

DANIELA LEITE

Prevalência e caracterização de cepas de *Bordetella pertussis* deficientes em pertactina em um país com vacina de células inteiras contra coqueluche.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração:

Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientador:

Profa. Dra. Rosângela Siqueira de Oliveira

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Leite, Daniela

Prevalência e caracterização de cepas de *Bordetella pertussis* deficientes em pertactina em um país com vacina de células inteiras contra coqueluche / Daniela Leite. - 2019.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Rosângela Siqueira de Oliveira.

1. *Bordetella pertussis*. 2. Coqueluche. 3. Pertactina. 4. Vacinação. 5. Sorotipagem. 6. Tipagem molecular.

SES/CCD/CD-392/2019



Fonte: ROBERT ALAN THOM, Coleção "Grandes Momentos na Medicina" publicada por Parke Davis & companhia, em 1966.

"Poucas coisas tiveram um impacto maior na saúde pública do que vacinas. E poucas coisas hoje são mais eficientes em termos de custo para salvar vidas, fortalecer sociedades e moldar o futuro da saúde humana."

Anthony Lake

*Aos meus amores, que me acompanham
nessa vida e que jamais lerão essa tese,
João, Camilla, Alexandre e Giovanna*

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

A Profa. Dra. Rosângela Siqueira de Oliveira, pela orientação deste trabalho.

A Dra. Lourdes Rehder Andrade Vaz de Lima, pela co-orientação deste trabalho.

A Dra. Maria Lúcia Tondella, do *Centers for Disease Control and Prevention* - CDC, Atlanta - USA, pelo material cedido para utilização nos testes laboratoriais.

A Dra. Lucia Pawloski, do *Centers for Disease Control and Prevention* – CDC, Atlanta – USA, no auxílio da análise dos resultados.

A Dra. Suely Kashino pela realização do ensaio de *Immunoblotting*.

Ao Dr. Carlos Henrique Camargo pelo auxílio na análise dos resultados obtidos pela técnica de eletroforese em gel por campo pulsado – PFGE e utilização do programa Bionumerics.

Ao Dr. Luis Fernando dos Santos pela doação de insumos para realização da PCR convencional.

Ao Dr. Euclides Ayres de Castilho e Dra. Ana Paula Sayuri Sato pela realização da análise do cálculo amostral.

A Dra. Gabriela Francisco pela ajuda incondicional em várias etapas deste trabalho.

A Ângela Brandão, pela disposição em ensinar a usar os programas Bioedit e DNASTar e auxílio na análise das sequências obtidas por Sanger.

A Juliana C. Pereira, Luciano M. Martins e Ricardo Polatto pelo suporte laboratorial.

Ao Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis do Ministério da Saúde e Vigilância Epidemiológica dos Estados de São Paulo e Pernambuco.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal - CAPES pelo apoio financeiro.

Este trabalho foi realizado no Centro de Bacteriologia - Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por patógenos Especiais e Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo.

Prevalência e caracterização de cepas de *Bordetella pertussis* deficientes em pertactina em um país com vacina de células inteiras contra coqueluche.

RESUMO

Bordetella pertussis é o agente causal da coqueluche, importante problema de saúde pública em todo o mundo, com elevada morbidade e mortalidade em crianças menores de um ano de idade. Dois tipos de vacinas contra coqueluche estão disponíveis: vacinas de célula inteira (wP) baseada em suspensões de *B. pertussis* mortos e vacinas acelulares (aP) baseada em um ou mais antígenos de *B. pertussis* altamente purificados, como a toxina, pertactina e fímbrias. Apesar de essas vacinas estarem disponíveis há mais de 50 anos, ainda hoje se observam ciclos epidêmicos da doença sugerindo que, embora a doença tenha diminuído, a transmissão de *B. pertussis* não está sendo controlada. Sabe-se que a duração da imunidade contra a coqueluche não é permanente e em comparação com a infecção natural, a duração da proteção após a vacinação parece ser menor. A proteção oferecida pelas vacinas aP parece ser menos duradoura que as wP, levantando a hipótese de que a substituição dessas vacinas pelas ap em muitos países, desde a década de 90, possa ter influenciado a reemergência da coqueluche. Diversos países relataram divergência antigênica das cepas circulantes em relação às cepas vacinais e enquanto as evoluções genéticas mais observáveis na era da vacina wP foram as variações alélicas e antigênicas, a aparição de cepas de *B. pertussis* deficientes em pertactina foi um fenômeno associado a introdução das vacinas acelulares.

O objetivo do estudo foi verificar a ocorrência de deficiência de pertactina em 555 isolados de *B. pertussis* coletados no Brasil durante 2010-2016.

Todos os 555 isolados foram caracterizados por PFGE e sorotipagem para determinar a distribuição dos perfis circulantes. O ensaio de ELISA foi realizado para triar os isolados de *B. pertussis* que não produzem pertactina. Todos os isolados identificados como deficientes em pertactina foram confirmados por PCR e *immunoblotting* e possíveis alvos genéticos para a deficiência foram determinadas pelo sequenciamento por Sanger.

O sorotipo predominante, Fim3, vem sendo gradativamente substituído por Fim2 e Fim2,3, perfazendo 75% dos isolados em 2016. A tipagem por PFGE apresentou 110 perfis distintos, com seis perfis representando a maioria dos isolados testados. A triagem por ELISA identificou oito isolados deficientes em pertactina, mas apenas três foram confirmados por *immunoblotting*. A PCR indicou que um isolado tinha uma mutação na região promotora do gene *prn*, enquanto os outros dois não apresentaram uma explicação genética óbvia para a sua deficiência. O sequenciamento revelou que os oito isolados carregavam o alelo *prn2*, o tipo mais prevalente em isolados recentes.

Embora a deficiência de pertactina tenha sido identificada em alguns isolados, este estudo não detectou uma ocorrência relevante de deficiência de pertactina, confirmando observações prévias de que essa deficiência é provavelmente impulsionada pelas vacinas acelulares.

Palavras-chave: *Bordetella pertussis*, coqueluche, pertactina, vacinação, sorotipagem, tipagem molecular.

Prevalence and characterization of pertactin deficient *Bordetella pertussis* strains in a country with whole-cell pertussis vaccine.

ABSTRACT

Bordetella pertussis is the causative agent of pertussis, an important public health concern worldwide, with high morbidity and mortality in infants. Two types of pertussis vaccines are available: whole-cell (wP) vaccines based on killed *B. pertussis* organisms, and acellular (aP) vaccines based on one or more highly purified individual pertussis antigens like pertussis toxin, pertactin and fimbriae. Despite the availability of these safe and effective vaccines for more 50 years old, there are still epidemic cycles of the disease suggesting that although disease was decreased, transmission of *B. pertussis* is not being controlled. It is known that the duration of immunity against pertussis is not permanent and compared to a natural infection, the duration of protection after vaccination appears to be shorter. The protection provided by aP is less enduring raising the possibility that the switch from wP vaccines to aP vaccines in many countries since the 1990s may have aggravated the pertussis resurgence. Several countries reported antigenic divergence between circulating strains and vaccine strains and while the most observable genetic evolutions in the wP vaccine were allelic and antigenic variations, the emergence of pertactin deficient strains was a phenomenon associated with the introduction of acellular vaccines.

The aim of this study was to determine the occurrence of pertactin deficiency in 555 isolates of *B. pertussis* collected in Brazil during 2010-2016.

All isolates were characterized by PFGE and serotyping to determine the distribution of circulating profiles. ELISA screening was done to detect pertussis isolates not producing pertactin. All pertactin deficient isolates identified were confirmed by immunoblotting and PCR, and possible genetic sources for the deficiency were determined by Sanger sequencing.

The predominant serotype, Fim3, has been gradually replaced by Fim2 and Fim2,3, making up 75% of the isolates in 2016. PFGE typing showed 110 profiles, with six profiles representing most of the isolates tested. ELISA screening identified eight pertactin deficient isolates, but only three were

confirmed by immunoblotting. PCR indicated that one isolate had a promoter mutation in *prn*, while the other two did not have an obvious genetic explanation for their deficiency. Sequencing revealed that the eight strains carried the *prn2* allele, the most prevalent type in modern isolates.

While pertactin deficiency was identified in a few isolates, this study did not detect a relevant occurrence of pertactin deficiency, confirming previous observations that pertactin deficiency is likely aP driven.

Keywords: *Bordetella pertussis*, whooping cough, pertactin, vaccination, serotyping, molecular typing.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACIP	Comitê Consultivo em Práticas de Imunizações
ACT	Toxina adenilato ciclase
AGG2 / AGG3	Aglutinogênio 2 / aglutinogênio 3
aP	Vacinas pertussis acelular
β	Beta
BCG	Bacilo Calmette Guerin
BioEdit	<i>Biological Sequence Alignment Editor Platform</i>
BM	Banho - Maria
BSA	Albumina de soro bovino
Bvg	<i>Bordetella virulence gene</i>
BvgAS	Sistema de regulação da virulência mestra de <i>Bordetella</i>
°C	Graus Celsius
CB	Centro de Bacteriologia
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEPIAL	Comitê de Ética em Pesquisa do IAL
cm	Centímetros
CRIE	Centros de Referências para Imunobiológicos Especiais
CSB	<i>Cell Suspension Buffer</i> – Tampão de suspensão celular
CT	Citotoxina traqueal
CTAI	Comitê Técnico Assessor em Imunizações
CTC	Conselho Técnico Científico
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico

DO	Densidade óptica
DTaP / DTPa	Vacina de difteria, tétano e pertussis acelular
dTpa / Tdap	Vacina de difteria, tétano e pertussis acelular, adulto
DTP / DTPw	Vacina de coqueluche de células inteiras combinada com os toxóides diftérico e tetânico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
et. al.	Em conjunto com
EUA	Estados Unidos da América
FHA	Hemaglutinina filamentosa
FIM2 / FIM3 / FIMD	Tipos de fimbriais
g	gramas
h	Horas
Hib	<i>Haemophilus influenzae b</i>
HLT	Toxina dermonecrótica ou toxina termo-lábil
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IFN-γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IS	Seqüência de inserção
Kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar

Mb	Megabases
mg	Miligramas (10^{-3} gramas)
min	Minutos
mL	Militros (10^{-3} Litros)
mM	Milimolar (10^{-3} Molar)
N	Normal
N°	Número
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ND	Não determinado
NDEI	Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especias
ng	Nanogramas (10^{-9} gramas)
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
nm	Nanômetro (10^{-9} metro)
nM	Nanomolar
O1	Antígeno somático
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pb	Pares de bases
PBS	Solução salina-fosfatada tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Eletrophoresis</i>
PNI	Programa Nacional de Imunizações
PRN / prn	Pertactina

PT / ptx	Toxina pertussis
ptxA	Subunidade A da toxina pertussis
ptxP	Promotor do operon da toxina pertussis
R1	Região 1
R2	Região 2
rcf	Força centrífuga (<i>relative centrifugal force</i>)
RGD	Trinca de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico
rpm	Rotações por minuto
S1	Subunidade 1
seg	Segundos
SIDS	Síndrome da morte súbita infantil
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TE	Tampão Tris / EDTA
TBE	Tampão Tris / Borato / EDTA
TBS	Tampão Tris-salina
TBST	Tampão Tris / NaCl / Tween20
Th1 / Th 2/ Th17	Células T helper tipo 1, 2, 17
TMB	Tetrametilbenzidina
TTSS	Sistema de secreção tipo III
U	Unidades
UF	Unidade federada
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
µg	Microgramas (10 ⁻⁶ gramas)
µl	Microlitros (10 ⁻⁶ Litros)
v	Volts
VOP	Vacina Oral da Poliomielite
wP	<i>whole cell pertussis</i>
XbaI	Enzima de restrição extraída de <i>Xanthomonas badrii</i>

Lista de Figuras

Figura 1. Fatores de virulência de <i>B. pertussis</i>	25
Figura 2. Estrutura do gene da pertactina.....	30
Figura 3. Infecção por <i>B. pertussis</i>	35
Figura 4. Estágios da doença por faixa etária e estado de imunização.....	36
Figura 5. Importância relativa de múltiplos fatores associados ao aumento da incidência de coqueluche.....	44
Figura 6. Fluxograma Metodológico.....	60
Figura 7. Representação esquemática da sorotipagem de <i>B. pertussis</i>	62
Figura 8. Gene da pertactina e respectiva posição dos iniciadores utilizados para reação de sequenciamento.....	71
Figura 9. Dendograma dos perfis de PFGE (pulsotipos) circulantes no Brasil, agrupados nos clusters A e B.....	82/83
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose do produto amplificado para a região promotora do gene da pertactina.....	85
Figura 11. Eletroforese de proteínas para detectar a expressão da pertactina em cinco isolados de <i>B. pertussis</i> , Brasil.....	86
Figura 12. Eletroforese de proteínas para detectar a expressão da pertactina em três isolados de <i>B. pertussis</i> , Brasil.....	87

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características diferenciais das espécies do gênero <i>Bordetella</i>	22
Tabela 2. Isolados de <i>B. pertussis</i> , por Unidade Federada e ano, Brasil, 2010-2016.....	59
Tabela 3. Iniciadores utilizados para as reações de PCR.....	67
Tabela 4. Iniciadores utilizados para as reações de sequenciamento.....	72
Tabela 5. Número de acesso - <i>GenBank</i> e variantes alélicas do gene pertactina de <i>B. pertussis</i>	73
Tabela 6. Compilado dos resultados obtidos dos oito isolados selecionadas para pesquisa da pertactina.....	89

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Casos globais de coqueluche, relatados por ano, e cobertura vacinal com três doses de DTP, 1980 – 2016.....	42
Gráfico 2. Coeficiente de incidência e cobertura vacinal com DTP e Tetravalente. Brasil, 1990 – 2017.....	43
Gráfico 3. Sorotipos circulantes entre os 555 isolados de <i>B. pertussis</i> estudados no Brasil, 2010 a 2016.....	74
Gráfico 4. Distribuição dos sorotipos de <i>B. pertussis</i> por regiões geográficas do Brasil.....	75
Gráfico 5. Sorotipos de <i>B. pertussis</i> circulantes na Região Sul, Brasil, 2010 a 2016.....	76
Gráfico 6. Sorotipos de <i>B. pertussis</i> circulantes na Região Sudeste, Brasil, 2010 a 2016.....	77
Gráfico 7. Sorotipos de <i>B. pertussis</i> circulantes na Região Centro - Oeste, Brasil, 2010 a 2016.....	77
Gráfico 8. Sorotipos de <i>B. pertussis</i> circulantes nas Regiões Norte e Nordeste, Brasil, 2010 a 2016.....	78
Gráfico 9. Pulsotipos predominantes de 511 isolados de <i>B. pertussis</i> , Brasil, 2010–2016.....	79
Gráfico 10. Distribuição dos pulsotipos predominantes de <i>B. pertussis</i> , por ano de estudo, Brasil, 2010–2016.....	80
Gráfico 11. Distribuição dos pulsotipos predominantes nas regiões do Brasil, 2010–2016.....	81

Lista de Anexos

Anexo 1 – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEPAL

Anexo 2 – Protocolo da metodologia de eletroforese em gel por campo pulsado (PFGE)

Índice

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Gênero <i>Bordetella</i>	20
1.1.1. Aspectos taxonômicos.....	20
1.1.2. <i>Bordetella pertussis</i>	24
1.1.2.1. Fatores de virulência.....	24
1.2. Coqueluche ou Pertussis.....	31
1.2.1. Histórico.....	31
1.2.2. Patogênese e doença.....	33
1.2.3. Tratamento.....	40
1.2.4. Aspectos Epidemiológicos.....	41
1.2.5. Vacinas.....	44
2. OBJETIVOS.....	55
2.1. Objetivo Geral.....	55
2.2. Objetivos Específicos.....	55
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3.1. Material.....	56
3.1.1. Isolados Bacterianos.....	56
3.2. Métodos.....	60
3.2.1. Reativação dos isolados.....	61
3.2.2. Determinação dos perfis circulantes.....	61
3.2.2.1. Sorotipagem.....	61

3.2.2.2. Eletroforese em gel por campo pulsado - <i>Pulsed-Field Gel Eletrophoresis</i> , PFGE.....	63
3.2.3. Detecção da expressão da proteína pertactina.....	64
3.2.3.1. Ensaio Imunoenzimático - <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> , ELISA.....	64
3.2.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.....	65
3.2.3.3. <i>Immunoblotting</i>	68
3.2.4. Verificação de possíveis fontes genéticas para a deficiência de pertactina.....	70
3.2.4.1. Sequenciamento de Sanger.....	70
3.2.4.1.1. Purificação do produto de PCR.....	71
3.2.4.1.2. Reação de sequenciamento com o <i>BigDye Terminator</i> v3.1.....	71
3.2.4.1.3. Purificação do produto do <i>Big Dye</i> [®]	72
3.2.4.1.4. Sequenciamento.....	73
4. RESULTADOS	74
4.1. Determinação dos perfis circulantes de <i>B. pertussis</i>	74
4.1.1. Sorotipagem.....	74
4.1.2. PFGE.....	78
4.2. Detecção da expressão da proteína pertactina.....	84
4.2.1 ELISA.....	84
4.2.2. PCR.....	84
4.2.3. <i>Immunoblotting</i>	85
4.3. Sequenciamento de Sanger.....	87

5. DISCUSSÃO.....	90
6. CONCLUSÕES.....	101
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

“Os benefícios da ciência não são para os cientistas, e sim para a humanidade”

Louis Pasteur

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gênero *Bordetella*

1.1.1. Aspectos taxonômicos

Os gêneros *Bordetella*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Kerstersia*, *Advenella* e *Paenalcaligenes* pertencem à família *Alcaligenaceae*, ordem *Burkholderiales*, subclasse β de *Proteobacteria* (Wirsing von König et al., 2015).

