



Identificação laboratorial da coqueluche na região do oeste do Estado de São Paulo

Laboratory identification of pertussis in the western region of São Paulo State, Brazil

RIALA6/1741

Carolina Yumi GUSHIKEN¹, Erika Kushikawa SAEKI^{1*}, Luciano Moura MARTINS², Juliana Cristina PEREIRA², Daniela LEITE²

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente, Av. Cel José S. Marcondes, 2357, Jd. Paulistano, Presidente Prudente, SP, Brasil, CEP: 19013-050. Tel: 18 3221 1449. E-mail: erikaksaeki@gmail.com

²Centro de Referência Nacional para Pertussis - Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 02.01.2018 - Aceito para publicação: 08.06.2018

RESUMO

O objetivo deste estudo foi de confirmar laboratorialmente os casos suspeitos de coqueluche na região oeste do Estado de São Paulo, ocorridos entre 2010 a 2015. A cultura foi realizada no Centro de Laboratório Regional - Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente e a PCR em tempo real (qPCR) foi realizada no Centro de Referência Nacional para Pertussis - Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, SP. Foram recebidas 189 amostras, sendo 29 (15,3%) confirmadas segundo os critérios laboratoriais (cultura e/ou qPCR). A faixa etária mais acometida foi em crianças menores de seis meses de idade (82,8%), não vacinados ou com o esquema de vacinação incompleto. Provavelmente, estes resultados representam apenas uma fração do número real de casos de coqueluche que ocorrem no Brasil. O contínuo monitoramento da doença e informações da prevalência por faixa etária são importantes ferramentas para melhorar as estratégias de imunização como forma de controlar esta doença reemergente.

Palavras-chave. *Bordetella pertussis*, diagnóstico laboratorial, PCR em tempo real, coqueluche.

ABSTRACT

The aim of this study was to confirm the suspected cases of pertussis in the Western region of the Sao Paulo State from 2010 to 2015. The samples were cultured in the Instituto Adolfo Lutz - Regional Laboratory of Presidente Prudente-SP, and the qPCR was performed at the National Reference Laboratory for Pertussis - Central Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP. In this period, 189 samples were received, being 29 (15.3%) confirmed by the laboratory criteria (culture and/or qPCR). The most affected group was the children less than six months old (82.8%), not vaccinated or with the incomplete vaccination. Most likely, these results only represent a fraction of the actual number of pertussis cases occurring in Brazil. The continuous disease monitoring and the prevalence data by age group are fundamental to improve the immunization strategies as a way to control this important re-emerging disease.

Keywords. *Bordetella pertussis*, laboratory diagnosis, Real-time PCR, pertussis.

INTRODUÇÃO

A coqueluche é uma doença infecciosa causada pela *Bordetella pertussis*. A transmissão ocorre pelo contato direto com indivíduos sintomáticos, por meio de gotículas de secreção eliminadas por tosse, espirro ou durante a fala¹.

Esta doença acomete principalmente crianças menores de um ano, porém, nas últimas décadas, a faixa etária dos indivíduos afetados parece ter sido ampliada, aumentando a incidência em adolescentes e adultos^{2,3}, que são grupos potenciais de transmissão da doença em recém-nascidos e crianças. Desta forma, a identificação imediata dos pacientes com coqueluche torna-se essencial, pois a demora no diagnóstico pode resultar em início tardio do tratamento, aumentando a possibilidade de transmissão secundária da doença⁴.

O método de cultura para o isolamento de *B. pertussis* continua sendo o padrão ouro para o diagnóstico da coqueluche. Entretanto, embora o método seja altamente específico, a sua sensibilidade pode ser variável. A partir de 2010, a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foi introduzida como metodologia complementar ao diagnóstico laboratorial da coqueluche para o Estado de São Paulo. Esta técnica é uma ferramenta importante para o diagnóstico rápido, e sua alta sensibilidade (70-90%) e especificidade (86-100%), fazem da técnica um método alternativo para o diagnóstico de *B. pertussis*^{5,6}.

