

ARTIGO ORIGINAL / ORIGINAL ARTICLE

Tosse convulsa – pesquisa e identificação de DNA de *Bordetella* – estudo retrospectivo

Whooping cough – identification of *Bordetella* DNA – retrospective study

/ A. Carmo¹ / A. Maresch¹ / L. Correia²
/ G. Marques¹ / L. Araújo¹ / H. Pereira²
/ F. Rodrigues¹

¹ Serviço de Patologia Clínica - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal;

² Laboratório de Biologia Molecular, Polo HP - Serviço de Patologia Clínica - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal.

Correspondência:

Henriqueta Pereira

Laboratório de Biologia Molecular, Polo HP

Hospital Pediátrico de Coimbra,

Coimbra, Portugal

Email: henriquetapereira@chuc.min-saude.pt

Patrocínios:

O presente estudo não foi patrocinado por qualquer entidade.

Artigo recebido em
20/12/2017

Artigo aceite para publicação em
23/02/2018

/ Resumo

Introdução: A tosse convulsa é uma toxi-infecção respiratória causada pela bactéria *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) que continua ainda hoje a ser um problema de saúde pública relevante.

Objetivos: Determinar retrospectivamente o número de casos positivos para *B. pertussis* identificados no laboratório de Biologia Molecular, Polo HP – Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), entre setembro de 2011 e março de 2017.

Métodos: Efetuámos uma pesquisa parametrizada anonimizada, por recurso ao *middleware* disponibilizado pelo Serviço de Patologia Clínica do CHUC, que teve por base o pedido de pesquisa de *B. pertussis*, tendo sido também solicitados os seguintes dados: idade, sexo e informação clínica. Em todos os pedidos a identificação da *B. pertussis* foi efetuada por PCR em tempo real (RT-PCR) e por *nested* multiplex PCR.

Resultados: Encontrámos 153 amostras positivas para *B. pertussis* (8% dos pedidos de pesquisa e identificação). Destes casos, 31,4% foram detetados em lactentes com idade $\leq 3M$. Em 20 doentes (13,1%) com pesquisa e identificação positiva da *B. pertussis* foi solicitado hemograma. Nove dos 20 doentes apresentavam linfocitose, sendo que 8 tinham idade $\leq 2M$. Todos os doentes com linfocitose necessitaram de internamento por dificuldade respiratória.

Conclusões: O número de pedidos de pesquisa de *B. pertussis* por suspeita de tosse convulsa tem aumentado desde que o teste foi disponibilizado no nosso Serviço, no último trimestre de 2011. O número de casos positivos para *B. pertussis* tem sofrido flutuações, com picos em 2012/13 e em 2016. Os casos positivos ocorreram principalmente em pequenos lactentes. A análise dos resultados reforça a necessidade de se manter um sistema ativo de vigilância epidemiológica e de se considerar a tosse convulsa como diagnóstico diferencial na infeção respiratória dos pequenos lactentes.

Palavras-chave: tosse convulsa; *Bordetella pertussis*; pequenos lactentes

/ Abstract

Introduction: Whooping cough is a respiratory infection caused by *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) a bacteria that continues to be a relevant public health problem.

Objectives: To determine the number of positive cases for *B. pertussis* identified in the Laboratory of Molecular Biology, HP Pole – Clinical Pathology Service of the Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), between September 2011 and March 2017.

Methods: The results were collected anonymously from our laboratory middleware database considering the request of *B. pertussis*. Age, sex, diagnosis, and clinical information was also collected. Identification of *B. pertussis* was performed by real time PCR and nested multiplex PCR. Data were analyzed with SPSS software.

Results: 8% of the request for *B. pertussis* identification were positive. 31.4% of the positive cases were detected in infants aged $\leq 3M$. A blood count was required in 20 patients (13.1%) with a positive identification of *B. pertussis*. Nine of the 20 patients had lymphocytosis, 8 of whom were $\leq 2M$. All patients with lymphocytosis required hospitalization due to respiratory failure.