Atualmente estão descritas nove espécies geneticamente distintas no gênero *Bordetella*: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. petrii* e *B. ansorpii*, quatro das quais são conhecidas por causar infecções respiratórias em seres humanos e outros mamíferos (*B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* e *B. holmesii*) (Mattoo e Cherry, 2005; Gross et al., 2010; Wirsing von König et al., 2015; Kilgore et al., 2016).

B. pertussis é um patógeno exclusivamente humano, agente causal da coqueluche endêmica e epidêmica em todo o mundo; *B. parapertussis* é responsável pela síndrome coqueluchoíde em humanos, doença semelhante à coqueluche, porém mais branda e responsável por causar doenças em animais domésticos, incluindo ovinos e suínos; *B. bronchiseptica* é identificada como a causa de doença entre pessoas imunocomprometidas, além de cães domésticos (tosse do canil), gatos, coelhos, roedores, porcos e outros animais; *B. holmesii* recentemente foi reconhecida como um agente patogênico

relevante, principalmente em pacientes imunodeprimidos, podendo causar uma variedade de doenças sistêmicas (Mattoo e Cherry, 2005; Gross et al, 2010; Wirsing von Konig et al., 2015; Kilgore et al., 2016; Nieves e Heininger, 2016).

Bactérias do gênero *Bordetella* são capazes de crescer em meios de cultura simples, sob condições aeróbicas, entretanto *B. pertussis* e *B. parapertussis* não apresentam crescimento em meios de cultura comuns. Essas espécies são mais suscetíveis a substâncias e metabólitos tóxicos, como os ácidos graxos, íons metálicos e peróxidos, presentes nesses meios, sendo necessário para seu isolamento a suplementação com carvão, sangue, albumina ou amido, para a absorção dessas substâncias tóxicas. A nicotinamida também é necessária para o seu crescimento (Loeffelholz, 2003; Wirsing von Konig et al., 2015).

As espécies de *Bordetella* são pequenos cocobacilos Gram negativos, não esporulados, aeróbios estritos, com temperatura ótima de crescimento entre 35 - 37 °C. A diferenciação das espécies é baseada principalmente em características fenotípicas, como tempo de crescimento, motilidade e reações bioquímicas (catalase, oxidase, produção de urease). As espécies são catalase positiva, oxidam aminoácidos, mas não fermentam carboidratos e muitas delas são móveis por flagelos peritríqueos (Wirsing von Konig et al., 2015) (Tabela 1).

Tabela 1. Características diferenciais das espécies do gênero *Bordetella*.

Características	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. ansorpii</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. hinzii</i>	<i>B. petrii</i>	<i>B. trematum</i>
Crescimento em:									
▪ Ágar Regan Lowe	+ (3-4 dias)	+ (2-3 dias)	+ (1-2 dias)	+ (2-3 dias)	ND	ND	ND	ND	ND
▪ Ágar Sangue	-	+	+	+	+	+	+	+	+
▪ Ágar MacConkey	-	+	+	+	+	+	+	+	+
▪ Ágar Citrato de Simmons	-	-	+	-	ND	V	+	+	+
Oxidase	+	-	+	-	+	+	+	+	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidade	-	-	+	-	V	-	+	-	+
Nitrato redutase	-	-	+	-	ND	-	-	+	V
Urease	-	+	+	-	ND	-	-	-	-
Pigmento difusível em ágar	-	Marrom	-	Marrom	-	-	-	Amarelo	Amarelo

Símbolos e abreviaturas: +, ≥ 90% das cepas são positivas; -, negativo; V, ≤ 10% das cepas são positivas; ND, não determinado.

Tabela extraída e adaptada de: Sanden e Weyant 2005; Wirsing von König et al., 2015.

O alto nível de conservação de sequências gênicas, estudos de hibridação e perfis metabólicos indicam uma estreita relação evolutiva entre *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*. Durante o primeiro projeto genoma de *Bordetella*, demonstrou-se que tanto *B. parapertussis* como *B. pertussis* evoluíram a partir de *B. bronchiseptica* (ou um ancestral semelhante a *B. bronchiseptica*) por um processo de redução e rearranjo do genoma. O genoma de *B. bronchiseptica* é maior (5,4 megabases - Mb) que o de *B. parapertussis* (4,8 Mb) e *B. pertussis* (4,1 Mb) (Sealey et al., 2016).

O projeto identificou que a expansão do número de cópias do elemento de sequência de inserção (elemento IS) dentro de *B. pertussis* e *B. parapertussis* era um fator chave em sua especiação. Os elementos da sequência de inserção bacteriana são unidades móveis de DNA (ácido desoxirribonucleico) que são capazes de se inserir em múltiplos locais em um genoma bacteriano (McLafferty et al., 1988). Esses elementos são considerados importantes para promover mudanças de rearranjo em genomas bacterianos, especialmente para espécies de *Bordetella* (Sealey et al., 2016).

As sequências de inserção estão presentes em poucas cópias por genoma em *B. bronchiseptica*, mas *B. pertussis* e *B. parapertussis* sofreram grande expansão no número de cópias, predominantemente em IS481 (aproximadamente (~) 250 cópias) e IS1663 (~ 20 cópias) em *B. pertussis* e IS1001 (~ 20 cópias) e IS1002 (~ 90 cópias) em *B. parapertussis*. Esta expansão criou focos para recombinação homóloga através destes genomas resultando em deleções e rearranjos intra-genômicos. Comparações entre as sequências genômicas dessas espécies identificaram que a diferença em seus tamanhos em comparação com *B. bronchiseptica* foi devido à deleção de DNA de *B. pertussis* e *B. parapertussis*. *B. pertussis* tem sofrido níveis muito maiores de perda gênica e rearranjo genômico em relação a *B. parapertussis* e esta em relação a *B. bronchiseptica* (Sealey et al., 2016). Os genes perdidos de *B. pertussis* são aqueles envolvidos na colonização de

hospedeiros não humanos e de modo geral, parece que a incapacidade de *B. pertussis* e *B. parapertussis* de sobreviver fora de um hospedeiro seja provavelmente devida à perda de numerosas vias acessórias para o uso de fontes alternativas de nutrientes, ao invés de uma falta de vias metabólicas centrais (Parkhill et al., 2003).

1.1.2. *Bordetella pertussis*

1.1.2.1. Fatores de virulência

Para colonizar o trato respiratório de seu hospedeiro, *B. pertussis*, requer fatores de virulência que são classificados em toxinas e adesinas. As toxinas alteram o sistema imune, impedindo a remoção das bactérias do trato respiratório, e as adesinas permitem a ligação de *B. pertussis* ao epitélio respiratório agindo como imunomoduladores. São classificadas como toxinas a toxina pertussis (PT), a citotoxina traqueal (CT), a toxina dermonecrótica ou toxina termo-lábil (HLT), a toxina adenilato ciclase (ACT), sistema de secreção tipo III (TTSS) e endotoxina ou lipopolissacarídeo (LPS). As adesinas são a hemaglutinina filamentosa (FHA), a pertactina (PRN) e duas adesinas fimbriais, Fim2 e Fim3 que atuam como alvos antigênicos para anticorpos e células T (Hegerle e Guiso, 2013; Hewlett et al., 2014; Zlamy, 2016) (Figura 1).

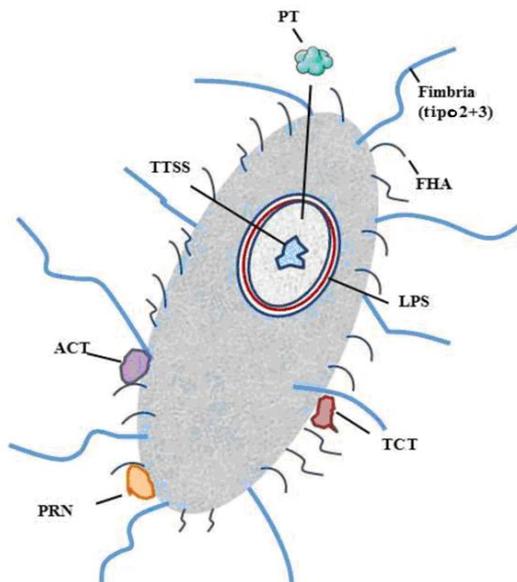


Figura 1. Fatores de virulência de *B. pertussis*.

PT, toxina pertussis; TCT, citotoxina traqueal; ACT, toxina adenilato ciclase; TTSS, sistema de secreção tipo III; LPS, lipopolissacarídeo; FHA, hemaglutinina filamentososa; PRN, pertactina.

Figura extraída e adaptada de Zlamy, 2016.

B. pertussis exibe um sistema de variação de fase na expressão dos fatores de virulência em resposta as condições ambientais, tais como a temperatura, a presença de ácido nicotínico ou sulfato de magnésio (van Beek et al., 2018). Este micro-organismo é capaz de alternar entre dois modos por um processo chamado modulação fenotípica. Isso é conseguido por um sistema que controla a transcrição de quase todos os genes de virulência, o lócus do sistema de regulação da virulência mestra de *Bordetella* (BvgAS) (Antoine et al., 2000; de Gouw et al., 2011; Dorji et al., 2018). Os dois componentes envolvidos no sistema de regulação são o BvgS que tem um domínio periplasmático e detecta os sinais externos e o BvgA, uma proteína ativadora da transcrição (Arico et al., 1991; de Gouw et al., 2011).

O BvgAS responde a vários sinais ambientais conhecidos que podem modular sua expressão, pelo menos em condições de laboratório. A variação de fase pode resultar no surgimento de variantes virulentas (Bvg +)

e avirulentas (Bvg -). A fase não-modulada, fase Bvg + ou fase virulenta está associada à expressão das toxinas e adesinas necessárias para a virulência. A fase Bvg + geralmente se manifesta quando a *B. pertussis* está crescendo a 37 °C no trato respiratório de um hospedeiro humano. Inversamente, quando a *B. pertussis* é cultivada na presença de quantidades milimolares de íons sulfato, ácido nicotínico ou a temperaturas por volta de 25 °C considera-se que estão em uma “fase modulada, Bvg - ou avirulenta”. Durante a infecção, o ambiente respiratório fornece sinais moduladores que induzem a expressão de fatores de virulência (Dorji et al., 2018).

Além das fases Bvg + e Bvg -, uma “fase intermediária” ou “fase Bvgⁱ” foi identificada em *B. pertussis*, desempenhando um papel importante na patogênese das espécies de *Bordetella* o qual pode envolver a transmissão de aerossóis e / ou colonização e sobrevivência no trato respiratório (de Gouw et al., 2011; Dorji et al., 2018).

Toxina Pertussis (PT) - *B. pertussis* é a única espécie entre as *Bordetellae* que expressa o principal fator de virulência, a toxina pertussis (PT). *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* possuem genes que codificam a toxina, mas não os expressam devido a múltiplas mutações na região promotora. A toxina é uma proteína de 105 quilodalton (kDa) de configuração AB₅. Composta da subunidade A, enzimaticamente ativa, também chamada S1 e a subunidade B organizada em uma estrutura de anel pentamérica composta das subunidades S2, S3, duas S4 e S5. A expressão dos cinco genes é regulada por um promotor localizado no gene que codifica S1. A ativação do promotor da toxina está sob o controle do regulador do gene de virulência (Bvg). A subunidade B é responsável pela ligação da toxina a receptores de células alvo extracelulares, permitindo a translocação da subunidade catalítica A (S1) através da membrana plasmática e a entrada da toxina nas células (Worthington et al., 2011; Cherry e Paddock, 2014; Dorji et al., 2018;).

A toxina pertussis é responsável pelo aumento das secreções respiratórias e produção de muco, pela sensibilização à histamina e pela linfocitose e leucocitose, importantes fatores de risco para doença grave em bebês não imunizados (Cherry e Paddock, 2014; Nieves e Heininger, 2016).

Citotoxina Traqueal (CT) - monômero de baixo peso molecular do peptidoglicano da parede celular que tem afinidade específica por células epiteliais ciliadas, sendo especificamente tóxica para essas células (Weiss e Hewlett, 1986; Nieves e Heininger, 2016).

Quando o movimento ciliar é retardado, a tosse é o único mecanismo para eliminar o acúmulo de outras moléculas inflamatórias do trato respiratório, resultando na tosse paroxística. A destruição das células ciliares também torna o hospedeiro suscetível a infecções secundárias, o que muitas vezes é a principal causa de morte (Dorji et al., 2018).

Toxina Dermonecrótica ou Toxina Termo-lábil (HLT) - proteína citoplasmática que causa lesões necróticas quando injetada subcutaneamente em camundongos em doses baixas, sendo letal em doses mais altas. Seu nome é derivado da lesão cutânea característica provocada nestes animais. Essa toxina pode inibir a síntese de DNA e proteínas, inibir a diferenciação osteoblástica e induzir a formação de organelas nas membranas (Weiss e Hewlett, 1986; Nieves e Heininger, 2016; Dorji et al., 2018).

Toxina Adenilato Ciclase (ACT) - toxina imunomoduladora produzida por *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*. É um importante fator de virulência secretado por *B. pertussis* no estágio inicial da infecção e pode desencadear uma resposta imune protetora (Weiss e Hewlett, 1986; Dorji et al., 2018). Funciona como uma hemolisina e citolisina, induz a apoptose e a parada do ciclo celular e inibe a fagocitose e a quimiotaxia (Zlamy, 2016).

Sistema de Secreção Tipo III (TTSS) - permite que a *Bordetella* transloque os fatores de virulência bacteriana, denominados efetores, diretamente para a membrana plasmática ou citoplasma das células do hospedeiro para exercer suas funções biológicas, levando ao estabelecimento de infecção, persistência e transmissão (Dorji et al., 2018). Promove a adesão bacteriana, suprime a resposta imune inata e adaptativa e aumenta a persistência de bactérias nos pulmões de camundongos (Nieves e Heininger, 2016).

Endotoxina ou Lipopolissacarídeo (LPS) - O LPS de *B. pertussis* é semelhante às endotoxinas de outras bactérias Gram-negativas e é necessário para colonização e sobrevivência de *Bordetella in vivo*. O LPS das espécies de *Bordetella* é pirogênico, mitogênico, tóxico e pode ativar a produção de citocinas pró-inflamatórias a partir de macrófagos (Higgs et al., 2012; Zlamy, 2016).

O LPS está presente em concentrações variadas na maioria das vacinas de células inteiras (*whole cell* – wP) e em combinação com outras toxinas, em particular a toxina pertussis. A reatogenicidade do wP, incluindo efeitos sistêmicos e neurológicos está atribuída ao LPS, no entanto sua remoção pode diminuir a eficácia da vacina (Higgs et al., 2012).

Hemaglutinina Filamentosa (FHA) - componente da parede celular de todas as *Bordetella* spp. É o principal agente para a adesão de *B. pertussis* à superfície mucosa do trato respiratório. Promove a adesão bacteriana às células epiteliais respiratórias ciliadas e promove a fagocitose por macrófagos e leucócitos polimorfonucleares (Nieves e Heininger, 2016; Zlamy, 2016).

