

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *BORDETELLA* E PROVAS  
SOROLÓGICAS, A PARTIR DE CRIANÇAS COM SINTOMAS DE  
COQUELUCHE, ATENDIDAS NO HOSPITAL DE ISOLAMENTO  
EMÍLIO RIBAS DE SÃO PAULO \*

Sebastião Timo IARIA \*\*

RSPU-B/194

IARIA, S. T. — *Isolamento de bactérias do gênero Bordetella e provas sorológicas, a partir de crianças com sintomas de coqueluche, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 7:409-32, 1973.*

RESUMO: *A partir de 255 crianças com sintomas de coqueluche atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo, procedeu-se a pesquisa de bactérias do gênero Bordetella. Em 46 delas, determinou-se, também, a elevação dos níveis de anticorpos circulantes aglutinantes e fixadores de complemento contra a B. pertussis, aglutinantes contra a B. parapertussis e fixadores de complemento contra adenovirus. Por outro lado, relacionaram-se os resultados do exame bacteriológico com o período da doença, em semanas, e com alguns sintomas principais apresentados. Foram também relacionados os resultados das provas bacteriológica e sorológica com a confirmação clínica do diagnóstico. Foram discutidos, por outro lado, o valor e as limitações das provas bacteriológica e sorológica no diagnóstico laboratorial da coqueluche.*

UNITERMOS: *Coqueluche\**; *Laboratório (Diagnóstico)\**; *Bordetella (Isolamento)\**; *Sorologia (Fixação de complemento e aglutinação).*

1. INTRODUÇÃO

No Município de São Paulo, segundo dados fornecidos, a pedido, pelo Serviço de Epidemiologia e Estatística do Departamento Regional de Saúde da Grande São Paulo, da Coordenadoria de Saúde da Comunidade da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, no período de 1964 a 1970, foram registrados 3 564 casos

de coqueluche com 308 óbitos, dos quais cerca de 90% e 95%, respectivamente, ocorreram em crianças com idades abaixo de 5 anos e, principalmente, inferiores a 2 anos.

Isto vem mostrar que apesar das várias armas disponíveis para o seu combate, entre elas, principalmente, as va-

\* Resumo de Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Saúde Pública da USP, em 1971.

\*\* Do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. — Av. Dr. Arnaldo, 715 — São Paulo, SP. — Brasil.

cinas e antibióticos, a coqueluche representa ainda um problema médico e de Saúde Pública, especialmente em crianças com idades inferiores a 5 anos.

O problema da coqueluche, no passado, apresentou gravidade bem maior em todo o mundo, polarizando a atenção de inúmeros pesquisadores.

Há cerca de um século iniciaram-se os estudos relativamente ao seu agente etiológico, quando CARLBURGER em 1883, CZAPLEWSKI & HENKEL em 1887, HENRY KOPLIK em 1898 e KRAUZE & LOCHMANN em 1901 (citados por NELSON<sup>48</sup>, 1970) verificaram a presença de numerosos bacilos na secreção de nasofaringe de crianças com coqueluche.

Porém, a *Bordetella pertussis* foi isolada pela primeira vez por BORDET & GENCOU<sup>3</sup> (1906) e posteriormente por CHIEVITZ & MEYER<sup>15</sup> (1916).

Anos mais tarde, BROWN<sup>11</sup> (1926) isolou de uma criança, com sintomas de coqueluche, uma estirpe de *Bordetella bronchiseptica* e observação semelhante foi feita por CHANG<sup>13</sup> (1950).

Em 1938, ELDERING & KENDRICK<sup>23</sup> responsabilizaram também a *Bordetella parapertussis* como causa de doença com características semelhantes às da coqueluche.

Assim sendo, as bactérias do gênero *Bordetella* (BREED et al.<sup>10</sup> 1957), ou sejam, *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*, podem provocar em pessoas infectadas, sintomas muito semelhantes. Por outro lado, parece que o mesmo pode ocorrer em casos de infecção por *H. influenzae* e *Diplococcus pneumoniae* (LAUTROP<sup>40</sup>, 1960).

As dúvidas existentes, desde há muitos anos, relativamente a etiologia em casos com sintomatologia de coqueluche, in-

cluindo uma possível participação viral, provocaram a realização de inúmeras pesquisas. Assim, através da inoculação de *B. pertussis*, SAUER & HAMBRECHT<sup>57</sup> (1929) e RICH et al.<sup>54</sup> (1932), reproduziram o quadro de coqueluche em macacos enquanto que MAC DONALD & MAC DONALD<sup>43</sup> (1933) o fizeram através da infecção experimental em crianças. Por outro lado, Mc CORDOCK<sup>42</sup> (1932) relatou o encontro de inclusões intranucleares nas células pulmonares de crianças com sintomas de coqueluche, sugerindo uma possível participação viral nesta doença. FRAWLEY<sup>29</sup> (1940), no entanto, não logrou a reprodução da sintomatologia típica de coqueluche pela instilação de filtrados de lavados nasais, de doentes com esta doença, em crianças.

Mais recentemente, novas pesquisas foram realizadas com o objetivo de verificar a participação de vírus em quadros clínicos de coqueluche. Destas, serão referidas apenas as de OLSON et al.<sup>49</sup> (1964) que isolaram adenovírus do tipo 12 e de CONNOR<sup>17</sup> (1970) e PEREIRA & CANDEIAS<sup>50</sup> (1971) que isolaram adenovírus dos tipos 1, 2, 3 e 5, a partir de crianças apresentando sintomatologia de coqueluche.

No diagnóstico bacteriológico de coqueluche, deve-se proceder ao isolamento de *B. pertussis*, a partir de material colhido da nasofaringe ou através da placa de tosse, mas deve ser pesquisada, também a presença de *B. parapertussis* e de *B. bronchiseptica* (BROWN<sup>11</sup>, 1926; ELDERING & KENDRICK<sup>23</sup>, 1938; LAUTROP<sup>40</sup>, 1960 e KENDRICK et al.<sup>33</sup>, 1963). Por outro lado, deve-se levar em conta que o isolamento de *B. pertussis* atinge percentuais mais elevados, nas primeiras semanas de doença, principalmente na primeira ou período catarral (BORDET & GENCOU<sup>3</sup>, 1906; CHIEVITZ & MEYER<sup>15</sup>, 1916; KRISTENSEN<sup>38</sup>, 1933; STRAKER & WASTE-

---

IARIA, S. T. — Isolamento de bactérias do gênero *Bordetella* e provas sorológicas, a partir de crianças com sintomas de coqueluche, atendidas no Hospital de Isolamento Emilio Ribas de São Paulo. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 7:409-32, 1973.

---

WATER<sup>59</sup>, 1937; SAITO et al.<sup>56</sup>, 1942 e MILLER JR. et al.<sup>47</sup>, 1943).

A utilização de provas sorológicas de aglutinação e de fixação de complemento (DONALD<sup>22</sup>, 1938, EVANS & MAINTLAND<sup>26</sup>, 1939 e KENDRICK et al.<sup>33</sup>, 1963) podem ser de grande valor, especialmente nos casos de coqueluche atípica ou quando a doença se apresenta em fases mais avançadas. Pode ser empregada também a pesquisa de opsoninas (KENDRICK et al.<sup>37</sup>, 1950, KENDRICK et al.<sup>33</sup>, 1963), porém é menos usada.

A imunidade conferida pela coqueluche é geralmente sólida e persiste por muitos anos, ao contrário do que ocorre com a imunização pela vacina (BARROS F.<sup>o</sup> 1, 1968). Quer pela doença, quer pela vacinação, desenvolvem-se no organismo aglutininas, anticorpos fixadores de complemento e opsoninas (KENDRICK et al.<sup>33</sup>, 1963).

Entre nós, não raramente, os pediatras referem a ocorrência de casos de coqueluche em crianças previamente vacinadas. Atribuem à doença a falhas de vacinas ou a possíveis infecções por *B. parapertussis*, a que chamam de para-coqueluche.

A frequência de infecções por *B. parapertussis* no nosso meio é, no entanto, desconhecida, dado o escasso número de investigações sobre o assunto. Apenas a Cidade do Rio de Janeiro conta com alguma informação a respeito (BARROS F.<sup>o</sup> 1, 1968 e UBATUBA<sup>60</sup>, 1969).

Para o nosso Estado e em particular o Município de São Paulo, não há dados informativos sobre o isolamento de *B. parapertussis*, a partir de crianças com coqueluche, e existe unicamente um trabalho sobre o isolamento de *B. pertussis* (LIMA<sup>41</sup>, 1932).

Por outro lado, não se pode excluir a possibilidade de falhas no diagnóstico clínico desta doença. Como é sabido, o mesmo é feito, praticamente na totalidade dos casos, apenas clinicamente, com base na sintomatologia e, quando possível, também nos dados epidemiológicos respectivos (BASTOS<sup>2</sup>, 1969). A respeito disto, é sabido também que os sintomas apresentados pelos doentes, principalmente nos períodos iniciais da doença, podem ser confundidos com os observados em outras infecções do aparelho respiratório, entre elas, adenovirose (OLSON et al.<sup>49</sup>, 1964 e CONNOR<sup>17</sup>, 1970), gripe, laringites, laringo-traqueites, rino-faringites (BARROS F.<sup>o</sup> 1, 1968 e BASTOS<sup>2</sup>, 1969) e resfriado comum (RICH<sup>54</sup> et al., 1932).