Conclusions: The number of requests for *B. pertussis* identification raised since the analysis became available in the last trimester of 2011. The number of positive cases for *B. pertussis* was not constant and presented 2 main peaks, one in 2012/13 and the other in 2016. The positive cases were mainly identified in infants. The analysis of the results reinforces the need to maintain an active system of epidemiological surveillance and to consider whooping cough as a differential diagnosis in the respiratory infection of young infants.

Keywords: Whooping cough, *Bordetella pertussis*, Infants

/ Introdução

A tosse convulsa é uma doença infecciosa do trato respiratório mais frequentemente causada por *Bordetella* (*B.*) *pertussis*, que tem o homem como único reservatório^{1,2}.

B. pertussis é um cocobacilo capsulado, gram negativo aeróbio pertencente ao género *Bordetella* que, para além de *B. pertussis*, é constituído por 8 espécies: *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. petrii*, e *B. ansorpii*²⁻⁴. As duas primeiras espécies, em conjunto com *B. pertussis*, são consideradas espécies clássicas e as cinco últimas são consideradas novas espécies. Relativamente a *B. parapertussis* existem duas estirpes: uma que causa infeções respiratórias no homem, com características semelhantes à infeção por *B. pertussis*; e outra que causa infeções respiratórias em ovinos^{5,6}. *B. bronchiseptica* é considerada o ancestral das espécies que infetam os mamíferos e causa infeções respiratórias em diversos mamíferos, nomeadamente gatos, cães, porcos e coelhos. No homem, apesar de a infeção por *B. bronchiseptica* ser rara, tem sido identificada em doentes que contactaram com animais infetados e em doentes imunodeprimidos, nomeadamente doentes infetados com o vírus da imunodeficiência humana, manifestando-se nestes casos como

uma pneumonia cavitada^{4,7}. Esta espécie de *Bordetella* tem a particularidade de, ao contrário da *B. pertussis* e da *B. parapertussis*, ser frequentemente resistente à eritromicina. *B. holmesii* tem sido identificada em situações de sépsis e de infeções respiratórias, manifestando-se de forma semelhante a *B. pertussis*. No entanto, os doentes são geralmente mais velhos que os afetados por *B. pertussis* e os episódios de cianose e de apneia são menos frequentes e menos intensos³. *B. avium*, *B. hinzii* e *B. petrii* foram identificadas em infeções respiratórias de aves e, ocasionalmente, em doentes imunodeprimidos com patologia pulmonar e em doentes que contactam com aves, não se conhecendo a sua contribuição nas infeções respiratórias⁴. Relativamente às espécies *B. trematum* e *B. ansorpii*, há ainda pouca informação no que concerne à sua capacidade de infetar o homem²⁻⁴.

A tosse convulsa é uma doença muito contagiosa, em que a transmissão ocorre por contacto com gotículas respiratórias da pessoa infetada. A infeção apresenta características sazonais e etárias, sendo mais frequente entre o verão e o outono, e afeta preferencialmente crianças entre os 3 e os 6 anos podendo no entanto afetar crianças de todas as faixas etárias e adultos^{1,8,9}.

B. pertussis coloniza as células ciliadas da mucosa respiratória e produz diversos fatores de virulência, nomeadamente toxina *pertussis*, toxina adenilato ciclase e adesinas como a hemaglutinina filamentososa, que alteram diversas vias de sinalização celular¹⁰⁻¹³. A toxina *pertussis* altera a via de sinalização da proteína G, contribuindo para a ativação do mecanismo da tosse paroxística, para o desenvolvimento da linfocitose e para o aumento da sensibilidade à histamina^{1,2}. A toxina adenilato ciclase é ativada pela calmodulina das células do hospedeiro, induzindo um aumento da produção do AMPc que inibe a resposta oxidativa das células fagocíticas e a atividade das células NK^{14,15}. A hemaglutinina filamentososa, em conjunto com outras adesinas, colabora no processo de adesão da bactéria ao hospedeiro e na alteração da atividade dos cílios^{14,16}.

