacientes suspeitos ou confirmados com doenças respiratórias como coqueluche e tuberculose, adoções das práticas de Biossegurança e a existência de programa de treinamento continuado. Buscou-se recolher informações referentes à exposição ao risco de contaminação, observando o aspecto subjetivo da percepção do profissional. Estas informações foram obtidas através de questionários aplicados em unidades de atendimento situadas no Estado do Rio de Janeiro.

A metodologia aplicada ao estudo abordou o aspecto qualitativo, uma vez que este se faz mais adequado às análises de percepção, onde o aspecto subjetivo adquire relevância.

Os resultados encontrados na pesquisa demonstraram que o aprimoramento profissional nas unidades de saúde através de investimento em programa de capacitação continuada nas temáticas Biossegurança e doenças respiratórias como coqueluche e tuberculose, é fundamental para reverter esta situação encontrada na pesquisa, bem como o maior investimento em infraestrutura nas unidades de saúde, principalmente nas unidades municipais.

Palavras chaves: coqueluche, Biossegurança, unidade de saúde , tuberculose; Rio de Janeiro.

Abstract:

In Brazil in the year 2012, 15.428 suspected pertussis cases have been reported, which 4453 (28.9%) of these were confirmed, representing an increase of 97% over the same period of 2011, when 2258 confirmed cases of pertussis were confirmed. Children under one year of age, belonged to the group with more pronounced rates of incidence and mortality.

The study established the perception of health professionals in health facilities in the state of Rio de Janeiro as an objective, whereas their view has been assayed on patients with suspected or confirmed respiratory diseases such as whooping cough and tuberculosis, before answering the form and adhered to biosafety practices and continued training programmes.

The methodology used in the study favored the qualitative aspect, since it has been better suited to analysis of perception where the subjective aspect would be considered relevant.

The research results showed that professional improvement in health facilities by investing in ongoing training programs on biosafety issues and respiratory diseases such as whooping cough and tuberculosis, is an essential issue to reverse this situation. Research, and large investments in infrastructure of health units, especially in the municipal hospitals, is most needed.

Keywords: Pertussis, Biosafety, health unit, tuberculosis, Rio de Janeiro

Introdução

A contaminação por patógenos nos locais de atendimento a saúde, especialmente os hospitais, considerando, sobretudo, aqueles que são realizados nas emergências, tem se caracterizado como fenômeno recorrente, envolvendo, enfaticamente a complexidade da infecção hospitalar como desafio para as instituições de saúde.^{1,6 e 11}

Tal complexidade abrange a questão da saúde dos profissionais, o controle das infecções entre os pacientes, o monitoramento do ambiente, como contexto relacionado à implementação de políticas institucionais de biossegurança, visando prioritariamente o desenvolvimento de uma cultura preventiva.^{1,6 e 11}

A deficiência de ações preventivas voltadas para monitoramentos eficazes de risco vulnerabilizam, em maior ou menor grau, a totalidade dos profissionais que atuam nos estabelecimentos de saúde, assim como as pessoas que circulam nestes locais, como pacientes, acompanhantes e visitantes.^{1,6 e 11}

Segundo Nichiata et al (2004) “a adesão às ações de biossegurança constitui o maior desafio, desde as primeiras formulações das medidas de proteção, inicialmente referidas como isolamentos. Apesar do desenvolvimento e emprego da tecnologia dos materiais utilizados em serviços de saúde, em especial os descartáveis e das técnicas e procedimentos recomendados na prevenção das infecções e das doenças transmissíveis, não se tem conseguido a redução das ocorrências das infecções e das doenças entre os trabalhadores”. No caso da contaminação pela *Bordetella pertussis*, quando da não identificação correta da coqueluche, realizada clinicamente e/ou por exame laboratorial, como base das medidas de isolamento como princípio preventivo, o processo de contaminação pode se expandir rapidamente, podendo sair originalmente das emergências e contaminar os Centros de Terapia Intensiva, as enfermarias como pacientes imunocomprometidos, as maternidades, os berçários, os setores pediátricos, caracterizando um quadro de expressivo risco.^{9,14}

Potencialmente perigosa, a coqueluche se caracteriza como doença infecciosa aguda, altamente contagiosa. Extremamente virulenta, o contágio se realiza pela propagação das gotículas nasofaríngeas quando o doente, tosse, espirra e fala. Deve-se realçar que até 1940, era a maior causa de mortalidade infantil no mundo. Apesar de ser uma doença imunoprevenível, em 2001, a World Health Organization, (WHO) revelava que a ocorrência anual global de 50 milhões de casos, registrando mais de 300 mil mortes.^{1 e 11}

Embora o senso comum tenha “banalizado” a coqueluche como doença infantil, verificou-se o crescente contágio entre adolescentes e adultos. Estudos epidemiológicos realizados na França desde a década de 1990 demonstraram que a incidência de coqueluche permanecia elevada na Europa: 12,2/100.000^{8,9 e 14}

No Brasil, não existem estudos conclusivos que possibilitem responder inequivocamente se há ou não a reemergência da pertussis, considerando especialmente os fatores que interferem no monitoramento da doença, tais como, a dimensão territorial do país, as variações socioeconômicas, climáticas, culturais e de infraestrutura relativa ao acesso ao sistema de saúde pública e dos sistemas de notificação. Estes aspectos relevantes fazem parte da realidade nacional e implicam nas possibilidades das análises do comportamento epidemiológico da doença. Contudo, algumas hipóteses podem ser levantadas. Uma delas refere-se à possibilidade de que a doença esteja de fato reemergindo no Brasil, de forma não perceptível, embora, nos últimos anos alguns estados tenham relatado um aumento significativo no número de casos.^{11 e 14}

Considera-se nesta abordagem o imperativo da adoção sistemática das medidas de b

Biossegurança como recurso fundamental para o controle da propagação da coqueluche, a partir do primeiro atendimento aos pacientes com sintomatologia indicadora da doença. Este imperativo vincula-se ao processo de contágio pela dispersão de partículas no ar que alcançam curtas distâncias. Tal processo de contágio é característico em outras doenças, como por exemplo, meningite, pneumonia por *Streptococcus pneumoniae*.^{11 e 14}

Observam-se como parâmetros históricos do controle da propagação de doenças infecciosas nos ambientes hospitalares as medidas formuladas em meados do século XIX, quando a enfermeira Florence Nightingale estabeleceu as primeiras recomendações sistematizadas relacionadas ao cuidado do paciente, enfatizando a necessidade da limpeza do ambiente hospitalar, observando a necessidade de separação dos doentes infectados dos não infectados. “Somente com o estabelecimento de uma causa microbiológica da doença, através da demonstração experimental feita por Pasteur e Koch, entre 1877 a 1897, houve novas possibilidades de formulações teóricas e novas intervenções sobre a questão do controle das doenças infecciosas. O avanço da bacteriologia, da imunologia e da epidemiologia propiciou a formulação dos conceitos até hoje consagrados, tais como, infectividade, virulência e patogenicidade, relacionados ao microorganismo produtor de infecção e doença. Definiram-se ainda, as propriedades dos hospedeiros, conceituando suscetibilidade e resistência. E talvez o mais importante, estabeleceu explicação sobre modos de transmissão, isto é, vias e condições

pelas quais os microorganismos penetram no organismo, conhecido como “cadeia do processo infeccioso”.^{4,8 e 14}

As conquistas do método experimental como base da microbiologia favoreceu a formulação de novas compreensões sobre o processo infeccioso, possibilitando a proposição de novas técnicas de controle de transmissão de doenças, a partir da adoção de ações voltadas para o aprimoramento da “asepsia, antisepsia, desinfecção, esterilização, antibioticoterapia e diferentes formas de isolamento”.^{1,4,6 e 14}

Na primeira metade do século XX a valorização dessas práticas legitimou a adoção do isolamento como medida eficaz para o controle de propagação de doenças infectocontagiosas nos estabelecimentos hospitalares. Contudo a ampliação do modelo hospitalar baseado no atendimento a pacientes portadores de doenças das várias especialidades médicas, denominado hospital geral, inviabilizou a manutenção dos isolamentos, propondo-se a substituição da segregação dos doentes que ofereciam risco de contágio, para as medidas mais próximas daquilo que posteriormente seria denominado biossegurança, tais como: a utilização de materiais e equipamentos individualizados e na maioria das vezes descartáveis para estes pacientes; uso de equipamento Individual de Proteção para os profissionais de saúde; desinfecção mais rigorosa e científica dos equipamentos; lavagem das mãos, entre outras.^{1, 6 e 14}

O estudo estabeleceu como objetivo de investigação a percepção dos profissionais de saúde das unidades pesquisadas diante do atendimento em pacientes suspeitos ou confirmados com doenças respiratórias como coqueluche e tuberculose, adoção das práticas de Biossegurança e programa de treinamento continuado nas unidades de saúde.

As medidas de Biossegurança adotadas desde o proto-atendimento até o isolamento de pacientes suspeitos ou confirmados com coqueluche e/ou tuberculose, em especial, a medida preventiva do isolamento pode apresentar-se como recomendada, considerando especialmente que a questão da reemergência da coqueluche é agravada pelo fato de hoje, a pertussis não pode ser considerada uma doença exclusiva do campo pediatria. Ela requer uma maior complexidade de percepção e ações, relativas ao diagnóstico, a epidemiologia, e outras especialidades que estão no âmbito da saúde pública. Sublinha-se que “a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização Panamericana de Saúde (OPAS) em 1960 definiu o isolamento como a segregação de pessoas infectadas, durante o período de transmissibilidade da doença, em local sob condições para evitar a transmissão direta ou indireta do agente infeccioso a indivíduos suscetíveis, ou que possam transmitir a outros. No Manual para el Controle de las Enfermedades Transmisibles,

uma publicação da OPAS, o isolamento é referido como uma medida de controle do paciente, seus contatos e ambiente e inclui medidas destinadas a evitar que o indivíduo infectado siga disseminando a doença “^{1,6,10 e12}.

Metodologia

Elegeu-se como locais de recolhimento de informações no Estado do Rio de Janeiro, seis estabelecimentos de atendimento, observando particularidades de cada um deles, ou seja: uma instituição de pesquisa que pratica atendimentos e acolhe portadores de doenças emergentes, re-emergentes e negligenciadas (unidade civil federal-UCF); um hospital militar federal (HMF) de grande porte com boa infraestrutura (com número expressivo de clínicas, leitos, berçário, CTI); uma policlínica militar federal (PMF) com grande número de atendimento pediátrico; um estabelecimento de assistência pública municipal (unidade de saúde municipal I-USM-I), com grande demanda e com deficiências infraestruturais; uma instituição de saúde do interior do Estado do Rio de Janeiro também com deficiências infraestruturais- (unidade de saúde municipal II- USM-II) e uma unidade de saúde da família. (unidade de saúde municipal III- USMIII)

Tais informações foram obtidas através da aplicação de questionários, previamente elaborados a partir da observação das particularidades de cada unidade através de visitas técnicas. Tais questionários privilegiaram perguntas relacionadas aos critérios de isolamento de pacientes suspeitos ou confirmados com coqueluche, adoção de medidas de Biossegurança pelos profissionais de saúde em casos suspeitos ou confirmados de coqueluche e tuberculose, e também sobre a existência de programa de treinamento continuado nas unidades de saúde.

Resultado

Em relação às unidades de saúde, observou-se que a realidade é bem diferenciada para o critério de isolamento de paciente com coqueluche, para o isolamento em quarto com sistema de filtragem de ar: 42% dos profissionais do HMF realizaram o procedimento, 100% do UCF, 11% PMF, as unidades municipais USM-I , USM-II e USM-III não realizaram tais procedimentos. Em relação ao isolamento em quarto sem sistema de filtragem de ar, obtivemos: 29% HMC, 45% PMF, 30% USM-I, 14% USM-II e 14% USM-III. (tabela I).

Tabela I

CRITÉRIO DE ISOLAMENTO DE PACIENTE SUSPEITO OU CONFIRMADO COM COQUELUCHE NAS UNIDADES DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO

	HMF	UCF	PMF	USM-I	USM-II	USM-III
QUARTO COM FILTRAGEM DE AR	42%	100%	11%			
QUARTO SEM FILTRAGEM DE AR	29%		45%	30%	14%	14%
ENFERMARIA	2%					
NÃO REALIZAM ISOLAMENTO POR FALTA DE INFRAESTRUTURA	12%		11%	30%	57%	57%
NÃO RESPONDERAM	15%		33%	40%	29%	29%

Legenda: HMF, hospital militar federal; UCF, unidade civil federal; PMF, policlínica militar federal; USM-I, unidade saúde municipal I; USM-II, unidade saúde municipal II e unidade saúde municipal III; USM-III.

Destaca-se, 57% dos profissionais da USM-II e USM-III não realizaram o isolamento por falta de infraestrutura e 40% não responderam do USM-I.

No que se refere aos critérios de Biossegurança adotados pelos profissionais de saúde para paciente suspeito ou internado com coqueluche desde pronto-atendimento até possível isolamento, observou-se para os percentuais majoritários: 32% do HMF informaram que raramente são adotados, 45% do UCF informaram que sempre adotaram, 29% do PMF frequentemente utilizaram tais procedimentos, 60% do USM-I informaram que raramente são utilizados os procedimentos, 43% do USM-II não adotaram os procedimentos e 42% dos profissionais da USM-III não responderam. (tabela II)

Tabela II

ADOÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA PARA PACIENTE SUSPEITO OU CONFIRMADO COM COQUELUCHE NAS UNIDADES DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO

	HMF	UCF	PMF	USM-I	USM-II	USM-III
SEMPRE MAIORIA	23%	45%	17%		15%	
FREQUENTEMENTE	26%	22%	29%	10%		
PARTE DOS PROFISSIONAIS	19%	11%	18%	20%	14%	
RARAMENTE	32%	11%	6%	60%	14%	29%
NÃO UTILIZAM OS PROCED. BIOSSEG.					43%	29%
NÃO RESPONDERAM		11%	18%	10%	14%	42%
NÃO SE APLICA			12%			

Legenda: HMF, hospital militar federal; UCF, unidade civil federal; PMF, policlínica militar federal; USM-I, unidade saúde municipal I; USM-II, unidade saúde municipal II e unidade saúde municipal III; USM-III.

Quando questionado para os mesmos procedimentos de Biossegurança para paciente suspeito ou confirmado com tuberculose foram obtidos os seguintes resultados: 50% dos profissionais do HMF informaram que apenas parte dos profissionais, 67% do UCF informaram que a maioria dos profissionais adotou, 50% do PCF informaram que uma minoria, 60% do USM-I parte dos profissionais e 29% do USM-II não utilizaram tais procedimentos e 29% respectivamente da USM-III informaram que a maioria adotou os procedimentos, porém 29% da mesma unidade relataram que uma minoria dos profissionais de saúde utilizou tais procedimentos. (tabela III).

Tabela III

ADOÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA PARA PACIENTE SUSPEITO OU CONFIRMADO COM TUBERCULOSE NAS UNIDADES DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO

	HMF	UCF	PMF	USM-I	USM-II	USM-III
SEMPRE	2%	22%	6%		15%	
MAIORIA	15%	67%	22%		14%	29%
PARTE DOS PROFISSIONAIS	50%	11%	22%	60%	14%	
MINORIA	33%		50%	30%	14%	29%
NÃO UTILIZAM OS PROCED. BIOSSEG.					29%	14%
NÃO RESPONDERAM				10%	14%	28%

Legenda: HMF, hospital militar federal; UCF, unidade civil federal; PMF, policlínica militar federal; USM-I, unidade saúde municipal I; USM-II, unidade saúde municipal II e unidade saúde municipal III; USM-III

Em relação ao treinamento continuado nas unidades de saúde estudadas, obtivemos os resultados: 63% do HMF informaram que não há, 56% do UCF informaram que existe capacitação continuada, 76% PMF informaram que não há, 83% da USM-I informaram que algumas vezes existem capacitações, 17% da USM-II informaram que não há e 86% da USM-III informaram que também não foram implementados tal programa de capacitação. (tabela IV).

Tabela IV

PROGRAMA DE CAPACITAÇÃO CONTINUADA NAS UNIDADES DE SAÚDE

	HMF	UCF	PMF	USM-I	USM-II	USM-III
SIM	7%	56%	6%		16%	
ALGUMAS VEZES	30%	44%	18%	83%	17%	14%
NÃO	63%		76%	17%	17%	86%
NÃO RESPONDERAM					33%	

Legenda: HMF, hospital militar federal; UCF, unidade civil federal; PMF, policlínica militar federal; USM-I, unidade saúde municipal I; USM-II, unidade saúde municipal II e unidade saúde municipal III; USM-III

Discussão e conclusão:

Nas cinco unidades estudadas, apenas a unidade civil federal informou que 100% dos doentes são internados em isolamento com sistema de filtragem de ar, as demais unidades de saúde, sejam federais ou municipais, informaram índice inferior a 50% ou não informaram. Quando analisamos outro sistema de bloqueio da disseminação da doença, através de quarto de isolamento sem filtração do ar ambiente, verificou-se índice abaixo de 50% para os profissionais que adotaram esse procedimento nas unidades de saúde: HMF, PMF, USM-I, USM-II e USM-III.