Pelas razões apontadas anteriormente, dado o número limitadíssimo de estudos sobre coqueluche em nosso país e em particular em nosso município, uma série de dúvidas têm surgido, relativas à eficiência das vacinas empregadas e, até mesmo, quanto à etiologia dos casos clínicos desta doença, principalmente em crianças vacinadas. Sabendo-se que a *B. parapertussis* e a *B. bronchiseptica* podem, também, determinar o aparecimento de quadros clínicos semelhantes ao da coqueluche, muitos atribuem a etiologia nos casos em que a criança foi vacinada, possivelmente à *B. parapertussis*, dado que, em muitos casos a doença se apresenta com um caráter menos severo. Por outro lado, muito raramente são utilizados os exames bacteriológico e sorológico, na confirmação laboratorial do diagnóstico clínico. Tendo em vista estes fatos, resolvemos elaborar um plano de pesquisa a respeito. O estudo que será relatado a seguir, refere-se apenas à parte do plano total de pesquisa por nós estabelecido e tem por finalidade, atingir os seguintes objetivos:

a — verificar em um grupo de crianças com sintomas de coqueluche, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, a frequência de isolamento de bactérias do gênero *Bordetella*;

b — verificar no soro sanguíneo dessas mesmas crianças, a elevação ou não dos níveis de anticorpos aglutinantes e fixadores de complemento;

c — relacionar os resultados dos exames bacteriológico e sorológico ao diagnóstico clínico.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

*Casos clínicos* — Elegemos como campo das nossas observações, crianças com sintomas de coqueluche e que recorrem aos serviços médicos do Hospital de Isolamento Emílio Ribas, no período compreendido entre julho de 1969 e dezembro de 1970. Este grupo, de 255 crianças, compôs-se de 121 indivíduos do sexo masculino e 134 do sexo feminino, com idades variando de 0 a 12 anos. Com relação a imunizações, de 162 indivíduos teve-se a informação de não terem sido vacinados contra a coqueluche e 56 não souberam informar. Por outro lado, 37 referiram vacinação anterior, dos quais, 8 receberam uma dose de vacina; 8, duas doses; 16, três doses; 2, quatro doses e 3 não souberam informar o número de doses.

O diagnóstico clínico ou de suspeita de coqueluche foi feito por médicos daquele hospital. Em uma ficha especialmente elaborada, foram registradas as informações dadas pelos acompanhantes dos doentes. Posteriormente, foram obtidas, através do exame dos prontuários, as informações relativas à confirmação clínica do diagnóstico de coqueluche.

*Coleta do material* — Das 255 crianças examinadas, apresentando suspeita de co-

queluche, de 127, procedeu-se a coleta do material no próprio ambulatório, utilizando-se inicialmente o processo da placa de tosse (CHIEVITZ & MEYER<sup>15</sup>, 1916 e LAUTROP<sup>40</sup>, 1960) e, logo a seguir, da nasofaringe através de uma zaragatoa (swab) por introdução per oral (BRADFORD & SLAVIN<sup>8</sup>, 1940 e LAUTROP<sup>40</sup>, 1960). Das 128 crianças restantes, logo após a sua internação, procedeu-se a coleta de material pelo método da placa de tosse e a seguir da nasofaringe pela técnica da zaragatoa por introdução per nasal (CRUICKSHANK<sup>19</sup>, 1944 e LAUTROP<sup>40</sup>, 1960).

De 46 crianças, das 255 estudadas, foram colhidas, também, duas amostras de 8 ml de sangue, para provas sorológicas, sendo a primeira logo após a internação e a segunda um mês após. As amostras de soro, assim obtidas, foram mantidas em congelador a  $-10^{\circ}\text{C}$  até a realização das provas sorológicas.

Após a coleta do material, as zaragatoas foram mantidas imersas em 0,5 ml de solução de casamino ácidos (técnico) a 1%, até o início do exame (KENDRICK et al.<sup>32</sup>, 1947; KENDRICK et al.<sup>36</sup>, 1961 e UBATUBA<sup>60</sup>, 1969). O tempo decorrido entre a coleta dos materiais e o início dos exames, nunca ultrapassou de duas horas (UBATUBA<sup>60</sup>, 1969).

As zaragatoas para a coleta de material da nasofaringe por introdução per oral e per nasal, foram preparadas segundo as técnicas mencionadas por LAUTROP<sup>40</sup> (1960). A solução de casamino ácidos (Difco-técnico) foi preparada a 1% em água destilada, contendo 0,6% de cloreto de sódio e apresentando um pH final de 7,2 (KENDRICK et al.<sup>32</sup>, 1947 e KENDRICK et al.<sup>36</sup>, 1961).

### *Meios de cultura empregados*

*Meio de Bordet-Gengou* — Este meio foi preparado segundo a fórmula usada no "Statens Serum Institut" de Copenhague (LAUTROP<sup>40</sup>, 1960) ou seja: 1000 g de

batatas, limpas, descascadas e picadas, foram colocadas num saco de gaze e a seguir, submersas em 2000 ml de água de torneira contendo 80 ml de glicerol. A mistura foi fervida até as batatas se tornarem amolecidas. O suco concentrado de batatas foi extraído, espremendo-as no saco de gaze. A seguir, a um volume de suco concentrado foram adicionados 3 volumes de solução de cloreto de sódio a 0,6%. O pH foi ajustado a 7,2 — 7,4 e o suco diluído, distribuído em garrafas de Roux. A seguir, após adição de 4% de agar (Difco), a mistura foi aquecida em banho-maria fervente para a dissolução do agar, e em seguida esterilizada a 120°C por 20 minutos em autoclave. No momento de ser usado, o meio base era fundido em autoclave com vapor fluente e, após ser esfriado a 45-50°C, era adicionado de sangue defibrinado, estéril, de carneiro na proporção de 50%.

*Meio com uréia* (método de Fergusson & Hook modificado — LAUTROP<sup>40</sup>, 1960) — Este meio foi preparado da seguinte maneira: fosfato monopotássico —  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anidro (0,1g), fosfato dipotássico —  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  anidro (0,1g), cloreto de sódio (0,5g), vermelho de fenol (1mg) e água destilada q.s.p. 100ml. A solução foi esterilizada a 120°C por 20 min. e em seguida, adicionada de 1% de uréia, partindo-se de uma solução a 20% esterilizada por filtração (Seitz). Posteriormente o meio foi distribuído em volume de 1 ml em tubos 12 x 120 mm. Este meio foi utilizado na prova do desdobramento da uréia. O meio utilizado como controle da prova, foi preparado da mesma maneira, porém, sem a adição da uréia.

*Caldo nitrado* (LAUTROP<sup>40</sup>, 1960) — Este meio foi assim preparado: peptona-Difco (0,5g), nitrato de potássio (0,1g) e água destilada q.s.p. 100 ml. Após ajus-

tar o pH a 7,2-7,4, foram distribuídos volumes de 5 ml em tubos medindo 16 x 160 mm; a seguir, procedeu-se à esterilização da solução em autoclave a 120°C por 20 min. Este meio foi utilizado na prova da redução de nitratos a nitritos.

*Citrato* — Na prova do aproveitamento do citrato foi utilizado o agar citrato de Simmons (Difco) (KENDRICK et al.<sup>33</sup>, 1963).

*Agar tirosina* (ESMINGER<sup>25</sup>, 1953) — Foi preparado agar simples com 0,1% de tirosina. A seguir o pH foi ajustado a 7,5 adicionando-se solução de NaOH N/1. Finalmente o meio foi distribuído em placas de Petri ou em tubos 16 x 160 mm, estes últimos mantidos em posição inclinada.

*Técnica de isolamento e de identificação de Bordetelas* — Nas placas de tosse, procedeu-se, simplesmente o espalhamento, na superfície, de 0,1 ml de solução de penicilina G potássica contendo 350 unidades por ml. Por outro lado, partindo-se das zaragatoas, realizou-se à semeadura de placas com meio de Bordet-Gengou, rolando-se o chumaço na superfície do meio. Em seguida, procedeu-se ao espalhamento da solução de penicilina G potássica, da maneira já descrita, usando-se uma espátula de Drigalski estéril (UBATUBA<sup>60</sup>, 1969). A concentração da solução de penicilina, usada, foi estabelecida previamente empregando-se amostras isoladas de *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*. A concentração selecionada, 0,1 ml de solução de penicilina G potássica com 350 unidades por ml, não impedia a multiplicação das bactérias das três espécies citadas, mas impedia de forma satisfatória o crescimento de colônias de outras bactérias presentes em materiais de nasofaringe, coletados de alguns indivíduos através de zaragatoa per nasal.

Segundo MACLEAN<sup>44</sup> (1937), CRUICKSHANK<sup>19</sup> (1944), BRADFORD et al<sup>6</sup> (1946) e LAUTROP<sup>40</sup> (1960) a adição de penicilina aumenta a positividade do isolamento de bordetelas.

As placas semeadas foram incubadas a 35°C em estufa saturada de umidade (BRADFORD & BROOKS<sup>5</sup>, 1941 e LACEY<sup>39</sup>, 1954). As placas foram examinadas diariamente do 2.º ao 10.º dia de incubação (LAUTROP<sup>40</sup>, 1960 e UBATUBA<sup>60</sup>, 1969). O reconhecimento de colônias de bordetelas foi realizado segundo os critérios apresentados e discutidos por LAUTROP<sup>40</sup>, (1960). Das placas eram selecionadas 6 a 8 colônias suspeitas de serem de bordetelas e, as mesmas eram semeadas em novas placas com meio de Bordet-Gengou. Estas placas eram incubadas a 35°C, em estufa saturada de umidade e a sua verificação era feita após 24, 48 e 72 h, até o 10.º dia. A partir destas culturas, prepararam-se, em lâminas, esfregaços corados pelo método de Gram, para a verificação da morfologia e a seguir procederam-se às inoculações dos meios para as seguintes provas de identificação bioquímica:

*Prova do desdobraimento da uréia*  
— Feita através da inoculação maciça (até a turvação) das bactérias a serem identificadas, em meio contendo uréia. A prova positiva era revelada pelo aparecimento de cor vermelha, dado pela viragem do vermelho de fenol após algumas horas (2 a 4 h) de incubação a 35°C. Realizou-se em todos os casos, paralelamente, uma prova controle inoculando-se maciçamente a cultura em meio preparado da mesma forma que o anterior, porém sem a adição de uréia.