Clinicamente, a infeção por *B. pertussis* caracteriza-se por um período de incubação de 7 a 10 dias, podendo variar de 5-21 dias. A infeção decorre em três fases: fase catarral, que se caracteriza por obstrução nasal, lacrimejo, tosse seca, sem febre ou febre baixa; fase paroxística, em que ocorre um agravamento da tosse caracterizada por paroxismos que podem acompanhar-se de cianose e que tipicamente terminam com um guincho inspiratório e vômito; fase de convalescença, em que os acessos de tosse se tornam ligeiros e menos frequentes. Pode ainda observar-se linfocitose, trombocitose, alteração da secreção de insulina, desidratação e má-nutrição no seguimento dos vômitos, ocasionalmente alterações neurológicas como confusão, convulsões, perda de consciência e recorrência dos acessos de tosse ao longo de dias a semanas após desaparecimento da infeção^{1,2,9,10,12}.

O diagnóstico da tosse convulsa é clínico, existindo no entanto vários exames laboratoriais para a sua confirmação, tais como: reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR-), serologia, imunofluorescência e cultura de amostras da nasofaringe¹⁷⁻¹⁹. Para além destes testes, a existência de linfocitose no hemograma e a observação no esfregaço de sangue periférico de linfócitos maduros, com núcleos frequentemente clivados, não sendo específicas, são sugestivas e consideradas indicadoras de gravidade e de prognóstico na infeção por *B. pertussis*^{20,21}.

De acordo com dados da OMS, anualmente existem cerca de 50 milhões de casos de tosse convulsa dos quais resultam cerca de 300 000 mortos, principalmente crianças^{8,11,18,19}. Em Portugal, de acordo com as informações divulgadas pela Direção-Geral de Saúde (DGS), entre 2012 e 2015 a maior incidência da tosse convulsa ocorreu em crianças com idade inferior a 2 meses (42% dos casos), seguida do grupo etário de 2 a 5 meses (32%), tendo os óbitos ocorrido exclusivamente em lactentes de idade inferior a 2 meses^{9,17,22}.

Considerando o aumento da incidência da tosse convulsa, realizámos um estudo retrospectivo para determinar o número de casos positivos para *B. pertussis* identificados no laboratório de Biologia Molecular, Polo HP - Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), entre setembro de 2011 e março de 2017.

/ Material e Métodos

Para determinar o número de pedidos de pesquisa de *B. Pertussis* efetuados entre setembro de 2011 e março de 2017, recorremos ao *middleware* disponibilizado pelo Serviço de Patologia Clínica do CHUC e efetuámos uma pesquisa parametrizada anonimizada que teve por base o pedido de pesquisa de *B. pertussis*, sendo em paralelo obtidos os seguintes dados: idade, sexo, serviço que solicitou o pedido e informação clínica.

A pesquisa de *B. pertussis* foi efetuada em zaragatoas nasofaríngeas enviadas ao laboratório de Biologia Molecular – Polo HP.

A metodologia utilizada para a deteção e identificação da *B. pertussis* baseou-se nas recomendações do grupo de trabalho "Coordination of activities for laboratory surveillance of whooping cough in Member States and EEA countries" criado pelo European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) que uniformizou os procedimentos laboratoriais adequados ao diagnóstico da tosse convulsa por técnicas de biologia molecular a partir de zaragatoas nasofaríngeas¹⁸.

No nosso estudo, para além da pesquisa e identificação da *B. pertussis*, foi também efetuada a pesquisa e identificação da *B. parapertussis*. Para tal, recorreu-se à técnica de RT-PCR, utilizando os sistemas Smart cycler Bp/Bpp Cepheid® e RIDA®GENE Bordetella da r-Biopharm; e à técnica de PCR, utilizando o sistema Nested Multiplex PCR, FilmArray® Respiratory Panel, Idaho Technology.