Adesinas Fimbriais - As fímbrias (Fim) são proteínas filamentosas poliméricas que se estendem da membrana bacteriana externa, essenciais para a colonização do trato respiratório. *B. pertussis* produz tipos de fímbrias sorologicamente distintas (sorotipos 2 e 3) compostas de duas subunidades

principais Fim2 e Fim3, também conhecidas como aglutinogênio 2 (AGG2) e aglutinogênio 3 (AGG3) codificados pelos genes dos locos cromossômicos, *fim2* e *fim3*, respectivamente (Dorji et al., 2018). São utilizadas na composição das vacinas anti-pertussis e na produção de anti-soros específicos para a caracterização antigênica (sorotipagem) das cepas de *B. pertussis* (Weiss e Hewlett, 1986; Ashworth e Robinson, 1989; Robinson et al., 1989). O aglutinogênio 2 (sorotipos Fim2 e Fim2,3) exibe uma vantagem colonizadora no trato respiratório e esses sorotipos predominam em comunidades não vacinadas, enquanto o sorotipo Fim3 torna-se prevalente em comunidades vacinadas quando a vacinação é introduzida com wP contendo ambos componentes, Fim2 e Fim3 (Williamson e Matthews, 1996). A vacina utilizada no Brasil contém esses dois componentes fimbriais em sua composição (Akamatsu et al., 2015).

A expressão das fímbrias é regulada por pequenas inserções ou deleções em um trecho de uma região promotora rica em citosina resultando na variação da fase fimbrial em adição a sua regulação positiva pelo sistema BvgAS. Consequentemente, esses genes independentes estão sujeitos a erros de adesão, permitindo que a *B. pertussis* se submeta à variação da fase fimbrial e expresse quaisquer combinações possíveis de Fim2 e Fim3. Além das subunidades centrais que formam a parte principal das proteínas Fim, a *B. pertussis* também possui uma subunidade menor, FimD, localizada na ponta das fímbrias e que contribui para a adesão aos monócitos (Hegerle e Guiso, 2013; Dorji et al., 2018).

Pertactina (PRN) - proteína autotransportadora de membrana externa de 69 kDa (P.69) que desempenha um papel na aderência de *B. pertussis* a monócitos e células epiteliais do hospedeiro. A P.69 é uma grande molécula precursora (910 aminoácidos) de 2.739 pares de base (pb), que contém a trinca de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), que funciona como um local de ligação celular em várias proteínas de mamíferos (Mooi et al., 1998; van Loo et al., 2002). Os aminoácidos 260-294 constituem a região

1 (R1) da pertactina que contém repetições constituídas por cinco aminoácidos Gly-Gly-Xaa-Xaa-Pro e está localizada próxima ao RGD; a região 2 (R2) contém repetições Pro-Gln-Pro (PQP) (Mooi, 2010; Dorji et al., 2018).

O polimorfismo na pertactina é encontrado nas duas regiões (R1 e R2), porém a maior parte da variação é encontrada na região 1 na qual têm sido identificadas 18 variantes diferentes (*prn1* – *prn18*) (Hijnen et al., 2008; Bouchez et al., 2015) (Figura 2). Quase todas as cepas vacinais usadas para a produção de vacinas celulares ou acelulares carregam os alelos *prn1* ou *prn7*, enquanto os isolados circulantes abrigam principalmente *prn2* ou *prn3* (He, 2016).

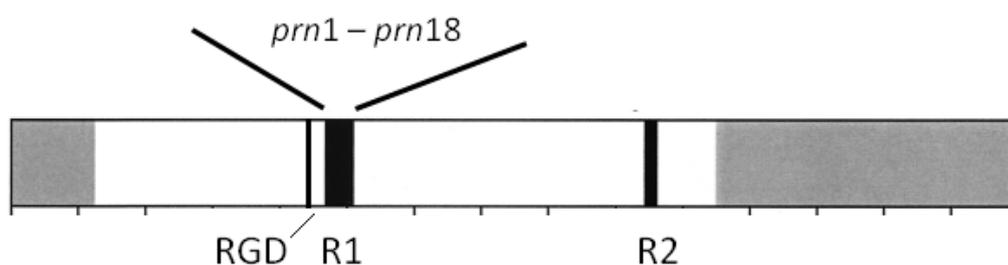


Figura 2. Estrutura do gene da pertactina.

R1, R2 e RGD indicam as regiões 1, 2 e RGD que codificam as repetições GGxxP e PQP, e ligação celular respectivamente.

Figura extraída e adaptada de Mooi et al., 1998 e Hijnen et al., 2008.

Estudos com *B. bronchiseptica* sugeriram que a PRN tem um papel crítico na resistência à depuração mediada por neutrófilos (Inatsuka et al., 2010). Parece não ter um papel importante na persistência de *B. pertussis*, uma vez que os mutantes deficientes em PRN foram capazes de colonizar e se multiplicar no trato respiratório de camundongos. Entretanto, experimentos de imunização mostraram que a PRN é um antígeno protetor nestes animais. Os anticorpos anti-PRN parecem ajudar a fagocitose de *B. pertussis* pelas células imunes do hospedeiro (Higgs et al., 2012; Nieves e Heininger, 2016; Dorji et al., 2018).

1.2. Coqueluche ou Pertussis

1.2.1. Histórico

As primeiras descrições da coqueluche datam da Idade Média e a designação precisa dos primeiros casos parece ser impossível de ser identificada devido a falta de nomenclatura médica unificada na época. Quase todas as regiões da Europa tinham seu próprio dialeto e, na maioria dos casos, os nomes das doenças eram transitórios, variando até mesmo dentro do território de um país. Dependendo da região, as pessoas sofriam de Chin-Cough, Chyncough, hooping cough (Inglaterra), kink ou kinkhost (Escócia), coqueluche, quinteuse de l'enfant (França), tosse canina, quint (Itália), Kirkhosta (Suécia), Keichhusten (Alemanha), Kwinthoest (Holanda), ou koklusz (Polônia). A terminologia latina também denominou a doença como coclude, tussis clongosa e pertussis (Kuchar et al., 2016).

Acredita-se que os primeiros relatos reconhecíveis de grandes surtos da coqueluche começaram nos séculos XIV e XV (Sealey et al., 2016). A primeira menção à coqueluche ocorreu na Inglaterra em 1540 e a primeira epidemia foi observada em Paris em 1578 e descrita por Guillaume de Baillou em 1673: *“O pulmão está tão irritado que, no esforço que faz para se livrar daquilo que o afeta, pode inalar e expirar apenas com dificuldade... O paciente incha e quase sofre, sente como se estivesse respirando com algo parado no meio da garganta... Alguns acreditam que esse nome [quinta] foi inventado por causa do som do paciente na tosse. O tormento da tosse às vezes é suspenso por 4 a 5 horas, após as quais o paroxismo retorna, o que geralmente é tão violento que causa a saída de sangue do nariz e da boca e, com muita frequência... causa vômitos”* (Aslanabadi et al., 2015). Em 1679, Sydenham descreveu a doença claramente e deu-lhe o nome de pertussis (que significa uma tosse violenta) (Cherry, 1999; Kuchar et al., 2016).

A disseminação em larga escala da *B. pertussis* é coincidente com o início da urbanização das populações humanas, criando uma estrutura de população hospedeira que favoreceria os patógenos causadores de doenças altamente infecciosas e agudas (Sealey et al., 2016).

No século XVIII a coqueluche era considerada uma doença perigosa e até mortal, sem tratamento. Nessa época os médicos notaram que a doença era contagiosa e acreditavam que ela afetava apenas as crianças e que, se alguém sofresse de coqueluche, não conseguiria contraí-la novamente (Kuchar et al., 2016).

Embora se soubesse que a doença era infecciosa, o agente causal só foi descoberto em 1906, por Jules Bordet e Octave Gengou, pesquisadores de Paris. Em 1900, a filha mais velha de Bordet havia sofrido de coqueluche, e Bordet tinha visto no escarro pequenos cocobacilos Gram-negativos, mas não conseguira cultivá-los em nenhum dos meios de cultura então disponíveis. Em 1906 seu filho desenvolveu a doença, e Bordet foi capaz de cultivar o organismo em meio de cultura que então levou seu nome. Esses pesquisadores mostraram que as pessoas infectadas desenvolviam um anticorpo fixador do complemento ao organismo; que o organismo não infectava os animais, mas produzia uma endotoxina que, em pequenas doses, dava origem a hemorragias petequiais, efusões pleurais, dispneia e necrose. Eles também mostraram que as vacinas com bactérias mortas tinham algum efeito na redução da incidência e da duração da doença (Oakley, 1962).

Em 1910, as estatísticas dos Estados Unidos da América (EUA) afirmavam que, para cada dez crianças que sofriam de coqueluche, havia em média, uma morte. Em 1912, W.C. Rucker descreveu a coqueluche, seu curso clínico e as estatísticas sobre morbidade e mortalidade relacionadas. Sua publicação transmitia uma real preocupação, pois a coqueluche era considerada uma doença potencialmente fatal (Kuchar et al., 2016).

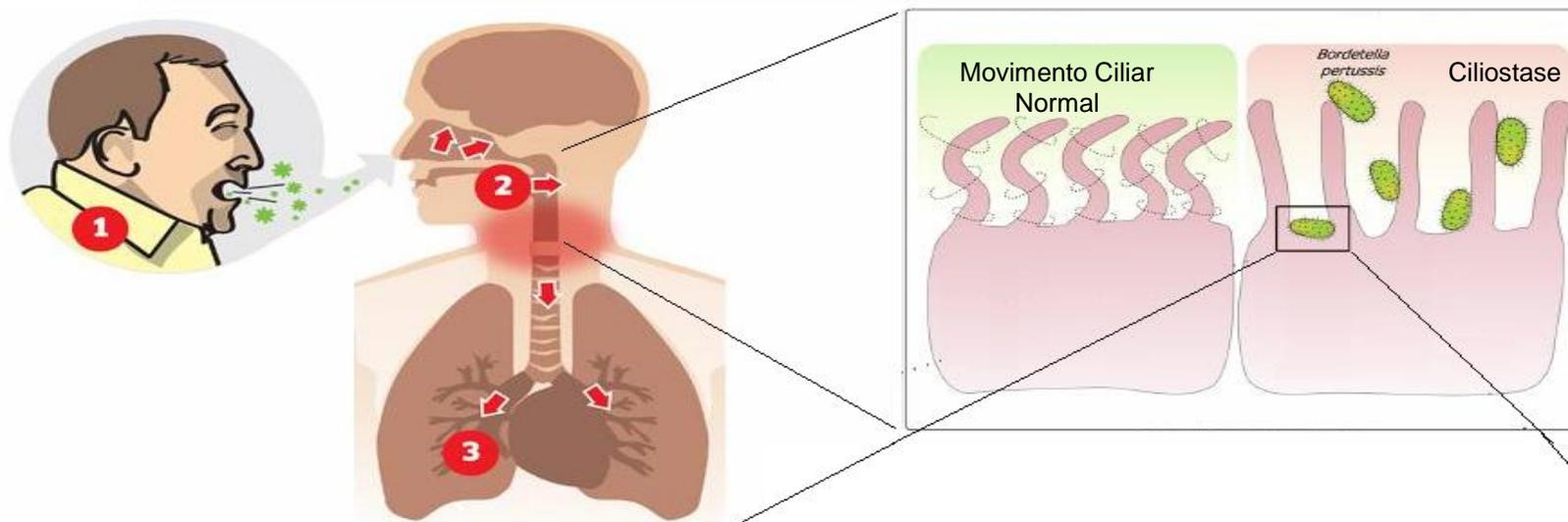
Ainda nos dias de hoje a coqueluche continua a ser um importante problema de saúde pública em todo o mundo, com elevada morbidade e mortalidade em crianças, principalmente as menores de um ano de idade (WHO, 2015). A história natural da doença indicava que esta se limitava a lactentes e crianças pequenas, muitas vezes causando morte ou complicações graves (Sealey et al., 2016). No entanto, observou-se que *B. pertussis* não infectava só crianças e com o passar do tempo, percebeu-se que a coqueluche leve ou atípica é comum e frequentemente detectada em adolescentes e adultos com tosse crônica, sendo considerados uma importante fonte de infecção para recém-nascidos e crianças parcialmente imunizadas (Cherry e Paddock, 2014; Kuchar et al., 2016).

1.2.2. Patogênese e doença

O trato respiratório humano representa um desafio para os patógenos das vias aéreas, como *B. pertussis*. O epitélio ciliado que reveste as vias respiratórias assegura que as secreções de muco contendo partículas (por exemplo, micro-organismos patogênicos ou pólen) sejam mecanicamente depuradas das cavidades nasais, da traqueia e dos tubos brônquicos. A colonização da *B. pertussis* também enfrenta competição direta por nutrientes e espaço com a flora residente, e é exposta a uma variedade de mecanismos de defesa do hospedeiro. A infecção bem-sucedida do hospedeiro pela *B. pertussis* é, portanto, dependente de sua capacidade de resistir a esses mecanismos de defesa antimicrobiana (de Gouw et al., 2011).

A infecção do hospedeiro por *B. pertussis* é iniciada através do contato com secreções respiratórias de um indivíduo infectado. Após a inalação destas partículas, as bactérias entram no trato respiratório superior e aderem via FHA e fímbrias às células epiteliais ciliadas na nasofaringe e traqueia. Uma vez ligada à superfície da mucosa, as células da *B. pertussis*

se multiplicam localmente, resistem aos mecanismos de defesa do hospedeiro (por exemplo, depuração mucociliar, peptídeos antimicrobianos e células inflamatórias) e causam danos locais nas vias aéreas superiores e inferiores com manifestações sistêmicas (de Gouw et al., 2011; Kilgore et al., 2016). A interação e o trabalho em equipe dos fatores de virulência previnem a *B. pertussis* de uma rápida depuração e permite sua disseminação para as áreas inferiores do trato respiratório (de Gouw et al., 2011; Zlamy, 2016) (Figura 3).



1 - Inalação das secreções respiratórias do indivíduo infectado

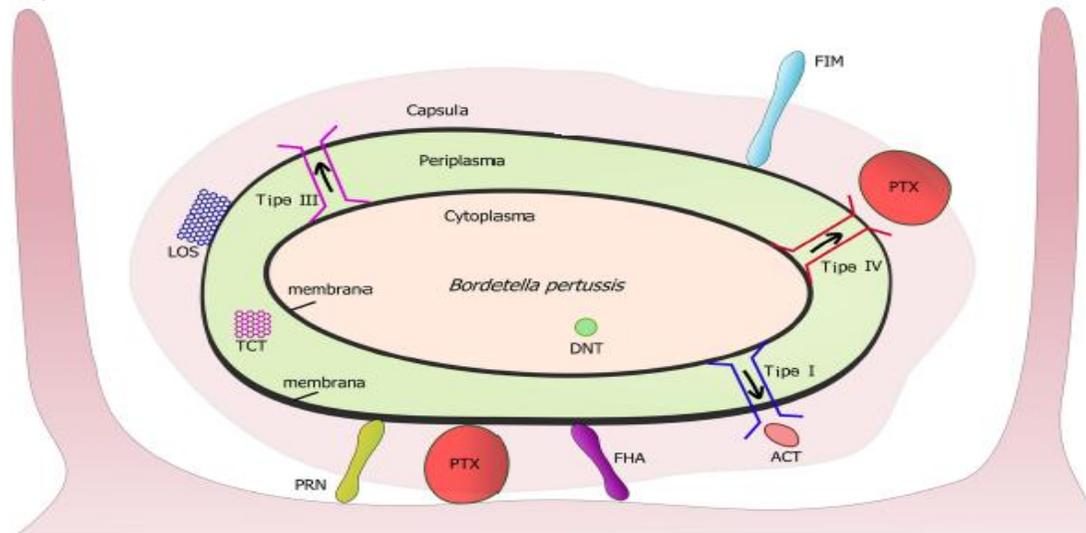
2 - Entrada das bactérias no trato respiratório superior e aderência na nasofaringe e traquéia

3 - Multiplicação bacteriana e danos locais nas vias aéreas superiores e inferiores

Figura 3. Infecção por *B. pertussis*.

PT, toxina pertussis; TCT, citotoxina traqueal; ACT, toxina adenilato ciclase; TTSS, sistema de secreção tipo III; LOS, lipooligossacarídeo; FHA, hemaglutinina filamentososa; PRN, pertactina; DNT, toxina dermo necrótica.

Figura extraída e adaptada de Jongerius et al., 2015.



A coqueluche é uma doença altamente infecciosa, com uma taxa de ataque de 15-17 (ou seja, o caso índice infecta de 15 a 17 pessoas suscetíveis) e uma taxa de ataque secundário para contatos domiciliares de 80-100% (Kent e Heath, 2014). Diversos estudos mostraram que os contatos domiciliares são a fonte mais importante de infecções para bebês e esses eram mais frequentemente infectados pelas mães, seguida dos pais e irmãos (Bisgard et al., 2004; Baptista et al., 2005; Berezin et al., 2014; Leite et al., 2015).

A apresentação clínica típica da coqueluche é vista principalmente em crianças não imunizadas (menos frequentemente em adolescentes e adultos) e é uma doença de três estágios: catarral, paroxístico e convalescência. A duração da doença é de aproximadamente seis a 12 semanas com um período médio de incubação de sete a dez dias (podendo ter um intervalo de cinco a 28 dias) (Nieves e Heininger, 2016) (Figura 4).