*Prova da redução de nitratos a nitritos*  
— Consistiu na inoculação maciça das bactérias a serem identificadas (até a turvação), em caldo nitrado. Após a incubação a 35°C por 24 horas, a 1 ml desta cultura, adicionaram-se algumas gotas dos reativos (solução de ácido sulfanílico a 0,8% em sol. de ácido acético 5N e solução de alfa naftilamina a 0,5% em sol. de ácido acético 5N). A prova positiva caracterizava-se pelo aparecimento de cor avermelhada.

*Prova do aproveitamento do citrato*  
— Foi feita por meio da sementeira das bactérias, em identificação, na superfície de agar citrato de Simmons, inclinado (Difco). Após incubação de até 4 dias a 35°C, a prova positiva manifestava-se pelo aparecimento de coloração azul no meio semeado.

*Prova da multiplicação em agar tirosina a 1%*  
— Consistiu na inoculação das bactérias a serem identificadas, na superfície de agar tirosina em placas ou em tubos. Nesta prova, o resultado positivo caracteriza-se pela ocorrência de multiplicação bacteriana, com escurecimento do meio de cultura (cor bronzeada). Este escurecimento é dado pelo ataque da tirosinase sobre a tirosina, produzindo-se uma pigmentação escura do tipo melanina (LAUTROP<sup>40</sup>, 1960).

Na Tabela 1 estão resumidos os resultados esperados, relativos às provas de identificação utilizadas no estudo presente, segundo as características bioquímicas pesquisadas das espécies de *Bordetella* (LAUTROP<sup>40</sup>, 1960 e KENDRICK et al.<sup>33</sup>, 1963).

A seguir, procedeu-se à identificação sorológica através de prova rápida de soro aglutinação em lâmina\*.

\* O soro anti-*Bordetella pertussis* usado, foi preparado no Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro e gentilmente cedido pela Dra. Arlette Ubatuba. O soro anti-*Bordetella paraper-tussis* (Difco) foi adquirido no comércio e utilizado após diluição a 1/10 em solução de cloreto de sódio a 0,85%, segundo a bula que acompanhava o produto.

IARIA, S. T. — Isolamento de bactérias do gênero *Bordetella* e provas sorológicas, a partir de crianças com sintomas de coqueluche, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 7:409-32, 1973.

TABELA 1

Comportamento das bactérias do gênero *Bordetella* nas provas bioquímicas realizadas.

Espécies	P r o v a s			
	Desdobramen- to da uréia	Redução de nitratos a nitritos	Aproveitamen- to do citrato	Multiplificação em agar tirosina
<i>B. pertussis</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<i>B. parapertussis</i>	Positivo	Negativo	Positivo	Crescimento e escurecimento
<i>B. bronchiseptica</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Crescimento sem escurecimento

A identificação sorológica das nossas culturas em lâmina, foi realizada através da mistura de uma gota de suspensão espessa das bactérias que estavam sendo identificadas, com uma gota de soro aglutinante. As leituras foram realizadas até 5 minutos após o início da prova, com o auxílio de uma lupa. Paralelamente, realizava-se uma prova controle usando-se uma mistura de uma gota de suspensão bacteriana espessa com uma gota de solução de cloreto de sódio a 0,85%.

*Provas realizadas com os soros dos doentes* — Nas duas amostras de soro, colhidas com intervalo de um mês, de 46 crianças, das 255 estudadas, foram determinados os níveis circulantes de anticorpos contra *B. pertussis*, pelas provas de aglutinação e de fixação do complemento (FC'); determinaram-se também os títulos aglutinantes para *B. parapertussis*. Para isso, os soros que estavam mantidos a  $-10^{\circ}\text{C}$  foram descongelados rapidamente, colocando-se os tubos em banho de água corrente por alguns minutos.

*Prova de aglutinação* — Os antígenos

foram preparados empregando-se a estirpe de *B. pertussis* A.T.C.C. 10536, utilizada em inúmeros laboratórios no preparo de vacina contra a coqueluche e, a estirpe de *B. parapertussis* 139, isolada pela Dra. Arlette Ubatuba, no Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro. Preliminarmente, na estirpe A.T.C.C. 10536, foi realizada a dosagem dos antígenos termolábeis "major" de envoltório 1, 2 e 3, empregando-se para tal, soros mono-específicos, tendo-se verificado a presença dos três antígenos.

As provas de aglutinação foram realizadas, segundo a técnica de PRESTON & TE PUNGA<sup>52</sup> (1959), utilizando-se o microtitulador Takatsi. Em placas "perspex", foram misturados 0,025 ml de soro a ser dosado, diluído de 1/2 a 1/4096 (diluições com fator 2) em solução salina fosfatada com pH 7,4 e 0,025 ml de antígeno. Os antígenos consistiram de suspensões contendo 30 bilhões de *B. pertussis* ou *B. parapertussis* por ml, em solução salina fosfatada com pH 7,4 (solução de fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) M/15, 10 ml, solução de fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) M/15, 40 ml, cloreto de sódio 8,5g, água

destilada q.s.p. 1000 ml). A concentração de *B. pertussis* ou *B. parapertussis*, nas suspensões, foi determinada colorimetricamente, empregando-se o colorímetro "EEL" portátil com filtro verde amarelado e o padrão de opacidade do "National Institute of Health" (NIH), EUA. As misturas foram a seguir agitadas durante 15 min. em agitador de Kahn (200 ciclos por min.), com amplitude de 3 cm. Após a agitação, as placas contendo as misturas foram mantidas na geladeira a 4°C por 20 min. e, a seguir, foram efetuados as leituras, com o auxílio de uma lupa entomológica, com foco de iluminação por cima. Foi considerado como título aglutinante do soro, a recíproca da maior diluição onde ainda se observava reação de aglutinação positiva.

*Prova de fixação do complemento* — Foi realizada somente contra a *B. pertussis* e empregou-se a técnica de BRADSTREET & TAYLOR<sup>9</sup> (1962) com modificações (CANDEIAS<sup>12</sup>, 1968). Nesta prova, misturou-se 0,1 ml de soro a ser titulado, em várias diluições (1/2 a 1/1024), 0,1 ml da dose ótima de antígeno, 0,1 ml de complemento diluído de forma a conter duas unidades C'H<sub>100</sub> e 0,2 ml de suspensão a 2% de hemácias sensibilizadas de carneiro. Como diluente, foi usada solução de cloreto de sódio a 0,85%.

O antígeno de *B. pertussis* empregado nesta prova foi preparado segundo a técnica de PRICE<sup>53</sup> (1932) modificada, descrita para o preparo do antígeno gonocócico, utilizado na prova de fixação de complemento (CRUICKSHANK et al.<sup>20</sup>, 1970). O antígeno foi constituído de uma suspensão com 10 bilhões de *B. pertussis* por ml, em solução de cloreto de sódio a 0,85%. Esta padronização foi feita também fotocolorimetricamente, usando-se o padrão de opacidade do "NIH" já referido. A cada 5 ml desta suspensão

foram adicionados 0,2 ml de solução de hidróxido de sódio N/1 e, a seguir, a mistura foi mantida em banho-maria a 37°C por 2 horas. Após esta incubação, o pH foi ajustado a 7,4 pela adição de solução de ácido clorídrico N/1. Este antígeno foi aquecido a 56°C, em banho-maria por 30 min. para reduzir a sua anticomplementaridade e, posteriormente, adicionado de 0,08% de azida de sódio.

*Complemento* — O complemento usado na reação, obtido de cobaias, foi preservado pela técnica de RICHARDSON<sup>55</sup> (1941) e, nestas condições, pode ser conservado por cerca de um ano (BRADSTREET & TAYLOR<sup>9</sup>, 1962). O complemento assim conservado é hipertônico e, por essa razão foi diluído com salina tamponada, de pH 7,2, e água destilada, respeitando-se as seguintes proporções: 0,1 ml de complemento, 0,7 ml de água destilada e um volume V de salina tamponada, a fim de se obter a diluição desejada. O volume V de salina tamponada pode ser calculado através da fórmula:

$$V = \frac{(dc' - 10) 8}{100}$$

sendo dc' a recíproca da diluição desejada do complemento.

*Hemácias sensibilizadas de carneiro* — suspensão de hemácias de carneiro a 2% foi sensibilizada com a dose de hemolisina em partes iguais, em banho-maria a 37°C por 10 min.

### 3. RESULTADOS

Dos 255 casos estudados, obteve-se o isolamento de *B. pertussis* de 55 (21,6%). De nenhum caso se isolou *B. parapertussis* ou *B. bronchiseptica*.

Relativamente a semanas de doença, 81 crianças foram referidas como estando na 1.ª semana, 69 na 2.ª, 39 na 3.ª, 35

IARIA, S. T. — Isolamento de bactérias do gênero *Bordetella* e provas sorológicas, a partir de crianças com sintomas de coqueluche, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 7:409-32, 1973.

na 4.<sup>a</sup> e 30 na 5.<sup>a</sup> ou mais semanas. O isolamento de *B. pertussis* foi obtido (Tabela 2), respectivamente, de 26 (32,1%), 16 (23,2%), 7 (17,9%), 4 (11,4%) e de 2 (6,5%).