De acordo com as recomendações do fabricante de cada sistema procedeu-se ao isolamento e amplificação exponencial do DNA da *B. pertussis* e da *B. parapertussis* por recurso à técnica de PCR. As reações de PCR decorreram na presença de uma molécula fluorescente que se intercala nos produtos de PCR, originando um sinal de fluorescência diretamente proporcional à quantidade do produto amplificado, o que permite diferenciar as amostras positivas das negativas e identificar a *B. pertussis* e a *B. parapertussis*.

Todos os dados foram analisados por recurso ao *software* IBM® SPSS.

/ Resultados

Entre setembro de 2011 e março de 2017 foram efetuados 1931 pedidos para deteção e identificação do DNA da *B. pertussis* e da *B. parapertussis*. Verificou-se que 67,6% de todos os pedidos foram provenientes do Serviço de Urgência do Hospital Pediátrico. A análise do número de pedidos por ano revelou que em 2012 foram efetuados 92 pedidos e em 2016, 739 pedidos, o que representa um aumento de aproximadamente oito vezes (Figura 1).

Das 1931 pesquisas de *B. pertussis*, verificou-se que 8% (153) foram positivas. Foram também efetuadas 384 pesquisas de *B. parapertussis*, sendo que 1,8% (7) foram positivas.

O número de casos positivos para *B. pertussis* em cada ano variou significativamente: 31 casos em 2012, 33 casos em 2013 e 52 casos

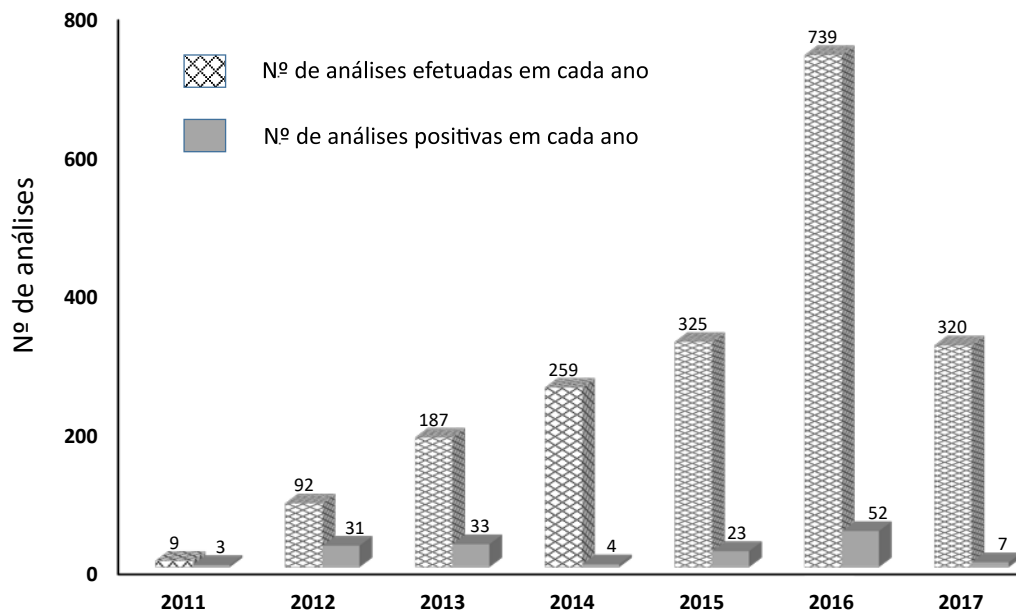


Figura 1 – N.º de análises efetuadas e n.º de análises positivas para *B. pertussis* em cada ano. O n.º de análises em 2017 diz apenas respeito ao 1.º trimestre.

em 2016. Nos anos de 2014 e 2015 observou-se uma redução do número de casos positivos, figura 1. No entanto, verifica-se que a maior percentagem de casos positivos foi observada em 2012 (33,7%). Em 2016, a percentagem de casos positivos foi de 7,0% (Figura 1).