Segundo dados registrados no Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), foram notificados, até a última semana epidemiológica de 2012, 15.428 casos suspeitos de coqueluche no país. Destes, 4.453 (28,9%) foram confirmados, representando um incremento de 97% em relação ao mesmo período de 2011, em que foram confirmados 2.258 casos.¹⁰

Atualmente, os indivíduos adultos e jovens adolescentes são os principais portadores assintomáticos e transmissores da doença para crianças abaixo de um ano de idade. Sendo assim, é fundamental a adoção de medidas de contenção na rotina das unidades de saúde, evitando a disseminação do microorganismo, principalmente para os profissionais da área de saúde que manipulam ou tenham contato com pacientes e/ou microorganismos.^{2,5,13}

Tais medidas são de grande relevância, evitando que os profissionais sejam também portadores assintomáticos e transmissores da doença, principalmente dentro de sua unidade.

Em relação à adoção dos procedimentos de Biossegurança pelos profissionais de saúde desde o pronto atendimento até o isolamento para paciente suspeito ou confirmado com a coqueluche, somente 45% da equipe médica da Unidade Civil Federal, informaram que os profissionais sempre adotaram os procedimentos, sendo o maior índice de todas as unidades, 23% HMC e 17% PMF.

Quando comparado esse resultado com pacientes suspeitos ou confirmado com a tuberculose, somente 22% da equipe médica UCF informaram que sempre os profissionais de sua unidade utilizam os procedimentos de Biossegurança desde o pronto atendimento até o isolamento. A equipe médica das demais unidades em sua maioria informou que somente parte dos profissionais valoriza e utiliza os procedimentos de Biossegurança, acentuando que uma minoria utiliza os equipamentos de proteção durante o contato com paciente. Destaca-se que este contexto de risco mostra-se preocupante, especialmente a partir da realidade do aumento da tuberculose e de sua complexidade. Observa-se que no ano de 2011 foram notificado 69.245 casos de tuberculose, destacando-se o aumento de notificação de casos por cepas multi-resistentes ao uso de antibióticos.⁷

Sublinha-se que, diferente da coqueluche, uma doença que não esta diariamente na rotina de atendimento médico, provavelmente devido ao desconhecimento de sua ressurgência, a tuberculose é uma doença de amplo conhecimento e suas práticas de Biossegurança deveriam ser adotadas por todos os profissionais de saúde rotineiramente que tenham contato com pacientes suspeitos ou internados.

Em relação à existência de programa de capacitação continuada nas unidades de saúde. Somente 56% dos profissionais de UCF informaram que existe tal programa, porém a grande maioria das unidades estudadas informaram que não há política de capacitação, 63%(HMF), 76%(PMF) e 86% (USM-III).

O programa de capacitação continuada nas unidades de saúde é fundamental em todos aspectos, o que tangue os princípios da Biossegurança seja para coqueluche ou tuberculose, como também para a conscientização da equipe médica para a necessidade de isolamento de paciente com doença infecto-contagiosa em ambiente hospitalar adequado. Destaca-se a necessidade de continuo investimento na infraestrutura das unidades de saúde, principalmente para as unidades municipais, que nesse estudo apresentaram condições inadequadas de trabalho para paciente com doenças como tuberculose e coqueluche.

Ressalta-se, que a falta de conhecimento qualificado para estabelecer corretamente as medidas preventivas frente às doenças respiratórias, à adoção de medidas de Biossegurança pelos profissionais de saúde desde o pronto atendimento até o isolamento para casos suspeitos ou confirmados de coqueluche e/ou tuberculose são resultados concretos da falta de investimento pelas unidades saúde em recursos humanos, através de programa de capacitação continuada para Biossegurança doenças re-emergentes. Destaca-se que em todas as unidades estudadas, não houve um resultado maior que 56% para a existência de programa de capacitação continuada.

O estudo observa que os “Indicadores de qualidade em Biossegurança” instituídos pela Portaria 3204 de 20 de outubro de 2010 do Ministério da Saúde não vem alcançando prioridades desejadas nas instituições pesquisadas. Tais parâmetros estabelecidos pela Portaria mencionada destacam a importância de se “monitorar e avaliar a eficácia da implantação das políticas e ações institucionais em Biossegurança, que devem considerar, entre outras, as condições de infraestrutura predial de equipamentos, o uso de boas práticas e capacitação profissional”.^{3 e 7}

Conclui-se que, o aprimoramento profissional nas unidades de saúde através de investimento em programa de capacitação continuada nas temáticas Biossegurança e doenças respiratórias como a coqueluche e a tuberculose, é fundamental para reverter a situação encontrada nessa pesquisa, bem como o maior investimento em infraestrutura nas unidades de saúde, principalmente nas unidades municipais.

Agradecimento

A todos os profissionais que contribuíram para a realização desse trabalho, bem como suas unidades de saúde.

Referências

1. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Pertussis. In Pickering LK. ed. 2000 Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases. 25^a ed. ELK Grove Village IL. American Academy of Pediatrics. 435-448. 2000
2. BISGARD KM et al. Infant pertussis: who was the source? *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23:985-89.

3. BRASIL. Ministério da Saúde. PORTARIA Nº 3.204, DE 20 DE OUTUBRO DE 2010. Aprova Norma Técnica de Biossegurança para Laboratórios de Saúde Pública. [Acesso 01/03/2013].
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt3204_20_10_2010.htm
4. CZERESNIA, D. Do contágio à transmissão: ciência e cultura na gênese do conhecimento. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1997.
5. FORSYTH, K.D.; WIRSING, V.K.C.H.; TAN, T, CARO, J.S. Prevention of pertussis: recommendations derived from the second Global Pertussis Initiative roundtable meeting. *Vaccine*. 25:2634-42. 2007
6. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil. [acesso 18/02/2013]
http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21901
7. NICHIIATA, L. ET al. Evolução dos isolamentos em doenças transmissíveis: os saberes na prática contemporânea. *Rev. Enferm USP*.38(1): 61-70. 2004
8. NIGHTINGALE, F. Notas sobre enfermagem: o que é e o que não é. São Paulo: Cortez; 1989.
9. P. BÉGUÉ <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X05816798> - aff1, BARON, S.; GRIMPREL, E. Epidémiologie de la coqueluche en Europe en 1995. *Médecine et Maladies Infectieuses* Volume 25, Supplement 3, January 1995, Pages 1263-1267
10. SISTEMA NACIONAL DE AGRAVO DE DOENÇAS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. [acessado 19/2/2013]
<http://dtr2012.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/coqueluche/bases/coquebrnet.def>
11. TREVIZAN, S.; COUTINHO S.E.D. Perfil epidemiológico da coqueluche no Rio Grande do Sul, Brasil: estudo da correlação entre incidência e cobertura vacinal. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 24(1); 93-102. 2008
12. WASHINGTON, D.C; ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD; 1997. 541p.(OPS. Publicación Científica, 564)
13. WENDELBOE, A.M. ET AL. Transmission of Bordetella pertussis to young infants. *Pediatr Infect Dis J*.26:293-99. 2007
14. WHO-recommended surveillance standard of pertussis. [acessado 05/02/2013].
http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/pertussis_surveillance/en/index.html

Artigo III

Fórum itinerante de ciência e saúde. Programa de capacitação para as doenças negligenciadas e re-emergentes.

Forum on Science and Health. Training program for neglected and re-emerging diseases

Autores: Flávio Rocha da Silva^{1,2}, Marli Brito M. de Albuquerque Navarro³ e Salvatore Giovanni De Simone^{4e 5}

¹Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil,

²Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz,

³Núcleo de Biossegurança-Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, Brazil,

⁴Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Inovação em Doenças Negligenciadas ((INCT-IDN)/Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde (CDTS), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil,

⁵Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil

Resumo:

O artigo analisa o impacto das iniciativas voltadas para sensibilização, atualização e capacitação através da organização e realização de fóruns e de cursos de capacitação destinados a profissionais de saúde e a líderes comunitários atuantes em alguns municípios do Rio de Janeiro (estendendo tal iniciativa para um município de Minas Gerais). Aborda o tema “doenças negligenciadas e re-emergentes”, tema este previamente explicitado como interesse dos interlocutores envolvidos em tal proposta, em especial, os representantes das secretarias de saúde dos municípios e das associações civis de caráter comunitário.

Destaca-se que os conteúdos temáticos e as estratégias metodológicas e pedagógicas, valorizaram a comunicação objetiva, de fácil compreensão, sem o comprometimento da qualidade científica. Objetivou-se também a ampliação de informações científicas como subsídio para o aprofundamento de diálogos com os poderes públicos no sentido de auxiliar a formulação de políticas públicas, refletidas em ações de saúde para as doenças negligenciadas.

Conclui-se que é de real importância que os profissionais de saúde, líderes comunitários e representantes dos poderes públicos participem de tais eventos a fim discutir e formular

propostas coletivas baseadas em informações qualificadas sobre os temas identificados como prioridade de saúde local a fim minimizar os impactos e avanço dessas enfermidades.

Palavras-chave: doenças negligenciadas; doenças re-emergentes; saúde pública; capacitação profissional

Abstract:

This article analyzes the impact of initiatives to raise awareness, updating and training through the organization and application of forums and training courses aimed at health professionals and community active leaders in some districts of Rio de Janeiro (extending this initiative to a district of Minas Gerais). It also addresses the theme "neglected and re-emerging diseases", a topic previously mentioned as a concern of the interlocutors involved in such a proposal, in particular, representatives of health departments of districts and civil associations of community character.

It should be noted that the thematic content and methodological and pedagogical strategies enhance the objective communication, easy to understand and without compromising the scientific quality. Another topic was the expansion of scientific information as a basis for deepening dialogue with the public authorities in order to help formulate public policies, reflected in health actions for neglected diseases.

It could be concluded that the importance to health professionals, community leaders and public representatives to participate in such events is real, leading to discussion and formulation of collective proposals based on quality information on the issues identified as a health priority site to minimize impacts and expansion of these diseases.

Keywords: Neglected diseases, re-emerging diseases, public health, professional training.

Introdução

Os mais relevantes programas de saúde pública em termos globais, destacam a urgência da implementação de recursos, incluindo qualificação de profissionais da área da saúde e a inovação tecnológica como itens fundamentais para a formulação de controles e/ou equacionamentos para as doenças negligenciadas e para as doenças re-emergentes, considerando a estreita proximidade entre as duas realidades, uma vez que as doenças negligenciadas possuem um grande potencial de ressurgência. Tais preocupações estão inclusas, por exemplo, nas

propostas de instituições como a Organização Mundial de Saúde, a organização humanitária Médicos Sem Fronteiras, dentre outras. Para as doenças negligenciadas resume-se conceitualmente que estas são doenças associadas à situação de pobreza, as precárias condições de vida, como consequência das profundas desigualdades socioeconômicas, como condição histórica dos países pobres e refletidas de maneira impactante na saúde de populações.

A denominação “negligenciada” originalmente vincula-se ao fato de não haver interesse das grandes empresas farmacêuticas multinacionais em carrear investimentos para pesquisas voltadas para estas doenças. Também verifica-se a carência de aportes financeiros das agências de fomento para viabilizar em escala significativa a inovação tecnológica, representada, sobretudo, em recursos terapêuticos mais eficazes. Destaca-se que muitos pesquisadores e gestores preferem utilizar o conceito de doenças emergentes e re-emergentes para se referir a este conjunto de doenças. Tal opção está lastreada pela definição do conceito. Segundo a vigilância epidemiológica do Brasil, definem-se as doenças “emergentes e re-emergentes como, doenças infecciosas clinicamente distintas, que tenham sido recentemente reconhecidas, ou uma doença conhecida cuja incidência esteja aumentando em um dado lugar ou entre uma população específica. É preciso levar em consideração fatores específicos de cada doença e o local onde ela aparece” (MS. Portal da saúde/SUS)¹

Observa-se que a linearidade desses conceitos esconde a ideia de que a emergência e reemergência de doenças no mundo estão fortemente potencializados pela interação de vários fenômenos. O contexto da emergência e da reemergência das doenças infecciosas, como acontecimento de caráter complexo, envolve múltiplos fatores imprevisíveis e sua incidência depende de uma complexa interação.²

Tendo como suporte estes contextos e estes indicadores conceituais, pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, entre os anos de 2010 e 2013, a partir de objetivos “exploratórios” realizaram uma “sondagem” sobre as competências, conhecimentos e experiências necessárias para elaboração de diagnósticos e/ou suspeitas das doenças negligenciadas, em alguns Municípios do Rio de Janeiro, acentuando também importância da possibilidade do registro dessas doenças como ressurgentes ou emergentes, visando a ampliação dos tratamentos adequados e notificações pertinentes. A análise dos conteúdos obtidos nas visitas, nas interlocuções estabelecidas com profissionais de saúde e nas observações de atendimento, resultaram na constatação de carências de técnicas, materiais, de formação e de

atualização para a percepção, suspeita, diagnóstico, tratamento e notificação das doenças negligenciadas e/ou emergentes e re-emergentes.

A partir da identificação do objeto das preocupações da iniciativa relatada, foi organizado, com o apoio dos orientadores da Coordenação de Ensino do Instituto Oswaldo Cruz –FIOCRUZ, contando também com a adesão de profissionais de diversas e instituições de saúde, o projeto “Ciência e Saúde Itinerante”, visando a difusão de conhecimentos sobre as doenças emergentes, re-emergentes e /ou negligenciadas.

O projeto estabeleceu como objetivos: o desenvolvimento do conhecimento para as doenças negligenciadas, emergentes e re-emergentes, a capacitação de estudantes e profissionais de saúde com informações pertinente ao desenvolvimento científico e tecnológico, o aprimoramento de conhecimentos científicos dos professores da rede pública de ensino através da participação ativa nos fóruns de ciência e saúde, a socialização de informações qualificadas em ciência, saúde e tecnologia para a população através das associações de moradores.

Elaboração das estratégias de atualização do conhecimento e capacitação: fórum e simpósio

Importantes reflexões motivadas pelas avaliações dos contextos indicadores da relevância da necessidade de prover de maior qualidade os serviços de saúde no Brasil, especialmente, considerando o caráter universal da saúde pública, através do SUS – Sistema Único de Saúde, colocam como imperativo a formulação de iniciativas traduzidas em programas voltados para a capacitação dos profissionais de saúde pública que atuam nos diversos serviços de saúde. Para L’Abbate (1999) o profissional que atua no âmbito da saúde pública precisa de maneira sistemática atualizar e aprimorar conteúdos e práticas que reflitam inovações de conhecimentos e conceitos, especialmente nos campos da Epidemiologia e das Ciências Sociais a fim de compreender as formas determinantes político-institucionais da organização do sistema de saúde brasileiro, assim como adquirir domínio técnico nas suas diversas áreas de atuação. Tendo como base tal afirmativa, entende-se como relevante a organização de espaços reflexivos capazes de provocar estímulos voltados para formulação de percepções críticas do cotidiano vivenciado pelos profissionais e absorção de conhecimentos representativos de aprofundamento de competências que irão se traduzir em aumento da qualidade do atendimento à população ³

Orientados por esta perspectiva, o relato apresentado expõe de forma analítica à proposição que resultou na organização de espaços reflexivos voltados para estimular debates baseados nas práticas do cotidiano dos profissionais da área da saúde pública em alguns

municípios do Rio Janeiro. Tendo como propósito o alcance do objetivo da capacitação sistemática como meio para o avanço da qualidade dos serviços foram organizados os seguintes eventos: Fórum de Ciência e Saúde e Curso de Capacitação para profissionais que atuam no âmbito da saúde pública e líderes comunitários.

Os fóruns de ciência e saúde, contou com as parcerias das Secretárias de Saúde dos Municípios de Paraty/RJ, Angra dos Reis/RJ, e com a adesão de um Município de Minas Gerais, Rio Preto, além de outras instituições, tais como, o Centro Integrado Empresa Escola/RJ(CIEE) e a Fiocruz através da inserção do campus “Mata Atlântica” situado em Jacarepaguá.

Os temas debatidos foram estabelecidos com a participação dos vários interlocutores locais a fim de abordar as questões vinculadas àquelas realidades, valorizando como critérios, as necessidades e apreensões das regiões com apresentam potencial ou manifestamente condições ou realidades epidemiológicas bem definidas para as doenças negligenciadas e/ou emergente e re-emergentes, considerando como relevante as informações fornecidas pelas Secretárias Municipais de Saúde de cada município e das instituições envolvidas. Sublinha-se que o público alvo foi representado por estudantes, profissionais de saúde e líderes comunitários.