Das 255 crianças estudadas, 155 foram internadas e submetidas a seguimento clínico e o diagnóstico de coqueluche foi confirmado clinicamente, por médicos do hospital, em 129 (83,2%) e não confirmado em 26 (16,8%). As 100 restantes não foram internadas e serão referidas como "casos não seguidos". A Tabela 3 mostra a positividade do isolamento de *B. pertussis* nos 129 casos com diagnóstico de coqueluche confirmado, nos 26 não confirmados e nos 100 não seguidos. As taxas de positividade foram, respectivamente, de 20,2%, 7,7% e 27,0%.

TABELA 2

Isolamento de *B. pertussis* de crianças com sintomas de coqueluche, segundo o período de doença (em semanas), atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas, São Paulo, junho de 1969 a dezembro de 1970.

Período de Doença (em Semanas)	N.º Examinado	Positivos	
		N.º	%
1. <sup>a</sup>	81	26	32,1
2. <sup>a</sup>	69	16	23,2
3. <sup>a</sup>	39	7	17,9
4. <sup>a</sup>	35	4	11,4
≥ 5. <sup>a</sup>	31	2	6,5
<b>TOTAL</b>	<b>255</b>	<b>55</b>	<b>21,6</b>

TABELA 3

Isolamento de *B. pertussis* de crianças com sintomas de coqueluche, segundo a confirmação clínica do diagnóstico, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas, São Paulo, junho de 1969 a dezembro de 1970.

Diagnóstico de Coqueluche Clinicamente Confirmado	N.º Examinado	Positivos	
		N.º	%
Sím	129	26	20,2
Não	26	2	7,7
Casos não seguidos	100	27	27,0
<b>TOTAL</b>	<b>255</b>	<b>55</b>	<b>21,6</b>

A Tabela 4 mostra as taxas de isolamento da *B. pertussis*, segundo a confirmação clínica do diagnóstico e o período de doença em semanas. Dos 129 casos confirmados clinicamente, 40 referiram estar na 1.<sup>a</sup> semana de doença, 28 na 2.<sup>a</sup>, 21 na 3.<sup>a</sup>, 22 na 4.<sup>a</sup> e 18 na 5.<sup>a</sup> ou mais semanas. Foi isolada a *B. pertussis*, respectivamente, de 40,0%, 17,9%, 14,3%, 4,5% e 5,6%. Dos 26 casos não confirmados clinicamente, a *B. pertussis* foi isolada de apenas 2 casos (22,2%) dos 9 referidos de 1.<sup>a</sup> semana de doença. Dos 100 casos não seguidos, 32 referiram estar na 1.<sup>a</sup> semana, 34 na 2.<sup>a</sup>, 12 na 3.<sup>a</sup>, 12 na 4.<sup>a</sup> e 10 na 5.<sup>a</sup> ou mais semanas. A positividade do isolamento de *B. pertussis* foi, respectivamente, de 25,0%, 32,4%, 33,3%, 25,0% e 10,0%.

A Tabela 5 mostra, nos 255 casos estudados, a positividade para *B. pertussis* segundo alguns sintomas mais frequentes e segundo a confirmação clínica do diagnóstico de coqueluche. Do total de casos, 52 apresentaram apenas tosse

IARIA, S. T. — Isolamento de bactérias do gênero *Bordetella* e provas sorológicas, a partir de crianças com sintomas de coqueluche, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 7:409-32, 1973.

comum, sem características específicas, 103 apenas tosse espasmódica e 100 tosse espasmódica com vômito, guincho ou ambos. A *B. pertussis* foi isolada, respectivamente, de 5 casos (9,6%), de 26 (25,2%) e 24 (24,0%).

TABELA 4

Isolamento de *B. pertussis* de crianças com sintomas de coqueluche, segundo a confirmação clínica do diagnóstico e o período de doença (em semanas), atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas, São Paulo, junho de 1969 a dezembro de 1970.

Diagnóstico de Coqueluche Clinicamente Confirmado	N.º	Período de doença (em semanas)					TOTAL
		1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	≥ 5.ª	
Sim	Examinados	40	28	21	22	18	129
	Positivos	16	5	3	1	1	26
	%	40,0	17,9	14,3	4,5	5,6	20,2
Não	Examinados	9	7	6	1	3	26
	Positivos	2	—	—	—	—	2
	%	22,2	—	—	—	—	7,7
Casos não Seguidos	Examinados	32	34	12	12	10	100
	Positivos	8	11	4	3	1	27
	%	25,0	32,4	33,3	25,0	10,0	27,0
TOTAL	Examinados	81	69	39	35	31	255
	Positivos	26	16	7	4	2	55
	%	32,1	23,2	17,9	11,4	6,5	21,6

Na Tabela 6 estão distribuídos os resultados das provas de aglutinação e de FC' frente a antígenos de *B. pertussis* e *B. parapertussis*, realizadas com os soros de 46 crianças internadas e submetidas a acompanhamento clínico. As provas de aglutinação e de FC' são referidas como positivas quando os exames das duas amostras colhidas com intervalo de um mês, revelaram uma elevação do nível de

anticorpos circulantes, de pelo menos 4 vezes. A prova de aglutinação para a *B. pertussis* foi positiva nos soros de 14 (30,4%) e a de FC', para esta mesma bactéria, nos de 19 (41,3%). A prova de aglutinação para *B. parapertussis* foi positiva apenas em um caso (2,2%). Nesta Tabela pode ser observada também a positividade das provas sorológicas segundo o isolamento de *B. pertussis*.

IARIA, S. T. — Isolamento de bactérias do gênero *Bordetella* e provas sorológicas, a partir de crianças com sintomas de coqueluche, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 7:409-32, 1973.

TABELA 5  
 Isolamento de *B. pertussis* de crianças com sintomas de coqueluche, segundo alguns sintomas referidos e a confirmação clínica do diagnóstico, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas, São Paulo, junho de 1969 a dezembro de 1970.

Diagnóstico de coqueluche clinicamente confirmado	Sim			Não			Casos não Seguidos			TOTAL			
	N.º Exami- nado	Positivos		N.º Exami- nado	Positivos		N.º Exami- nado	Positivos		N.º Exami- nado	Positivos		
		N.º	%										
Sintomas													
Tosse comum	20	3	15,0	19	1	5,3	13	1	7,7	52	5	9,6	
Tosse espasmódica	59	10	16,9	7	1	14,3	37	15	40,5	103	26	25,2	
Tosse espasmódica acompanhada de vômito, guincho ou de ambos	50	13	26,0	—	—	—	50	11	22,0	100	24	24,0	
TOTAL	129	26	20,2	26	2	7,7	100	27	27,0	255	55	21,6	

IARIA, S. T. — Isolamento de bactérias do gênero *Bordetella* e provas sorológicas, a partir de crianças com sintomas de coqueluche, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 7:409-32, 1973.

TABELA 6  
 Provas sorológicas, para *B. pertussis* e *B. parapertussis*, de 46 crianças com sintomas de coqueluche, segundo o isolamento de *B. pertussis*, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas, São Paulo, junho de 1969 a dezembro de 1970.

Isolamento de <i>B. pertussis</i>	N.º Exami- nado	P R O V A S S O R O L Ó G I C A S														
		B. pertussis						B. parapertussis								
		Agl. +		FC' +		Agl. + FC' +		Agl. + FC' -		Agl. - FC' +		Agl. - FC' -				
		N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%			
Positivo	7	14,3	3	42,9	--	--	1	14,2	3	42,9	3	42,9	--	--	7	100,0
Negativo	39	33,3	16	41,0	8	20,5	5	12,8	8	20,5	18	46,2	1	2,6	38	97,4
TOTAL	46	30,4	19	41,3	8	17,4	6	13,0	11	23,9	21	45,7	1	2,2	45	97,8

IARIA, S. T. — Isolamento de bactérias do gênero *Bordetella* e provas sorológicas, a partir de crianças com sintomas de coqueluche, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 7:409-32, 1973.

Na Tabela 7, encontra-se a distribuição dos resultados de isolamento de *B. pertussis* e das provas sorológicas segundo a confirmação clínica do diagnóstico, relativos aos 46 casos referidos. Destes, 36 foram confirmados clinicamente como sendo de coqueluche e 10 não foram confirmados. A positividade laboratorial,

levando em conta o isolamento de *B. pertussis* e/ou provas sorológicas, foi respectivamente de 22 casos (61,1%) e 6 casos (60,0%). Por outro lado, 14 (38,9%) dos confirmados clinicamente e 4 (40,0%) dos não confirmados, revelaram-se negativos nos exames bacteriológico e sorológico.

TABELA 7

Resultados do isolamento e das provas sorológicas para *B. pertussis* realizadas a partir de 46 crianças com sintomas de coqueluche, segundo a confirmação clínica do diagnóstico, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas, São Paulo, junho de 1969 a dezembro de 1970.

Diagnóstico de Coqueluche Clinicamente Confirmado ISO- lamente e/ou sorologia para <i>B. pertussis</i>	Sim		Não		TOTAL	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%
	Isolamento + Sorologia +	4	11,1	—	—	4
Isolamento + Sorologia —	3	8,3	—	—	3	6,5
Isolamento — Sorologia +	15	41,7	6	60,0	21	45,7
<b>SUB-TOTAL</b>	<b>22</b>	<b>61,1</b>	<b>6</b>	<b>60,0</b>	<b>28</b>	<b>60,9</b>
Isolamento — Sorologia —	14	38,9	4	40,0	18	39,1
<b>TOTAL</b>	<b>36</b>	<b>100,0</b>	<b>10</b>	<b>100,0</b>	<b>46</b>	<b>100,0</b>

#### 4. DISCUSSÃO

Das 255 crianças estudadas, foram isoladas 55 estirpes de *B. pertussis*, identificadas bioquímica e sorologicamente. Em nenhum caso obteve-se o isolamento de *B. parapertussis* ou de *B. bronchiseptica*.