A distribuição pela idade revelou que 31,4% dos casos positivos para *B. pertussis* foram detetados em lactentes com idade igual ou inferior a 3 meses (M); 15% tinham uma idade compreendida entre 4 M e 2 anos (A); 17% dos casos tinham uma idade compreendida

entre 3-6 anos; 17% tinham uma idade compreendida entre 7 e 12 anos e 19,6% tinham uma idade superior ou igual a 13 anos; a idade mínima foi 3 semanas, e a máxima foi 27 (Figura 2).

A análise da distribuição dos casos positivos ao longo dos meses evidenciou que o maior número de casos positivos ocorreu entre abril e setembro (Figura 3).

Considerando que a tosse convulsa pode estar associada a linfocitose determinou-se o número de casos em que foi efetuado estudo

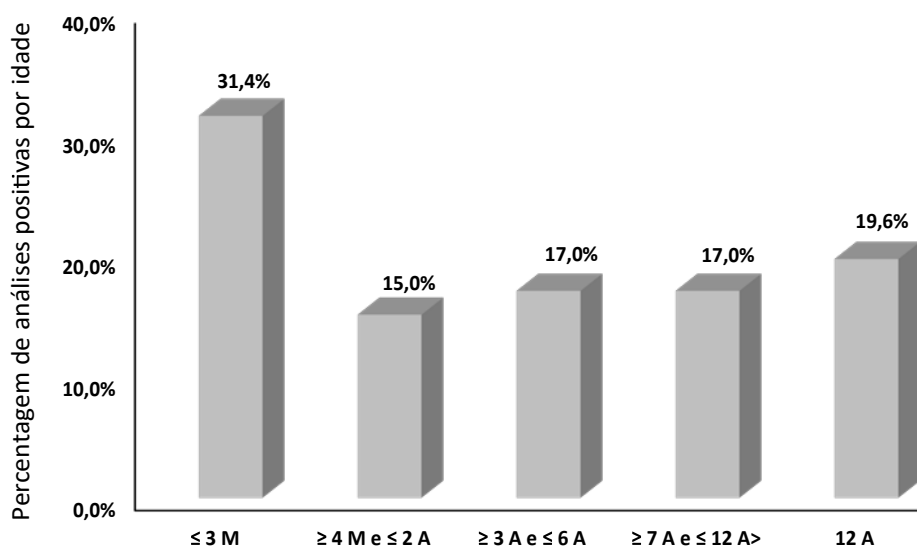


Figura 2 – Percentagem de casos positivos de *B. pertussis* por idade

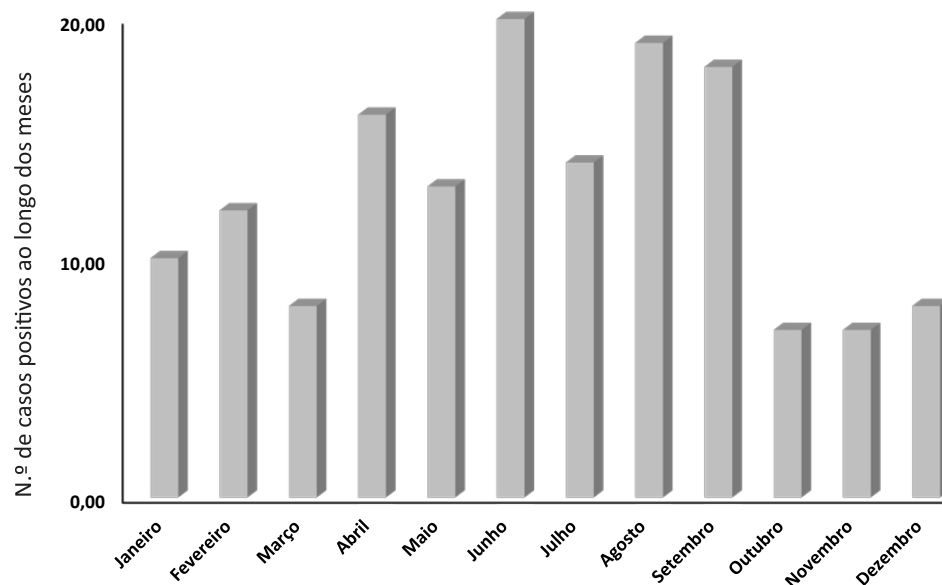


Figura 3 – Distribuição dos casos positivos de *B. pertussis* pelos meses do ano

analítico hematológico. Em 20 doentes com pesquisa e identificação positiva de *B. pertussis* foi solicitado hemograma (13,1%). Em 11 dos 20 doentes (55%) o número de linfócitos encontrava-se dentro