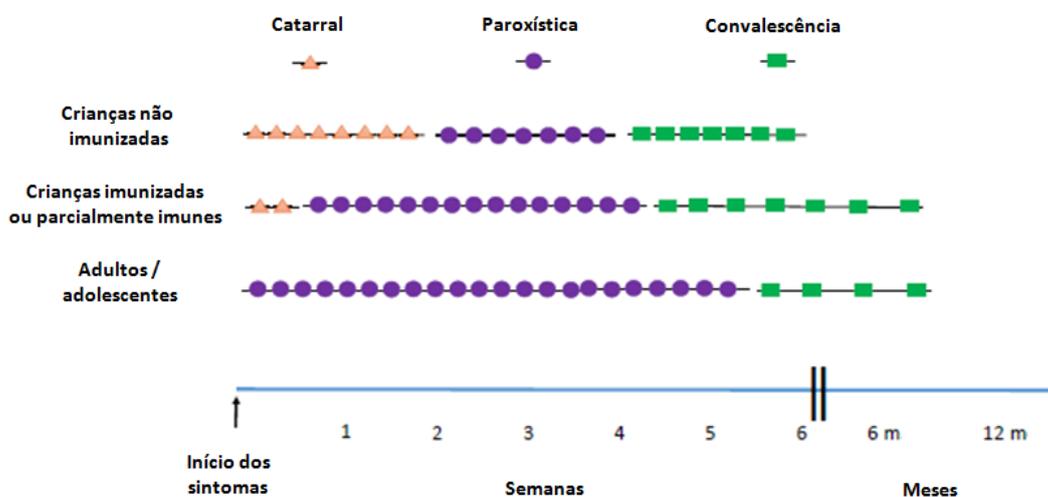


Figura 4. Estágios da doença por faixa etária e estado de imunização.

Figura extraída e modificada de Souder e Long, 2015.

]

A fase catarral da doença é semelhante a um resfriado comum caracterizada por sintomas inespecíficos como congestão nasal, rinorréia, lacrimejamento, mal-estar, dor de garganta e tosse leves, com duração de uma a duas semanas. A hipoglicemia também pode ser observada. A febre não é comum e, se presente, pode sugerir uma infecção secundária (Pittman, 1974; Nieves e Heininger, 2016). Nesta fase pode ocorrer uma linfocitose relativa e absoluta, geralmente acima de 10 mil linfócitos/mm³ e os leucócitos totais podem atingir um valor, em geral, superior a 20 mil leucócitos/mm³ (Oliveira et al., 2017). A infecção é mais transmissível durante essa fase, quando é menos aparente e geralmente não é suspeita (de Celle's et al., 2016). O diagnóstico precoce é frequentemente ignorado pelos clínicos, uma vez que os sinais e sintomas nesta fase imitam os de outras infecções virais associadas à rinovírus, coronavírus e vírus influenza, dificultando o tratamento e o isolamento bacteriano (Kilgore et al., 2016).

A frequência e a intensidade da tosse se agravam, caracterizando o início da fase paroxística, que geralmente dura de duas a seis semanas. Nesta fase o número de leucócitos pode ser elevado para 30 ou 40 mil/mm³ estando associado a uma linfocitose de 60 a 80% (Oliveira et al., 2017).

Os paroxismos são séries repetitivas de cinco a dez ou mais tosses vigorosas durante uma única expiração, podendo ocorrer mais de 30 vezes por 24 horas e são mais comuns à noite (Kent e Heath, 2014; Nieves e Heininger, 2016). As crises deixam o hospedeiro exausto e ofegante produzindo um som de guincho quando tentam inalar depois de um ataque de tosse (Sealey et al, 2016).

Os episódios de tosse podem causar cianose ou descoloração facial como resultado de congestão venosa, protrusão da língua, salivação, produção grossa de mucosa oral, lacrimejamento e frequentemente terminam em vômitos (Kent e Heath, 2014; Kilgore et al., 2016). As crises ocorrem espontaneamente e podem ser desencadeadas por estímulos como

chorar, rir, bocejar e comer ou são precipitadas por estímulos externos, como ruído e ar frio. Entre os episódios de tosse, existem poucos sinais clínicos, a menos que se desenvolvam complicações (Kent e Heath, 2014; Kilgore et al., 2016).

A fase de convalescença, que geralmente dura de uma a 12 semanas, é caracterizada pela diminuição da frequência e gravidade dos episódios de tosse e vômito. Durante o período de recuperação, as infecções respiratórias virais secundárias podem desencadear uma recorrência de paroxismos (Nieves e Heining, 2016).

A gravidade dos sintomas depende de vários fatores, incluindo a idade do paciente, a força da resposta imune e a extensão da disseminação bacteriana sistêmica. Em lactentes, as bactérias saem do trato respiratório superior para o inferior, são disseminadas para os pulmões causando bronquite necrosante, dano alveolar difuso, hemorragia intra-alveolar, edema fibrinoso, alvéolo rico em macrófagos infiltrados e broncopneumonia (Kilgore et al., 2016). As complicações associadas incluem pneumonia, hipoxemia, pneumotórax, sinusite, otite média, deficiência nutricional, prolapso retal, convulsões e encefalopatia. Em casos mais graves, ocorre linfocitose extrema que está relacionada à hipertensão pulmonar, insuficiência respiratória e até a morte (Gentile, 2010; Melvin et al., 2014; Souder e Long, 2015; Sealey et al., 2016). Adolescentes e adultos podem desenvolver além de pneumonia bacteriana, tosse persistente, encefalopatia, problemas relacionados ao sono como incontinência urinária e fraturas de costelas (Nguyen e Simon, 2018).

Em crianças mais velhas, adolescentes e adultos a apresentação clínica pode ser inespecífica, especialmente em hospedeiros imunizados ou parcialmente imunes. Os sintomas atípicos podem ser comuns e incluem coriza e tosse crônica sem o guincho característico, tornando o diagnóstico e o tratamento apropriado mais difícil (Calvert e Heath, 2017). Em lactentes

com menos de seis meses de idade podem ocorrer engasgos e a apneia sem a tosse característica (Souder e Long, 2015; Nieves e Heininger, 2016).

As coinfeções com vírus respiratórios (vírus sincicial respiratório, adenovírus e influenza) e patógenos bacterianos respiratórios (*Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*) dependem da epidemiologia local e não contribuem necessariamente para a gravidade da coqueluche (Nieves e Heininger, 2016).

O diagnóstico específico para a coqueluche é realizado mediante o isolamento da *B. pertussis* pela técnica de cultura de material colhido de nasofaringe e pela realização do diagnóstico rápido pelo método da PCR em Tempo Real. A cultura é considerada o "padrão ouro" para detecção de *B. pertussis*, com altas taxas de isolamento quando a coleta de material é realizada no início dos sintomas (fase catarral). A PCR em tempo real tem alta sensibilidade (70-90%) e especificidade (86-100%) e permite a coleta de material até a terceira semana após o início dos sintomas (Leite et al., 2013).

O teste de imunoadsorção enzimática (ELISA) da toxina pertussis (PT) é um método alternativo de diagnóstico, útil na fase tardia da doença, particularmente entre adultos e adolescentes que freqüentemente apresentam um sintoma atípico de coqueluche e geralmente não procuram atendimento médico imediato (Vaz-de-Lima et al., 2014).

Exames complementares como o leucograma podem ser utilizados para auxiliar na confirmação ou descarte dos casos suspeitos. A presença da leucocitose e linfocitose indicam forte suspeita clínica de coqueluche, mas sua ausência não exclui o diagnóstico da doença, sendo necessário levar em consideração o quadro clínico e os antecedentes vacinais do paciente (Oliveira et al., 2017).

1.2.3. Tratamento

Os macrólídeos (eritromicina, azitromicina, claritromicina) são os antibióticos utilizados para tratamento e quimioprofilaxia da coqueluche e têm igual eficácia: erradicam *B. pertussis* em 97% dos casos após 2-3 dias, em 100% após 14-21 dias e após cinco dias de tratamento o paciente não é mais infeccioso (Tozzi et al., 2005).

A azitromicina é a droga de escolha para crianças menores de seis meses de idade e deve ser administrada uma vez ao dia durante cinco dias; a claritromicina, de 12 em 12 horas durante sete dias, porém não é indicada para crianças menores de um mês de idade. A eritromicina é administrada de seis em seis horas por sete a 14 dias, porém seu uso em crianças menores de um mês de idade está associado ao desenvolvimento da síndrome de hipertrofia pilórica, doença grave que pode levar à morte. Nos casos de contraindicação ao uso desses macrolídeos, recomenda-se o sulfametoxazol associado ao trimetoprim, de 12 em 12 horas por um período de sete dias (Oliveira et al., 2017).

A eficácia da terapia antibiótica depende do estágio da doença em que a terapia é iniciada, podendo prevenir ou atenuar a coqueluche clínica quando administrados durante o período de incubação ou no início do estágio catarral. As primeiras três semanas da doença são o melhor momento do tratamento para melhorar os sintomas da coqueluche e erradicar a *B. pertussis*. Infelizmente, o tratamento raramente é administrado cedo o suficiente para afetar o curso da doença (Kilgore et al., 2016; Oliveira et al., 2017).

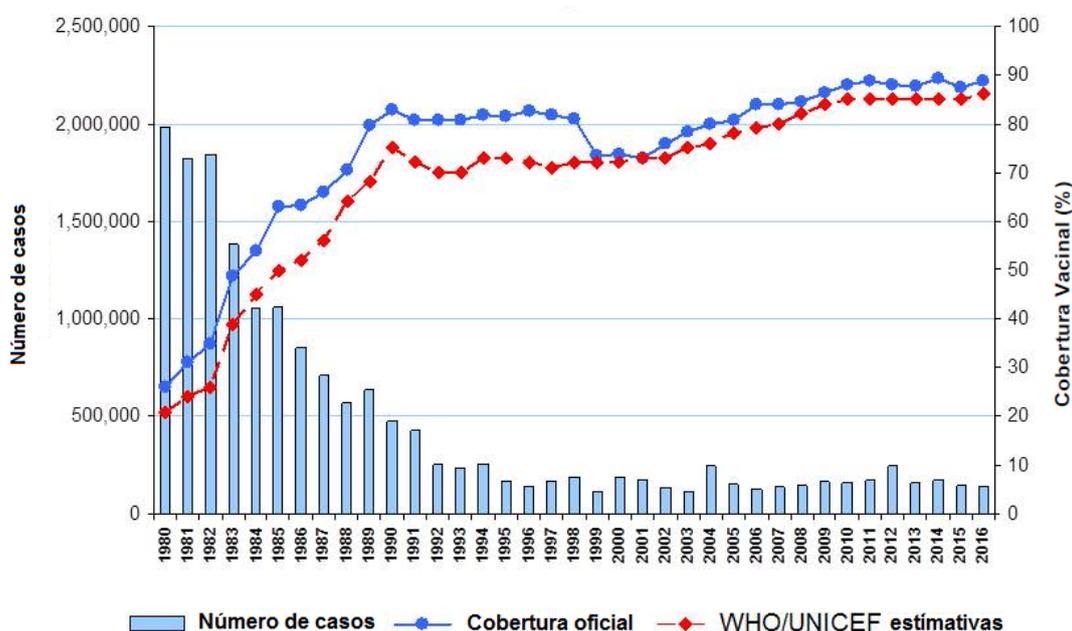
Quando administrados durante a fase paroxística da doença, as drogas antimicrobianas não alteram o curso clínico, mas podem eliminar a bactéria da nasofaringe e, assim, reduzir a transmissão. Os casos não tratados podem permanecer infecciosos por até três semanas após o início

dos sintomas (Kent e Heath, 2014; WHO, 2015).

1.2.4. Aspectos Epidemiológicos

O aumento da incidência de coqueluche tem sido observado em países desenvolvidos e em desenvolvimento. No início dos anos 2000, os Estados Unidos e alguns países da América Latina, incluindo Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Panamá e México observaram aumento no número de casos de coqueluche e relatos de surtos (Pinell-McNamara et al., 2017). Na Argentina, a incidência da doença passou de 1,8/100.000 habitantes em 2003, 5,7/100.000 em 2005 para 8,3/100.000 em 2011. Na China, um total de 3.408 e 6.658 casos de coqueluche foi notificado em 2014 e 2015, respectivamente. Na Inglaterra e no País de Gales, o número total de casos confirmados foi 9.741 em 2012, 10 vezes maior do que em 2008 com 902 casos relatados. Em 2012, o número de casos notificados nos EUA foi de 48.277, o maior dos últimos 50 anos neste país (Chen e He, 2017). Em 2011, de acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), a coqueluche causou 50 milhões de casos e 300.000 mortes e em 2013 causou cerca de 63.000 mortes em crianças menores de cinco anos de idade (PAHO, 2011; WHO, 2015) (Gráfico 1).

Gráfico 1. Casos globais de coqueluche, relatados por ano, e cobertura vacinal com três doses de DTP, 1980 – 2016.

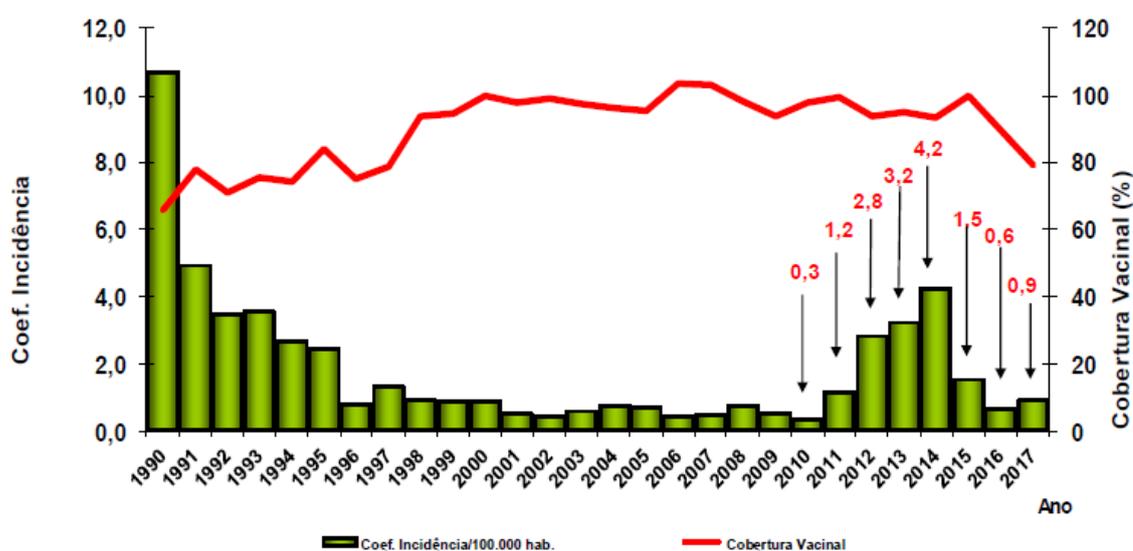


Fonte: WHO/IVB database, 2017.

No Brasil, nas décadas de 50 e 60, a incidência da coqueluche era alta. Em 1973 houve a implantação do Programa Nacional de Imunizações (PNI) e a vacina DTP (coqueluche de células inteiras combinada com os toxóides diftérico e tetânico) passa a ser preconizada para todas as crianças. Neste mesmo ano, a coqueluche torna-se uma doença de notificação compulsória e, no início da década de 1980, foram notificados mais de 40 mil casos anuais com coeficiente de incidência superior a 30/100.000 habitantes, caindo abruptamente a partir de 1983, mantendo uma tendência decrescente (Fernandes et al., 2018). Em 1990, o coeficiente de incidência foi de 10,6/100.000 habitantes, sendo a maior incidência observada na década. A partir de 1995 houve um aumento da cobertura vacinal, alcançando valores próximos a 95 - 100%, observando-se um declínio no número de casos, principalmente a partir de 1998, registrando uma incidência de 0,9/100.000 habitantes em 2000. No período de 2001 a 2010, a incidência variou entre 0,3 a 0,7/100.000, porém a partir de 2011 um aumento súbito do número de casos da doença no país

foi observado. Registros do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) indicam que no período de 2011 a 2014 foram confirmados 22.772 casos de coqueluche, em todo o país, aumentando a incidência de 1,2 para 4,2/100.000 habitantes, sendo as crianças menores de um ano responsáveis por 61% dos casos e dentre estas 87% eram os menores de seis meses. A partir de 2015, observou-se uma queda no número de casos e a incidência da doença passou de 4,2/100.000 habitantes em 2014 para 0,9/100.000 habitantes em 2017 (Ministério da Saúde, 2018) (Gráfico 2).