Curso de capacitação

Os fóruns mostraram-se extremamente importantes para a construção da proposta dos Cursos de Capacitação com carga horária de 8 horas. Eles permitiram avaliações fundamentais para a proposição temática, metodológica, pedagógica, e outras estratégias capazes de aumentar interesses dos participantes e estimular novas iniciativas. Destaca-se portanto, que os temas e as metodologias de apresentação despertaram grande interesse entre os profissionais que atuam na área da saúde. Estes manifestaram igualmente o desejo de articular algumas iniciativas voltadas para uma maior visibilidade epidemiológica da região e o aprofundamento do conhecimento relativo as doenças negligenciadas e/ou emergentes e re-emergentes, a fim de ampliar a perspectiva de soluções ou equacionamentos dos problemas que estão no âmbito da saúde pública, da educação em saúde e da prevenção, visando também sensibilizar a população para a importância da adoção de hábitos que se traduzam objetivos preventivos, além de dialogar com os poderes públicos, a fim de viabilizar políticas públicas, refletidas em ações de saúde para as doenças negligenciadas.

Estratégias e procedimentos organizacionais

A elaboração dos conteúdos das palestras valorizaram os recursos pedagógicos explicativos com uma linguagem de fácil compreensão sem o prejuízo de sua precisão científica. Sublinha-se que o universo temático foi estabelecido com a participação dos representantes das instituições envolvidas, observando as necessidades de saúde pública e do conhecimento científica que foram manifestadas pelos Municípios e pelas demais instituições participantes. Destacou-se igualmente a relevância das informações divulgadas por instituições de grande credibilidade no campo da saúde, tais como a Organização Mundial de Saúde (OMS), o Ministério da Saúde (MS), o Centers for Disease Control (CDC) e a organização humanitária Médicos Sem Fronteiras (MsF). Foram proferidas palestras expositivas com exemplos práticos de aplicação do conhecimento científico.

Foi disponibilizado material didático relativos aos temas abordados para os participantes, visando a socialização de conteúdos de referências teórica e prática. Sublinha-se que este material foi elaborado a partir das demandas manifestadas pelos participantes. Destaca-se igualmente que tais eventos, os fóruns e os cursos de atualização e capacitação voltam-se também para o objetivo da formação de multiplicadores, buscando atender a demanda local verificada entre estudantes, profissionais de saúde e líderes comunitários.

Resultados

Em parceria com a prefeitura de Paraty (RJ), através da Secretária Municipal de Saúde, foram realizados no período compreendido entre 2010/2012 três edições do Fórum de Ciência e Saúde, voltados para o estímulo à capacitação dos profissionais de saúde da região da Costa Verde frente às doenças infecto-parasitárias e/ou negligenciadas, emergentes e re-emergentes. Foram estreitados movimentos de colaboração com os profissionais de saúde desses municípios, no sentido do estabelecimento de intensões de formação continuada privilegiando temas relativos as doenças emergentes, re-emergentes e negligenciadas, destacando-se uma maior demanda de conhecimento sobre seguintes patologias: leishmanioses, hanseníase, hepatites virais, coqueluche, além de demandas informações sobre vacinas. Destaca-se que foi manifestado com relevância informações sobre as possibilidades de qualificações mais aprofundadas em outros níveis de pós-graduação, referentes aos temas abordados. Em termos quantitativos, a primeira edição do evento realizado no ano de 2010 reuniu 150 participantes, formalmente inscritos e um número expressivo de ouvintes não inscritos. Outros eventos realizados como desdobramento dessas parcerias, foram organizados, a saber: cursos de atualização em epidemiologia, diagnóstico e

tratamento da tuberculose no ano de 2010 e o curso sobre aspectos epidemiológicos, impacto social e tratamento da hanseníase realizado em 2012.^{4 e 5}

Outro importante desdobramento efetivou-se a partir da necessidade expressada pelas Secretarias Municipais referente ao aprimoramento e capacitação dos profissionais de saúde que atuam no diagnóstico e prevenção das Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST). Tal demanda fundamenta-se nos dados demonstrativos que indicam o aumento gradativo destes agravos nas regiões de Paraty e Angra dos Reis (Costa Verde do Estado do Rio de Janeiro). A partir dessa preocupação a continuidade da parceria com a Secretaria de Saúde de Paraty, traduziu-se na promoção do III Fórum de Ciência e Saúde da Costa Verde em 2012. . Tal aprofundamento das parcerias agregou outros especialistas de instituições de pesquisa, ensino e serviços, tais como: Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP/Fiocruz), Fiocruz campus Mata Atlântica, Hospital Central do Exército (HCE), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Universidade Federal Fluminense (UFF). A ampliação temática alcançou as preocupações referentes a capacitação em diagnósticos, em atenção básica à família e em doenças negligenciadas.(tabela I)

4, e 5

Tabela I- Número de profissionais que participaram nos eventos do município de Paraty

	I Fórum	II Fórum	III Fórum	Curso de tuberculose	Curso de Hanseníase
	Ano 2010	Ano 2011	Ano 2013		
Médico	21	26	38	13	5
Enfermeiro	31	45	44	15	14
Farmacêutico	5	7	8	4	3
Biólogo	2	5	9	1	-
Tec. Enfer.	35	23	33	37	24
Demais profissionais	62	47	12	3	-
Total	156	153	144	73	46

Destaca-se que no Município de Angra dos Reis (RJ) a parceria agregou também a contribuição da Fundação de Saúde de Angra dos Reis (FUSAR), visando a organização e a realização do I Fórum de Ciência e Saúde ocorrido nesse município, um dos maiores da região da Costa Verde. Tal Fórum objetivou a ampliação dos debates sobre os contextos de algumas doenças negligenciadas, salientando as abordagens das políticas públicas da região e sua capacidade de promoção das discussões sobre os problemas de saúde enfrentado pelo município.

6 e 7

Os temas das palestras proferidas no evento tiveram como títulos: “Doenças negligenciadas – expressão da pobreza e da desigualdade”; “Aspectos da ecologia de vetores das leishmanioses na Ilha Grande”, “Leishmaniose Tegumentar no estado do Rio de Janeiro”; “Tuberculose no Rio de Janeiro”; “Doenças Sexualmente Transmissíveis: HTLV, HPV em mulheres e a espera da vacina no SUS”; “Estratégias de controle das DST e AIDS na atenção básica,”; “Biossegurança para profissionais de saúde”. Participaram desse evento 157 profissionais de saúde, distribuídos em 24 médicos, 40 enfermeiros, 12 farmacêuticos, 04 biólogos, 02 dentistas, 10 técnicos de enfermagem e 65 profissionais da Fundação de Saúde de Angra dos Reis. ^{6 e 7}

Uma região que manifestou grande interesse no projeto de capacitação fora do Estado do Rio de Janeiro foi o Município de Rio Preto na região da zona da Mata Mineira. Destaca-se que a região da Zona da Mata (MG) engloba mais 37 municípios. Vários desses municípios apresentam alta incidência de algumas doenças negligenciadas. A partir da leitura desse contexto, foi realizado em 2011, o I Simpósio de doenças emergentes, re-emergentes e negligenciadas. Outros temas foram abordados a partir dos interesses locais, a saber: “o impacto da coqueluche no Brasil”; “epidemiologia e vetores das leishmanioses no Brasil”; “epidemiologia da dengue e seus vetores”; “atenção clínica e terapêutica dos estados reacionais e o efeito colateral da poli quimioterapia em pacientes com hanseníase”; “raiva e o atendimento antirrábico humano”; “biossegurança na área de saúde. ⁸

Em 2012, foi realizado uma edição do Fórum em Ciência e Saúde em Rio Preto, que contou igualmente com a participação de profissionais da área de saúde, estudantes e moradores da região. O programa estabeleceu temas em torno de questões sobre saúde pública e doenças como leishmanioses, meningite, febre maculosa, parasitoses, acidentes com animais peçonhentos e aplicação biotecnológica no diagnóstico das doenças infecto-parasitária.

O evento reuniu cerca de 120 profissionais da área de saúde, estudantes e moradores da região, a fim de disseminar conhecimentos relacionados a aspectos epidemiológicos de doenças infecciosas e parasitárias, além abordar questões importantes sobre a saúde e as condições de vida da população. Segundo a pesquisadora Alba Valéria Machado, que ministrou a palestra “Epidemiologia das leishmanioses”, o I Fórum na Zona da Mata contribuiu para conscientização de profissionais e da população sobre aspectos relacionados a doenças de importância médica. No depoimento da pesquisadora: “O Fórum possibilitou a sensibilização de profissionais de saúde e da população com relação a agravos que atingem a região”. (tabela II) ^{8 e 9}

Tabela II - Número de profissionais que participaram nos eventos do município de Rio Preto/MG

	I Simpósio	I Fórum
	Ano: 2011	Ano: 2012
Médico	8	7
Enfermeiro	15	23
Farmacêuticos	16	12
Biólogo	7	5
Med. veterinário	13	15
Tec. enfermagem	10	16
Professores	10	19
Demais profissionais e estudantes	30	24
Total:	109	120

No Município do Rio de Janeiro foram realizados dois eventos de caráter de sensibilização para as doenças negligenciadas e re-emergentes: o I simpósio de doenças re-emergentes e negligenciadas para profissionais e estudantes de saúde do estado do Rio de Janeiro e I Fórum de Ciência e Saúde da Fiocruz do campus Mata Atlântica.

Em parceria com o Centro de Integração Empresa-Escola do Rio de Janeiro (CIEE), foi realizado o I simpósio de doenças re-emergentes e negligenciadas para profissionais e estudantes de saúde do Estado do Rio de Janeiro. O evento ocorreu em abril de 2012 e buscou aprimorar o conhecimento desse público sobre o tema. O encontro fez parte da programação da Expo CIEE Rio2012. As exposições e reflexões sobre o eixo temático proposto abordou as seguintes doenças: coqueluche, hanseníase, tuberculose, leishmanioses. Tais reflexões foram sintetizadas na palestra ministrada intitulada “Doenças negligenciadas: expressão da pobreza e da desigualdade”. O evento teve lugar no Centro de Convenção Sul América, Cidade Nova – Centro – Rio de Janeiro. Mais de duzentos estudantes e profissionais participaram no evento.^{10 e 11}

O I Fórum de Ciência e Saúde, realizado no campus da Fiocruz Mata Atlântica, no bairro de Jacarepaguá, Zona Oeste do Rio de Janeiro, reuniu 150 pessoas. Organizado pela Fiocruz em parceria com a Prefeitura do Município do Rio de Janeiro, o evento contou com a participação da comunidade científica do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).¹²

Os temas foram adequados ao perfil epidemiológico da região. As palestras foram reeditadas para cumprir este objetivo. Sendo assim, o tema, doenças negligenciadas no contexto das desigualdades socioeconômica e sua recorrência histórica no Brasil foi acompanhado por abordagens técnicas e científicas mais detalhadas, situando-se as questões de saúde referentes, sobretudo, as hepatites, sendo esta abordagem complementada pela exposição sobre

biossegurança para profissionais de saúde, uma vez que dados constataam a incidência importante das hepatites nos acidentes de infecção entre os profissionais da saúde. Como reflexões e exposições síntese foram realizadas duas mesas-redondas aprofundando os debates sobre as leishmanioses, as doenças bacterianas re-emergentes, a coqueluche, a tuberculose e a hanseníase.

11

Como desdobramento do evento Fórum Fiocruz *campus* Mata Atlântica, foram realizados no segundo semestre de 2012 quatro cursos de atualização e aprimoramento profissional, abordando as leishmanioses, a hanseníase, a micologia médica e a biossegurança.¹²(tabela III).

Tabela III- Número de participantes em relação ao fórum e cursos de atualização na Fiocruz Mata Atlântica

	I Fórum	Curso de Leishmaniose	Curso de Hanseníase	Curso de Biossegurança	Curso de Micologia Médica
	Ano: 2012				
Médico	10	4	6	2	4
Enfermeiro	23	6	4	3	5
Farmacêuticos	12	2	5	2	4
Biólogo	15	3	6	5	4
Med. veterinário	5		3	1	3
Tec. enfermagem	13	5	9	10	9
Professores	10	4	3	6	4
Demais profissionais, estudantes e comunidade.	64	12	17	25	17
Total:	152	36	53	54	50

Em todos eventos foram abordados dezoitos temas (tabela IV), distribuídos em seis fóruns, três simpósios, seis cursos de aprimoramento profissional com a participação de quarenta palestrantes de diversas instituições de saúde e ensino. Foram capacitado um total de mil e quinhentos profissionais em todos os eventos.

Como fato de impacto dessas iniciativas, diversos outros municípios do Estado do Rio de Janeiro manifestaram o desejo de realizarem tais eventos (Fórum e Curso de Capacitação). Também o CIEE e Fiocruz Mata Atlântica, programaram para o ano de 2013 a realização do II Fórum de Ciência e Saúde e o II Simpósio de doenças re-emergentes e negligenciadas no Rio de Janeiro.

O CIEE estabeleceu como locus do evento o complexo do “alemão” no Rio de Janeiro para o ano de 2013, com a finalidade de sensibilizar e propor para estas comunidades ações

proativas no sentido de estimular iniciativas preventivas voltadas para doenças re-emergentes e negligenciadas com enfoque nas doenças vetoriais, nas DSTs e tuberculose. O evento ocorreu em abril de 2013 e contou com a participação de cinco palestrantes de diversas instituições de ensino e pesquisa: Instituto Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública e Hospital Federal dos Servidores do Estado. Os temas abordados contemplaram as doenças negligenciadas e re-emergentes no município do Rio de Janeiro, o aumento de casos de tuberculose no Estado do Rio de Janeiro, a propagação da pediculose e as doenças sexualmente transmissíveis.

Paralelo ao evento, ocorreu uma mostra científica, contando com material didático de caráter interativo como forma de despertar o interesse e o desenvolvimento da ciência e saúde na região do complexo do “alemão”. A mostra contou com a participação do Instituto Oswaldo Cruz, Instituto Vital Brazil e Centro Integrado Empresa Escola do Rio de Janeiro.

Foram exibidas na mostra informações sobre a prevenção de acidentes com animais peçonhentos, controle da dengue, controle da leishmaniose e ação das cracas. Também foram exibidos vídeos sobre as temáticas: “o mundo macro e micro do mosquito *Aedes aegypti*, para combatê-lo é preciso conhecê-lo”, “*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*: uma ameaça nos trópicos” e “Triatomíneos o elo de uma enfermidade”¹²

Como ação proativa voltada para a população da comunidade moradora do complexo do “alemão”, o CIEE realizou cadastro de todos os participantes para incluir em seus diversos programas de capacitação profissional e estágios.

Esta proposta de sensibilização alcançou um total de 70 participantes, a maioria moradores da região do complexo do “alemão”, líderes comunitários e estudantes universitários de diversas regiões, além de um número significativo de crianças que interagiram motivadas pelas atividades sugeridas pela mostra científica.¹³

O principal legado expressado pelos eventos científicos realizados junto aos municípios e instituições envolvidas foi a afirmação da necessidade da continuidade das iniciativas de capacitação dos profissionais de saúde, principalmente para as doenças negligenciadas e re-emergentes.

Destaca-se conclusivamente que alguns temas foram re-editados e adequados às necessidades dos desdobramentos dos eventos, tais como as exposições sobre leishmaniose e biossegurança. Outros temas como as DSTs foram especificados como demanda dos municípios de Paraty e Angra dos Reis. Segundo o critério de adequação temática às demandas locais, o

município de Rio Preto-MG, expressou interesse sobre os seguintes temas: febre maculosa e meningite.

Tabela IV- Temáticas abordadas nos fóruns e simpósios

	I Fórum Paraty	II Fórum Paraty	III Fórum Paraty	I Fórum Angra dos Reis	I Fórum Rio Preto	I Fórum Fiocruz Mata Atlântica	I Simpósio Rio Preto	I Simpósio	II Simpósio CIEERJ
								CIEERJ	
Leishmaniose	X	X		X	X	X	X	X	
Dengue							X		
Tuberculose		X		X		X		X	X
Hanseníase		X				X		X	
Febre maculosa					X				
Coqueluche	X					X	X	X	X
Meningite	X						X		
Doenças negligenciadas				X		X		X	X
Raiva							X		
DST			X	X					X
Hepatite			X						
Animais peçonhentos	X				X				
Políticas de saúde pública			X	X	X				
Vermínose e Promoção de saúde			X		X				
Aplicação biotecnológica			X		X				
Pós-graduação		X							
Vacinas		X							
Pediculose									X
Biossegurança	X			X		X	X		

A análise desse processo realça a necessidade da formulação de políticas de capacitação dos novos profissionais de saúde, acentuando importância das doenças negligenciadas e re-emergentes, sublinhando que grande parte dos profissionais da área da saúde, participantes dos eventos declararam várias dificuldades para o reconhecimento de tais enfermidades na rotina das unidades de saúde onde atuam.