do intervalo de referência (IR) corrigido para a idade. Nove doentes (45%) apresentavam linfocitose, com o valor médio de $27 \times 10^9/L$ (mínimo: $14,5 \times 10^9/L$, máximo: $64,4 \times 10^9/L$), sendo que 8 destes doentes tinham idade $\leq 2M$, e um doente tinha 2 anos.

Todos os doentes com linfocitose necessitaram de internamento por insuficiência respiratória. Dos 11 doentes que apresentavam

um número de linfócitos dentro do IR apenas 2 (ambos com 1M de idade) tiveram necessidade de internamento. Todos os doentes internados apresentaram boa evolução clínica e laboratorial. Num doente com linfocitose foi efetuado esfregaço de sangue cuja observação evidenciou a presença de linfócitos maduros, de pequenas dimensões, com núcleos frequentemente clivados que são sugestivos de infeção por *B. pertussis*, principalmente em lactentes (Figura 4).

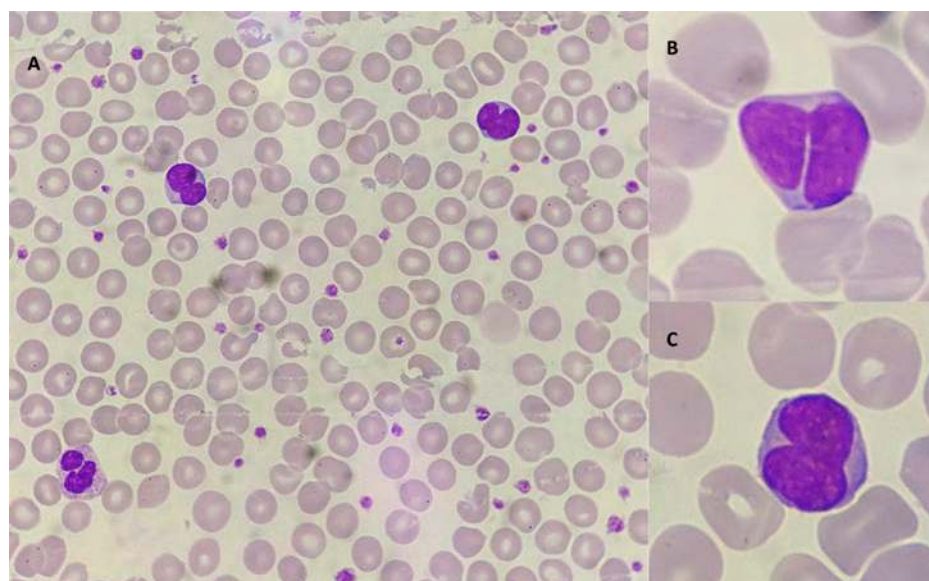


Figura 4 – Esfregaço de sangue em doente com pesquisa de *B. pertussis* positiva e linfocitose. Presença de linfócitos maduros, de pequenas dimensões, com núcleos frequentemente clivados. Esfregaço de sangue corado com May-Grünwald Giemsa. A: ampliação de 100x.