Gráfico 2. Coeficiente de incidência e cobertura vacinal com DTP e Tetravalente. Brasil, 1990 – 2017.



Fonte: Ministério da Saúde, 2018.

A razão para o aumento da incidência de coqueluche na última década, em diferentes partes do mundo, como também no Brasil, com notificações de vários picos epidêmicos, provavelmente está relacionado a vários fatores sobrepostos e sequenciais: (i) melhoria na notificação da doença, (ii) maior conscientização por parte dos médicos, (iii) métodos de diagnóstico laboratoriais mais sensíveis e específicos, (iv) aumento da circulação bacteriana entre adolescentes e adultos relacionada ao declínio

da imunidade induzida por vacina, (v) mudanças antigênicas das cepas circulantes, ocasionando alteração do patógeno (possivelmente decorrentes da substituição das vacinas celulares para as vacinas acelulares), (vi) diminuições na cobertura vacinal e falta de reforços suficientes, (vii) aumento de grupos de crianças não vacinadas. Todos esses fatores desempenham papéis importantes na atual tendência crescente da prevalência da doença (Sedighi et al., 2016; Souder e Long, 2015; Fedele e Stefanelli, 2017; Ministério da Saúde, 2018) (Figura 5).

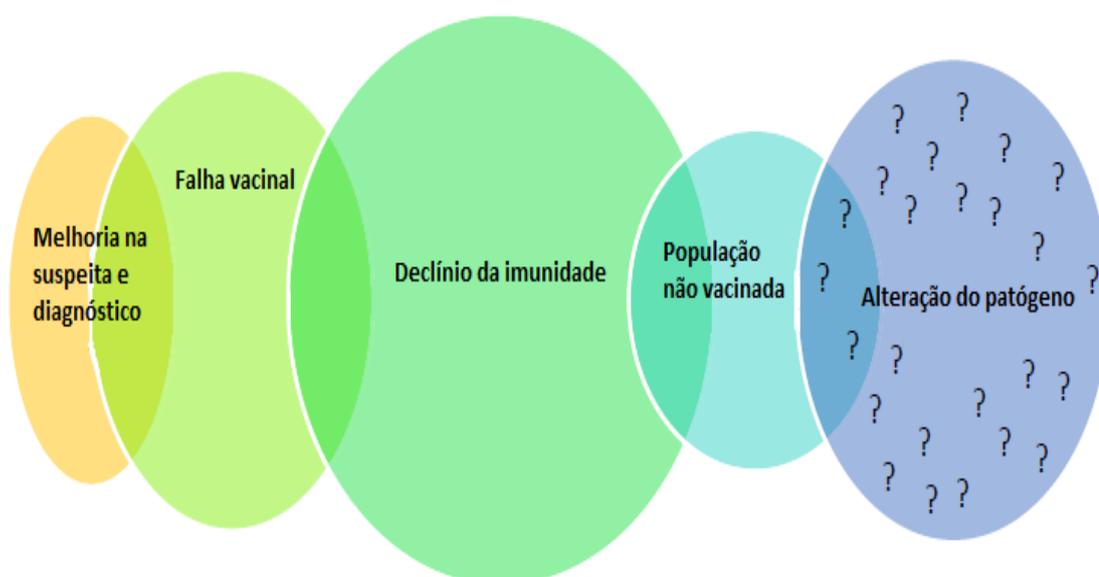


Figura 5. Importância relativa de múltiplos fatores associados ao aumento da incidência de coqueluche¹.

Figura extraída e adaptada de Souder e Long, 2015.

1.2.5. Vacinas

As vacinas contra coqueluche de células inteiras desenvolvidas a partir de suspensões de bacilos inteiros mortos (geralmente por aquecimento ou tratamento com formalina) foram licenciadas pela primeira vez nos EUA

¹. Tamanho da circunferência corresponde à importância do fator.

em 1914 (Klein, 2014). Em 1932, Pearl Kendrick e Grace Elderlin, do Departamento de Saúde de Michigan, começaram a pesquisar novas ferramentas de diagnóstico e vacinas eficazes relacionadas à coqueluche.

Em primeiro lugar, eles melhoraram os métodos de isolamento de *B. pertussis* e modificaram o meio de crescimento criado por Bordet e Gengou. Tornou-se então viável a cultura dos bacilos mais rapidamente, o que ajudou a simplificar os diagnósticos. O próximo passo foi produzir uma vacina de célula inteira gerada a partir de bactérias quimicamente inativadas (Kuchar et al., 2016).

Em 1948, a vacina contra coqueluche de células inteiras foi combinada com os toxóides diftérico e tetânico e tornou-se uma vacina contra difteria, tétano e pertussis (DTP), ocorrendo sua implementação maciça nas décadas de 1950 e 1960 (Klein, 2014; Loch, 2018).

Nos EUA a incidência da coqueluche caiu quase 99% nos anos 80 e o medo da doença se transformou no medo dos efeitos colaterais da vacina, pois as vacinas DTP eram muito reatogênicas e a preocupação com a segurança cresceu. Uma elevada proporção de crianças experimentou efeitos colaterais e os mais comuns foram febre, vermelhidão e inchaço nos membros, choro persistente, convulsões febris e, ocasionalmente, episódios hipotônicos-hiporresponsivos. Embora nenhum efeito tenha sido associado à sequelas graves em longo prazo, esses eventos adversos contribuíram para aumentar as preocupações do público sobre a segurança da vacina, ligando a DTP com casos de síndrome da morte súbita infantil (SIDS), asma ou encefalopatias (Klein, 2014; Kuchar et al., 2016).

Esse fato fez com que na virada das décadas de 1970 e 1980, a Suécia e o Japão suspendessem o programa de vacinação contra coqueluche por motivos de segurança. Devido à falta de aprovação dos pais para a vacinação, outros países como o Reino Unido, Irlanda, Itália, Rússia e

Austrália, observaram uma redução na taxa de cobertura da imunização (Klein, 2014). Essa atitude levou a consequências que foram observadas entre 1978 e 1982 no Reino Unido com a ocorrência de dois surtos de coqueluche e no Japão em 1979 com o aumento no número de casos (Kuchar et al., 2016). Por outro lado, a vacinação controlou a coqueluche na Hungria, na Polônia, na antiga Alemanha Oriental e nos EUA (Gangarosa et al., 1998).

Os movimentos anti-vacinais porém, tiveram alguns efeitos benéficos demonstrando a necessidade do desenvolvimento de uma vacina nova e melhor tolerada (Gangarosa et al., 1998). As idéias mais promissoras se basearam no desenvolvimento de uma vacina acelular, contendo alguns antígenos de *B. pertussis* em vez de toda a bactéria morta (Kuchar et al., 2016).

A primeira vacina acelular (aP) foi desenvolvida no Japão em 1981, e gradualmente se tornaram o tipo predominante usado nos países industrializados. Estas vacinas contêm um ou mais dos seguintes antígenos purificados: PT, FHA, PRN e FIM tipos 2 e 3 e diferem (i) no número de componentes (somente PT), (PT e FHA), (PT, FHA e PRN) ou (PT, FHA, PRN e FIM tipos 2 e 3), (ii) na concentração dos componentes do antígeno, (iii) no clone bacteriano usado na produção, (iv) nos métodos de purificação e desintoxicação e (v) nos adjuvantes e conservantes (tiomersal e fenoxietanol) (WHO, 2015).

Durante a década de 1990, diversos países conduziram numerosos testes de eficácia com a vacina combinada contra difteria, tétano e pertussis acelular (DTaP). O uso desta vacina tornou-se comum nos EUA e, em 1992, o Comitê Consultivo em Práticas de Imunizações (ACIP) recomendou que a DTaP substituísse as duas últimas doses (4^a e 5^a doses do esquema de imunização) de DTP em crianças com mais de 15 meses de idade. Em 1997, a recomendação se estendeu para o uso exclusivo da vacina DTaP no

calendário de imunização e, em 2006, uma dose de reforço de toxóide tetânico, toxóide diftérico reduzido e coqueluche acelular (Tdap) foi indicada para todos os adolescentes (Kuchar et al., 2016).

No Brasil, os calendários de vacinação são normatizados por meio de Portaria do Ministério da Saúde, conforme determina o Decreto número (nº) 78.231, de 12 de agosto de 1976 (Brasília, 1976) que dispõe sobre a organização das ações de Vigilância Epidemiológica e do PNI, como também estabelece normas relativas à notificação compulsória de doenças (Ministério da Saúde, 2015).

Em 1977, o primeiro Calendário Nacional de Vacinação normatizou a obrigatoriedade das vacinas do Bacilo Calmette Guerin (BCG), Vacina Oral da Poliomielite (VOP), vacina DTP e a vacina contra sarampo, no primeiro ano de vida da criança (Ministério da Saúde, 2015).

A vacina DTP pode estar associada a outras vacinas, chamadas vacinas combinadas, como a tetravalente (tetra) vacina adsorvida contra difteria, tétano, pertussis e *Haemophilus influenzae* tipo b (conjugada), e a pentavalente (penta) vacina adsorvida contra difteria, tétano, pertussis, hepatite B (recombinante) e *Haemophilus influenzae* tipo b (conjugada) (Oliveira et al., 2017).

A vacina pentavalente foi introduzida na rotina de serviços a partir de 2012, indicada em três doses, aos dois, quatro e seis meses de idade, e dois reforços com a vacina DTP, o primeiro aos 15 meses e o último entre quatro e seis anos de idade (Ministério da Saúde, 2015).

A vacina DTPa (acelular) está disponibilizada nos Centros de Referências para Imunobiológicos Especiais (CRIE) e é recomendada nas seguintes situações:

- crianças que após o recebimento de qualquer uma das doses da vacina DTP, Tetra ou Penta apresentem os seguintes eventos adversos: convulsões nas primeiras 72 horas; episódio hipotônico-hiporresponsivo nas primeiras 48 horas;
- apresentem doença pulmonar ou cardíaca, crônicas, com risco de descompensação em vigência de febre;
- doenças neurológicas crônicas incapacitantes;
- doença convulsiva crônica (Ministério da Saúde, 2014a).

Desde 2010, observou-se em diversos países, um aumento no número de infecção em crianças menores de seis meses com o esquema de imunização incompleto e de maior gravidade nos menores de dois meses, sem nenhuma proteção (Ministério da Saúde, 2014b). Várias estratégias de vacinação foram sugeridas, dentre elas a estratégia *cocooning* e a imunização materna. A estratégia *cocooning* refere-se à vacinação de todos os contatos próximos de recém-nascidos e lactentes, entre eles mães, pais, avós, irmãos, cuidadores e profissionais de saúde. O *cocooning* é uma estratégia difícil de implementar e de impacto limitado, uma vez que um programa bem-sucedido implica em uma ampla cobertura de vacinação entre todos os possíveis contatos do lactente, a fim de alcançar um impacto significativo sobre a coqueluche infantil grave (Safadi, 2015; Fedele e Stefanelli, 2017).

A vacinação de gestantes é uma estratégia proposta para aumentar os títulos de anticorpos maternos e, conseqüentemente, neonatais. Essa estratégia foi aprovada pela OMS e diversos órgãos como ACIP dos EUA, o Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas, a Academia Americana de Pediatras dos EUA e no Brasil pelo Comitê Técnico Assessor em Imunizações (CTAI) do PNI. A recomendação destas instituições é a vacinação de todas as gestantes com a vacina acelular dTpa, a partir da vigésima sétima semana (27^a) até a trigésima sexta semana (36^a) de gestação, a fim de reduzir a morbidade e mortalidade em crianças com

menos de seis meses de idade. A dTpa deve ser administrada a cada gestação pois os anticorpos tem curta duração e a vacinação durante uma gravidez não manterá alto o nível de anticorpos protetores em outras gestações (Ministério da Saúde, 2014b).

Países como Costa Rica, México, Paraguai, Argentina, Chile, Uruguai, Estados Unidos, Alemanha, França, Holanda, Reino Unido já recomendam o seu uso desde 2012 (Safadi, 2015). O Ministério da Saúde do Brasil incluiu a vacinação das gestantes no Calendário Nacional de Vacinação em novembro de 2014, seguindo o protocolo da administração da dTpa determinado pela OMS até 2017, quando passa a disponibilizar a vacina para as gestantes a partir da 20^a semana de gestação. As mulheres que perderam a oportunidade de serem vacinadas durante a gestação, devem receber uma dose de dTpa no puerpério o mais rapidamente possível. A transferência dos anticorpos da mãe para o feto, diminui a possibilidade que eles contraíam a doença até que completem o esquema de vacinação com a pentavalente, aos seis meses de idade, além do benefício adicional de proteger a mãe contra a doença (Safadi, 2015; Ministério da Saúde, 2016).

Além da vacinação em gestantes para a proteção dos menores de seis meses, é de fundamental importância a vacinação dos profissionais de saúde que atuam em maternidades e em unidades de internação neonatal atendendo recém-nascidos e crianças menores de um ano de idade, como também para médicos anestesistas, ginecologistas, obstetras e pediatras (Oliveira et al., 2017).

Apesar da disponibilidade de vacinas seguras e eficazes contra coqueluche há mais de 50 anos em muitos países, observam-se os ciclos epidêmicos da doença a cada 3–5 anos sugerindo que, embora a doença tenha diminuído, a transmissão de *B. pertussis* não está sendo controlada (Sealey et al., 2016; Fedele e Stefanelli, 2017).

Estudos recentes indicam que o ressurgimento da coqueluche ocorra devido à diminuição da imunidade induzida pela vacina. Sabe-se que a duração da imunidade contra a coqueluche não é permanente e estima-se que, após infecção natural ou vacinação, a duração seja de aproximadamente sete a 20 anos e quatro a 12 anos, respectivamente. Em comparação com uma infecção natural, a duração da proteção após a vacinação parece ser menor, principalmente após a vacinação com vacinas acelulares que substituíram as vacinas de células inteiras na maioria dos países industrializados desde a década de 1990. A proteção oferecida pelas vacinas aP parece ser menos duradoura do que se pensava anteriormente, levantando a possibilidade de que a mudança das vacinas possa ter agravado o problema da coqueluche (Chen e He, 2017).

Com a imunidade reduzida pelas vacinas aP, houve um aumento acentuado na incidência de coqueluche na faixa etária de sete a 11 anos, enquanto que a vacinação com wP confere proteção a esse grupo. Além disso, a imunidade induzida por aP mesmo protegendo da doença, parece não impedir a colonização e / ou a transmissão de *B. pertussis*. As descobertas feitas usando modelos de infecção e modelagem matemática de primatas não humanos, sugerem que a transmissão assintomática ocorra, apoiando a hipótese de que essa transmissão é um dos principais impulsionadores do ressurgimento da coqueluche em populações altamente vacinadas (Sealey et al., 2016; Fedele e Stefanelli, 2017).

A hipótese de que as vacinas acelulares protegem contra a doença, mas não contra a colonização, parece ser devido às menores respostas T helper tipo 1 e tipo 17 (Th1 / Th17) (Chen & He, 2017). Tanto as vacinas celulares quanto as acelulares são capazes de gerar altos níveis de anticorpos para os componentes bacterianos, mas somente as vacinas de células inteiras ativam eficientemente as células Th1, que geram uma resposta efetiva do interferon γ (IFN- γ), levando à ativação de células fagocíticas que eliminam a infecção por *B. pertussis* (Smallridge et al., 2014).

As respostas de Th17 são eficientes após infecção natural e vacinação com wP conferindo imunidade à mucosa, desempenhando um papel importante na proteção contra a coqueluche (Gill et al., 2017; Locht, 2018).

As vacinas acelulares parecem induzir uma resposta imune predominantemente Th2 caracterizada pela secreção de interleucina 4 e uma forte resposta de anticorpos (principalmente imunoglobulina E - IgE), não sendo esperado interferência com os patógenos nas superfícies das mucosas. No entanto, também foi observada uma resposta Th1 ou Th1/Th2 mista após a vacinação contra coqueluche acelular com três componentes. Foi demonstrado que a resposta imune Th2 não é tão eficaz quanto à resposta Th1/Th17 podendo explicar a menor proteção em longo prazo das vacinas acelulares (Smallridge et al., 2014; Kilgore et al., 2016; Chen e He, 2017; Gill et al., 2017).

Após o uso universal da vacinação contra coqueluche, houve uma pressão seletiva nas populações circulantes de *B. pertussis*, que no primeiro momento tiveram que evoluir em resposta às vacinas de células inteiras e, então, às vacinas acelulares (Bouchez et al., 2015). Muitos países relataram divergência antigênica das cepas circulantes em relação às cepas vacinais, com diversos estudos realizados mostrando variações alélicas em *B. pertussis* que evoluíram ao longo dos anos (Locht, 2018).