Dos estudos existentes, sabe-se que a

ocorrência de infecções pela *B. bronchiseptica* em casos clínicos de coqueluche é rara (LAUTROP<sup>40</sup>, 1960). Na Inglaterra, em pesquisa realizada pelo MEDICAL RESEARCH COUNCIL<sup>46</sup> (1951), de 836 casos de coqueluche, foi isolada a *B. bronchiseptica* de apenas 1 (cerca de 0,1%).

Por outro lado, a *B. parapertussis* ocorre com frequência maior que a anterior, embora de forma variável. Em estudos realizados, BRADFORD & SLAVIN<sup>7</sup> (1937), em Nova York, isolaram *B. parapertussis* de 5% de 160 casos de coqueluche confirmados bacteriologicamente; em Michigan, ELDERING & KENDRICK<sup>24</sup> (1952), de 2% de casos clínicos positivos bacteriologicamente, isolaram essa bactéria. Na Dinamarca, as infecções por *B. parapertussis* são mais frequentes (ELDERING & KENDRICK<sup>24</sup>, 1952) e na Tchecoslováquia pela sua frequência, apresenta-se com certa importância, o que motivou a sua inclusão na vacina contra a coqueluche (VYSOKA-BURIANOVA, 1962 apud UBATUBA<sup>60</sup>, 1969, VYSOKA-BURIANOVA<sup>61</sup>, 1970). No Brasil, no único estudo existente feito na cidade do Rio de Janeiro, dos casos clínicos de coqueluche confirmados bacteriologicamente, cerca de 1% foi devido à *B. parapertussis* (BARROS F.<sup>o</sup>1, 1968; UBATUBA<sup>60</sup>, 1969). Em São Paulo, CORREA et al.<sup>18</sup> (1970), tentaram determinar a frequência de infecções por *B. parapertussis*, realizando um inquérito sorológico em 163 crianças, através da prova de aglutinação. Segundo estes pesquisadores "dez exames mostraram reações só relacionadas com a *B. parapertussis* e proporcionaram baixos teores de positividade que, talvez, não indiquem com segurança acometimentos, no passado por esse germe".

Ressaltamos que no nosso estudo, de 255 crianças estudadas, isolamos apenas a *B. pertussis* dos 55 casos positivos. Se houvesse sido estudado um número maior de casos, é possível que viesse a ser isolada alguma estirpe de *B. parapertussis*.

Como é sabido, na coqueluche, o isolamento de *B. pertussis* é mais frequente nas primeiras semanas da doença, principalmente na primeira ou fase

catarral. Nesta fase, pode-se atingir uma taxa de isolamento do agente de cerca de 80% (KENDRICK & ELDERING<sup>34</sup>, <sup>35</sup> 1934 e 1935; STRAKER & WESTEWATER<sup>59</sup>, 1937; SAITO et al.<sup>56</sup>, 1942), de 98% (SILVERTHORNE & FRASER<sup>58</sup>, 1935) ou até de 100% (DONALD<sup>22</sup>, 1938). No Brasil, CUNHA<sup>21</sup> (1943) em casos de coqueluche obteve na primeira semana de doença uma positividade de 46,6%. Na fase de tosse espasmódica a positividade para a *B. pertussis* vai decrescendo, atingindo níveis muito baixos na 6.<sup>a</sup> e 7.<sup>a</sup> semanas. A Tabela 8 mostra os resultados obtidos por vários pesquisadores em estudos relacionados com o isolamento de *B. pertussis* e o período de doença.

Na presente pesquisa, distribuindo-se a frequência do isolamento de *B. pertussis* segundo o período de doença (Tabela 2), verificamos que a taxa de positividade foi também maior, entre os doentes que, pelas informações, estavam na 1.<sup>a</sup> semana de doença (32,1%). Observamos, ainda, que a positividade depois decresceu atingindo 23,2% nos doentes de 2.<sup>a</sup> semana, 17,9% de 3.<sup>a</sup>, 11,4% de 4.<sup>a</sup> e 6,5% nos de 5.<sup>a</sup> ou mais semanas.

Comparando os nossos resultados com os obtidos por vários pesquisadores (Tabelas 2 e 8), verificamos que os nossos percentuais de positividade foram relativamente baixos. No entanto, deve ser salientado que aquelas pesquisas foram realizadas em épocas e locais diferentes e por investigadores distintos, dando a essa comparação um valor relativo.

Na época em que tais pesquisas foram realizadas, não havia a interferência dos antibióticos nos resultados dos exames bacteriológicos. Por outro lado, devemos também considerar as falhas no diagnóstico clínico da doença e as falhas de ordem técnica, cuja frequência desconhecemos, relacionadas à colheita do

IARIA, S. T. — Isolamento de bactérias do gênero *Bordetella* e provas sorológicas, a partir de crianças com sintomas de coqueluche, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 7:409-32, 1973.

TABELA 8

Resumo dos resultados obtidos por alguns pesquisadores, no isolamento de *B. pertussis*, segundo o período de doença (em semanas), a partir de casos de coqueluche.

Autor	N.º de Exames Realizados	Isolamento de <i>B. pertussis</i> (%)							
		Seg. o período da doença (em semanas)							
		Total	1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	5.ª	6.ª	7.ª
Chievitz & Meyer <sup>15</sup> (1916)	156	42,9	38,9	72,7	33,3	33,3	8,3	—	—
Gardner & Leslie <sup>30</sup> (1932)	47	—	75,0	67,0	75,0	25,0	—	—	—
Kristensen <sup>38</sup> (1933)	2144	51,1	65,3	58,1	52,4	40,0	33,7	7,5	—
Kendrick & Endering <sup>34</sup> (1934)	257a	64,2	75,0	70,0	83,0	39,0	11,0	—	—
Kendrick & Endering <sup>35</sup> (1935)	551b	48,1	78,0	64,0	62,0	32,0	15,0	3,0	—
Silverthorne & Fraser <sup>58</sup> (1935)	198	60,1	98,0	79,0	20,0	18,0	—	—	—
Madsen, 1935 apud Straker e Westwater <sup>59</sup> (1937)	—	—	75,0	57,0	61,0	45,0	—	—	—
Straker e Westwater <sup>59</sup> (1937)	125	78,4	36,5	84,4	70,6	50,0	—	—	—
Donald <sup>22</sup> (1938)	530c	24,9	100,0	93,5	94,8	44,0	7,1	0,8	0,7
Saito, et al <sup>56</sup> (1942)	210d	60,5	81,8	68,1	48,7	59,1	35,7	—	11,1
Miller et al <sup>47</sup> (1943)	342	57,0	81,1	72,1	50,0	45,1	32,1	7,1	8,3

a — referente a 207 casos

b — a 332 casos

c — referente a 136 casos

d — a 152 casos

material, à possível variação da eficiência dos vários lotes de meios de cultura, ao número de exames feitos para o mesmo doente, etc. Há que se considerar também o período de doença referido pelos acompanhantes dos doentes. É sabido que grande parte dos doentes recorre ao hospital em busca de assistência médica numa fase não inicial da doença, mas sim quando a mesma se encontra já na fase espasmódica (DONALD<sup>22</sup>, 1938; BARROS F.<sup>o</sup> 1, 1968). Assim sendo, deve haver casos que são referidos como sendo de 1.<sup>a</sup>, 2.<sup>a</sup> ou 3.<sup>a</sup> semana de doença, mas que na realidade estariam já na 4.<sup>a</sup>, 5.<sup>a</sup> ou mais semanas.

Analisando a Tabela 4, pode-se verificar que entre os casos referidos como sendo de 1.<sup>a</sup> semana de doença, obtivemos o isolamento de *B. pertussis* em 40% dos que tiveram o diagnóstico confirmado clinicamente. A porcentagem de positividade decresceu, como era de se esperar, atingindo 17,9% nos doentes de 2.<sup>a</sup> semana, 14,3% nos de 3.<sup>a</sup>, 4,5% nos de 4.<sup>a</sup> e 5,6% nos de 5.<sup>a</sup> ou mais semanas. Nos casos em que o diagnóstico clínico não foi confirmado clinicamente, a positividade foi de 22,2% dos que referiram estar na 1.<sup>a</sup> semana de doença. Os valores por nós obtidos podem mostrar, mais uma vez, a possibilidade da ocorrência de falhas no diagnóstico clínico desta doença, fato já constatado ou referido por vários autores, entre eles. CHANY<sup>14</sup> (1958), FARBER & VAWTER<sup>28</sup> (1961), OLSON et al.<sup>49</sup> (1964), BASTOS<sup>2</sup> (1969) e CONNOR<sup>17</sup> (1970).

Nos nossos casos, a positividade do isolamento de *B. pertussis* foi de 21,6% (55 casos), a qual consideramos relativamente baixa, quando comparada com as obtidas por outros pesquisadores. KENDRICK & ELDERING<sup>34</sup> (1934), SILVERTHORNE & FRASER<sup>58</sup> (1935), STRAKER & WESTWATER<sup>59</sup> (1937), SAITO et al.<sup>56</sup>

(1942), obtiveram positivities que variaram de 60 a 80% e CHIEVITZ & MEYER<sup>15</sup> (1916), KENDRICK & ELDERING<sup>35</sup> (1935) e MILLER JR. et al.<sup>47</sup> (1943), positivities de 40 a 60%. Outros investigadores, porém, obtiveram também positivities mais baixas, como DONALD<sup>22</sup> (1938), 24,9% e CRUICKSHANK et al.<sup>20</sup> (1970), 28%.