Com a finalidade de facilitar a imunização, em 2002, foi criado um imunobiológico combinado para o esquema básico de imunização contra a coqueluche (três doses), a vacina tetravalente contendo Tríplice Bacteriana e *Haemophilus influenzae* b (DTP + Hib)⁷. Após 10 anos, este esquema básico foi substituído para três doses de pentavalente: difteria, tétano, pertussis, hepatite B e *Haemophilus influenzae* b (DTP + Hib + Hepatite B) aos 2, 4 e 6 meses de idade, com primeiro reforço aos 15 meses e o segundo com 4 anos de idade, conforme preconizado pela Portaria nº 1.498, de 19 de julho de 2013⁸.

O objetivo deste trabalho foi confirmar laboratorialmente pelas técnicas de cultura e qPCR os casos suspeitos de coqueluche na região oeste do Estado de São Paulo no período de 2010 e 2015.

MÉTODOS

Este estudo retrospectivo foi realizado através da análise dos resultados de pacientes com suspeita de coqueluche e notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), atendidos em 45 municípios pertencentes ao Departamento Regional de Saúde - DRS XI, localizados na região oeste do Estado de São Paulo, no período de Janeiro de 2010 a Dezembro de 2015. Neste período foram coletadas amostras de nasofaringe de acordo com a definição de caso suspeito recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil^{9,10}.

Isolamento e identificação de *B. pertussis*

A coleta das amostras foi realizada com *swabs* ultrafinos, flexíveis, estéreis e alginatados e transportadas ao Centro de Laboratório Regional de Presidente Pudente (CLR IAL-PP-V) em ágar Regan Lowe (RL) semi-sólido (Oxoid), suplementado com 10% de sangue desfibrinado, estéril, de carneiro ou cavalo e cefalexina.

As amostras de secreção de nasofaringe foram semeadas no mesmo dia da coleta em placas de Petri contendo o meio RL sólido, suplementado com cefalexina e sangue desfibrinado, estéril, de carneiro ou cavalo. As placas foram incubadas em atmosfera úmida a 35-37 °C por até 10 dias.

As amostras que apresentaram crescimento a partir do terceiro ou quarto dia de incubação, com colônias sugestivas de pertencerem ao gênero *Bordetella* foram submetidas à coloração de Gram e a caracterização bioquímica e antigênica previamente descritas¹¹.

PCR em tempo real – qPCR

Após a semeadura os *swabs* foram transferidos para um tubo de ensaio estéril seco, e mantidos em freezer a -20 °C para posterior encaminhamento ao Instituto Adolfo Lutz – São Paulo (IAL) para realização da qPCR.

A extração do DNA foi realizada empregando-se o kit-I para isolamento e purificação de DNA genômico (Roche AppliedScience, Indianapolis, IN) no extrator automático da Roche MagNa Pure LC, seguindo as instruções sugeridas pelo fabricante.

O método de qPCR utilizado foi o proposto por Leite et al⁶. As reações de amplificação do material

genômico foram realizadas utilizando o Termociclador LightCycler®480 Software Release 1.5.0 sp3 - Roche® incluindo primers e probes específicos para a detecção do gene da toxina pertussis, *ptxS1* (GenBank nº AJ920066), e a sequência de inserção IS481 (GenBank acesso nº M22031).

Análise dos dados

Os dados dos resultados laboratoriais foram obtidos do Sistema Informatizado de Gestão (SIGH) do CLR IAL-PP-V na forma de relatórios anuais em planilhas do programa Microsoft Excel® 2007.

Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Conselho Técnico Científico do IAL (CTC-IAL 20-I/2016) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CAAE: 58193216.1.0000.0059).