As alterações nas cepas circulantes de *B. pertussis* foram observadas em regiões genéticas de relevância antigênica, como na *prn* (18 alelos), codificando a proteína pertactina, o promotor do operon da toxina pertussis *ptxP* (20 alelos) codificador da toxina pertussis, *ptxA* (11 alelos) codificando a subunidade 1 (S1) da PT, *fim2* (dois alelos) e *fim3* (seis alelos), codificando as proteínas fimbriais Fim2 e Fim3, respectivamente. Apesar disso, essas alterações não afetaram a eficácia das vacinas de células inteiras (Bouchez et al., 2015).

Na era pré-vacinal, os alelos *prn1*, *ptxA2*, *ptxP1* foram predominantes, no entanto, nos anos 80, 20 a 30 anos após a introdução da vacinação com células inteiras, as cepas *prn1* foram substituídas pelas cepas *prn2* e *prn3*. Como a maioria das vacinas contém *prn1*, sugeriu-se que o surgimento de *prn2* e *prn3* foi orientado pela vacinação. De acordo com essa hipótese, verificou-se que uma vacina de célula inteira contendo *prn1* foi menos eficaz contra cepas de *prn2* em comparação com cepas de *prn1* em um modelo de camundongo. As cepas de *prn2* agora predominam na maioria das populações vacinadas (van Gent et al., 2011; Bouchez et al., 2015).

Enquanto as evoluções genéticas mais observáveis na era da vacina wP foram as variações alélicas e antigênicas, a aparição de cepas de *B. pertussis* deficientes em pertactina foi um fenômeno associado ao uso de vacinas acelulares predominando em vários países nos quais essas vacinas têm sido usadas por muitos anos. Esse fenômeno não tem sido observado em países como Polônia, Sérvia e Tunísia, onde as vacinas de células inteiras estão ainda em uso (Mooi et al., 2015; Vodzak et al., 2017; Ben Fraj et al, 2019), como também nenhum isolado deficiente em pertactina foi detectado na Dinamarca, onde a vacina acelular utilizada não contém o componente pertactina (Hiramatsu et al., 2017).

O rápido aumento de cepas de *B. pertussis* deficientes em pertactina observado em vários países como Finlândia, Suécia, Estados Unidos, Japão e Austrália, combinado com a evidência de que várias mutações (inserções de IS481 em múltiplos locais, códons de terminação e deleções) podem resultar na falta da pertactina, sugerem que essa deficiência possa conferir uma vantagem seletiva à bactéria, beneficiando-a especialmente entre uma população altamente imunizada (Souder e Long, 2015; Breakwell et al., 2016).

A pertactina desempenha um importante papel na aderência de *B. pertussis* às células epiteliais humanas; entretanto, estudos em camundongos imunizados com vacina acelular demonstraram que cepas deficientes em pertactina poderiam colonizar o trato respiratório mais efetivamente do que cepas produtoras de pertactina, sugerindo que as pessoas vacinadas com aP são mais suscetíveis a cepas deficientes em pertactina do que as cepas produtoras de pertactina (Martin et al., 2015; Hiramatsu et al., 2017).

A deficiência de pertactina também pode facilitar a transmissão, por exemplo, camundongos vacinados com vacinas acelulares infectados com cepas deficientes em pertactina sofreram infecções mais longas do que aqueles infectados com cepas que expressam pertactina. A deficiência de pertactina pode resultar em melhor transmissão, evitando as respostas imunes induzidas pela vacina que são específicas da pertactina (Breakwell et al., 2016). Esses relatos sugerem que cepas deficientes em pertactina têm maior aptidão em pessoas que foram vacinadas com aP e que sua expansão pode reduzir a eficácia dessas vacinas (Hiramatsu et al., 2017). As cepas de escape vacinal deficientes para a pertactina podem, portanto, emergir rapidamente, pois têm uma forte vantagem seletiva em uma população imunizada com vacinas acelulares contendo este componente (He, 2016; Lochter, 2016; Lochter, 2018).

A literatura sugere que as vacinas acelulares são responsáveis pelo aparecimento e propagação de isolados deficientes em pertactina e até o momento, não existem relatos de cepas pertactina deficientes em populações vacinadas com vacina celular e, no Brasil, não existe nenhum estudo sobre esses isolados.

No Brasil, o Instituto Adolfo Lutz (IAL) é o Laboratório de Referência Nacional para Coqueluche, sendo responsável pelo diagnóstico laboratorial do agravo como também pelo desenvolvimento de pesquisas para

caracterizar os isolados de *B. pertussis* circulantes no país. Dessa maneira, estudos que adicionem maior conhecimento da relação entre o sucesso de uma vacina e a variabilidade genética das cepas circulantes no país poderão contribuir para o melhor entendimento da epidemiologia da coqueluche em nosso meio.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar a ocorrência de isolados de *B. pertussis* deficientes em pertactina no Brasil, no período de 2010 a 2016.

2.2. Objetivos Específicos

- a. Determinar os sorotipos e perfis genéticos circulantes, dos isolados de *B. pertussis*, pelas técnicas de sorotipagem e eletroforese em gel por campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* - PFGE);
- b. Realizar a triagem para a expressão da proteína pertactina, dos isolados de *B. pertussis*, por meio do Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* - ELISA);
- c. Confirmar a triagem realizada por ELISA, por meio das técnicas da reação em cadeia da polimerase (PCR) e *Immunoblotting*;
- d. Determinar possíveis alvos genéticos para a deficiência em pertactina por meio do sequenciamento de Sanger.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Conselho Técnico Científico (CTC) do Instituto Adolfo Lutz (IAL) em fevereiro de 2015 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEPIAL) do IAL em abril de 2015 sob o número: 77G/2014 (CAAE: 42590415.8.0000.0059). O estudo obedeceu às recomendações da Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466 de 2012.

3.1. Material

3.1.1. Isolados Bacterianos

A coqueluche é uma doença de notificação compulsória no território nacional desde 2000 e por esta razão o Brasil consta de um sistema de vigilância sentinela no país tendo como principal objetivo à triagem adequada de casos, a partir de uma definição de caso suspeito e da confirmação da doença por critério laboratorial, por meio da coleta oportuna da secreção da nasofaringe e realização da cultura.

O diagnóstico laboratorial da coqueluche pela cultura é realizado no Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz Central - **Laboratório de Referência Nacional para Coqueluche**, nos doze Centros de Laboratórios Regionais do IAL (CLRs) como também nos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs), localizados nos Estados brasileiros.

Em razão do IAL ser o Laboratório de Referência Nacional para Coqueluche, todas as culturas provenientes da rotina diagnóstica dos CLRs e LACENs, com resultados presuntivos de pertencerem ao gênero *Bordetella*, são encaminhadas ao IAL para que se realizem as provas bioquímicas para a identificação das espécies, a caracterização primária pela determinação dos sorotipos, bem como a guarda e manutenção dos isolados por meio das técnicas de congelamento e / ou liofilização.

Assim, os isolados bacterianos selecionados para este estudo são provenientes da rotina diagnóstica do IAL Central, CLRs e LACENs e mantidos na coleção de culturas do Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais (NDEI) - Centro de Bacteriologia e no Núcleo de Coleção de Micro-organismos – Centro de Procedimentos Interdisciplinares, do Instituto Adolfo Lutz Central.

O número de amostras analisadas foi inicialmente calculado a partir de um estudo piloto com 162 isolados de *B. pertussis*. O cálculo amostral foi realizado pela aproximação da distribuição binomial para a distribuição normal, para uma proporção esperada de isolados deficientes em pertactina. O tamanho mínimo amostral ajustado para uma população finita foi calculado utilizando as fórmulas:

$$n = \frac{z^2 \cdot P(1-P)}{d^2} \quad \text{e} \quad \frac{N \cdot n}{N+n} \quad \text{onde:}$$

n = tamanho amostral mínimo

z = 1,96 → valor da distribuição normal reduzida (intervalo de confiança desejado)

d = 1% → precisão / margem de erro / limite de confiança

P = 1,23% → proporção esperada

N = 3.557 → ajuste por amostra finita

O tamanho mínimo de isolados foi calculado em 413 de um universo de 3.557 isolados provenientes das cinco regiões geográficas do Brasil entre os anos de 2010 a 2016.

Desta maneira, dos 3.557 isolados, determinou-se analisar 555, que foram selecionados aleatoriamente respeitando as distribuições proporcionais segundo área geográfica e ano calendário apresentados na Tabela 2. Ano calendário e Unidade Federada que apresentaram número total de amostras igual à “zero” significa que aquela unidade naquele determinado ano não isolou nenhuma *B. pertussis*. Ano calendário e

Unidade Federada que apresentaram número de amostras analisadas igual à “zero” significam que o número total de isolados analisados naquela região geográfica, para aquele ano, já estava representativo.

Tabela 2. Isolados de *B. pertussis*, por Unidade Federada e ano, Brasil, 2010-2016.

Região	Unidade Federada (UF)	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		N° isolados analisados	Total Recebido
		Analis	Total	Analis	Total	Analis	Total	Analis	Total	Analis	Total	Analis	Total	Analis	Total		
Sul (n = 129) (Total = 894)	Rio Grande do Sul	5	11	2	6	4	23	6	34	3	11	0	0	1	1	21	86
	Paraná	2	2	1	31	0	42	20	111	13	73	6	39	0	0	42	298
	Santa Catarina	3	5	4	27	4	139	21	127	17	124	5	76	12	12	66	510
Sudeste (n = 240) (Total = 1.939)	São Paulo	7	53	19	208	17	336	46	343	41	603	19	130	41	58	190	1.731
	Rio de Janeiro	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	3	4
	Espírito Santo	0	0	0	0	0	11	1	1	0	0	0	0	0	0	1	12
	Minas Gerais	1	6	1	6	1	30	22	57	6	44	5	39	10	10	46	192
Nordeste (n = 61) (Total = 308)	Bahia	4	4	0	31	2	17	5	52	5	51	0	0	0	0	16	155
	Alagoas	3	3	3	3	0	0	3	4	0	0	0	0	0	0	9	10
	Pernambuco	0	0	1	7	4	57	8	34	10	15	4	19	2	3	29	135
	Paraíba	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	3	3	0	0	6	7
	Ceará	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
Norte (n = 19) (Total = 40)	Tocantins	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
	Amapá	0	0	0	0	1	2	4	13	1	10	0	0	0	0	6	25
	Acre	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5	0	0	0	0	4	5
	Rondonia	0	0	0	0	0	0	0	0	6	7	2	2	0	0	8	9
Centro-Oeste (n = 106) (Total = 376)	Mato Grosso do Sul	2	8	3	6	0	33	10	60	10	80	5	38	0	0	30	225
	Goiás	0	0	0	0	0	2	2	8	0	0	3	6	0	0	5	16
	Distrito Federal	3	3	0	0	15	15	23	24	23	70	5	21	2	2	71	135
	TOTAL N°	30	95	34	325	48	708	171	868	143	1.098	60	376	69	87	555 (15,6%)	3.557 (100%)

n = número; analis = analisado

3.2. Métodos

A reativação dos isolados, sorotipagem, eletroforese em gel por campo pulsado - PFGE e reação em cadeia da polimerase - PCR foram realizados no NDEI – Centro de Bacteriologia; o ensaio imunoenzimático - ELISA e a metodologia de *imunoblotting* no Centro de Imunologia e o sequenciamento de Sanger no Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz Central – São Paulo.

Abaixo segue a representação esquemática das metodologias utilizadas no estudo, seguidas de suas descrições (Figura 6).

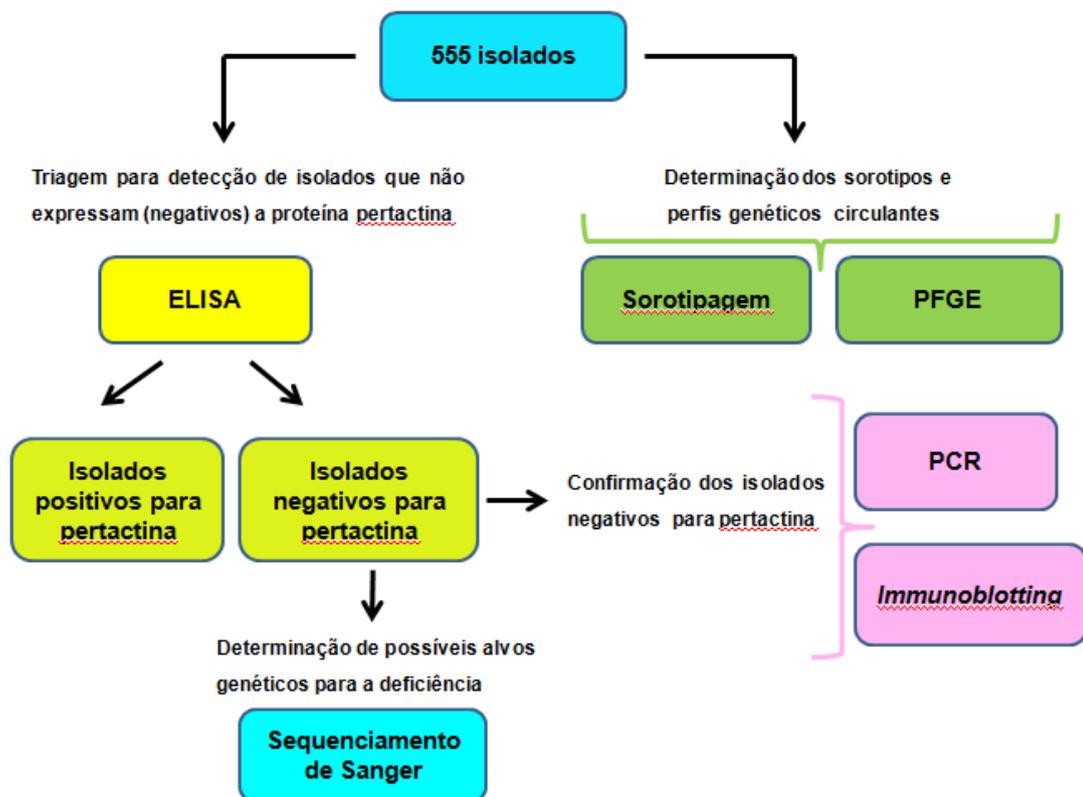


Figura 6. Fluxograma metodológico.

3.2.1. Reativação dos Isolados

Todos os isolados de *B. pertussis* utilizados para as técnicas de PFGE, PCR, ELISA, *imunoblotting* e sequenciamento estavam congelados ou liofilizados e foram reativados realizando semeadura em placas de ágar carvão (Oxoid™) suplementado com 10% de sangue de cavalo desfibrinado e estéril, incubados a 35-37 °C, em atmosfera úmida por um período de até cinco dias.

3.2.2. Determinação dos perfis circulantes de *B. pertussis*

A caracterização primária e perfil epidemiológico dos isolados foram realizados por meio das técnicas de sorotipagem (Pittman, 1974) e PFGE (Advani et al., 2004).

3.2.2.1. Sorotipagem

A caracterização antigênica ou sorotipagem é baseada na técnica de macroaglutinação em lâmina (Pittman, 1974) para a detecção do antígeno somático O1, confirmatório para a espécie *B. pertussis*, pois se trata de um antígeno espécie específico, e para a detecção dos antígenos de estruturas fimbriais Fim2 e Fim3, importantes na diferenciação dos isolados e detecção de mudanças temporais na população de *B. pertussis*.

A sorotipagem é realizada de forma rotineira e, portanto, os 555 isolados foram sorotipados ao longo dos anos de estudo, como parte do processo de identificação e confirmação da espécie.

Os antissoros foram produzidos no Laboratório de Referência Nacional para Coqueluche - IAL, utilizando as cepas de referência de *B. pertussis* (GL353, 360E, H36) recebidas do Laboratório de Referência da Organização Mundial da Saúde para Pertussis – Universidade de

Manchester, Inglaterra.

O preparo dos antígenos para a imunização de coelhos e a absorção para obtenção dos antissoros foi realizada seguindo a técnica descrita por Preston e Te Punga, 1959.

A técnica de macroaglutinação em lâmina (placa de vidro quadriculada, colocada sobre uma caixa munida de lâmpada (Caixa de Huddleson)) foi realizada a partir da mistura de 20 µl de suspensão bacteriana densa com aspecto leitoso, preparada em solução fisiológica 0,85% (0,85 g NaCl em 100 mL de água destilada estéril) com um volume igual do antissoro O1, do antissoro Fim2, do antissoro Fim3 e de solução salina a 2% (2 g NaCl em 100 mL de água destilada estéril) para o controle da rugosidade das cepas (autoaglutinação).