Sublinha-se que nos cursos de atualização profissional realizados após os fóruns, manifestou-se com relevância a necessidade da capacitação contínua dos profissionais, observando que doenças como a tuberculose, por exemplo, que acreditava-se haver capacitação suficiente entre os profissionais de saúde, apresenta vulnerabilidades importantes, especialmente quanto as deficiências relativas as normas de biossegurança, assim como, o conhecimento relativo ao novo programa de tratamento adotado pelo Ministério da Saúde. Tais fatores de vulnerabilidade foram destacados pelos participantes como defasagem de conhecimento que interfere no desempenho profissional e na qualidade do atendimento.

Em termos conclusivos, afirma-se que os programas de capacitação para doenças negligenciadas e re-emergentes representaram uma real contribuição para as políticas de saúde locais. Sendo assim, a extensão do Programa de Capacitação com suportes nos eventos relatados, deverão alcançar outros municípios, visando também suprir, através das temáticas propostas, as possíveis deficiências, por vezes verificadas na formação acadêmica e no processo da elaboração de competências científicas e das ações práticas exigidas na atuação dos profissionais atuantes no setor da saúde.

Acentua-se que os profissionais de saúde devem ter acesso constante aos espaços de reflexão que estimulam também a manifestação crítica de experiências cotidianas, revelando suas perspectivas, apreensões, sugestões, manifestando as propostas criativas dos sujeitos construtores da qualidade e da ética.

Conclui-se que é de real importância os profissionais de saúde, líderes comunitários e representantes das associações de moradores participem de tais eventos a fim discutir e formular propostas coletivas baseadas em informações qualificadas sobre os temas apresentados visando a difusão dessas informações no sentido de promover ações preventivas no âmbito das doenças negligenciadas e re-emergentes em suas localidades, minimizando assim o impacto do avanço dessas enfermidades.

Referências

1. BRASIL. Ministério da Saúde.

http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=28002

2. SOUZA, W. Doenças negligenciadas. Ciência e tecnologia para o desenvolvimento nacional. Estudos estratégicos – Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2010. 56 p. :il. – ISBN: 978-85-85761-30-1
3. SOLANGE L'ABBATE. Educação e serviços de saúde: avaliando a capacitação dos profissionais Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 15(Sup. 2):15-27, 1999
4. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. INSTITUTO OSWALDO CRUZ (acesso em 25/04/2013)
<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1286&sid=32>
5. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. INSTITUTO OSWALDO CRUZ (acesso em 25/04/2013)
<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1573&sid=32>
6. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. INSTITUTO OSWALDO CRUZ (acesso em 25/04/2013)

<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1644&sid=32>

7. PREFEITURA MUNICIPAL DE ANGRA DOS REIS (acesso 27/04/2013)

http://www.angra.rj.gov.br/imprensa_noticias_release.asp?vid_noticia=8597&IndexSigla=imp#.UXKwvLWTjeE

8. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. INSTITUTO OSWALDO CRUZ (acesso em 27/04/2013)

<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1162&sid=32>

9. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. INSTITUTO OSWALDO CRUZ (acesso em 28/04/2013)

<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1519&sid=32>

10. CENTRO INTEGRADO EMPRESA ESCOLA (acesso 28/04/2013)

<http://cieerio.blogspot.com.br/2013/04/cieerio-e-fiocruz-no-complexo-do-alemao.html>

11. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. CANAL SAÚDE (acesso em 27/04/2013)

<http://www.canal.fiocruz.br/destaque/index.php?id=497>

12. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. (acesso em 27/04/2013)

<http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/campus-mata-atl%C3%A2ntica-recebe-f%C3%B3rum-sobre-ci%C3%A2ncia-e-sa%C3%BAde-nesta-quarta-305>

13. FOLHA DIRIGIDA. EDUCAÇÃO (acesso 8/04/2013)

http://www.dirigida.com.br/fd/Satellite/mercado-de-rabalho/cursos_e_eventos/Ciee-promove-dia-27-de-abril-Simposio-para-moradores-do-Complexo-so-Alemao-2000041474598-1400002100391

Artigo IV

Identification of linear B epitopes of pertactin of *Bordetella pertussis* induced by immunization with whole and acellular vaccine

Flavio R. da Silva^b, Paloma Napoleão-Pego^b and Salvatore G. De-Simone^{a,b,c,*}

^a*Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde (CDTS)/Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Inovação em Doenças Negligenciadas (INCT-IDN), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, Brazil*

^b*Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, IOC-FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ, Brazil*

*Corresponding author at: Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, IOC-FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ, Brazil

Tel: +55 21 38658183, faxc +55 21 38658240

E-mail addresses: dsimone@ioc.fiocruz.br (S.G. De-Simone).

Highlights

-Sera of mice immunized with Pertussis cellular and acellular vaccines recognized twenty four and twelve IgG binding epitopes within pertactin protein, respectively.

-Mice sera anti-Pertussis cellular vaccine recognized exclusively seven epitopes in pertactin.

-Mice sera anti-Pertussis acellular vaccine recognized exclusively eight epitopes in pertactin.

Keywords: *Bordetella pertussis*, pertactin, B-epitope, peptide array, SPOT-synthesis, synthetic peptides, technological innovation.

Abbreviations: Diphtheria-tetanus-pertussis vaccine (DTP), Diphtheria-tetanus-pertussis acellular vaccine (DTPa); filamentous hemagglutinin (FHA); mice immunized with Pertussis acellular (miPa); mice immunized with Pertussis cellular (miPc); monoclonal antibodies (mAb); out membrane protein (OMP); pertactin (Prn); Pertussis acellular (Pa); Pertussis cellular (Pc) Pertussis toxin detoxified (Ptx); phosphate buffer pH 7.3 containing 150 mM NaCl (PBS); 50 mM Tris-buffer saline, pH 7 (TBS).

Abstract

Pertussis, a serious infectious disease of the respiratory tract caused by *Bordetella pertussis*, is reemerging in several countries with a traditionally high vaccine uptake on vaccinated population. An analysis of clinical isolates have suggested antigenic divergence between vaccine strains and circulating strains. Although P.69 antibodies are involved in protective immunity it is not yet known the structure of antigenic determinants and all molecular its location. Site-directed mutagenesis, pepscan and spin-spot techniques has been applied promptly to identify discontinuous and continuous B epitopes recognized by mouse monoclonal antibodies and human antibodies, respectively. Here, we focused on the precise mapping using the Spot-synthesis peptide arrays on cellulose membranes comprising the entire predicted sequence of pertactin. The epitopes patterns from mice immunized with Pertussis cellular (miPc) vaccine were immunodominant when compared to mice immunized with Pertussis acellular (miPa) vaccine. A total of twenty two major epitopes were identified by serum from miPc vaccine, while twelve were identified by sera miPa vaccine. Most of these epitopes sequences are shared, however, seven epitopes were specifically identified by miPa vaccine while eight by the miPc vaccine. These epitopes were distributed along all the pertactin sequence. Epitope correlation homologies indicated that the variation in pertactin mutations does not constitute a problem in vaccination process in highly immune animals. Concluding, we describe the complete linear antigenic determinants repertory of the *B. pertussis* pertactin molecule and show for the first time that a higher number of B-linear epitopes are preferentially induced in mice immunized with the Pc vaccine than the Pa vaccine, instead of both preparation be protective.

1.Introduction

Pertussis or whooping cough is an acute infectious disease caused by the bacterium *Bordetella pertussis*, a small coccobacilli, Gram-negative and aerobic, especially in young children. Once present in the lungs, the bacterium attaches to ciliated pulmonary epithelial cells via a collection of outer membrane proteins, all of which are virulence factors. Although vaccination against *pertussis* has been highly successful in reducing morbidity and mortality, it has remained one of the 15 most common causes of death from infectious diseases worldwide [1]. During the past 15 years there has been a resurgence of *pertussis* in countries with a high vaccine uptake. Several explanations have been suggested for the reemergence of *pertussis* in these countries together with increased responsiveness improved diagnosis of the disease, waning immunity in both adolescents and adults and the adaptation of the *B. pertussis* population [2].

Innate resistance [3] and pathogen adaptation has probably played an important role in the resurgence of *pertussis* [4,7]. Analysis of clinical isolates collected in the last 50 years revealed antigenic divergence between vaccine strains and circulating strains in both Europe, the United States, Japan and Australia [5–17]. Polymorphisms were found in at least two proteins implicated in protective immunity: pertactin (P.69 Prn) and *pertussis* toxin (Ptx) [2,18,19].

Previous results obtained with Pertussis cellular (Pc) and Pertussis acellular (Pa) vaccines immunization indicate that independently of the process of antigen preparation a robust protection is induced [20]. However, as the Pc vaccines are developed using heat-killing bacteria and this physical process entails denaturation of the proteins and consequently the lost of the most discontinuous epitopes, thus the linear epitopes assume great importance in the understanding of the vaccine induced protection.

Most of Pa vaccines containing five immunogen: pertussis toxin detoxified (Ptx), filamentous hemagglutinin (FHA), fimbrial serotype 2 and 3 and P.69 Prn [21]. Passive and active immunization studies in mice and pigs have shown that antibodies levels against P.69 Prn correlated with protective immunity [22,23] and clinical protection [24,25]. Anti-P.69 Prn antibodies, but not anti-Ptx, anti-fimbriae, or anti-filamentous hemagglutinin antibodies, were found to be crucial for *B. pertussis* phagocytosis [26].

Prn, is an out membrane protein (OMP) and belongs to the family of so-called autotransporter proteins which undergo autoproteolytic processing [27]. P.69 Prn is processed from a 93 kDa large precursor to a 69 kDa (P.69) and 22 kDa (P.30) protein [28]. The unprocessed polypeptide is directed via a signal peptide to the secretory machinery in the inner membrane where the signal peptide is cleaved. Subsequently, the polypeptide is directed towards the outer membrane where P.30 forms a pore through which the 69-kDa protein is transported. After secretion via the autotransporter domain, proteolytic activities shape the 69-kDa protein to its final 60.37 or 58.34 kDa form [29]. These final forms (referred to as P.69 Prn), stay noncovalently bound to the bacterial cell surface and are used in most Pa vaccine [30].

The X-ray crystal structure of P.69 pertactin has been determined and the protein fold consists of a 16-stranded parallel-helix with a V-shaped cross-section. The structure appears as a helix from which several loops protrude, one of which contains the sequence motif associated with the biological activity of the protein; adherence to host tissues [31]. P.69 Prn is polymorphic, and 13 variants (P.69 Prn1–P.69 Prn13) have been identified so far [32]. These variation are limited to two regions, designated region 1 and 2, which are comprised of Gly-Gly-

X-X-Pro (r1 repeat) and Pro-Gln-Pro (r2 repeat) repeats, respectively. Most variation is found in region 1 which is located proximal to the N-terminus and flanks the Arg-Gly-Asp (RGD) motif, implicated in ligand–receptor interactions in eukaryotes. It has been shown that the RGD motif is involved in P.69 Pr in mediated attachment of *B. pertussis* to mammalian cells [33,34].

Even though a number of studies in both animals and humans have indicated that P.69 Prn can elicit protective antibodies [35-37], however information about the location of B-linear epitopes to which these antibodies are directed is limited [38]. Most of the continuous and discontinuous epitopes identified until today were realized using different methodological approaches and sera of different hosts [39]. These studies has addressed important segments or domain of the toxins and under our knowledge there isn't work comparing the immune response against the two vaccine type at epitope level. In addition, our results confirms and refine these studies on the comprehension of pertactin epitopes localization and allowed us to identify epitopes which were not identified previously.

2. Material and methods

2.1. Materials

Amino acids for peptide synthesis were from Calbiochem-Novabiochem Corp. (Germany) and cellulose membranes from (Intavis AG Bioanalytical Instruments, Germany). Sheep anti-mice immunoglobulin was obtained from Promega Biosciences, CA, USA and the SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate from Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA. All other reagents and chemicals were from Merck (Darmstadt, Germany). The DTP vaccine was obtained from Bio-Manguinhos (FIOCRUZ, RJ, Brazil) and the DTPa vaccine from GlaxoSmithKline.

2.2. Immunization of mice and ethical aspects

Fifteen NIH Swiss mice of 12-16 g were immunized with three batches of DTP (**2 IU of Brazilian National Immunization Program**) and DTPa (2 IU) with intervals of seven days and the sera collected one week after the last inoculation. The sera was obtained and stocked at -20°C. The DTP vaccine is a suspension composed of diphtheria and tetanus toxoid obtained by inactivation of toxins by formaldehyde combined with the pertussis vaccine (wool cell), derived from the bacterium *Bordetella pertussis* inactivated by formaldehyde gel adsorbed on aluminum hydroxide and thimerosal added as a preservative). The DTPa contains the two toxoids plus the pertussis toxin, pertactin, hemagglutinin filamentous and fimbria 2 and 3.

We confirm that any aspect of the work covered in this manuscript that has involved experimental animals has been conducted with the ethical approval of all relevant bodies and that such approvals are acknowledged within the manuscript.

2.3. Synthesis of the cellulose-membrane-bound peptide array

A peptide array comprising a total of 179 overlapping 15-mer peptides with a 4-amino-acid offset (**Fig. 1**) and cover the entire region of the 900 aa sequence of the pertactin protein was performed on amino-PEG₅₀₀-UC540 cellulose membranes according to standard SPOT synthesis protocols [40] using an Auto-Spot Robot ASP222 (Intavis). Membranes containing the synthetic peptides were either probed immediately or stored at -20°C until needed. Negative controls [without peptide; peptide IHLVNNESSSEVIVHK (*C. tetani*, precursor)], positive control. Blocking the remaining amino functions between spots provided discrete reaction sites on the membrane for further standard solid-phase peptide synthesis with amino acid pentafluorophenyl esters.

2.4. Screening and measurement of spot signal intensities

The screening and measurements of spot signal intensity was realized as described [41]. Briefly, prior probing the peptides with the antibody, the SPOT membranes were wetted with 20 ml of methanol and transferred into 20 ml of TBS (50 mM Tris-buffer saline, pH 7.0, pH 7.4) for 3 min. The free sites of the membranes were blocked with 3% BSA in TBS-CT (Tris-buffer saline, 3% casein, 0.1% Tween 20, pH 7.0) for 1 h at room temperature. After extensive washing with TBS-CT, the membrane was incubated in blocking buffer containing primary antibody at a dilution of 1:250 (1h), followed by sheep anti-mice IgG (1:5000 in TBS-CT with 1% BSA) secondary antibody conjugated to alkaline phosphatase. The membrane was washed several times with TBS-T, incubated with chemiluminescent substrate working solution (0.125 ml/cm^2) for 5 min. Chemiluminescent signals were detected on MF-ChemiBis 3.2 (DNR Bio-Imaging Systems, Israel) at a resolution of 5 MP. The digital image file was analyzed with TotalLab Software (Nonlinear Dynamics, USA) to quantify signal intensities and to define the empirical probability that the intensity from a spot was distinct from that of the background signal using algorithms that compared the intensities between background, spot area and negative controls.

2.5. Bioinformatics and in silico analysis model

The complete sequence of *B. pertussis* pertactin (A4UTL5) used for epitope mapping and the other strains of *B. pertussis* (Q03035, K4QEP0, K4TPW9, Q9L4E2, Q6U896, K4TCV0, Q9AIX8, K0MTC8, J7RKB0, A4UTL5, F4LFL2, P14283) were retrieved from the National Center for Biotechnology Information, USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and the multiple alignment realized using the programs ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) and BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

The alignment of the P.69 Prn of the three major species of *Bordetella spp.* (*B. pertussis* (Tahoma I), *B. parapertussis* (12822) and *B. bronchiseptica* (RB50)) was performed using the program Kodon (Applied Maths, Belgium).

To predict model of pertactin, A4UTL5 sequence was submitted to the I-Tasser server [42,43]. Main parameters indicates a borderline quality of the model (confidence score equal - 2.16 and TM-score of 0.47 ± 0.15) despite the initial part of the residue 35 to 564 have 97.8% identity with the 1DAB (resolution of 2.5 Å) structure used as template. The final sequences presented lower identity (55.1%) to the template (3QQ2:A) that have low resolution 3.0Å, the overall outcome of the model was diminished.

3. Results

3.1. Epitope mapping

To identify the epitopes recognized by the sera of mice immunized with the *B. pertussis* whole cell vaccine and the acellular *B. pertussis* vaccine on pertactin toxin, two identical peptide libraries composed by a set of 179 overlapping peptides each and covering all the pertactin sequence (900 amino acids) were probed with serum of mice immunized. The peptides were directly synthesized at the same time onto cellulose membranes by standard SPOT protocols. Each synthesized peptide consisted of 14 amino acids and was offset by five amino acids from the previous peptide. A typical recognition pattern of mice IgG is shown in **Figure 1**. In **panel A**, normalized measured intensities from chemiluminescence are presented with 100% defined by the positive controls (not shown). An image from a representative membrane presenting the peptide library a probed with miPc vaccine (**panel A,C**) and miPa vaccine (**panel B,D**) is shown in **Fig. 1**. A list of the peptides and their coordinates on the membranes is listed in **Fig. 1 panel C**.