RESULTADOS

No período do estudo foram analisadas 189 amostras de pacientes suspeitos de coqueluche de 45 municípios. Destes, 29 (15,3%) foram confirmados como *B. pertussis* segundo os critérios laboratoriais estabelecidos: a qPCR detectou 28 (14,8%) amostras, a cultura 13 (6,9%) e qPCR e cultura detectaram 29 (15,3%) amostras simultaneamente.

Conforme a Tabela 1, nos anos de 2010 e 2012 não houve amostras positivas. Nos anos de 2011, 2013, 2014 e 2015, houve positividade para coqueluche em 3, 6, 11 e 9 amostras, respectivamente.

A faixa etária mais acometida por coqueluche foram crianças menores de seis meses de idade (82,8%; 24/29). Em crianças entre seis meses a um ano, um caso (3,4%; 1/29) e entre 2 a 15 anos foram confirmados quatro casos (13,8%; 4/29); não havendo nenhuma positividade em pacientes acima de 15 anos (0%).

Quanto ao gênero dos indivíduos, o diagnóstico positivo de coqueluche foi maior para o sexo masculino (55,2%; 16/29) em relação ao sexo feminino (44,8%; 13/29) do total de casos positivos.

Tabela 1. Número de casos suspeitos por ano e total de amostras positivas para *B. pertussis* pela técnica de cultura e/ou qPCR no período de 2010 à 2015, região oeste do Estado de São Paulo

Ano	Suspeitos	Positividade	
		Cultura e/ou qPCR	%
2010	2	0	0
2011	6	3	50,0
2012	2	0	0
2013	55	6	11,0
2014	67	11	16,4
2015	57	9	15,8
TOTAL	189	29	15,3

qPCR: teste de reação em cadeia da polimerase em tempo real

Tabela 2. Distribuição etária e resultados da cultura e/ou qPCR em pacientes com suspeita de infecção por *B. pertussis*

Idade	Cultura e/ou qPCR		Total
	Negativo	Positivo	
≤ 6 meses	78	24	102
6 meses - 1 ano	15	1	16
2 à 15 anos	32	4	36
>15 anos	35	0	35
Total	160	29	189

qPCR: teste de reação em cadeia da polimerase em tempo real

DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado um aumento na investigação de casos suspeitos e notificação da coqueluche a partir do ano de 2013; sendo o ano de 2014 com mais casos suspeitos e positivos. Esta doença é considerada reemergente e apresenta surtos epidêmicos a cada três a cinco anos.

Segundo dados do Grupo de Vigilância Epidemiológica, no ano de 2011, houve um grande aumento no número de casos de coqueluche no Brasil. As hipóteses para a reemergência são: perda da imunidade adquirida após a vacina ou infecção natural, diminuição da eficácia da vacina; mudança genética bacteriana, melhoria no diagnóstico, como por exemplo, a implementação da qPCR; ou melhoria no sistema de Vigilância

Epidemiológica em capacitar os profissionais da saúde em identificar novos casos de coqueluche^{12,13}.

O aumento da sua prevalência tem sido relatado nos últimos anos em outros países^{15,16} e inclusive no Brasil^{12,16}.

Durante o período avaliado, houve 15,3% de positividade nas 189 amostras suspeitas para coqueluche. Estudos realizados entre 2001 a 2005 por Oliveira e Silva et al¹⁸ constataram que a região de Presidente Prudente não apresentou amostras positivas para *B. pertussis*.

Almeida et al¹⁷ e Oliveira e Silva et al¹⁸, reportaram uma positividade de 7,1% e 9,4%, respectivamente no estado de São Paulo, provavelmente devido a não realização da técnica de qPCR no período avaliado.

Estudo realizado por Torres et al¹⁹ no estado do Paraná entre 2007-2013, reportou 35,0% de positividade para *B. pertussis*. Guimarães et al¹² relataram que no Brasil, no período de 2007-2014, houve 32% de casos positivos de coqueluche.