A determinação dos sorotipos de *B. pertussis* foi realizada de acordo com Robinson et al., (1989) observando a presença de aglutinação com os antígenos O1, Fim2 e Fim3 (Figura 7).

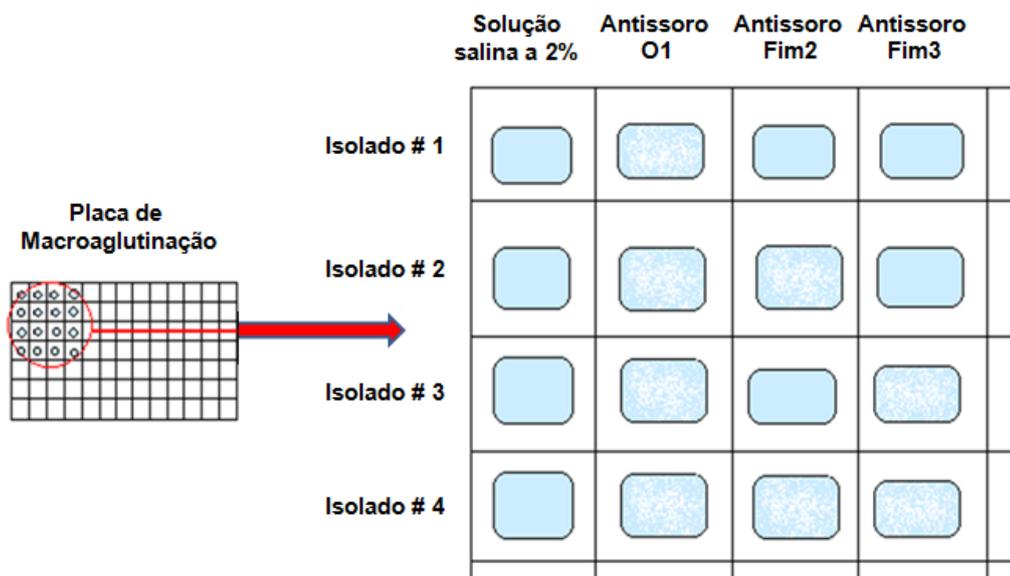


Figura 7. Representação esquemática da sorotipagem de *B. pertussis*.

Quando nenhuma reação foi detectada com os antígenos fimbriais, o sorotipo foi definido como não tipável. De acordo com a expressão destes antígenos, os sorotipos de *B. pertussis* são designados:

- ❖ Sorotipo 1,2: quando o antígeno somático O1 está associado à presença do antígeno fimbrial Fim2;
- ❖ Sorotipo 1,3: quando o antígeno somático O1 está associado à presença do antígeno fimbrial Fim3;
- ❖ Sorotipo 1,2,3: quando o antígeno somático O1 está associado à presença dos antígenos fimbriais Fim2 + Fim3.

3.2.2.2. Eletroforese em gel por campo pulsado - *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, PFGE

A PFGE é considerada uma metodologia de referência para estudos epidemiológicos da coqueluche por apresentar um alto poder discriminatório, capaz de monitorar diferenças genéticas entre isolados de *B. pertussis* ao longo do tempo.

Seguiu-se o método de PFGE² descrito por Advani et al., (2004), utilizando a enzima de restrição *XbaI* (*Xanthomonas badrii*) (Promega Corporation, Madison, USA) com poucas modificações. Foram analisados 511 isolados dentre os 555 estudados, pois 44 deles não foram viáveis após duas tentativas de reativação.

A eletroforese foi realizada em aparelho **CHEFF DR III** (Bio-Rad, USA) a 6 v / cm, 14 °C, por 24 h dividido em dois blocos sendo: pulso inicial de 5 segundos (seg) e final de 6 seg por 11 h (bloco 01) e pulso inicial de 8 seg e final de 35 seg por 13 h (bloco 02).

². Metodologia na íntegra pode ser consultada no Anexo 2.

A análise do perfil de bandas foi realizada utilizando-se o programa BioNumerics versão 7.1 (AppliedMaths, Keistraat, Belgium) para a construção do dendrograma de similaridade genética pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) com base no padrão de bandas do DNA de *Salmonella* Branderup (H9812) como padrão de normalização.

3.2.3. Detecção da expressão da proteína pertactina

Foram realizados três métodos para a detecção da proteína pertactina, sendo: o ensaio de ELISA (Martin et al, 2015) como método de triagem inicial e a PCR (Pawloski et al., 2014) e *immunoblotting* (Green e Sambrook, 2012) como métodos confirmatórios.

3.2.3.1. Ensaio Imunoenzimático - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA

Todos os 555 isolados foram submetidos à técnica de ELISA sanduíche para triagem da expressão da proteína pertactina, realizada de acordo com a metodologia descrita por Martin et al, (2015). Como controles padrões de referência positivos para pertactina foram utilizadas as cepas H921 e H936 e como controles negativos para pertactina as cepas H920 e H939, fornecidos gentilmente pela Dra. Maria Lucia Tondella, do Laboratório de Pertussis e Difteria do *Centers for Disease Control and Prevention*, (CDC), Atlanta, GA, USA.

A partir do crescimento bacteriano foi preparada uma suspensão em 2 ml de PBS (solução salina-fosfatada tamponada) 0,01M pH 7,2, e a concentração ajustada à densidade óptica (DO) de 1,6-1,9 (comprimento de onda de 620 nm). Após ajuste, as suspensões bacterianas foram inativadas com 20 µl de formalina e estocadas a 4 °C até a realização da técnica.

As microplacas foram sensibilizadas com 100 µl das suspensões bacterianas diluídas 1:2 em PBS 0,01 M pH 7,2 e incubadas por um período de 18-20 h a 37 °C. Após esse período as placas foram lavadas três vezes utilizando lavador automático de microplacas (Seac, Radim, Inc. Company) e em seguida 100 µl do soro de carneiro anti 69 kDa (Pertactina) de *Bordetella pertussis* (PRN) (National Institute for Biological Standards and Control, PRN/NIBSC n° catálogo 97/558) diluído em tampão de ensaio (PBS 0,01M pH7,4, BSA 4%, Tween 20 0,05%) em diluição 1:40.000, foi adicionado em toda a placa e incubado por 1h a 37°C. Em seguida o conjugado-Peroxidase anti IgG carneiro (H+L) (KPL, Gaithersburg, Maryland) diluído 1:2000 foi adicionado à reação e incubado por 1h a 37 °C. A placa foi novamente submetida ao processo de lavagem e a solução de cromógeno TMB-tetrametilbenzidina (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) colocada em toda a placa e incubada em temperatura ambiente por 10 min. A reação foi interrompida com a adição de ácido clorídrico 1N.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro para microplacas (Sunrise, Tecan, Switzerland) em comprimento de onda de 450 nm, utilizando o software Magellan 6.2. Todas as leituras foram realizadas em triplicata e a média das leituras da DO de cada amostra foi calculada.

Os isolados que expressaram a proteína pertactina (positivos) apresentaram valores de DO na faixa de 0,6 - 2,5 enquanto os isolados deficientes em pertactina (negativos) apresentaram valores de DO entre 0,2 – 0,5. Os controles da reação (apenas PBS) apresentaram $DO \leq 0,06$.

3.2.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Após a triagem por ELISA, os isolados que obtiveram resultados negativos ou deficientes para pertactina, foram submetidos a PCR para confirmação.

O procedimento foi realizado de acordo com o descrito por Pawloski et al., (2014) para detectar a inserção de IS481 dentro do gene *prn* nas regiões 3' e 5' e identificar mutação na região promotora deste gene.

A extração dos DNAs foi realizada a partir de suspensões bacterianas feitas em 1 ml de solução fisiológica 0,85% inativadas em termobloco a 99 °C por 30 min.

Após esse período as suspensões foram centrifugadas a 15.000 x g (rcf) por 10 minutos e então os sobrenadantes foram retirados e estocados a 4 °C até serem usados para PCR.

A PCR foi realizada a partir da combinação dos iniciadores (*primers*) BF, BR, PRN-F, PRN-R, PRN-P-F e PRN-P-R (senso, F e anti-senso R) (Tabela 3) em três reações distintas descritas abaixo:

- ❖ **Reação 1:** BF + PRN-R : Captura o a sequência de inserção IS481 na região 3' (Tamanho do fragmento esperado: 1,4 Kb para tipo selvagem; 2,4 Kb para mutante).
- ❖ **Reação 2:** PRN-F + BR : Captura o a sequência de inserção IS481 na região 5' (Tamanho do fragmento esperado: 2,2 Kb para tipo selvagem; 3,2 Kb para mutante).
- ❖ **Reação 3:** PRN-P-F + PRN-P-R : Engloba a região do promotor e capta a mutação de inversão (Tamanho do fragmento esperado: 450 pb para tipo selvagem; 0,7 Kb para mutante).

Tabela 3. Iniciadores utilizados para as reações de PCR.

Iniciador	Sequência de nucleotídeos 5´ - 3´	Posição na cepa Tohama I em relação à prn*	Fonte
BF	AGC TGG GCG GTT CAA GGT	1,398 a 1,415	Mooi et al., 1998
BR	CGG ATT CAG GCG CAA CTC	1,915 a 1,932	Mooi et al., 1998
PRN-F	CGT ACT TTT GCT GCG CCC AT	-79 a -60	Otsuka et al., 2012
PRN-R	CCA AGC TCC AGG AAA ACC TC	2,761 a 2,780	Otsuka et al., 2012
PRN-P-F	TGC CAA GAC GGT ATC TGT	-331 a -314	Pawloski et al., 2014
PRN-P-R	GAC TGG TTG TTC CAG TCG	102 a 119	Pawloski et al., 2014

PRN / prn = pertactina;

*prn encontra-se na região entre os nucleotídeos 1.098.091 e 1.100.823 do genoma completo da cepa de referência Tohama I (número de acesso do GenBank NC_002929.2).

Em cada uma das reações foi utilizado um volume total de 25 µl para todas as amostras, composta de 12,5 µl de HotStarTaq® Master Mix Kit (QIAGEN), 0,5 µl de cada iniciador (F e R) a 100 µM, 2 µl de DMSO (dimetil sulfóxido) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e 7 µl de água grau PCR (Roche Diagnostics, Indianapolis, Ind) adicionados de 2,5 µl de DNA bacteriano.

As ciclagens foram realizadas no termociclador Veriti *Thermal Cycler* (Applied Biosystems) como se segue:

Denaturação Inicial:	95 °C/ 15 min		
30 ciclos:	} 95 °C/ 30 seg - Denaturação 55 °C/ 30 seg - Anelamento 72 °C/ 2,5 min - Extensão		
		Extensão final:	72 °C/ 5 min
		Conservação:	4 °C

Os produtos amplificados foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose a 2% em tampão TBE 0,5X (Tampão Tris-Borato EDTA), a 80 volts por 1 hora e 30 minutos.

A visualização dos produtos foi realizada por meio de Sistema de Fotodocumentação e os resultados interpretados de acordo com os respectivos tamanhos de fragmentos descritos nas reações 1, 2 e 3.

Os controles positivos e negativos das reações (cepas H921/H936 e H920/H939, respectivamente) bem como todos os conjuntos de iniciadores foram fornecidos gentilmente pela Dra. Maria Lucia Tondella – CDC/ Atlanta.

3.2.3.3. Immunoblotting

Os isolados que foram triados como deficientes para pertactina pelo ensaio de ELISA foram testados por *immunoblotting* como mais um teste confirmatório dos resultados.

A metodologia foi realizada segundo Green e Sambrook (2012) com algumas modificações a seguir.

A partir do crescimento confluyente, os isolados de *B. pertussis* foram cuidadosamente colhidos da superfície do ágar e ressuspensos em 1 ml de PBS 0,01M pH 7,2, e a concentração ajustada à DO de 0,4 (comprimento de onda de 540 nm).

As suspensões foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 min a temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos foram coletados em 50 µl de PBS 0,01M pH 7,2.

A concentração proteica das suspensões foi determinada utilizando o equipamento NanoDrop® 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher

Scientific Inc., NY, EUA), absorvância a 280 nm, obtendo um valor médio para cada suspensão a partir de três medições.

As concentrações foram ajustadas para 50 µg de proteína em um volume total de 20 µl de PBS 0,01M pH 7,2. As suspensões foram diluídas (1:2) em tampão da amostra SDS PAGE (Trizma 60mM, pH 6,8 contendo glicerol 25% (v/v) e azul de bromofenol 0,1% em água milliQ) e solubilizados por aquecimento a 100 °C por 10 min em termobloco.

A eletroforese de poliacrilamida (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis* - PAGE) foi realizada seguindo a técnica de Laemmli, 1970. Utilizou-se um gel de empilhamento de 5% e um gel de separação de 12%.

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida, as proteínas fracionadas foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose utilizando um sistema de transferência semi-seco. A eficiência da transferência proteica foi avaliada por coloração da membrana com Ponceau S (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

A membrana de nitrocelulose foi descorada por quatro vezes com água destilada (5 min cada lavagem) e incubada, sob agitação, com solução bloqueadora (Tris-HCl 1,6 mM, NaCl 153,9 mM, pH 7,5, contendo leite desnatado a 5% (p/v)) durante 2 h a temperatura ambiente. Após desprezar a solução bloqueadora e quatro lavagens (5 min cada) com TBS (Tris-salina) pH 7,5 com 0,05% de Tween 20 (TBST - Tris10mM, NaCl 0,9%, Tween20 0,05%), foi adicionado soro de carneiro anti 69 kDa (Pertactina) de *Bordetella pertussis* (PRN) (NIBSC 97/558, EUA) (1:1000 em solução bloqueadora a 1%) e a membrana foi incubada por 18 h a 4 °C. Após esse período, nova sequência de quatro lavagens (TBS pH 7,5 com 0,05% de Tween 20 (TBST) foi realizada e foi adicionado o conjugado-peroxidase anti IgG (Imunoglobulina G) de carneiro (H+L) (1: 2000 em solução bloqueadora a 1%) (KPL 14-23-06, MA, EUA) por 1h à temperatura ambiente e protegido

da luz. Após seis novas lavagens com o mesmo tampão citado anteriormente, a membrana foi incubada com a solução cromógena (4-cloro-1-naftol 16 mM em metanol a 0,2% misturado com peróxido de hidrogénio diluído em TBS pH 7,5 a uma concentração final de 0,025%).

A reação foi interrompida com água destilada, lavando-se quatro vezes, sendo a membrana seca entre folhas de papel de filtro e guardada para documentação dos resultados.

Para confirmação dos resultados, o ensaio de *immunoblotting* foi realizado em duplicata para cada amostra testada.

Foram utilizados como controles positivos e negativos da reação as cepas H921/H936 e H920/H939, respectivamente, cedidas gentilmente pela Dra. Maria Lucia Tondella – CDC/Atlanta.

Os isolados que apresentaram bandas de peso molecular igual a 69 kDa foram consideradas positivos ou seja, detectaram anticorpos anti proteína pertactina, enquanto aqueles que não apresentaram nenhuma banda visível foram considerados negativos ou deficientes em pertactina, isto é, não detectaram anticorpos anti proteína pertactina.

3.2.4. Verificação de possíveis alvos genéticos para a deficiência de pertactina

3.2.4.1 Sequenciamento de Sanger

O sequenciamento de Sanger foi realizado para a verificação de possíveis alvos genéticos relacionadas à deficiência da pertactina, naqueles isolados que foram triados como deficientes pela metodologia de ELISA.

O sequenciamento foi realizado a partir do produto da reação da PCR (PRN-F + BR) que engloba a região promotora e as regiões 1 e 2

(regiões de maior polimorfismo) do gene da pertactina, (Figura 8) conforme protocolo utilizado pelo CDC (Bowden, 2015).

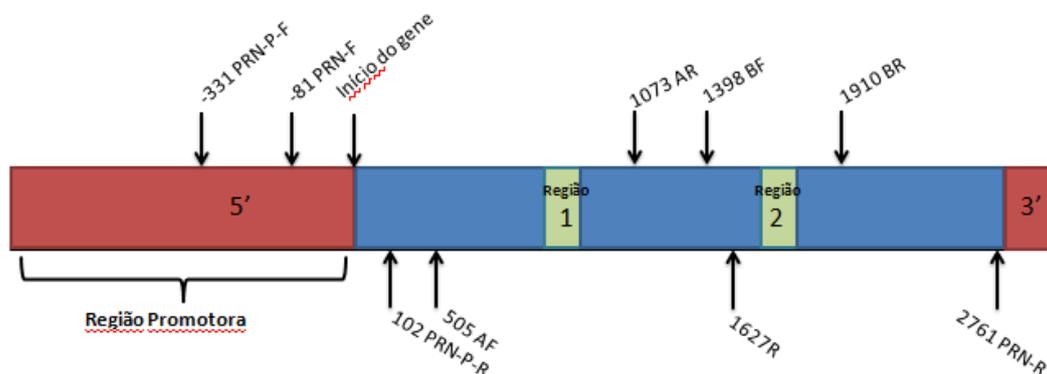


Figura 8. Gene da pertactina e respectiva posição dos iniciadores utilizados para reação de sequenciamento.