No Brasil, LIMA<sup>41</sup> (1932), estudando casos de coqueluche, isolou a *B. pertussis* de 60% dos pacientes. Mais recentemente, BARROS F.<sup>o</sup> 1 (1968) obteve uma positividade de 48,9% e UBATUBA<sup>60</sup> (1969) relata o isolamento de *B. pertussis* de 64,1% de 156 doentes estudados.

Na presente investigação já referimos alguns dos muitos fatores que poderiam interferir, provocando baixa positividade do isolamento de *B. pertussis*. Por outro lado, temos a salientar que, de acordo com a sintomatologia apresentada pelos doentes, cerca de 80% já se mostrava na fase espasmódica; isto resulta como já é sabido, em maior número de exames negativos.

Acreditamos, assim, ser de grande valor o acompanhamento dos contatos, pois caso venham alguns deles a contrair a doença, a mesma poderá, nesses casos secundários, ser diagnosticada bacteriológicamente com relativa facilidade na sua fase inicial, o que poderia, inclusive, esclarecer o diagnóstico de coqueluche de casos primários, se negativos ao exame de laboratório. Sabemos, entretanto, que, embora esta conduta seja a ideal, nem sempre ela pode ser realizada, pelas inúmeras dificuldades existentes.

Além do exame bacteriológico, podemos, como é sabido, utilizar provas sorológicas no diagnóstico laboratorial da coqueluche e as mais usadas são as de aglutinação e de FC'. Estas provas foram utilizadas pela primeira vez por BORDET & GENCOU<sup>3,4</sup> (1906, 1907). Em estudos pos-

teriores verificou-se que a prova de FC' torna-se positiva na 2.<sup>a</sup> ou 3.<sup>a</sup> semana de doença e atinge um máximo de positividade na 7.<sup>a</sup> ou 8.<sup>a</sup> semana (WINHOLT<sup>62</sup>, 1915; CHIEVITZ & MEYER<sup>15</sup>, 1916; GUNDEL & SCHLÜTER<sup>31</sup>, 1933/1934 e DONALD<sup>22</sup>, 1938).

No entanto, da 7.<sup>a</sup> semana de doença em diante a positividade das provas sorológicas decresce (CHIEVITZ & MEYER<sup>15</sup>, 1916) a ponto de se ter reações de FC' negativas no soro de indivíduos que tiveram coqueluche há 2, 3 e 5 anos (WINHOLT<sup>62</sup>, 1915). A fim de mostrar melhor a positividade da reação de FC', segundo o período de doença, foram resumidos na Figura, os resultados obtidos por CHIEVITZ & MEYER<sup>15</sup> (1916) e DONALD<sup>22</sup> (1938).

Uma reação de FC' positiva pode indicar, com muita probabilidade, que uma criança tem ou teve a doença; por outro lado, a reação negativa não evidencia com tanta segurança que o mesmo não tenha a doença no momento ou que não tenha apresentado anteriormente (CHIEVITZ & MEYER<sup>15</sup> 1916). É óbvio que o surgimento das vacinas contra a coqueluche, provocou modificação na afirmação feita por estes pesquisadores. Havendo sintomas de coqueluche, deve-se verificar a elevação dos níveis de anticorpos de pelo menos 4 vezes, empregando-se duas amostras de soro do doente, colhidas com intervalo apropriado.

Relativamente à prova de soro-aglutinação, EVANS & MAITLAND<sup>26, 27</sup> (1939) verificaram que esta prova torna-se positiva também na 3.<sup>a</sup> semana de doença; por outro lado, concluíram que a prova de aglutinação se mostrou mais sensível do que a de FC'.

WINTER<sup>63</sup> (1953) de 50 casos de coqueluche positivos ao exame bacteriológico, observou elevação do título de aglutininas em 31 (62%).

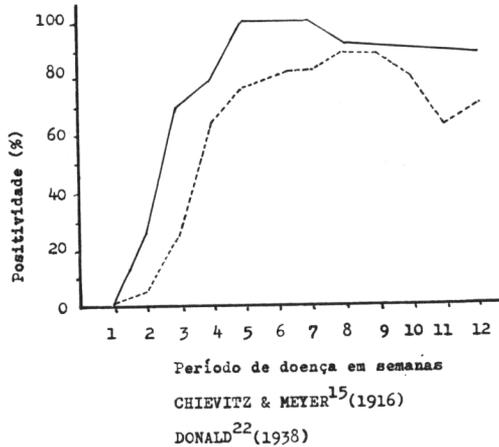


Fig. — Positividade da prova de fixação de complemento obtida por CHIEVITZ & MEYER<sup>15</sup> (1916) e DONALD<sup>22</sup> (1938), em soros de doentes com coqueluche, segundo o período de doença em semanas.

Mais recentemente na Escócia, CRUICKSHANK et al.<sup>20</sup>, (1970) compararam os resultados das provas de aglutinação e de FC e concluíram, da sua pesquisa, que há uma boa correlação nos resultados obtidos por ambas as provas. Observaram, no entanto, que nos casos em que se isolou a *B. pertussis*, a prova de FC' parece ter se revelado mais sensível que a de aglutinação.

Em nosso estudo, dos 155 casos que foram internados, foi possível obter duas amostras de sangue de 46 doentes, a fim de serem realizadas as provas sorológicas. Dos demais casos, colheu-se, de cada doente, somente a primeira amostra de sangue e não se pôde coletar a segunda, pois os pacientes não compareceram ao hospital na data marcada para o retorno, ou seja, um mês após a obtenção da primeira amostra.

Foi baseado nos estudos de CHIEVITZ & MEYER<sup>15</sup> (1916) e de DONALD<sup>22</sup> (1938) que elegemos o intervalo de um mês para a coleta das duas amostras de sangue.

CRUICKSHANK et al.<sup>20</sup> (1970) o fizeram com intervalo de 14 dias. PRESTON<sup>51</sup> (1970) recomenda a coleta da primeira amostra de sangue em época a mais próxima do início da doença e, a segunda amostra, cerca de seis semanas após.

Nas amostras de soro dos 46 pacientes por nós estudados, realizamos as provas de FC' e de aglutinação para *B. pertussis* e de aglutinação para *B. parapertussis*.

Pelas provas sorológicas, apenas um caso apresentou elevação do título de anticorpos contra *B. parapertussis*, mas revelou, também, níveis de igual teor de anticorpos para *B. pertussis*. Esta infecção poderia, assim, ter sido devida à *B. pertussis*, a mais comum, tendo ocorrido, provavelmente, uma positividade sorológica cruzada (Tabela 6).

Na mesma Tabela, podemos verificar, ainda, que a reação de FC' apresentou sensibilidade maior que a de aglutinação, principalmente nos casos em que se isolou a *B. pertussis*, levando-se em conta a elevação do nível de anticorpos. Embora CRUICKSHANK et al.<sup>20</sup> (1970) tenham feito observação semelhante, no nosso estudo não nos foi possível tirar conclusões a respeito, dado ser pequeno o número de casos examinados.

É importante salientar que de 13 casos referidos como de 1.ª semana de doença, 10 possuíam anticorpos em níveis dosáveis, já na primeira amostra de soro. Destes, um foi positivo na prova de aglutinação e 5 na de FC' e 4 em ambas as provas. A presença de anticorpos circulantes contra a *B. pertussis* nestes pacientes, pode ser devida a vacinação anterior, parcial ou completa, a infecções prévias por essa bactéria, na forma clínica ou sub-clínica, com sintomatologia típica ou atípica. Por outro lado, pode-

riam estar não na primeira semana de doença, mas sim num estágio mais avançado.

Analisando a Tabela 7, verificamos que dos 46 casos estudados bacteriológica e sorologicamente, 36 (78,3%) tiveram o diagnóstico de coqueluche confirmado clinicamente e 10 (21,7%) não confirmado. No laboratório, através dos exames bacteriológico e sorológico, dos 46 casos, 28 (60,9%) foram diagnosticados como sendo de coqueluche e 18 (39,1%) apresentaram resultados negativos.

Dos 36 casos confirmados clinicamente, foram diagnosticados laboratorialmente, através do isolamento de *B. pertussis* e/ou provas sorológicas de aglutinação e/ou de FC', 26 (61,1%). Dos 10, cujo diagnóstico não foi confirmado clinicamente, 6 (60%) revelaram-se positivos pelas provas sorológicas. Aplicado o teste estatístico de MACNEMAR<sup>45</sup> (1960), observou-se que a diferença entre a positividade do diagnóstico clínico e a dos exames bacteriológico e/ou sorológico, levando-se em conta as discordâncias (Tabela 7), não foi significativa ao nível de 5%. Entretanto, salientamos que dos 36 casos confirmados clinicamente como sendo de coqueluche, 14 (38,9%) mostraram-se negativos nos exames bacteriológico e sorológico; dos 10 doentes que tiveram também o diagnóstico inicial de coqueluche, o qual não foi confirmado clinicamente, 6 (60,0%) foram positivos pelos exames sorológicos. Estas observações revelam a importância das provas bacteriológica e sorológica no diagnóstico de coqueluche, pois, houve casos em que a confirmação diagnóstica foi obtida apenas através das provas de laboratório, no caso, as sorológicas.