O diagnóstico da coqueluche pela cultura em ágar carvão denominado Regan e Lowe (RL) é considerado um método altamente específico, porém com uma sensibilidade variável. A implementação da técnica de qPCR tem auxiliado na detecção da doença, podendo identificar o DNA da bactéria com maior rapidez, uma alta sensibilidade e especificidade (>95%)²⁰. Neste estudo, evidenciou-se uma maior positividade pela técnica de qPCR quando comparado com a cultura bacteriológica, uma vez que a técnica molecular identifica o DNA da cepa bacteriana, não precisando esta estar viável para sua detecção²¹.

Os resultados do presente estudo reforçam a importância do trabalho da Vigilância Epidemiológica Estadual e Municipal na capacitação e conscientização dos profissionais de saúde para realização do diagnóstico da coqueluche, pois esta doença tem como dificuldade a sua identificação clínica, tendo em vista que seu quadro clínico se assemelha a outras doenças respiratórias agudas virais ou bacterianas.

Observou-se que a faixa etária mais acometida foi entre os lactentes de até seis meses de idade (82,8%; 24/29). Estes dados corroboram com Almeida et al¹⁷ que obtiveram 81,5% na mesma faixa etária. Guimarães et al¹² e Bellettini et al²

encontraram dados inferiores, sendo respectivamente 71,7% e 51,5% de casos entre lactentes de até seis meses de idade. Nesta idade os bebês não estão com o calendário vacinal completo, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde, ficando mais suscetíveis à doença. Além disso, uma das principais fontes de infecção da coqueluche em lactentes (principalmente em bebês) é através da exposição de pessoas infectadas, sem serem diagnosticadas, na comunidade. Outro fator é o contato de pessoas próximas com a doença, principalmente a mãe, ou pessoas que residem na mesma casa ou mesmo profissionais da área da saúde^{16,22,23}.

Embora a coqueluche não tenha preferência por gênero, em nosso estudo obteve-se maior incidência no sexo masculino (55,2%; 16/29) dos casos. Santos et al²² também relatou maior positividade (54,8%;) para o sexo masculino.

Segundo o Ministério da Saúde, a cobertura vacinal considerada adequada é $\geq 95\%$ ²⁴. Constatou-se que no Sistema de Informação de Avaliação do Programa Nacional de Imunizações (SIAPI) a cobertura vacinal da tetravalente e pentavalente na região estudada, apresentaram-se acima de 95% entre 2010 e 2015. Inclusive, houve cobertura vacinal acima de 100%.

As hipóteses para esta cobertura acima de 100% podem estar relacionadas com o cálculo inexato da população de nascidos vivos (gestantes que tenham seus partos em municípios maiores e registrem um endereço de residência diferente do habitual), maior facilidade de acesso à sala de vacinação por habitantes de municípios vizinhos e mudança de população de um município para outro, visitantes ou turistas que se encontram nos respectivos municípios²⁵.

Portanto, nota-se que apesar da cobertura vacinal de tetravalente e pentavalente se apresentar acima da média estipulada entre 2010 e 2015, ainda houveram casos positivos de coqueluche na região do estudo.

As equipes de saúde têm papel fundamental no reconhecimento da coqueluche e sua notificação. Por isso, melhoria nos programas de vigilância e controle de doenças, aumento das práticas de conscientização e divulgação do agravo podem ser úteis para diminuir a incidência da doença em nosso país. A introdução da

qPCR para o diagnóstico a coqueluche foi um excelente método adicional na rotina laboratorial para a identificação de *B. pertussis*.

CONCLUSÃO

A maior positividade da doença pelo critério laboratorial foi detectada em crianças menores seis meses de idade, não vacinados ou com o esquema de vacinação incompleto. Provavelmente, esses resultados representam apenas uma fração do número real de casos de coqueluche que ocorrem no estado de São Paulo e no Brasil. O contínuo monitoramento da doença e informações da prevalência por faixa etária são importantes ferramentas para melhorar as estratégias de imunização como forma de controlar esta doença reemergente.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Aprimoramento Profissional na área da Saúde, Secretaria Estadual da Saúde (SES) – Instituto Adolfo Lutz.