The pattern of reactivity of the mice antisera immunized with Pc vaccine gave a major number of positive spot than the antisera of mice immunized with Pa vaccine (**Fig. 1A**). The overlapping of the positive spots depicted 22 epitopes recognized by the sera of miPc vaccine while only 12 epitopes were identified by the miPa vaccine (**Fig. 2**). However, seven epitopes (ITLQAGHAAQGKALL, SGLFRMNVFADLGL, MQDA, GHTD, ANGLRVRDE, EVGKRIELAGRQV, SVLQEFDGA) were specifically identified by the miPc vaccine while eight (VMLRDTNVT, TIRRGDAPA, GTSIGPLDV, ARWT, SGQNRLWRNSGSE, ATFTLANKD, NGQWSLVGAKAP PAACV, YLDATLRAS) by the sera of miPa vaccine (**Fig. 2**). The remaining epitopes shared epitopes amino acid sequence (**Fig. 2**).

3.2-Localization of the B-epitopes in the 69-Prn

No reactivity was observed in the first thirty-five amino acids, a signal region comprising the pre/pro region of the Prn protein. Eleven epitopes were identified in the P.69 Prn by the miPc vaccine (Prn-1, Prn-3, Prn-4, Prn-5, Prn-6, Prn-8, Prn-9, Prn-12, Prn-13, Prn-17, Prn-18) and five epitopes (Prn-12, Prn-17, prn-19, Prn-20, Prn-22) by the miPa vaccine (**Fig. 2**). However, the twenty two linear B-epitopes identified by the Spot-synthesis analysis were distributed along the pertactin protein (**Fig. 2**).

The **region 1** (289-371aa) presented the minor number of epitopes. The epitope Prn-12 (286-290 aa) was recognized either by miPc vaccine sera and miPa vaccine sera. The miPc vaccine sera identified one additional epitopes, the Prn-13 (341-345 aa).

Nine epitopes (Prn-26-Prn34) were localized in the **region 2** (600-887 aa) and were recognized by the miPc vaccine sera while only one epitope (Prn-26) was recognized by the miPa vaccine sera. The major response of the Pa vaccine was found in the inter region 1 and 2. Most of the identified epitopes were located in loop/coil structures and were disposable outside of the protein surface and accessible to the solvent (**Fig. 3**).

The crystal structure of mature pertactin has been determined to 2.5Å resolution by means of X-ray diffraction. The fold is characterized by a 16-stranded parallel beta-helix, with a V-shaped cross-section. Several between-strand amino-acid repeats form internal and external ladders. The helical structure is interrupted by several protruding loops that contain motifs associated with the activity of the protein. One such sequence - [300-GGXXP-304] - appears directly after the RGD motif, and may mediate interaction with epithelial cells [44]. While the RGD motif (260-272)

from region 1 is part of an epitope recognized by sera of miPa vaccine sera (**257-TIRRGDAPA-265**), the adjacent sequence involved in the epithelial adhesion is not present in this epitope. Either, this epitope was not recognized by sera of miPc vaccine sera (Fig 2).

3.3. Cross-immunity conferred by strains of *Bordetella pertussis*

To investigate the cross-immunity conferred by the *B. pertussis* pertactin protein twelve data bank deposited sequences were aligned and the antigenic epitopes sequences compared. This analysis showed that the totality of epitopes identified by mice immunized sera are shared with the pertactin protein strains sequences (**Fig. 4**). The highly conservation of the structure of the epitopes suggest that a strong cross-immunity is induced by the immunization. Yet the epitopes identified in this work by the Spot-synthesis (immunized by cellular and acellular vaccine) and those identified in the literature by different methodologies and host immunization were pointed and correlated. The data is presented in the **figure 2** and showed that 33 epitopes could be depicted independent of the host response.

3.4. Correlation of pertactin within *Bordetella sp*

Pertactin is one of the most virulence factor of the *Bordetella sp*. Contain an Arg-Gly-Asp (RGD) motif that promotes binding to integrins, known to be important in cell mobility and development. The production of most *Bordetella* virulence factors (including pertactin) is controlled by a two-component signal transduction system, comprising the BvgA regulator and the BvgS sensor. As showed in the **Fig. 5** the pertactin proteins shares a high level of structural similarity and therefore the totality of linear epitopes are identified with other *Bordetella sp* adhesins proteins. This fact suggest that a cross-immunity to pertactin is induced upon vaccination either with Pc vaccine and Pa vaccine.

4. Discussion

Studies in animals and humans have indicated that pertactin plays an important role in immunity to pertussis. Especially relevant are the results of two independent field trials, which revealed a correlation between pertactin antibodies and clinical protection .

Although in the practical human vaccination both vaccines are effective, our results shown that the immune response of animals although comparable is not identical (**Fig. 1**). The peptide array showed that the sera of mice immunized with the Pc vaccine recognized 22 epitopes, while the animals immunized with the Pa vaccine identified only 12 epitopes (**Fig. 1 and Fig 2**).

Pertactin belongs to a family of secreted proteins designated autotransporter proteins. It is produced as a large (900-910aa) precursor molecule which is proteolytically processed at its N and C termini to produce P.69 and P.30, which are located at the cell surface and in the outer membrane, respectively [27]. P.69 pertactin, but not P.30, is included in acellular vaccines.

Comparing the immune response against different segments of the pertactin it is possible to identify that the best robust immune response of miPc vaccine was directed against the N-terminus and C-terminus (P.30 Prn) while the major response of the Pa vaccine was in the segment inter region 1 and 2. As the Pa vaccine is composed exclusively by the P.69 Prn segment no immune response was detected against this P.30 Prn C-terminal segment (**Fig. 1**). At the same way in another work the N-terminus of pertactin was immunodominant in both rabbits and humans but in this work the P.30 Prn was not investigated [44]. In addition, a refined analysis demonstrated that distinct but specific antibodies are induced either immunizing mice with Pc vaccine or Pa vaccine. This fact and the decreasing of P.69 Prn antigenicity in the Pa vaccine could be explained by the physical and chemical treatment effect necessary for the antigen detoxification. The Pc vaccines are normally developed by heat-killed bacteria or formaldehyde treatment, while the Pa vaccine by treatment of the toxins with formaldehyde. The association between antibody responses with accessibility site is a phenomenon which has been frequently reported for various antigens [45], This most likely reflects exposure to the antigen and possibly maturation of the immune system over time. Besides, the most common pertactin whole (Pw) vaccines are generally composed of 1,2, or 3 different strains, while the Pa vaccines by 3-4 components. The Pa vaccine used in our study is composed by three components including the Prn protein. Independent of this fact, the common epitopes of the P.69 Prn become the most important targets of the immune response neutralization since both Pc and Pa vaccines are protective.

Previously, it was reported that several linear epitopes were recognized by human serum antibodies and mAbs [44]. Our study shows that, in general, there exists a good correlation within the epitope sequences identified in our study and those described in the literature (Fig 2). This is in spite of left or right amino acid sequence differences that can be detected within the immunized hosts.

The Prn possess two important regions, these regions are denominated region 1 and 2 and are comprised of repeats known to create polymorphisms at a much higher rate than can be achieved by point mutations and therefore important for immune escape [46]. Previous reports have

depicted the role of the region 1 (**276-GGFGP-280**) and region 2 (**575-PQPPQPQPEAPAPQP-590** and **594-RELSA-598**) of the 69-Prn in conferring immunity in rabbit [47]. However, in our Spot-synthesis analysis these regions were not immunogenic to mice immunized either with Pc and Pa vaccines (**Fig. 2**).

The regions 1 and 2 also contain the amino acid triplet arginine-glycine-aspartic acid (RGD), a sequence motif that functions as a cell-binding site in a number of mammalian proteins. It has been shown that the pertactin RGD sequence is also involved in adherence to host cells [33] and in this work we have shown that both RGD site 1 (**257-TIRRGDAPA-265**, **266-270**) and 2 (**691-693**) are part of epitopes (**257-265** and **686-699**) recognized by sera of the miPa vaccine and not by the miPc vaccine sera. Therefore the absence of reactivity of mice immunized with Pc vaccine to this epitope could be explained by the lack of accessibility to this segment in the preparation of Pc present in the vaccine. Normally, this segment is entrapped inside the membrane of the bacteria and possibly not accessible to the immune system. Independent of this fact, the Pc vaccine is strongly effective and protects the host independent of the absence of this epitope. However, the antibodies induced by these epitopes should be in some aspects important for the neutralization of the attachment of the bacterium to the target cell.

The C-terminal region of the P.69 Prn contains another important [**569-PQPGPQPPQPPQPPQPEAPAPQP-583**] motif loop, which appears to contain the major human immunoprotective epitope, however in our study this epitope was not recognized neither by sera of miPc vaccine or miPa vaccine (**Fig. 2**).

The antigenic determinant **XCDRF** identified previously by others [44] is also recognized by the miPa vaccine and miPc vaccine. Here we also describe that the amino acid sequence of several continuous epitopes recognized by mice sera shared the same sequence or are located proximate to epitopes to which human antibodies bind (**Fig. 2**).

Pw vaccination induces a broad immune response against hundreds of bacterial proteins, leading to the control of the circulation of isolates similar to the vaccine strains. However, this vaccination approach did not control the circulation of other

isolates and did not control the virulence of the isolates. In previous studies in mice, it was shown that *B. holmesii* does not possess cross-reactive epitopes with *B. pertussis* [48], however this bacteria does not comprise the complex responsible for the pertussis syndrome. The Pa vaccine-induced immune response targets the virulence of *B. pertussis* and not of *B. parapertussis*

[49,50], another causative agent of the disease. These species are in general immunologically distinct [38], but in our study we have showed that all the epitopes recognized by miPc vaccine and miPa vaccine shared common sites within *Bordetella sp* including the *B. parapertussis* and *B. bronchiseptica*. Consequently we have shown that the immunity of Prn protein is broad and covers all strains and species which express and secrete the toxin. Therefore, the absence or decreasing of Pc and Pa vaccine protection appear not be due to the absence of neutralizing antibodies to the Prn *B. parapertussis* protein but the presence of other virulent factors not covered by Pc and Pa vaccines in circulating strains and species of *Bordetella*. In conclusion the mapping of Prn protein epitopes demonstrated a higher number of linear B-cell epitopes immunized with the Pc vaccine than the Pa vaccine. In addition, specific epitopes were identified by antibodies produced in response to the miPa vaccine and miPc vaccine.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian Council for Scientific Research (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro-(FAPERJ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and FIOCRUZ (PROEP). The results are part of a DrSci Thesis (IPEC, FIOCRUZ) of FRS. We thank L.P. Gomes for help in establishing the modeling figures, DWPJr for helpful comments and revision of the manuscript. Acknowledgments are also due to the National Institute of Quality Control of Health (INCQS-FIOCRUZ) for providing the DTP and DTPa vaccine and the platform of peptide synthesis (PDTIS/FIOCRUZ) for use of its facilities.

REFERENCES

- [1] Kerr JR, Matthews RC. *Bordetella pertussis* infection: pathogenesis, diagnosis, management, and the role of protective immunity. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2000;19:77–88.
- [2] Mooi FR, Vander Maas NA, De Melker HE. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin. Epidemiol Infect. 2013; 13:1-10.
- [3] Zurita E, Moreno G, Errea A, Ormazabal M, Rumbo M, Hozbor D. The stimulated innate resistance event in *Bordetella pertussis* infection is dependent on reactive oxygen species production. Infect Immun. 2013;81:2371-8.
- [4] Mooi FR, van Loo IH, King AJ. Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: a cause for its reemergence? Emerg. Infect. Dis. 2001; 7:526–8.

- [5] de Melker HE, Schellekens JF, Neppelenbroek SE, Mooi FR, Rumke HC, Conyn-van Spaendonck MA. Reemergence of *pertussis* in the highly vaccinated population of the Netherlands: observations on surveillance data. *Emerg. Infect. Dis.* 2000;6:348–57.
- [6] de Melker HE, Conyn-van Spaendonck MA, Rumke HC, van Wijngaarden JK, Mooi FR, Schellekens JF. *Pertussis* in The Netherlands: an outbreak despite high levels of immunization with whole-cell vaccine. *Emerg. Infect. Dis.* 1997;3:175–8.
- [7] King AJ, van der Lee S, Mohangoo A, van Gent M, van der Ark A, van de Waterbeemd B. Genome-wide gene expression analysis of *Bordetella pertussis* isolates associated with a resurgence in pertussis: elucidation of factors involved in the increased fitness of epidemic strains. *PLoS One.* 2013; 8 :e66150.
- [8] Mastrantonio P, Spigaglia P, van Oirschot H, van der Heide HG, Heuvelman K, Stefanelli P, et al. Antigenic variants in *Bordetella pertussis* strains isolated from vaccinated and unvaccinated children. *Microbiol.* 1999;145:2069–75.
- [9] Mooi FR, He Q, van Oirschot H, Mertsola J. Variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors *pertussis* toxin and pertactin in vaccine strains and clinical isolates in Finland. *Infect. Immun.* 1999;67: 3133–4.
- [10] Fry NK, Neal S, Harrison TG, Miller E, Matthews R, George RC. Genotypic variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertactin and *pertussis* toxin in historical and recent clinical isolates in the United Kingdom. *Infect. Immun.* 2001; 69:5520–8.
- [11] Cassidy P, Sanden G, Heuvelman K, Mooi F, Bisgard KM, Popovic T. Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and *pertussis* toxin virulence factors in the United States, 1935–1999. *J. Infect. Dis.* 2000;182:1402–8.
- [12] Gzyl A, Augustynowicz E, Gniadek G, Rabczenko D, Dulny G, Slusarczyk J. Sequence variation in *pertussis* S1 subunit toxin and *pertussis* genes in *Bordetella pertussis* strains used for the whole-cell *pertussis* vaccine produced in Poland since 1960: efficiency of the DTwP vaccine-induced immunity against currently circulating *B. pertussis* isolates. *Vaccine* 2004;22:2122–8.
- [13] Weber C, Boursaux-Eude C, Coralie G, Caro V, Guiso N. Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39:4396–403.

- [14] Poynten M, McIntyre PB, Mooi FR, Heuvelman KJ, Gilbert GL. Temporal trends in circulating *Bordetella pertussis* strains in Australia. *Epidemiol. Infect.* 2004;132: 185–93.
- [15] Gzyl A, Augustynowicz E, Loo I, Slusarczyk J. Temporal nucleotide changes in pertactin and *pertussis* toxin genes in *Bordetella pertussis* strains isolated from clinical cases in Poland. *Vaccine* 2001;20: 299–303.
- [16] Kourova N, Caro V, Weber C, Thiberge S, Chuprinina R, Tseneva G, et al. Comparison of the *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* isolates circulating in Saint Petersburg between 1998 and 2000 with Russian vaccine strains. *J Clin Microbiol* 2003;41: 3706–11.
- [17] Guiso N, Boursaux-Eude C, Weber C, Hausman SZ, Sato H, Iwak M, et al. Analysis of *Bordetella pertussis* isolates collected in Japan before and after introduction of acellular *pertussis* vaccines. *Vaccine* 2001;19:3248–52.
- [18] van Loo IH, van der Heide HG, Nagelkerke NJ, Verhoef J, Mooi FR. Temporal trends in the population structure of *Bordetella pertussis* during 1949–1996 in a highly vaccinated population. *J Infect Dis* 1999;179:915–23.
- [19] He Q, Makinen J, Berbers G, Mooi FR, Viljanen MK, Arvilommi H, et al. *Bordetella pertussis* protein pertactin induces type-specific antibodies: one possible explanation for the emergence of antigenic variants? *J. Infect. Dis.* 2003;187:1200–5.
- [20] Canthaboo C, Williams L, Xing DK, Corbel MJ. Investigation of cellular and humoral immune responses to whole cell and acellular pertussis vaccines. *Vaccine* 2000;19:637-43.
- [21] Gustafsson L, Hallander HO, Olin P, Reizenstein E, Storsaeter J. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell *pertussis* vaccine. *N Engl JMed* 1996;334:349–55
- [22] Kobisch M, Novotny P. Identification of a 68-kilodalton outer membrane protein as the major protective antigen of *Bordetella bronchiseptica* by using specific-pathogen-free piglets. *Infect. Immun.* 1990;58:352–7.
- [23] King AJ, Berbers G, van Oirschot HF, Hoogerhout P, Knipping K, Mooi FR. Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity. *Microbiol.* 2001;147:2885–95.