/ Conclusão

A análise dos resultados revelou que a partir do ano de 2012 se assistiu a um aumento significativo do número de pedidos de pesquisa de *B. pertussis*. Em 2012, 33,7% dos pedidos foram positivos, o que correspondeu a 31 casos. Em 2013, apesar de a percentagem de casos positivos (17,6%) ter diminuído, o número de casos aumentou para 33. Em 2014 e 2015 houve uma redução da percentagem e do número absoluto de casos positivos para *B. pertussis*. Em 2016, o número de casos positivos aumentou para 52, constituindo 7,0% do número de casos analisados. Verificou-se também que esse aumento ocorreu principalmente nos pequenos lactentes, estando em concordância com os dados nacionais revelados pela DGS.

Relativamente à distribuição dos casos positivos pelos meses do ano, verificou-se que a maioria dos casos foi diagnosticada nos meses de verão, o que se encontra de acordo com as características epidemiológicas da infeção por *B. pertussis*^{2,8,10}.

Tendo em conta a elevada percentagem de casos positivos em lactentes com idade igual ou inferior a 3M, conclui-se que o intervalo de idades anteriormente considerado (3-6A) como sendo o mais afetado por *B. pertussis* já não se aplica, o que evidencia uma alteração das características epidemiológicas da tosse convulsa.

Dado que a maioria dos doentes eram pequenos lactentes, o estudo hematológico foi solicitado apenas nos casos que apresentavam maior gravidade. A análise dos nossos dados demonstrou que dos 9 doentes que apresentavam linfocitose todos necessitaram de internamento. Dos 11 doentes que não apresentavam linfocitose apenas 2 necessitaram de internamento. Apesar do número reduzido de doentes em que foi realizado hemograma, estes dados parecem estar de acordo com resultados de estudos anteriores que referem que a leucocitose com linfocitose, não sendo específica da infeção por *B. pertussis*, é considerada indicador de gravidade^{20,21}.

O aumento da incidência da tosse convulsa e a alteração da faixa etária afetada foram observados em diversos países, o que

determinou a avaliação da eficácia das vacinas e dos planos de vacinação. Os estudos realizados apontaram como causas principais para o aumento da incidência da tosse convulsa: a redução, em alguns países, do número de vacinações por se ter transmitido a ideia de que a doença estava quase erradicada e que não era uma doença grave; a substituição das vacinas do tipo célula inteira por vacinas acelulares que apresentam menos efeitos secundários mas que possuem também uma eficácia mais reduzida com perda da imunidade ao longo do tempo; e a ocorrência de mutações no genoma bacteriano que limitam o efeito da vacina^{2,8,11,13,23}.

Considerando os resultados destes estudos e o aumento do número de casos positivos em recém-nascidos, os planos de vacinação em vários países foram reformulados, sendo que em Portugal a Comissão de Vacinas recomendou "A vacinação de jovens pais e conviventes que desejem reduzir o risco de infeção para si e para os recém-nascidos com quem residem; a vacinação durante o terceiro trimestre da gravidez (entre as 28 e 36 semanas) durante surtos, como o que ocorre atualmente na Europa; a vacinação de adolescentes e adultos pode ser recomendada como medida de proteção individual"²⁴. Para além disso, em 2016, a DGS recomendou a vacinação da grávida, entre as 20 e as 36 semanas de gestação, idealmente até às 32 semanas, com uma dose de vacina combinada contra a tosse convulsa, o tétano e a difteria, em doses reduzidas (TdpA) no sentido de diminuir o número de casos de tosse convulsa nos pequenos lactentes²².

A análise dos nossos resultados em conjunto com os resultados publicados a nível mundial reforça a necessidade de se manter um sistema ativo de vigilância epidemiológica e de considerar a tosse convulsa como diagnóstico diferencial na infeção respiratória dos lactentes, particularmente naqueles que não efetuaram a vacina DTPa e/ou cujas mães não efetuaram a vacina durante a gravidez. Nesta faixa etária, a tosse convulsa pode assumir características de grande gravidade, podendo manifestar-se através de episódios de cianose ou de apneia, acompanhados ou não de bradicardia e de paroxismos de tosse.