Fonte de financiamento: Secretaria Estadual da Saúde (SES)

REFERÊNCIAS

1. Nobre JOC, Nunes EM, Yu ALF, Sousa MNA, Freitas TD, Medeiros RC et al. Pertussis: Incidence and Surveillance in Municipalities of 6 Regional Health Management of Paraíba, Brazil. *Int Arch Med*. 2016;9(384):1-8. <http://dx.doi.org/10.3823/2255>
2. Belletini CV, Oliveira AW, Tusset C, Baethgen FL, Amantéa SL, Motta F et al. Preditores clínicos, laboratoriais e radiográficos para infecção por *Bordetella pertussis*. *Rev Paul Pediatr*. 2014;32(4):292-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpped.2014.06.001>
3. Fathima S, Ferrato C, Lee BE, Simmonds K, Yan L, Mukhi SN et al. *Bordetella pertussis* in sporadic and outbreak settings in Alberta, Canada, July 2004 – December 2012. *BMC Infect Dis*. 2014;14:48. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-14-48>
4. Tozzi AE, Ravà L, Ciofi Degli Atti ML, Salmaso S, Progetto Pertosse Working Group. Clinical presentation of pertussis in unvaccinated and vaccinated children in the first six years of life. *Pediatrics*. 2003;112(5):1069-75. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.112.5.1069>
5. Dalby T, Andersen PH, Hoffmann S. Epidemiology of pertussis in Denmark, 1995 to 2013. *Euro Surveill*. 2016;21(36):1-8. <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.36.30334>
6. Leite D, Blanco MR, Melo LCV, Fiorio CE, Martins LM, Vaz TMI et al. Implementation and assessment of the use of Real-Time PCR in routine diagnosis for *Bordetella pertussis* detection in Brazil. *Arch Pediatr Infect Dis*. 2013;2(2):196-202. <http://dx.doi.org/10.5812/pedinfect.12505>
7. Centro de Vigilância Epidemiológica. Divisão de Imunização. Secretaria do Estado da Saúde. Informe Técnico. Vacina combinada contra DTP e Hib; 2002. [acesso 2018 Jan 02]. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/imuni/tetra_valente.pdf
8. Ministério da Saúde (BR). Portaria nº 1.498, de 19 de julho de 2013. Redefine o Calendário Nacional de Vacinação, o Calendário Nacional de Vacinação dos Povos Indígenas e as Campanhas Nacionais de Vacinação, no âmbito do Programa Nacional de Imunizações (PNI), em todo o território nacional. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 22 jul 2013. Seção1(139):31. [acesso 2018 Jan 02]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2013/prt1498_19_07_2013.html
9. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações. Informe Técnico para Implantação da Vacina Adsorvida Difteria, Tétano e Coqueluche (Pertussis Acelular) Tipo adulto – dTpa; 2014. [acesso 2018 Jan 02]. Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/junho/26/Informe-Tecnico-dTpa-2014.pdf>
10. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Manual de vigilância epidemiológica coqueluche: normas e instruções. São Paulo; 2000. [acesso 2018 Jan 02]. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/resp/manu_coque.pdf