- [24] Miller E. Overview of recent clinical trials of acellular *pertussis* vaccines. *Biologicals* 1999;27:79–86.
- [25] Gotto JW, Eckhardt T, Reilly PA, Scott JV, Cowell JL, Metcalf TN, et al. Biochemical and immunological properties of two forms of pertactin, the 69,000-molecular-weight outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 1993;61:2211–5.
- [26] Hellwig SM, Rodriguez ME, Berbers GA, VanDeWinkel JG, Mooi FR. Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity. *J Infect Dis* 2003; 188:738–42.
- [27] Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* 1998;6:370–8.
- [28] Hellwig SM, Rodriguez ME, Berbers GA, VanDeWinkel JG, Mooi FR. Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity. *J Infect Dis* 2003; 188:738–42.
- [29] Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect. Immun.* 2001;69:1231–43.
- [30] Miller E. Overview of recent clinical trials of acellular *pertussis* vaccines. *Biologicals* 1999;27:79–86
- [31] Emsley P, Charles IG, Fairweather NF, Isaacs NW. Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature* 1996;381:90–2.
- [32] King AJ, Berbers G, van Oirschot HF, Hoogerhout P, Knipping K, Mooi FR. Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity. *Microbiol.* 2001;147:2885–95.
- [33] Leininger E, Ewanowich CA, Bhargava A, Pepler MS, Kenimer JG, Brennan MJ. Comparative roles of the Arg-Gly-Asp sequence present in the *Bordetella pertussis* adhesins pertactin and filamentous hemagglutinin. *Infect. Immun.* 1992;6:2380–5.
- [34] Leininger E, Roberts M, Kenimer JG, Charles IG, Fairweather N, Novotny P, et al. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:345–9

- [35] King AJ, Berbers G, van Oirschot HF, Hoogerhout P, Knipping K, Mooi FR. Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity. *Microbiol.* 2001;147:2885–95.
- [36] Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, Stehr K. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine* 1998;16:1901–6.
- [37] Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Levels of antipertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 1998;16:1907–16.
- [38] Khelef N, Danve B, Quentin-Millet MJ, Guiso N. *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*: two immunologically distinct species. *Infect Immun.* 1993;61:486–90
- [39] Hijnen M, Voer R, Mooi FR, Schepp R, Moret EE, van Gageldonk P, Smits G and Berbers GAM. The role of peptide loops of the *Bordetella pertussis* protein P.69 pertactin in antibody recognition. *Vaccine* 2007;25:5902-5914.
- [40] Frank, R. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports-principles and applications. *J Immunol Meth* 2002; 267, 13-26.
- [41] De-Simone, Napoleão-Pego P, Teixeira-Pinto LAL, Santos' JDL, De-Simone <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010113002183> - aff2 TS, Melgarejo AR, Aguiar AS, Marchi-Salvador DP. Linear B-cell epitopes in BthTX-1, BthTX-II and BthA-1, phospholipase A₂'s from **Bothrops jararacussu** snake venom, recognized by therapeutically neutralizing commercial horse antivenom. *Toxicon* 201;3 72: 90-101.
- [42] Zhang, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 2008: 9, 40.
- [43] Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* 2010; 5: 725-738.
- [44] Hijnen M, Mooi FR, van Gageldonk PG, Hoogerhout P, King AJ, Berbers GA. Epitope structure of the *Bordetella pertussis* protein P.69 pertactin, a major vaccine component and protective antigen. *Infect Immun* 2004;72:3716–23.
- [45] Trollfors B. Factors influencing antibody responses to acellular pertussis vaccines. *Dev Biol Stand.* 1997;89:279-82.

- [46] Sutherland JN, Chang C, Yoder SM, Rock MT, Maynard JA. Antibodies recognizing protective pertussis toxin epitopes are preferentially elicited by natural infection versus acellular immunization. *Clin Vaccine Immunol.* 2011; 18:954-62.
- [47] Hijnen M, He Q, Schepp R, Van Gageldonk P, Mertsola J, Mooi FR, Berbes GA. Antibody responses to defined regions of the *Bordetella pertussis* virulence factor pertactin, *Scand J. Infect Dis* 2008; 40:94-104.
- [48] Zhang X, Weyrich LS, Lavine JS, Karanikas AT, Harvill ET. Lack of cross-protection against *Bordetella holmesii* after pertussis vaccination. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18: 1771-9.
- [49] Khelef N, Danve B, Quentin-Millet MJ, Guiso N. *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*: two immunologically distinct species. *Infect Immun* 1993 ; 61:486–90.
- [50] Wolfe DN, Goebel EM, Bjornstad ON, Restif O, Harvill ET. The O antigen enables *Bordetella parapertussis* to avoid *Bordetella pertussis* -induced immunity. *Infect Immun* 2007; 75:4972–9

Legends to figures and tables (até 6)

Fig.1: Fine mapping of mouse sera immunized with DTP (A,C) and DTPa (B,D) with the library (E) of the pertactin *B. pertussis* protein synthetic 15-mer peptides. Binding of Ab to individual peptides was detected by incubating the membrane with alkaline goat anti-mouse immunoglobulin. The intensity of signal (A,B) was obtained by scanning of the membranes (C,D) probed with the antisera.

Fig. 2- *B. pertussis* P.133 Prn protein sequence showing the epitopes identified in this study by Spot-synthesis using mice sera immunized with cellular (grey) and acellular (clear boxed) vaccines. The position of the minor loop (224-233aa) and major loop (433-441aa) are designated. Red (1-34 aa), signal sequence of the P.133 Prn protein. Yellow, pink and green represents the epitopes sequence identified previously by others using rabbit sera [47], mice sera or mAb [44] and human sera [39,44], respectively.

Fig. 3- Spatial localization of the linear epitopes recognized by mice sera immunized with acellular (A) and cellular (B) *B. pertussis* vaccine in three dimensional structures of P.133 Prn toxin. The epitopes number (Prn-1-26) are highlighted in different colors to facilitate identification. The P.133 Prn structure was obtained from protein data bank (<http://www.pdb.org>) and drawn using PyMol. The C-terminal amino acid residues 600–887, containing region 2, are not part of the resolved structure (1DAB.pdb) and was obtained by molecular modeling. Arrows indicate the positions of the minor loop (224-233aa) and major loop (433-441aa).

Fig. 4- Cross-reactivity epitopes of the P.133 Prn protein within strains of *Bordetella pertussis* [(1) Q03035, (2) K4QEP0, (3) K4TPW9, (4) Q9L4E2, (5) Q6U896, (6) K4TCV0, (7) Q9AIX8, (8) K0MTC8, (9) J7RKB0, (10) A4UTL5, (11) F4LFL2, (12) P14283]. The boxed sequences represents the IgG epitopes identified in this work by Spot-synthesis and in the literature [39,44,47] using different methods. In grey is signaled the epitope (Prn-11) of the polymorphic region 1 (amino acid 291-371). The region 2 comprises the amino acids 600-887 with a cleavage site at the amino acid 566.

Fig 5- Cross reactivity of the P.133 Prn within *Bordetella sp.* (1) *B. pertussis* (access number, A4UTL5); (2) *B. parapertussis* (access number, P24328); (3) *B. bronchiseptica* (access number, Q9L4E2). The boxed sequences represents the 33 pertactin (Prn) IgG epitopes identified in this work and in the literature by mouse sera immunized or vaccinated with Pc or Pa vaccine.

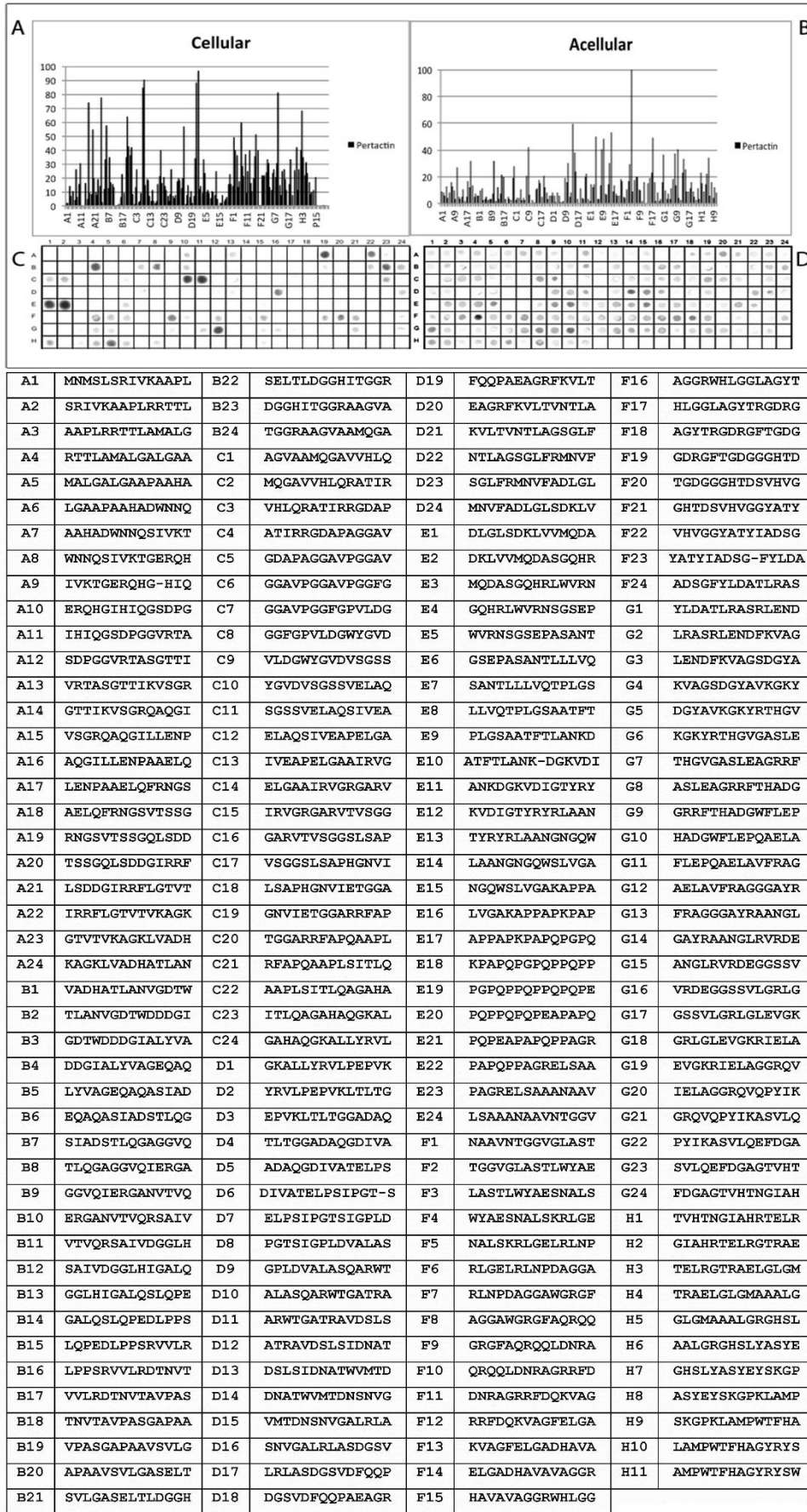


Fig. 1

1 MNMSLSRIVK AAPLRRTTLA MALGALGAAP AAHADWNNQS IVKTGERQHG IHIQGSDPGG

 61 VRTASGTTIK VSGRQAQGIL LENPAAELOF RNGSVTSSGQ LSDDGIRRFI GTVTVKAGKL
 SGTIKK GIL LEN GIRRFI I
 121 VADHATLANV GDTWDDGGIA LYVAGEQAQA SIADSTLQGA GGVQIERGAN VTVORSAIVD
 TWDDD
 181 GGLHIGALQS LQPEDLPPSR VVLRDTNVTA VPASGAPAAV SVLGASELTL DGGHITGGRA
 S LQPED GASEL
 241 AGVAAMQGA VHLQRATIRR GDAPAGGAVP GGAVPGGFGP VLDGWYGV DV SGSSVELAQS
 ATIRR GDALAGGAVP GGAVPGGFGP VLDGW
 301 IVEAPELGAA IRVGRGARVT VSGGSLSAPH GNVLETGGAR RFAPQAAPLS ITLQAGAHAQ
 RFAPQ S ITLQAGAH
 361 GKALLYRVLP EPVKLTLTGG ADAQGDIVAT ELPSIPGTSI GPLDVALASQ ARWTGATRAV
 KALLYR T ELPSIPG
 421 DSLSIDNATW VMTDNSNVGA LRLASDGSVD FQPAEAGRF KVLTVNTLAG SGLFRMNVFA
 LAG SGL
 481 DLGLSDKLVV MQDASGQHRL WVRNSGSEPA SANTLLLVQT PLGSAATFTL ANKDGKVDIG
 FTTL ANK
 541 TYRYRLAANG NGQWSLVGAK APPAPKPAPQ PGPQPPQPQ PQPEAPAPQP PAGRELSAAA
 PAPQ P P RELSA
 FQ PGPQP QPEAPAPQP rabbit
 601 NAAVNTGGVG LASTLWYAES NALSKRLGEL RLNPDAGGAW GRGFAQRQQL DNRAGRRFDQ
 S NALSKRL DNRAG
 661 KVAGFELGAD HAVAVAGGRW HLGGLAGYTR GDRGFTGDGG GHTDSVHVGG YATYIADSGF
 HLGGLAGY
 721 YLDATLRASR LENDFKVAGS DGYAVKGYR THGVGASLEA GRRFTHADGW FLEPQAEALAV
 781 FRAGGGAYRA ANGLRVRDEG GSSVLGRLGL EVGKRIELAG GRQVQPYIKA SVLQEFDGAG
 841 TVHTNGIAHR TELRGTRAEI GLGMAAALGR GHSLYASYEY SKGPKLAMPW TFHAGYRYSW

Fig. 2

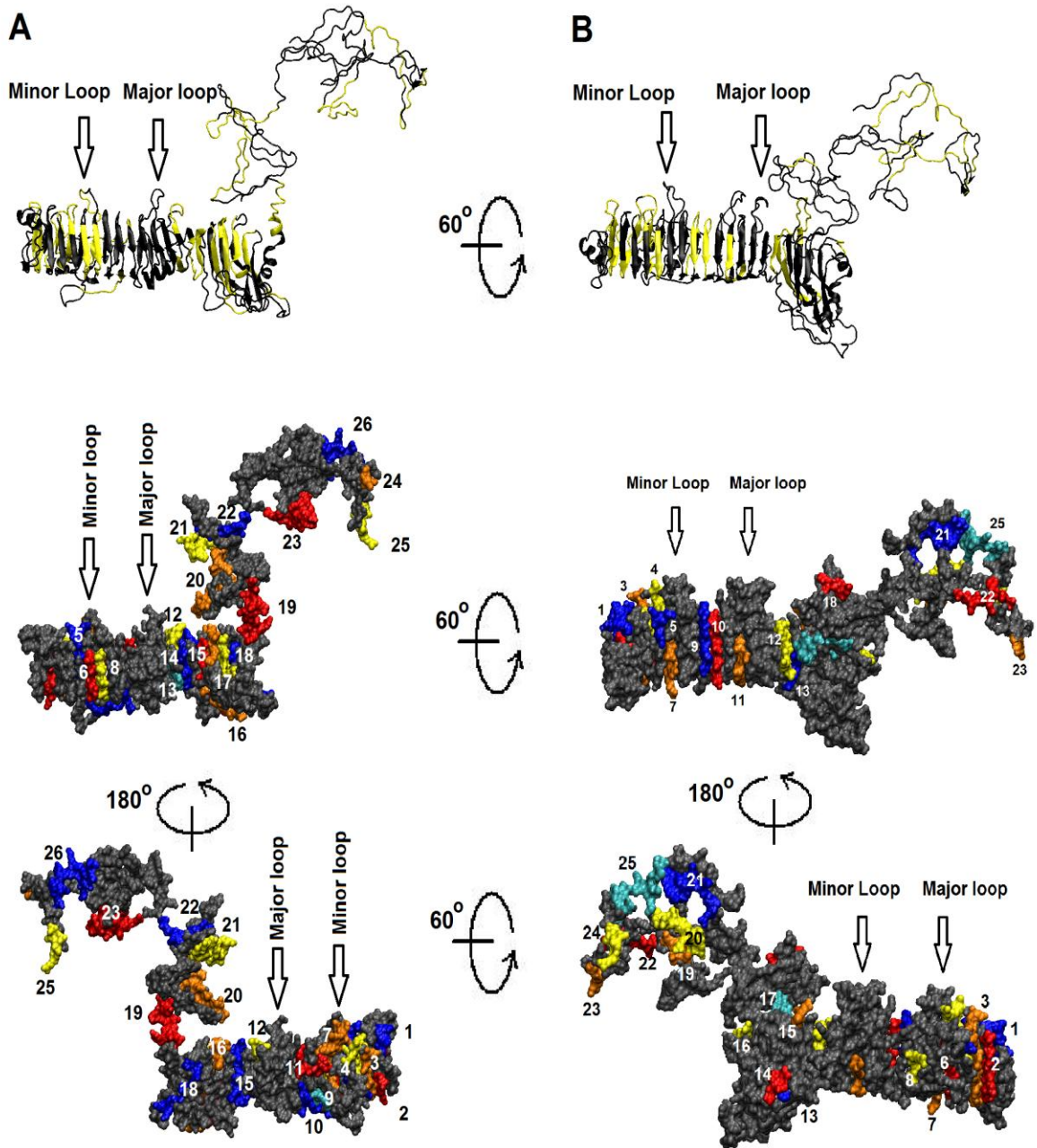


Fig. 3

		Prm-1		Prm-2		Prm-3		Prm-4	
1	MMSLSRIVKAAPLRRRTTLMALGA---	LGAA	PA	AH	AD	WN	NS	IV	KR
2	MMSLSRIVKAAPLRRRTTLMALGA---	LGAA	PA	AH	AD	WN	NS	IV	KR
3	MMSLSRIVKAAPLRRRTTLMALGA---	LGAA	PA	AH	AD	WN	NS	IV	KR
4	MMSLSRIVKAAPLRRRTTLMALGA---	LGAA	PA	AH	AD	WN	NS	IV	KR
5	MMSLSRIVKAAPLRRRTTLMALGA---	LGAA	PA	AH	AD	WN	NS	IV	KR
6	MMSLSRIVKAAPLRRRTTLMALGA---	LGAA	PA	AH	AD	WN	NS	IV	KR
7	MMSLSRIVKAAPLRRRTTLMALGA---	LGAA	PA	AH	AD	WN	NS	IV	KR
8	MMSLSRIVKAAPLRRRTTLMALGA---	LGAA	PA	AH	AD	WN	NS	IV	KR
9	MMSLSRIVKAAPLRRRTTLMALGA---	LGAA	PA	AH	AD	WN	NS	IV	KR
10	MMSLSRIVKAAPLRRRTTLMALGA---	LGAA	PA	AH	AD	WN	NS	IV	KR
11	MMSLSRIVKAAPLRRRTTLMALGA---	LGAA	PA	AH	AD	WN	NS	IV	KR
12	MMSLSRIVKAAPLRRRTTLMALGA---	LGAA	PA	AH	AD	WN	NS	IV	KR