/ Bibliografia

- Hewlett EL, Burns DL, Cotter PA, et al. Pertussis pathogenesis – what we know and what we don't know. *J Infect Dis*. 2014;209(7):982-985.
- Melvin J a, Scheller E V, Miller JF, Cotter P a. Bordetella pertussis pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(4):274-288.
- Pittet LF, Emonet S, Schrenzel J, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM. Bordetella holmesii: An under-recognised Bordetella species. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(6):510-519.
- Srigley JA, David M. Goldfarb, Pernica and JM. Bordetella Species Other than Bordetella pertussis. *Clin Microbiol Newsl*. 2015;37(8):61-65.
- Sammels L. Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis. *PCR Clin Microbiol*. 2010:119-123.
- Qin X, Zerr DM, Kronman MP, et al. Comparison of molecular detection methods for pertussis in children during a state-wide outbreak. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016;15(1):28.
- Huebner ES, Christman B, Dummer S, Tang Y-W, Goodman S. Hospital-acquired Bordetella bronchiseptica infection following hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol*. 2006;44(7):2581-2583.
- Clark TA. Changing pertussis epidemiology: everything old is new again. *J Infect Dis*. 2014;209(7):978-981.
- Silva SR, Ribeiro F, Maia C, Roseta J, Flores MM, Pedro HID. Internamento por tosse convulsa – casuística de cinco anos de um hospital de nível II da região centro. 2010;XXV:252-255.

10. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(2):326-382.
11. CDC. Pertussis. *Epidemiol Prev Vaccine-Preventable Dis Pink B.* 2015:81-100.
12. Paddock CD, Sanden GN, Cherry JD, et al. Pathology and Pathogenesis of Fatal *Bordetella pertussis* Infection in Infants. *Clin Infect Dis.* 2008;47:328-338.
13. World Health Organization. The Immunological Basis for Immunization Series Module 4 : *Pertussis Update* 2009.; 2009.
14. Guiso N. *Bordetella* Adenylate Cyclase-Hemolysin Toxins. *Toxins (Basel).* 2017:1-13.
15. Carbonetti N. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Futur Microbiol.* 2011;5:455-469.
16. Sebo P, Osicka R, Masin J. Adenylate cyclase toxin-hemolysin relevance for pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2014;13(10):1215-1227.
17. Correia P, Tavares M. Linhas de Orientação para Diagnóstico e Terapêutica da Tosse Convulsa. *Publicação da Soc Port Pediatr.* 2010:1-9.
18. European Centre for Disease Prevention and Control. *Guidance and protocol for the use of real-time PCR in laboratory diagnosis of human* *Guidance and protocol for the use of RT-PCR for diagnosis of Bordetella infections 2012.*
19. World Health Organization. *Laboratory Manual for the Diagnosis of Whooping Cough Caused by Bordetella Pertussis/ Bordetella Parapertussis Update 2014.*
20. Soumya Pandey and Neslihan Cetin. Peripheral smear clues for *Bordetella pertussis*. *Blood.* 2013;122:4012.
21. Funaki T, Miyairi I. Lymphocytosis in a baby with pertussis. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(1):130.
22. Direção-Geral da Saúde. *Vacinação da grávida contra a tosse Convulsa.* Orientação 2/2016 da DGS, 2016. Disponível em <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/orientacao-n-0022016-de-15072016.aspx>, acedida em 1/12/2017.
23. Jerris RC, Williams SR, MacDonald HJ, Ingebrigtsen DR, Westblade LF, Rogers BB. Testing implications of varying targets for *Bordetella pertussis*: comparison of the FilmArray Respiratory Panel and the Focus B. *pertussis* PCR assay. *J Clin Pathol.* 2015;68(5):394-396.
24. Comissão de vacinas SIP-SPP. *Recomendações sobre vacinas extra programa nacional de vacinação.* Sociedade de Infeciologia Pediátrica da Sociedade Portuguesa de Pediatria. 2016. Disponível em http://www.spp.pt/conteudos/default.asp?ID=573#accordion_ancora, Acedido em 1/12/2017.