Devemos salientar, no entanto, que essas provas laboratoriais, apresentam

algumas limitações. Com relação ao isolamento da *B. pertussis*, é sabido que os resultados podem ser obtidos já após dois a três dias, ou após um período de tempo maior. Segundo LAUTROP<sup>40</sup> (1960), devem ser realizados exames de pelo menos três amostras consecutivas de material, para se considerar o resultado como sendo negativo. Uma outra limitação é a fase da doença, relativamente ao isolamento da *B. pertussis*. Em nosso estudo já referimos que cerca de 80% dos casos examinados apresentavam-se na fase espasmódica, na qual a positividade ao isolamento de *B. pertussis* é mais baixa. Nestes casos, em que a doença se apresenta já em fases mais avançadas, as provas sorológicas podem ter grande valor diagnóstico, medindo-se a elevação do título de anticorpos circulantes específicos. No entanto, às vezes pode haver dificuldade quanto a interpretação dos resultados. LAUTROP<sup>40</sup> (1960) comenta a esse respeito que, na maioria das vezes, os anticorpos aparecem na 3.<sup>a</sup> e 4.<sup>a</sup> semanas de doença, atingem o nível máximo na 7.<sup>a</sup> e 8.<sup>a</sup> semanas, o qual depois diminui. Nesta fase de declínio, pode haver nova elevação do título de anticorpos circulantes contra a *B. pertussis*, devida a estímulos inespecíficos decorrentes, por exemplo, de infecções por outros agentes.

Na presente investigação, pareceu-nos conduta mais acertada, considerar a positividade sorológica, apenas quando houve elevação de título de anticorpos de pelo menos 4 vezes. Isto porque, não está estabelecido um nível mínimo de anticorpos circulantes, de valor diagnóstico, o qual poderia ser determinado em uma única amostra de soro do doente, colhida em época adequada. Em qualquer região, porém, onde seja extensiva a prática da vacinação contra a coqueluche, a presença de anticorpos no soro do doente, observada através de uma única

determinação, poderia representar tanto infecção presente, como infecção ou imunização anteriores.

Em nossa pesquisa, apesar de ser sabido que o nível de anticorpos decresce após a 7.<sup>a</sup> semana de doença, indivíduos que se apresentavam na 8.<sup>a</sup> semana ou mais, mostraram ainda elevação dos títulos de anticorpos contra a coqueluche. Houve casos, mesmo, em que a segunda coleta do sangue ocorreu na 13.<sup>a</sup> e 14.<sup>a</sup> semanas de doença e ainda assim observamos aumento dos títulos de anticorpos contra a *B. pertussis*.

Apesar das limitações apresentadas, relativas aos exames bacteriológico e sorológico, na coqueluche, estes devem ser realizados, pois os seus resultados são importantes, não só para os clínicos, mas também à Saúde Pública.

Como já foi referido, segundo observações mais recentes, pode haver casos apresentando sintomatologia de coqueluche, devidos a infecções por adenovírus (CHANY et al.<sup>14</sup>, 1958; FABER & VAWTER<sup>28</sup>, 1961; OLSON et al.<sup>40</sup>, 1964; COLLIER et al.<sup>16</sup>, 1966 e CONNOR<sup>17</sup>, 1970). Em vista disto, embora não fosse um dos nossos objetivos, no presente estudo, resolvemos determinar nas amostras de soro dos 46 casos referidos, o título de anticorpos fixadores de complemento contra adenovírus. Nestas dosagens, empregou-se a técnica de BRADSTREET & TAYLOR<sup>9</sup> (1962) modificada, usada por CANDEIAS<sup>12</sup> (1968). Verificou-se que dos 46 casos, 7 (15,2%) apresentaram elevação do nível de anticorpos FC' somente contra adenovírus, 9 (19,6%) contra adenovírus e *B. pertussis*, nesta última pelas provas de aglutinação e/ou FC' e 16 (34,8%), unicamente contra a *B. pertussis*; 14 casos (30,4%) não revelaram aumento do título de anticorpos contra ambos os agentes.

Dos 16 casos em que se observou a elevação do nível de anticorpos FC' contra adenovírus, isolou-se de dois a *B. pertussis* e nestes casos o diagnóstico clínico de coqueluche foi também confirmado. Dos 4 restantes, não se isolou a *B. pertussis* e destes, 7 revelaram elevação do título circulante de anticorpos, unicamente contra *B. pertussis* e 7 somente contra adenovírus. Nestes dois grupos verificou-se nos prontuários que a confirmação clínica do diagnóstico de coqueluche foi, respectivamente, de 85,7%, ou seja, em 6 casos cada.

Entretanto, dado o fato de não ter sido examinado um grupo controle, não nos é possível tirar conclusões sobre a participação de adenovírus no desencadeamento da sintomatologia de coqueluche, apresentada pelos doentes estudados.

## 5. CONCLUSÕES

Segundo os resultados obtidos na presente investigação e de acordo com a discussão por nós desenvolvida, acreditamos ter contribuído com algumas informações a respeito da coqueluche em nosso meio, sintetizadas nas conclusões que passaremos a enumerar:

1. De 255 crianças apresentando sintomas de coqueluche, isolou-se a *B. pertussis* de 55 (21,6%). Não foram isoladas estirpes das outras espécies de bactérias do gênero *Bordetella*, ou sejam, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*.

2. De 129 doentes cujo diagnóstico de coqueluche foi confirmado clinicamente, a positividade do isolamento de *B. pertussis* foi de 20,2% (26 casos). Dentre os pacientes referidos como se encontrando na primeira semana de doença, a positividade foi de 40%, depois decresceu, atingindo 5,6% nos casos já na quinta ou mais semanas. De 26 casos não confirma-

dos clinicamente, como sendo de coqueluche, isolou-se a *B. pertussis* de dois (7,7%), dos que foram referidos como estando na primeira semana de doença.

3. Dos 46 casos estudados bacteriológica e sorologicamente, 36 (78,3%) tiveram o diagnóstico confirmado clinicamente. Destes, 22 (61,1%) revelaram resultados positivos nos exames bacteriológico e/ou sorológico. Nos 10 casos (21,7%) restantes, o diagnóstico inicial de coqueluche não foi confirmado clinicamente, porém, 6 (60,0%) deles revelaram elevação do nível de anticorpos contra a *B. pertussis*, através das provas sorológicas. Portanto, dos 46 doentes, através do exame bacteriológico e/ou das provas sorológicas, de fixação de complemento e de aglutinação, foram diagnosticados como sendo de coqueluche, 28 casos (60,9%).

4. Dos 46 doentes, cujos soros foram submetidos a provas sorológicas, 14 casos (30,4%) revelaram elevação do nível de anticorpos na prova de aglutinação e 19 (41,3%) na de fixação de complemento. Oito casos (17,4%) foram positivos em ambas as provas; 6 (13,0%), somente na de aglutinação e 11 (23,9%), unicamente na de fixação de complemento. Estas observações sugerem que a reação de fixação de complemento foi mais sensível que a de aglutinação.

5. Os exames bacteriológico e sorológico mostraram-se elementos muito importantes no diagnóstico da coqueluche, pois, através deles, confirmaram-se, como sendo desta doença, casos suspeitos que não haviam sido confirmados clinicamente. Quanto às provas sorológicas, acreditamos ser conveniente o emprego concomitante da prova de aglutinação e de fixação de complemento. Note-se que pelas nossas observações, se tivéssemos realizado apenas a prova de fixação de complemento, teríamos obtido 19 casos

---

IARIA, S. T. — Isolamento de bactérias do gênero *Bordetella* e provas sorológicas, a partir de crianças com sintomas de coqueluche, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 7:409-32, 1973.

---

positivos, ao passo que o emprego de ambas proporcionou a evidência de 25 casos.

#### 6. AGRADECIMENTOS

A todos que colaboraram, direta ou indiretamente na realização desta pesquisa.

RSPU-B/194

---

IARIA, S. T. — [Isolation of bacteria of genus *Bordetella* and serological studies in Brazilian children with symptoms of whooping-cough]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 7:409-32, 1973.

**SUMMARY:** *Cultures from cough plates and swabs were performed in 255 children with whooping-cough symptoms, hospitalized at "Hospital de Isolamento Emílio Ribas" in S. Paulo. Complement fixation and agglutination tests for Bordetella pertussis, agglutination tests for B. parapertussis and complement fixation test for adenovirus were performed in 46 children, using two blood samples taken one month apart; the isolation results for bacteria of genus Bordetella were correlated to the period of illness, some of the major symptoms and the clinical diagnosis. A discussion of the efficiency and limitations of both bacteriological and serological tests in the laboratory diagnosis is presented.*

**UNITERMS:** *Whooping-cough\*; Laboratory, diagnosis\*; Bordetella, isolation\*; Serology (complement fixation and agglutination tests).*

---

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARROS F.º, S. D. — Coqueluche: aspectos e observações no Rio de Janeiro, *Arq. Hig.*, Rio de Janeiro, 24:7-105, 1968.
2. BASTOS, C. O. — Coqueluche. In: VERONESI, R. ed. *Doenças infecciosas e parasitárias*. 4.ª ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara-Koogan, 1969, p. 416-23.
3. BORDET, J. & GENGOU, O. — Le microbe de la coqueluche. *Ann. Inst. Pasteur*, 20:731-41, 1906.
4. BORDET, J. & GENGOU, O. — Note complémentaire sur le microbe de la coqueluche. *Ann. Inst. Pasteur*, 21:720-6, 1907.
5. BRADFORD, W. L. & BROOKS, A. M. — Cultures of material from the nasopharynx of patients with pertussis. *Amer. J. Dis. Child.*, 62:436, 1941.
6. BRADFORD, W. L. et al. — Improvement of the nasopharyngeal swab methods diagnosis in the pertussis by the use of penicillin. *Amer. J. publ. Hlth*, 36:468-70, 1946.
7. BRADFORD, W. L. & SLAVIN, B. — An organism resembling *Hemophilus pertussis* with special reference to color change produced by its growth upon certain media. *Amer. J. publ. Hlth*, 27:1277-82, 1937.
8. BRADFORD, W. L. & SLAVIN, B. — Nasopharyngeal cultures pertussis. *Proc. Soc. exp. Biol.* New York, 43:590-3, 1940.
9. BRADSTREET, C. M. P. & TAYLOR, C. E. D. — Technique of complement-fixation test applicable to the diagnosis of virus diseases. *Mth Bull. Minist. Hlth Lab. Serv.*, 21:96-104, 1962.