		Prm-5		Prm-6		Prm-7		Prm-8	
1	GKLVADHATLVNGVTDWDD	I	A	L	V	G	E	Q	A
2	GKLVADHATLVNGVTDWDD	I	A	L	V	G	E	Q	A
3	GKLVADHATLVNGVTDWDD	I	A	L	V	G	E	Q	A
4	GKLVADHATLVNGVTDWDD	I	A	L	V	G	E	Q	A
5	GKLVADHATLVNGVTDWDD	I	A	L	V	G	E	Q	A
6	GKLVADHATLVNGVTDWDD	I	A	L	V	G	E	Q	A
7	GKLVADHATLVNGVTDWDD	I	A	L	V	G	E	Q	A
8	GKLVADHATLVNGVTDWDD	I	A	L	V	G	E	Q	A
9	GKLVADHATLVNGVTDWDD	I	A	L	V	G	E	Q	A
10	GKLVADHATLVNGVTDWDD	I	A	L	V	G	E	Q	A
11	GKLVADHATLVNGVTDWDD	I	A	L	V	G	E	Q	A
12	GKLVADHATLVNGVTDWDD	I	A	L	V	G	E	Q	A

		Prm-9		Prm-10		Prm-11		Prm-12	
1	GRAAGVAAMQAVVHLQRT	I	R	R	D	A	P	A	G
2	GRAAGVAAMQAVVHLQRT	I	R	R	D	A	P	A	G
3	GRAAGVAAMQAVVHLQRT	I	R	R	D	A	P	A	G
4	GRAAGVAAMQAVVHLQRT	I	R	R	D	A	P	A	G
5	GRAAGVAAMQAVVHLQRT	I	R	R	D	A	P	A	G
6	GRAAGVAAMQAVVHLQRT	I	R	R	D	A	P	A	G
7	GRAAGVAAMQAVVHLQRT	I	R	R	D	A	P	A	G
8	GRAAGVAAMQAVVHLQRT	I	R	R	D	A	P	A	G
9	GRAAGVAAMQAVVHLQRT	I	R	R	D	A	P	A	G
10	GRAAGVAAMQAVVHLQRT	I	R	R	D	A	P	A	G
11	GRAAGVAAMQAVVHLQRT	I	R	R	D	A	P	A	G
12	GRAAGVAAMQAVVHLQRT	I	R	R	D	A	P	A	G

		Prm-13		Prm-14		Prm-15		Prm-16	
1	GARRFADAPLSLTLQAGAHQ	C	A	L	L	V	P	E	P
2	GARRFADAPLSLTLQAGAHQ	C	A	L	L	V	P	E	P
3	GARRFADAPLSLTLQAGAHQ	C	A	L	L	V	P	E	P
4	GARRFADAPLSLTLQAGAHQ	C	A	L	L	V	P	E	P
5	GARRFADAPLSLTLQAGAHQ	C	A	L	L	V	P	E	P
6	GARRFADAPLSLTLQAGAHQ	C	A	L	L	V	P	E	P
7	GARRFADAPLSLTLQAGAHQ	C	A	L	L	V	P	E	P
8	GARRFADAPLSLTLQAGAHQ	C	A	L	L	V	P	E	P
9	GARRFADAPLSLTLQAGAHQ	C	A	L	L	V	P	E	P
10	GARRFADAPLSLTLQAGAHQ	C	A	L	L	V	P	E	P
11	GARRFADAPLSLTLQAGAHQ	C	A	L	L	V	P	E	P
12	GARRFADAPLSLTLQAGAHQ	C	A	L	L	V	P	E	P

		Prm-18		Prm-19		Prm-20		Prm-21	
1	AGRFKLVNVTLAGSGLFRMVFADLGI	S	K	L	V	M	Q	D	S
2	AGRFKLVNVTLAGSGLFRMVFADLGI	S	K	L	V	M	Q	D	S
3	AGRFKLVNVTLAGSGLFRMVFADLGI	S	K	L	V	M	Q	D	S
4	AGRFKLVNVTLAGSGLFRMVFADLGI	S	K	L	V	M	Q	D	S
5	AGRFKLVNVTLAGSGLFRMVFADLGI	S	K	L	V	M	Q	D	S
6	AGRFKLVNVTLAGSGLFRMVFADLGI	S	K	L	V	M	Q	D	S
7	AGRFKLVNVTLAGSGLFRMVFADLGI	S	K	L	V	M	Q	D	S
8	AGRFKLVNVTLAGSGLFRMVFADLGI	S	K	L	V	M	Q	D	S
9	AGRFKLVNVTLAGSGLFRMVFADLGI	S	K	L	V	M	Q	D	S
10	AGRFKLVNVTLAGSGLFRMVFADLGI	S	K	L	V	M	Q	D	S
11	AGRFKLVNVTLAGSGLFRMVFADLGI	S	K	L	V	M	Q	D	S
12	AGRFKLVNVTLAGSGLFRMVFADLGI	S	K	L	V	M	Q	D	S

		Prm-23		Prm-24		Prm-25		Prm-26	
1	-----GP	-	Q	P	P	P	P	P	P
2	-----GP	-	Q	P	P	P	P	P	P
3	-----GP	-	Q	P	P	P	P	P	P
4	-----GP	-	Q	P	P	P	P	P	P
5	-----GP	-	Q	P	P	P	P	P	P
6	-----GP	-	Q	P	P	P	P	P	P
7	-----GP	-	Q	P	P	P	P	P	P
8	-----GP	-	Q	P	P	P	P	P	P
9	-----GP	-	Q	P	P	P	P	P	P
10	-----GP	-	Q	P	P	P	P	P	P
11	-----GP	-	Q	P	P	P	P	P	P
12	-----GP	-	Q	P	P	P	P	P	P

		Prm-28		Prm-29		Prm-30			
1	DLGACYTRGDFGTDDGGGHTDSVHVG	G	Y	A	T	I	A	S	G
2	DLGACYTRGDFGTDDGGGHTDSVHVG	G	Y	A	T	I	A	S	G
3	DLGACYTRGDFGTDDGGGHTDSVHVG	G	Y	A	T	I	A	S	G
4	DLGACYTRGDFGTDDGGGHTDSVHVG	G	Y	A	T	I	A	S	G
5	DLGACYTRGDFGTDDGGGHTDSVHVG	G	Y	A	T	I	A	S	G
6	DLGACYTRGDFGTDDGGGHTDSVHVG	G	Y	A	T	I	A	S	G
7	DLGACYTRGDFGTDDGGGHTDSVHVG	G	Y	A	T	I	A	S	G
8	DLGACYTRGDFGTDDGGGHTDSVHVG	G	Y	A	T	I	A	S	G
9	DLGACYTRGDFGTDDGGGHTDSVHVG	G	Y	A	T	I	A	S	G
10	DLGACYTRGDFGTDDGGGHTDSVHVG	G	Y	A	T	I	A	S	G
11	DLGACYTRGDFGTDDGGGHTDSVHVG	G	Y	A	T	I	A	S	G
12	DLGACYTRGDFGTDDGGGHTDSVHVG	G	Y	A	T	I	A	S	G

		Prm-31		Prm-32		Prm-33			
1	SVLGRGLGVKRIELAGGRV	P	P	I	K	S	V	L	Q
2	SVLGRGLGVKRIELAGGRV	P	P	I	K	S	V	L	Q
3	SVLGRGLGVKRIELAGGRV	P	P	I	K	S	V	L	Q
4	SVLGRGLGVKRIELAGGRV	P	P	I	K	S	V	L	Q
5	SVLGRGLGVKRIELAGGRV	P	P	I	K	S	V	L	Q
6	SVLGRGLGVKRIELAGGRV	P	P	I	K	S	V	L	Q
7	SVLGRGLGVKRIELAGGRV	P	P	I	K	S	V	L	Q
8	SVLGRGLGVKRIELAGGRV	P	P	I	K	S	V	L	Q
9	SVLGRGLGVKRIELAGGRV	P	P	I	K	S	V	L	Q
10	SVLGRGLGVKRIELAGGRV	P	P	I	K	S	V	L	Q
11	SVLGRGLGVKRIELAGGRV	P	P	I	K	S	V	L	Q
12	SVLGRGLGVKRIELAGGRV	P	P	I	K	S	V	L	Q

Fig 4

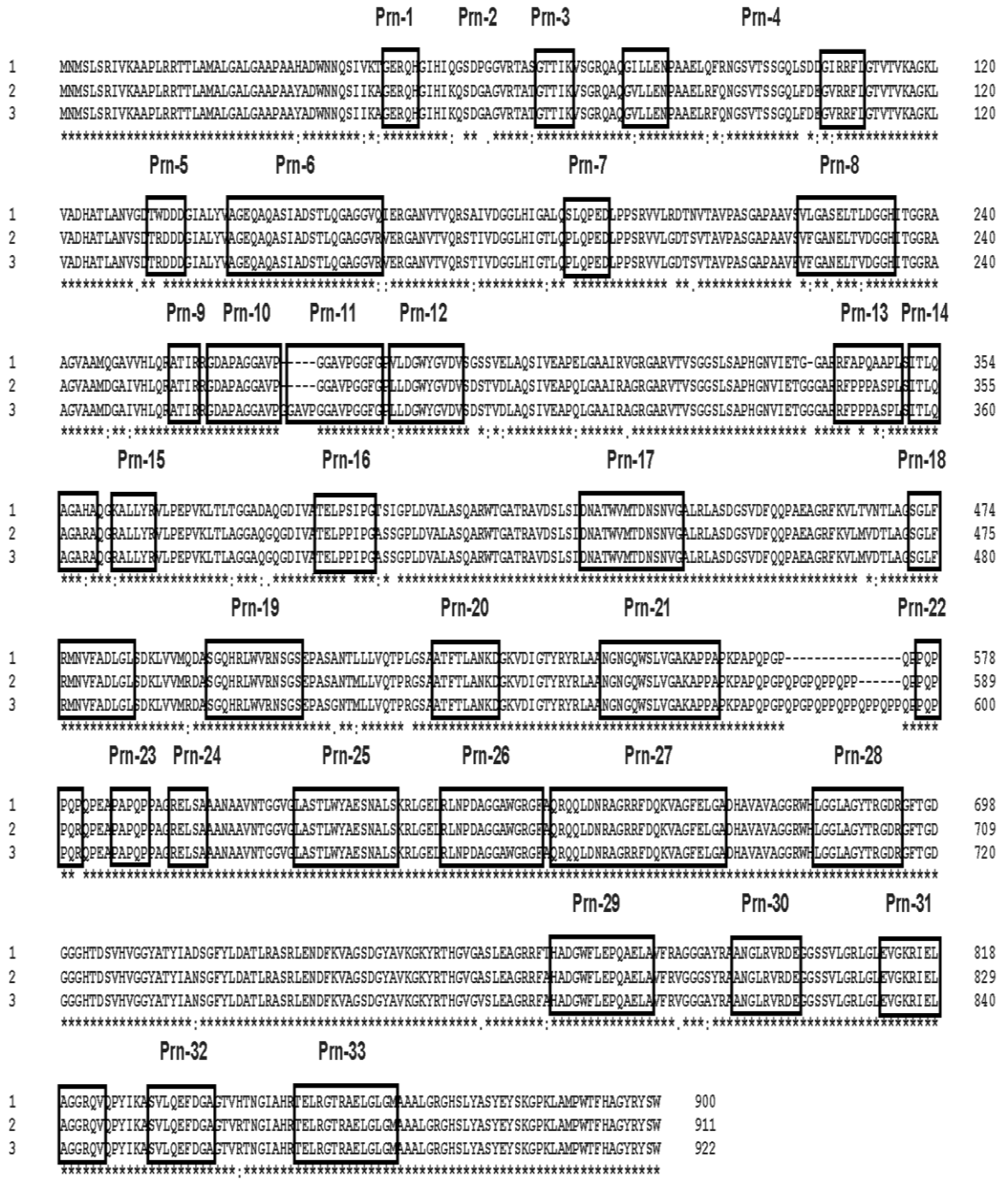


Fig 5

5) DISCUSSÃO:

Em todas as regiões do Brasil, ocorreu aumento nos índices de notificações de coqueluche, porém em alguns estados o aumento de casos não foi tão perceptível, provavelmente pelo desconhecimento da ressurgência da coqueluche no Brasil.

No artigo “An overview of reemerging Pertussis and evidence of resurgence in Brazil” elaborado como resultado da pesquisa, concluiu-se que um dos principais fatores que contribuíram para subnotificação da doença foi a não percepção médica para a possibilidade do ressurgimento da doença em no estado do Rio de Janeiro. O estudo apontou que uma das dificuldades para a elaboração precisa do diagnóstico, relatadas pela maioria dos profissionais integrantes das equipes médicas, estão situadas na ausência da realização dos exames laboratoriais e pela falta de formação clínica para o diagnóstico inicial da doença. Estes resultados se confirmaram na dificuldade encontrada pela maioria dos profissionais envolvidos, conforme resultado do artigo: “A re-emergência da coqueluche. Da rotina dos atendimentos ao imperativo da Biossegurança”.

Quando se analisou a adoção de procedimento de Biossegurança do pronto atendimento até o isolamento para casos suspeitos ou confirmados da coqueluche, o maior índice encontrado na maioria das unidades estudadas foi de 45%. Destaca-se que nas unidades o índice para o critério de isolamento de paciente suspeito e/ou internado com coqueluche foi inferior a 50%; apenas a unidade cível federal apresentou 100% para esse critério. Observou se que a falta da percepção para o ressurgimento da coqueluche somada à dificuldade do fechamento do diagnóstico acarretou procedimento errôneo no isolamento dos pacientes com suspeita da doença, valorizou-se também na percepção a adoção incorreta das medidas de Biossegurança pelos profissionais envolvidos no atendimento dos pacientes.

Foi evidenciado nesse artigo que as unidades de saúde que participaram da pesquisa não possuíam programa de capacitação continuada para os seus profissionais, seja para a área da Biossegurança, seja para o fenômeno da ressurgência de doenças, seja para a questão das doenças negligenciadas, contribuindo assim para a falta de formação adequada no diagnóstico correto da coqueluche e de outras doenças. Também declararam a não aplicação dos procedimentos de Biossegurança.

Sublinha-se que os resultados citados são advindos do processo de formação médica, pois na percepção evidenciada pelas equipes médicas. Do universo pesquisado; 65% declararam que o atual programa de residência médica não aborda a clínica para as doenças re-emergentes ou negligenciadas. Este fato pode ter contribuído para a não percepção da ressurgência da

coqueluche nos últimos anos durante o atendimento clínico em nosso Estado pela maioria dos profissionais envolvidos.