11. Gonçalves CR, Vaz TMI, Medeiros MIC, Castro MTE, Rocha MMM, Melles CEA, Irino, K. Phenotypical and genotypical characterization of *Bordetella pertussis* strains isolated in São Paulo, Brazil, 1988-2002. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2007;49(2):123-5. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652007000200012>
12. Guimarães LM, Carneiro ELNC, Carvalho-Costa FA. Increasing incidence of pertussis in Brazil: a retrospective study using surveillance data. *BMC Infect Dis*. 2015;15(442):1-12. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1222-3>
13. Porto MA, Santos CP, Gonçalves GG, Martinato LHM, Miranda PP, Celeste RK. Análise das desigualdades socioeconômicas na cobertura da vacina contra difteria, tétano e coqueluche (DTP)/tetravalente para menores de 1 ano de idade no Rio Grande do Sul, 2000-2009. *Epidemiol Serv Saúde*. 2013;22(4):579-86. <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742013000400004>
14. Riolo MA, King AA, Rohani P. Can vaccine legacy explain the British pertussis resurgence? *Vaccine*. 2013;31(49):5903-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.09.020>
15. Matthias J, Pritchard PS, Martin SW, Dusek C, Cathey E, D'Alessio R et al. Sustained transmission of pertussis in vaccinated 1-5-year-old children in a preschool, Florida, USA. *Emerging Infectious Disease*. 2016;22(2):242-6. <http://doi.org/10.3201/eid2202.150325>
16. Berezin EN, de Moraes JC, Leite D, Carvalhanas TR, Yu AL, Blanco RM et al. Sources of Pertussis Infection in Young Babies From São Paulo State, Brazil. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33(12):1289-91. <http://doi.org/10.1097/INF.0000000000000424>
17. Almeida IAZC, Marques DF, Alves EC, Silva PM, Leite D. Coqueluche: avaliação de 10 anos de diagnóstico laboratorial na região Noroeste do Estado de São Paulo 2001-2011. *BEPA, Bol epidemiol paul*. 2011; 90:16-23. Disponível em: http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-42722011000600003&lng=pt&nrm=iss&tlng=pt
18. Oliveira e Silva RB, Lemes-Marques EG, Medeiros MIC, Almeida IAZC, Esper MRNR, Garbelotti M et al. Diagnóstico laboratorial da coqueluche: frequência do isolamento de *Bordetella pertussis* de amostras clínicas, por meio da técnica de cultura realizada nos laboratórios regionais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007;66(2):194-200. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/2000/rial66_2_completa/1128.pdf
19. Torres RSLA, Santos TZ, Torres RAA, Pereira VVG, Fávero LAF, M Filho OR et al. Resurgence of pertussis at the age of vaccination: clinical, epidemiological and molecular aspects. *J Pediatr*. 2015;91(4):333-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.09.004>
20. Qin X, Zerr DM, Kronman MP, Adler AL, Berry JE, Rich S et al. Comparison of molecular detection methods for pertussis in children during a state-wide outbreak. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016;15(28):1-7. <https://doi.org/10.1186/s12941-016-0142-4>
21. van der Zee A, Schelleken JE, Mooi FR. Laboratory Diagnosis of Pertussis. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(4):1005-26. <http://doi.org/10.1128/CMR.00031-15>
22. Santos BA, Bischoff AR, Chikota C, Silva CC, Lima NB, Agne M et al. Coqueluche em crianças menores de 3 anos de idade hospitalizadas em 2011 e 2012. *Clin Biomed Res*. 2015;35(4):227-32. <http://dx.doi.org/10.4322/2357-9730.60323>
23. Leite D, Martins LM, Fiório CE, Blanco RM, Moraes JC, Berezin EN et al. Laboratory Detection of *Bordetella pertussis*: Are the Household Contacts a Major Sources of Infection for Infants? *SM Vaccine Vaccin*. 2015;1(3):1012.
24. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Imunizações: aspectos históricos dos calendários de vacinação e avanços dos indicadores de coberturas vacinais de 1980 a 2013. *Boletim Epidemiológico*. 2015; 46(30):1-13. Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/outubro/14/besvs-pni-v46-n30.pdf>
25. Nora TTD, Paz AA, Linch GFC, Pelegrini AHW, Wachter MZD. Situação da cobertura vacinal de imunobiológicos no período de 2009-2014. *Rev Enferm UFSM*. 2016;6(4):482-93. <http://dx.doi.org/10.5902/2179769221605>