---

IARIA, S. T. — Isolamento de bactérias do gênero *Bordetella* e provas sorológicas, a partir de crianças com sintomas de coqueluche, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 7:409-32, 1973.

---

10. BREED, R. S. et al. — *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1957, p. 402-3.
11. BROWN, H. — *Bacillus bronchisepticus* infections in a child with symptoms of pertussis. *Bull. Johns Hopk. Hosp.*, 38:147-57, 1926.
12. CANDEIAS, J. A. N. — Anticorpos fixadores de complemento para o vírus respiratório sincicial e adenovirus e inibidores da hemaglutinação para o vírus parainfluenza 1, 2 e 3 numa população infantil brasileira. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 2:44-67, 1968.
13. CHANG, S. M. — Pertussis due to *Brucella bronchoseptica*. *Pediatrics*, 6:227-8, 1950.
14. CHANY, C. et al. — Severe and fatal pneumonia in infants and young children associated with adenovirus infections. *Amer. J. Hyg.* 67:367-78, 1958.
15. CHIEVITZ & MEYER, A. H. — Recherches sur la coqueluche. *Ann. Inst. Pasteur*, 30:503-24, 1916.
16. COLLIER, A. M. et al. — Generalized type 5 adenovirus infections associated with the pertussis syndrome. *J. Pediat.*, 69:1073-8, 1966.
17. CONNOR, J. D. — Evidence for an etiologic role of adenoviral infection in pertussis syndrome. *New Engl. J. Med.*, 283:390-4, 1970.
18. CORREA, A. et al. — Pesquisa de casos de paracoqueluche entre crianças residentes em habitação coletiva da cidade de São Paulo. *Rev. med. IAMSPE*, 1:6-8, 1970.
19. CRUICKSHANK, R. — Postnasal swab in diagnosis of pertussis. *Lancet*, 1:176-7, 1944.
20. CRUICKSHANK, R. et al. — Diagnosis of whooping-cough: comparison of serological tests with isolation of *B. pertussis*. *Brit. med. J.*, 4:637-9, 1970.
21. CUNHA, R. — Contribuição ao estudo bacteriológico da coqueluche, *Hospital*, Rio de Janeiro, 23:117-45, 1943.
22. DONALD, A. B. — The diagnosis of whooping-cough. *Brit. med. J.*, 2:613-8, 1938.
23. ELDERING, G. & KENDRICK, P. — *Bacillus parapertussis*: a species resembling both *Bacillus pertussis* and *Bacillus bronchisepticus* but identical with neither. *J. Bact.*, 35:561-72, 1938.
24. ELDERING, G. & KENDRICK, P. — Incidence of parapertussis in the Grand Rapids Area as indicated by 16 years experience with diagnostic cultures. *Amer. J. publ. Hlth*, 42:27-31, 1952.
25. ESMINGER, P. W. — Pigment production by *Haemophilus parapertussis*. *J. Bact.*, 65:509-10, 1953.
26. EVANS, D. G. & MAITLAND, H. B. — The failure of whooping-cough sera to neutralise pertussis toxin. *J. Path. Bact.*, 48:465-7, 1939.
27. EVANS, D. G. & MAITLAND, H. B. — Agglutinations as a diagnostic test for whooping-cough. *J. Path. Bact.*, 48: 468-70, 1939.
28. FARBER, S. & VAWTER, G. F. — Clinical pathological conference. *J. Pediat.*, 58:876-82, 1961.
29. FRAWLEY, J. M. — A study of the virus factor in whooping-cough. *J. Pediat.*, 16:18-9, 1940.
30. GARDNER, A. D. & LESLIE, P. H. — Early diagnosis of whooping-cough by the droplet method. With a note on vaccines and their use. *Lancet*, 1:9-12, 1932.
31. GUNDEL, M. & SCHLUTER, W. — Die serologie des keuchhustens. *Z. Immun. Forsh*, 81:218-51, 1933/34.
32. KENDRICK, P. et al. — Mouse protection test in the study of pertussis vaccine. *Amer. J. publ. Hlth*, 30:803-10, 1947.
33. KENDRICK, P. et al. — Whoopingcough. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Diagnostic procedures and reagents*. 4th ed. New York, 1963. p. 398-413.

---

IARIA, S. T. — Isolamento de bactérias do gênero *Bordetella* e provas sorológicas, a partir de crianças com sintomas de coqueluche, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 7:409-32, 1973.

---

34. KENDRICK, P. & ELDERING, G. — Cough plate examinations for *B. pertussis*. *Amer. J. publ. Hlth*, 24:309-18, 1934.
35. KENDRICK, P. & ELDERING, G. — Significance of bacteriological methods in the diagnosis and control of whooping-cough. *Amer. J. publ. Hlth*, 25:147-55, 1935.
36. KENDRICK, P. et al. — Fluorescent antibody techniques (methods for identifications for *Bordetella pertussis*). *Amer. J. Dis. Child.*, 101:149-54, 1961.
37. KENDRICK, P. et al. — *Hemophilus pertussis*. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — *Diagnostic procedures and reagents*. 3rd ed. New York, 1950. p. 136-55.
38. KRISTENSEN, B. — Occurrence of Bordet-Gengou bacillus. *J. Amer. med. Ass.*, 101:204-6, 1933.
39. LACEY, B. W. — A new selective medium for *Hemophilus pertussis*, containing a diamidine, sodium fluoride and penicilin. *J. Hyg.*, 52:271-303, 1954.
40. LAUTROP, H. — Laboratory diagnosis of whooping-cough or *Bordetella* infections. *Bull. Wld Hlth Org.* 23:15-31, 1960.
41. LIMA, C. — Diagnóstico e vacinoterapia da coqueluche. *An. paul. Med. Cirug.*, 24:95-8, 1932.
42. McCORDOCK, H. A. — Intracellular inclusions in pertussis. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 29:1288-91, 1931/32.
43. MACDONALD, H. & MACDONALD, E. J. — Experimental pertussis. *J. infect. Dis.*, 53:328-30, 1933.
44. MACLEAN, I. H. — A modification of the coughplate method of diagnosis in whooping-cough. *J. Path. Bact.*, 45:472-3, 1937.
45. MACNEMAR, Q. — *Psychological statistics*. 2nd ed. New York, Wiley, 1960.
46. MEDICAL RESEARCH COUNCIL. — The prevention of whooping-cough by vaccination. *Brit. med. J.*, 2:1463-70, 1951.
47. MILLER JR., J. J. et al. — Comparison of whooping-cough and pertussis carriers. *Amer. J. publ. Hlth*, 33:839-43, 1943.
48. NELSON, J. D. — Whooping-cough — viral or bacterial disease? *New Engl. J. Med.*, 283:428-9, 1970.
49. OLSON, L. C. et al. — Acute infections lymphocytosis presenting as a pertussis-like illness: its association with adenovirus type 12. *Lancet*, 1:200-1, 1964.
50. PEREIRA, M. S. & CANDEIAS, J. A. N. — The association of viruses with clinical pertussis, 1971. *J. Hyg. Camb.* 69:399-403, 1971.
51. PRESTON, N. W. — Pertussis agglutinins in the child. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PERTUSSIS, 25th, Bilthoven, 1969. *Proceedings*. München, S. Karger, 1970. p. 121-5. (Symposia Series Immunobiological Standardization, v. 13).
52. PRESTON, N. W. & Te PUNGA, W. A. — The relation between agglutinin production by pertussis vaccines and their immunising potency imoce. *J. Path. Bact.*, 78:209-16, 1959.
53. PRICE, I. N. O. — The gonococcal fixation test: further improvements in technique resulting in increased sensitivity. *J. Path. Bact.*, 35:635-6, 1932.
54. RICH, A. R. et al. — Experiments upon the cause of whooping-cough. *Science*, 76:330-1, 1932.
55. RICHARDSON, G. M. — Preservation of liquid complement serum. *Lancet*, 2:696-7, 1941.
56. SAITO, T. M. et al. — The nasopharyngeal swab in the diagnosis of pertussis. *Amer. J. publ. Hlth*, 32:471-4, 1942.
57. SAUER, L. W. & HAMBRECHT, E. — Experimental whooping-cough. *Amer. J. Dis. Child.*, 37:732-44, 1929.
58. SILVERTHORNE, N. & FRASER, D. T. — The bacteriological diagnosis of whooping-cough. *Canad. med. Ass. J.*, 32:367-70, 1935.
59. STRAKER, E. A. & WESTWATER, J. S. — The bacterial diagnosis of whooping-cough. *Lancet*, 2:565-7, 1937.

---

IARIA, S. T. — Isolamento de bactérias do gênero *Bordetella* e provas sorológicas, a partir de crianças com sintomas de coqueluche, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 7:409-32, 1973.

---

60. UBATUBA, A. — Bacteriologia da coqueluche. Identificação das bordetelas isoladas de crianças no Rio de Janeiro. *Hospital*, Rio de Janeiro, 75:105-15, 1969.
61. VYSOKA — BURIANOVA, B. et al. — Experiences with a new combined vaccine against *B. parapertussis*, diphtheria, tetanus and *B. pertussis* employed in a field trial in Prague 10. *J. Hyg. Epidem.* Prague 14:481-7, 1970.
62. WINHOLT, W. — Complement fixation in whooping-cough. *J. infect. Dis.* 16:389-98, 1915.
63. WINTER, J. L. — Development of antibodies in children convalescent from whooping-cough. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 83:866-70, 1953.

*Recebido para publicação em 17-9-1973*

*Aprovado para publicação em 9-10-1973*