A necessidade de um programa amplo de capacitação continuada ou mesmo de programas de sensibilização e atualização para as enfermidades negligenciadas e re-emergentes, incluindo abordagens no contexto da Biossegurança foram temáticas da pesquisa e resultaram na elaboração do artigo: “Fórum itinerante de ciência e saúde. Programa de capacitação para as doenças negligenciadas e re-emergentes”. Este relato elaborou indicadores para as questões mencionadas. Tais indicadores foram verificados após nove edições dos fóruns de debates e de seis edições dos cursos de atualizações. Verificou-se a real necessidade de implementação de programas de capacitação nas diversas questões inseridas nos temas doenças negligenciadas, ressurgência de doenças e biossegurança. Nos municípios participantes dos eventos, ocorreram avaliações nas unidades de saúde. Verificou-se que outros municípios e instituições manifestaram interesse em participar de programas capacitação voltados para os profissionais da área da saúde.

Destaca-se que os profissionais de saúde, líderes comunitários e representantes das associações de moradores dos municípios que participaram desses eventos devem ter acesso sistemático aos espaços para estimular a reflexão, visando à construção da perspectiva crítica das experiências cotidianas. Índícios de tal construção manifestaram-se nas preocupações e sugestões da maioria dos participantes que colocaram nos debates sugestões indicadoras de propostas criativas, enfatizando contribuições, enquanto sujeitos construtores da qualidade profissional, do compromisso social e ético. Sublinha-se que tais eventos se caracterizam como multiplicadores de informações e de conhecimentos, favorecendo o estímulo de uma prática voltada para a ampliação da qualidade da saúde pública da localidade.

O processo de interlocução com os profissionais médicos das unidades de saúde avaliadas demonstrou que a maior dificuldade para o fechamento do diagnóstico da coqueluche é acessibilidade aos exames que possuem maior eficácia para a identificação da doença na fase inicial. Destaca-se que a coqueluche durante décadas foi banalizada como doença infantil, fato que também influi no diagnóstico inadequado nos pacientes que não pertencem à faixa etária da infância. Hoje os maiores transmissores da doença são os adolescentes e adultos que podem apresentar assintomaticamente a Pertussis e transmitir para pessoas susceptíveis, em sua maioria crianças abaixo de um ano de idade (BISGAROD et. al. 2004; WHO, 2013).

A melhor maneira de prevenir a doença entre os profissionais de saúde é a vacinação, porém hoje o Programa Nacional de Imunização (PNI) somente disponibiliza vacina do tipo celular para coqueluche, que são administradas na fase inicial da infância, para a imunização dos

profissionais de saúde em suas unidades são necessárias aplicações de vacinas acelulares, porém estas não estão disponíveis no PNI para os profissionais de saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Buscando uma proposta de inovação tecnológica, foi realizada nesse estudo a identificação dos principais epítomos lineares B da pertactina, um dos fatores imunogênico da *Bordetella pertussis* e também componente da vacina acelular, resultando assim no artigo : “Identification of linear B epitopes of pertactin of *Bordetella pertussis* induced by immunization with whole and acellular vaccine”.

Os resultados encontrados foram a obtenção de um total de vinte e dois epítomos identificados por soro de camundongo imunizados pela vacina celular e doze identificados por soro de camundongo imunizado por vacina acelular. A maioria dos epítomos encontrados se sobrepõe, porém sete foram identificados apenas pela vacina acelular e oito identificados pela vacina celular. Parte dos epítomos encontrados sobrepõe aos citados na literatura, porém o nosso trabalho identificou toda a proteína da pertactina, não limitado às regiões 1 e 2 da proteína.

Os resultados poderão contribuir no futuro para o aperfeiçoamento de uma vacina menos reatogênica e de baixo custo de produção, sendo assim ofertado ao PNI. As identificações dos epítomos também poderão contribuir para o desenvolvimento de novas metodologias de diagnósticos mais eficientes, tão aclamadas pelos profissionais de saúde que participaram da pesquisa.

6) CONCLUSÃO:

Conclui-se que:

1. O Brasil carece de estudos sobre a re-emergência da *pertussis*, que considerem todos os aspectos relacionados à realidade nacional e que possam interferir nas análises sobre o comportamento epidemiológico da doença, incluindo a possibilidade de que a doença esteja de fato re-emergindo no Brasil, agravada pelo fato de atualmente não poder ser mais considerada uma doença exclusiva do campo da pediatria.
2. Este estudo demonstra que a coqueluche no Rio de Janeiro é sub-notificada, principalmente devido à falta de formação por parte dos profissionais de saúde para o reconhecimento dos sinais clínicos da doença, não resultando no diagnóstico correto, muitas vezes, por falta de infraestrutura para a realização de exames laboratoriais confirmatórios.
3. O aprimoramento profissional nas unidades de saúde através de investimento em programa de capacitação continuada nas temáticas Biossegurança e doenças respiratórias como coqueluche e tuberculose, é fundamental para reverter a situação encontrada nessa pesquisa, bem como o maior investimento em infraestrutura nas unidades de saúde, principalmente nas unidades municipais.
4. É de real importância, que os profissionais de saúde, líderes comunitários e representantes das associações de moradores participem de eventos de capacitação como ocorreu nos fóruns e simpósios, a fim de discutir e formular propostas coletivas baseadas em informações qualificadas sobre os temas apresentados visando à difusão dessas informações no sentido de promover ações preventivas no âmbito das doenças negligenciadas e re-emergentes em suas localidades, reduzindo assim o impacto do avanço dessas enfermidades.
5. Neste estudo, foram identificados todos os epítomos B lineares dos imunógenos da pertactina. Uma maior intensidade de sinais foi detectada usando-se a vacina DTP do que DTPa. Resultados desse trabalho poderão contribuir para entendermos o processo de imunização e o aperfeiçoamento de vacinas para que sejam mais eficientes e menos reatogênicas.

7) REFERÊNCIAS

1. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Pertussis. In: Pickering L, Baker CJ, Kimberlin D, Long SS, eds *Red Book: 2009 Report of the Committee on Infectious Diseases*. 28th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics, 504–19. 2009
2. BAMBERGER E.S.; SRUGO I. What is new in pertussis? *Eur. J. Pediatr.* 167: 133-139. 2008.
3. BISGARD, K.M. et al. Infant pertussis: who was the source? *Pediatr Infect Dis J.* 23:985-89. 2004
4. BORDET, J ; GENGOU, O. Observação complémentaire sur le microbio de la coqueluche . *Annales de l'Institut Pasteur.* 21 : 720 - 6 . 1907
5. CAMPING-MARTI, M; CHENG, H.K; FORSYTH, K; GUIISO, N; HALPERIN. Recommendations are needed for adolescent and adult Pertussis imunisation:Rationale and strategies for consideration. *Vaccine*, 2001: 641-646
6. CDC. Morbidity and Mortality Weekly Report . Pertussis United States, 1997—2000. February 1, 2002 / 51(04);73-6 Atlanta, USA. [Acesso:10/01/2012] [.http://www.cdc.gov/mmwr/index2002.htm](http://www.cdc.gov/mmwr/index2002.htm)
7. CDC. Guidelins for control of pertussis outbreaks.Atlanta: Center for Disease Control and Prevention.[Acesso:05/06/2013] <http://www.cdc.gov/vaccines/vpd-vac/pertussis/default.htm>
8. CDC. Preventing tetanus, diphtheria, and pertussis among adolescents: use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP).55(No. RR-3):1–43. 2006
9. CDC. Updated Recommendations for Use of Tetanus Toxoid, Reduced Diphtheria Toxoid and Acellular Pertussis (Tdap) Vaccine from the Advisory Committee on Immunization Practices. 60(No.1):13-15. 2011
10. CDC. Updated recommendations for use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccine (Tdap) in pregnant women and persons who have or anticipate having close contact with an infant ages <12 months – Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2011.

11. CHERRY, J.D. Why Do Pertussis Vaccines Fail? *Pediatrics*. 129 (5): 968-970. 2012
12. CROWCROFT, N.S., BRITO, J. Whooping cough a continuing problem. *BMJ* . 324: 1537-1538. 2002
13. DAS, P. Whooping cough makes global comeback. *Lancet Infectious Diseases* . 2:322. 2. 2002
14. EDWARDS, K.M.; DECKER, M. D.; MORTIMER, E. A. Pertussis vaccine. In: *Vaccines* (S.A. Plotkin & W.A. Orenstien, ed.), pp. 239-337, Philadelphia: W.B. Saunders. 1999
15. FARIZO, K.M.; COCCHI, S.I.; ZELI, E.R.; BRINK, E.W.; WASSILAK, S.G.; PATRIARCA, P.A. Epidemiological features of Pertussis in the United States, 1980-1989. *Clinical Infectious Diseases*. 14: 708-719. 1999
16. GREENBERG, D.P. Pertussis in adolescents: increasing incidence brings attention to the need for booster immunization of adolescents. *Pediatr Infect Dis J*. 24:721-8. 2005
17. HALASA, N.B.; EDWARDS, K. M. Is pertussis disease increasing? *Int J Epidemiol*. 33:365-6. 2004
18. HANS, H.; ABDLOREZA, A.; MARION, R.; CARL, H. W.; NICOLE, G.; FRITS, R. *Bordetella pertussis* strains circulating in Europe in 1999 to 2004 as determined by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*. P. 3257-3262. 2007
19. HEWLETT, E.L. *Bordetella* species. In: *Principles and practice of infectious diseases*. MANDELL G.L.; DOUGLAS, R.G. JR. BENNETT JE (eds): Churchill Livingstone, New York. pp 2078-2084. 1995
20. IVANOFF, B.; ROBERTSON, S. E. Pertussis vaccine Trial. Pertussis: A worldwide problem. *Developments in Biological Standardization*, 89:3-13. 1997.
21. KERR, J.R.; MATTHEWS, R.C. *Bordetella pertussis* infection: Pathogenesis, Diagnosis, Management, and the Role of Protective Immunity. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis*. 19: 77-88. 2000
22. KENDRICK, P.L. Um estudo de campo de alum-precipitado vacina pertussis combinada e toxóide diftérico para a imunização activa. *Am J Hyg* . 38 . :193-202. 1943

23. LIPHAUS et. al . Coqueluche epidemiologia e controle. Boletim epidemiológico paulista.v.5;nº53.2008.[acesso20/07/2013]http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa53_coqueluche.htm.
24. LUZ, P.M.; CODEÇO, C.T.; WERNECK, G.L. A reemergência da coqueluche em países desenvolvidos: um problema também para o Brasil? *Cad Saúde Pública*. 19:1209-13. 2003
25. MADSEN, T. Vaccination against whooping cough. *JAMA*. 101:187-8. 1933
26. MANCLARK, C.R.; COWEEL, J. R. Pertussis. *Bacterial Vaccine*. 3:69-106. 1995
27. MARGARET, M.; CORTESE, M.D.; ANDREW, L.; KRISTION, B.; SRIVASTAVA, P. A. “New Age “ in Pertussis Prevention. New opportunities Throug Adult Vaccination. *Am J. Prev. Med.* 32 (3). 2007
28. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil. [Acesso: 13/06/2013] http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21901
29. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde (Funasa) - Guia de Vigilância Epidemiológica. 5ª ed., Brasília.181-199. 2006
30. MOOI, F.R.; VAN LOO, I.H.; KING ,A.J. Adaptation of Bordetella pertussis to vaccination: A cause for its reemergence? *Emerging Infectious Diseases*.7: 526-528. 2001
31. OLSON, L. Pertussis.*Medicine*,(54): 727-460. 1995
32. PIROFSKI, L. et. al. Use of licensed vaccines for active immunization of the immunocompromised host. *Clinical Microbiology Reviews*.11:1-26. 1998
33. SAUER, L;W. Whooping cough: resume of seven years’ study. *J Pediatr*. 1933;2:740–9. DOI: 10.1016/S0022-3476(33)80047-3
34. SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVO DE NOTIFICAÇÕES DO MINISTÉRIO DA SAÚDE.[Acesso 01/07/2013].<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/coqueluche/bases/coquebrnet.def>
35. TAN, T.; TRINDADE, E.; SKOWRONSKI D. Epidemiology of pertussis. *Pediatr Infect Dis J*. 24: S10-S18. 2005

36. TREVIZAN, S.; COUTINHO, S.E.D. Perfil epidemiológico da coqueluche no Rio Grande do Sul, Brasil: estudo da correlação entre incidência e cobertura vacinal. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 24(1); 93-102. 2008
37. WATANABE, M.; CONNELLY, B.; WEISS, A. Characterization of Serological Resposonse to Pertussis. *Clinical and Vaccine Immunology*, Mar. pp. 341-348. 2006
38. WENDELBOE, A.M.; NJAMKEPO, E.; BOURILLON, A. et al. Transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *Pediatr Infect Dis J*. 26:293-99. 2007
39. WHO-recommended surveillance standard of pertussis. [Acesso 05/02/2013]. http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/pertussis_surveillance/en/index.html

APÊNDICE

Questionário aplicado à equipe da unidade de saúde

Aprovado pela CEP - 053/2010

Setor:

Especialidade Médica:

Nome do Médico (opcional):

Tempo de clínica:

Prezado Doutor (a);

Estamos realizando uma pesquisa sobre doença re-emergente: Aspecto epidemiológico da coqueluche no Estado do Rio de Janeiro.

Um dos objetivos da pesquisa é verificar a dificuldade encontrada pelos profissionais de saúde no diagnóstico dessa doença, principalmente devido a sua re-emergência em várias regiões do Brasil.

Também verificar os procedimentos adotados de Biossegurança entre pacientes e profissionais de saúde.

Sua colaboração é fundamental.

Questionário

1) Quantos pacientes em média apresentaram os quadros clínicos nos dois últimos anos (tosse com duração de 14 dias ou mais, associado pelo menos um dos sintomas: tosse rápida e incontrolável, paroxismos, guinchos ou vômitos pós-tosse.).

a) 1 a 10 b) 10 a 20 c) 20 a 30 d) acima de 30 e) nenhum caso

2) Com que frequência foram atendidos lactentes de até 3 meses com crise de apnéia ou cianose nos dois últimos anos.

a) 1 a 5 b) 5 a 10 c) 10 a 15 d) 15 a 20 e) acima 20 casos d) nenhum caso

f) Não se aplica a essa unidade de saúde.

3) Qual é a estimativa de pacientes atendido na sua rotina com o quadro clínico suspeito de coqueluche no período de dois anos.

a) 1 a 5 b) 5 a 10 c) 10 a 15 d) 15 a 20 e) acima 20 casos d) nenhum caso

4) Quais são as dificuldades encontradas para a confirmação do diagnóstico de paciente suspeito com coqueluche.

a) Quadro clínico do paciente b) A faixa etária do paciente c) Não realização diagnóstico laboratorial na unidade (cultura da nasofaringe para *Bordetella pertussis* , testes sorológico ou PCR)

d) Outros fatores (mencione).....

e) Não há dificuldade .

5) Quais são as principais complicações encontradas na sua rotina em pacientes com suspeita de coqueluche:

a) pneumonia ou brocopneumonia b) cefalopatia (convulsões) c) desidratação, d) otite e)

Outras:..... f) Não se aplica

6) Rotineiramente, os pacientes suspeitos de coqueluche são isolados dos demais pacientes durante o tratamento na unidade de saúde ?

a) sempre b) frequentemente c) algumas vezes d) raramente e) retornam para a residência dependendo da fase da doença.

7) Como ocorre o isolamento de paciente com infecção respiratório em sua unidade de saúde?

- a) quarto de isolamento com filtragem de ar
- b) quarto de isolamento sem filtragem de ar.
- c) isolamento ocorre por divisórias entre as camas na enfermaria.
- d) Não realiza o isolamento por falta de infraestrutura da unidade de saúde.

8) Quando ocorreu o último diagnóstico de paciente com coqueluche em sua rotina clínica?

9) Os profissionais de saúde de sua unidade, que tem contato com paciente suspeito ou internado com coqueluche, adotam rotineiramente todos os procedimentos padrões e de Biossegurança durante o período de tratamento ou internação do doente.

- a) sempre
- b) frequentemente
- c) algumas vezes
- d) raramente
- e) não adotam

10) Na sua percepção, os profissionais de saúde de sua unidade são treinados, sendo assim conhecedores dos procedimentos padrões e dos cuidados de Biossegurança na manipulação de pacientes suspeito ou confirmado com doenças respiratórias (coqueluche, tuberculose) desde do pronto atendimento até o isolamento.

- a) sim, todos.
- b) sim, a maioria
- c) parte dos profissionais
- d) uma minoria
- e) Não são treinados

11) Existe programa de treinamento continuado em sua unidade de saúde ?

- A) sim
- b) não
- c) algumas vezes.

12) Na sua percepção, o atual programa de residência médica, atende a formação para clinica de doenças re-emergentes e negligências.

13). Na sua opinião, atualmente, quais são as maiores dificuldades encontradas para o fechamento do diagnóstico de paciente com suspeita de coqueluche?

ANEXO - PRÊMIAÇÃO