3.2.4.1.1. Purificação do produto de PCR

O produto da PCR foi purificado pelo método de ExoSAP-IT (Applied Biosystems), adicionando-se 6 μ l de ExoSAP-IT em 15 μ l do produto amplificado e incubação em termociclador Veriti *Thermal Cycler* (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 37 °C por 15 min, 80 °C por 15 min e armazenamento a 4 °C até o momento do uso.

3.2.4.1.2. Reação de sequenciamento com o *BigDye Terminator v3.1*

A partir do produto amplificado e purificado foi feita uma nova reação de PCR, utilizando-se o *BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A reação foi realizada em um volume total de 20 μ l composta de 7 μ l de água grau PCR (Roche Diagnostics, Indianapolis, Ind) 4 μ l do tampão do *Big Dye*[®], 1 μ l de *Big Dye*[®] e 5 μ l dos iniciadores F ou R (concentração inicial 0,62 μ M) e 3 μ l da amostra purificada. Os iniciadores utilizados nesta etapa estão descritos na tabela 4 e demonstrados na figura 8.

Tabela 4. Iniciadores utilizados para as reações de sequenciamento.

Iniciador	Sequência de nucleotídeos 5´- 3´	Posição na cepa Tohama I em relação ao códon de iniciação da prn*	Fonte
BF	AGC TGG GCG GTT CAA GGT	1,398 a 1,415	Mooi et al.,1998
BR	CGG ATT CAG GCG CAA CTC	1,915 a 1,932	Mooi et al.,1998
AF	GCC AAT GTC ACG GTCC AA	505 a 522	Mooi et al.,1998
AR	GCA AGG TGA TCG ACA GGG	1,073 a 1,090	Mooi et al.,1998
PRN-F	CGT ACT TTT GCT GCG CCC AT	-79 a - 60	Otsuka et al., 2012
1627R	TAT CGA CCT TGC CGT CCT T	1,627 a 1,645	Pawloski et al., 2014

PRN / prn = pertactina (número de acesso do *GenBank* AJ006158.1)

*prn encontra-se na região entre os nucleotídeos 1.098.091 e 1.100.823 do genoma completo da cepa de referência Tohama I (número de acesso do *GenBank* NC_002929.2).

As reações foram feitas em placa de 96 poços e as ciclagens foram realizadas no termociclador Veriti *Thermal Cycler* (Applied Biosystems) como se segue:

25 ciclos:	}	96 °C/ 10 seg - Denaturação
		52 °C/ 5 seg - Anelamento
		60 °C/ 4 min - Extensão
Conservação:		4 °C

3.2.4.1.3. Purificação do produto do *Big Dye*[®]

A partir da placa com a reação com o *Big Dye*[®], foi realizada a purificação do produto adicionando-se 80 µl da solução de acetato de sódio e etanol (3M NaOAc, pH 5,3 / 95% etoh) e incubação em temperatura ambiente por 15 min. Seguiu-se de centrifugação por 45 min (4 °C, 2000 xg), retirou-se o excesso de sobrenadante e centrifugou-se a placa invertida em papel filtro por 1 min a 4 °C 500 xg. Foi adicionado à placa 150 µl de etanol

70% e centrifugou-se por 10 min a 4 °C 2000 xg, com nova retirada do sobrenadante e centrifugação invertida. A placa foi mantida por 5 min a temperatura ambiente e então foi coberta em papel alumínio e armazenada a -20 °C até o momento do sequenciamento.

3.2.4.1.4. Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram feitas pelo método de Sanger no equipamento Sequenciador Automático Applied 3010 XL (Applied Biosystems) segundo as instruções do fabricante. Todos os conjuntos de iniciadores utilizados para o sequenciamento foram cedidos gentilmente pela Dra. Maria Lucia Tondella – CDC / Atlanta.

As análises das sequências para o gene da pertactina foram realizadas com auxílio dos pacotes de programas de análise de sequências DNASTAR - *SeqmanII* e BioEdit (*Biological Sequence Alignment Editor Platform*). As sequências foram comparadas àquelas depositadas no banco de sequências *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information - NCBI*) (números de acesso disponíveis na tabela 5).

Tabela 5. Número de acesso - *GenBank* e variantes alélicas do gene pertactina de *B. pertussis*.

Variantes alélicas de <i>prn</i>		Variantes alélicas de <i>prn</i>	
	Número de Acesso		Número de Acesso
<i>prn1</i>	AJ011091.1	<i>prn10</i>	AJ784875.1
<i>prn2</i>	AJ011092.1	<i>prn11</i>	AJ507642.1
<i>prn3</i>	AJ011093.1	<i>prn12</i>	AB278117.1
<i>prn4</i>	AJ011015.1	<i>prn13</i>	EF486277.1
<i>prn5</i>	AJ011016.1	<i>prn14</i>	HQ165753.1 (parcial)
<i>prn6</i>	AJ132095.1	<i>prn15</i>	KX778732.1
<i>prn7</i>	AJ133784.1	<i>prn16</i>	KC981248.1
<i>prn8</i>	AJ133245.1	<i>prn17</i>	KC981249.1
<i>prn9</i>	AJ315611.1	<i>prn18</i>	KX778733.1

prn = pertactina

4. RESULTADOS

4.1. Determinação dos perfis circulantes de *B. pertussis*

4.1.1. Sorotipagem

Todos os 555 isolados de *B. pertussis* testados foram positivos para o antígeno O1, espécie-específico, confirmando a identificação da espécie.

Cento e noventa e dois isolados foram caracterizados como sorotipo Fim2,3; 182 como sorotipo Fim2; 175 como Fim3, e seis isolados foram não tipáveis.

Pode-se observar que a dominância de cada sorotipo variou ao longo do tempo. No período entre 2010 a 2012 houve predomínio do sorotipo Fim3, que foi gradativamente substituído pelo sorotipo Fim2 predominando no ano de 2014. Nos anos de 2015 e 2016 houve novamente uma substituição do sorotipo predominante, prevalecendo o sorotipo Fim2,3 em aproximadamente 75% dos isolados em relação aos outros sorotipos (Gráfico 3).

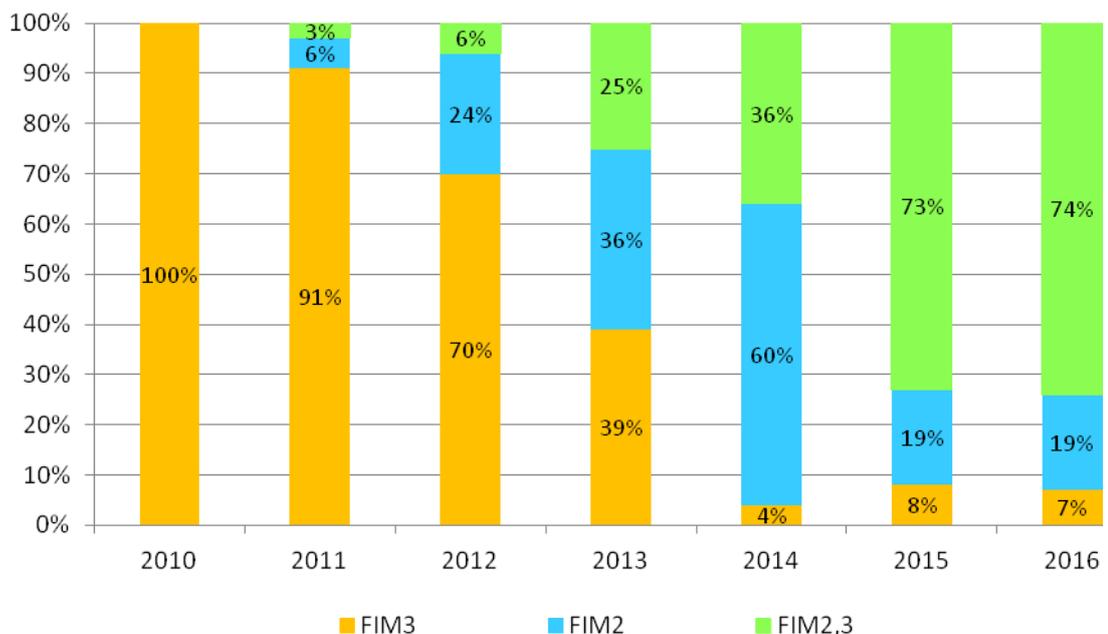


Gráfico 3. Sorotipos circulantes entre os 555 isolados de *B. pertussis* estudados no Brasil, 2010 a 2016.

Quando se analisa os sorotipos separadamente pelas regiões geográficas do país, pode-se observar a predominância do sorotipo Fim3 na região nordeste, do sorotipo Fim2 na região sul e do sorotipo Fim2,3 na região norte. Na região centro-oeste os sorotipos Fim2 e Fim3 tiveram igual predomínio enquanto na região sudeste os três sorotipos circularam de maneira homogênea, com discreto predomínio do sorotipo Fim3 (Gráfico 4).

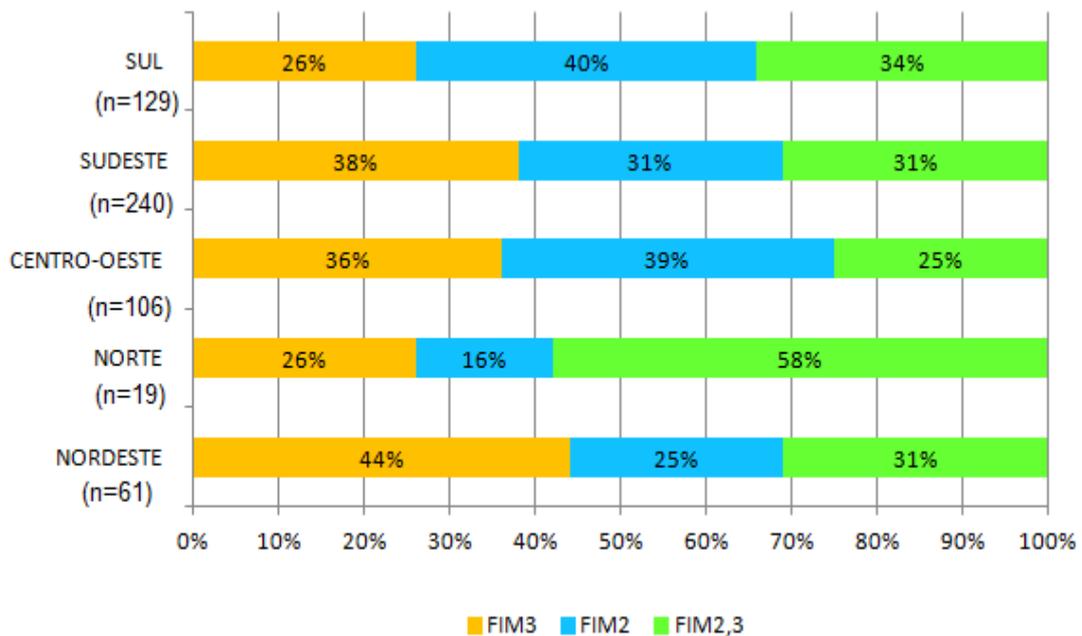


Gráfico 4. Distribuição dos sorotipos de *B. pertussis* por regiões geográficas do Brasil.

Nos gráficos a seguir (Gráficos 5,6,7 e 8) podemos observar a substituição dos sorotipos ao longo dos anos estudados, nas diversas regiões do país. O sorotipo Fim3 teve total predomínio em todas as regiões nos anos de 2010 e 2011, com exceção da região Norte que não houve isolados estudados nesses anos. Esse predomínio se manteve nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste até o ano de 2013.

Na região Sul (Gráfico 5), a partir de 2012, o Fim3 foi substituído pelo Fim2, o qual predominou até 2014, quando houve nova alteração, tornando-se o Fim2,3 o sorotipo predominante na região nos anos de 2015 e 2016.

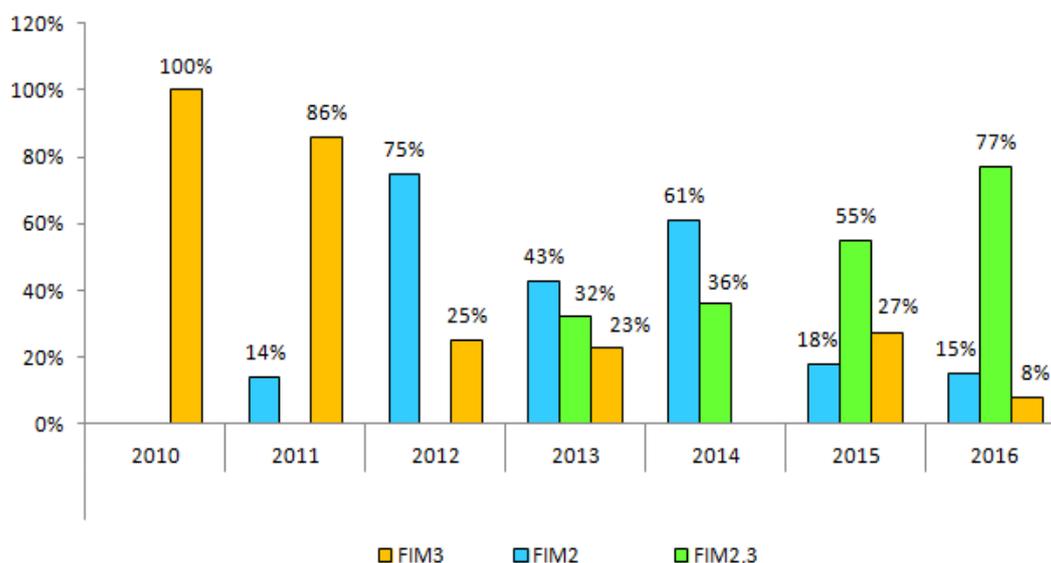


Gráfico 5. Sorotipos de *B. pertussis* circulantes na região Sul, Brasil, 2010-2016.

Na região Sudeste (Gráfico 6), os três sorotipos circularam de maneira uniforme ao longo do ano de 2013. Em 2014, o sorotipo Fim2 prevaleceu e, como ocorrido na região Sul, esse sorotipo foi gradualmente substituído pelo Fim2,3 nos anos de 2015 e 2016.

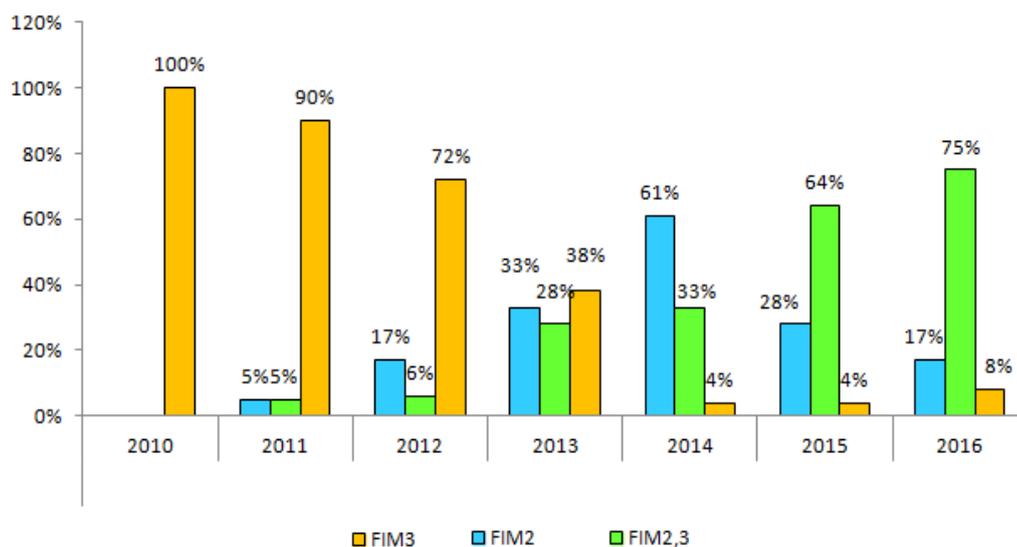


Gráfico 6. Sorotipos de *B. pertussis* circulantes na região Sudeste, Brasil, 2010-2016.

No Centro-Oeste do país (Gráfico 7), o sorotipo Fim2 foi predominante nos anos de 2014 e 2016, sendo o Fim2,3 a maioria no ano de 2015.

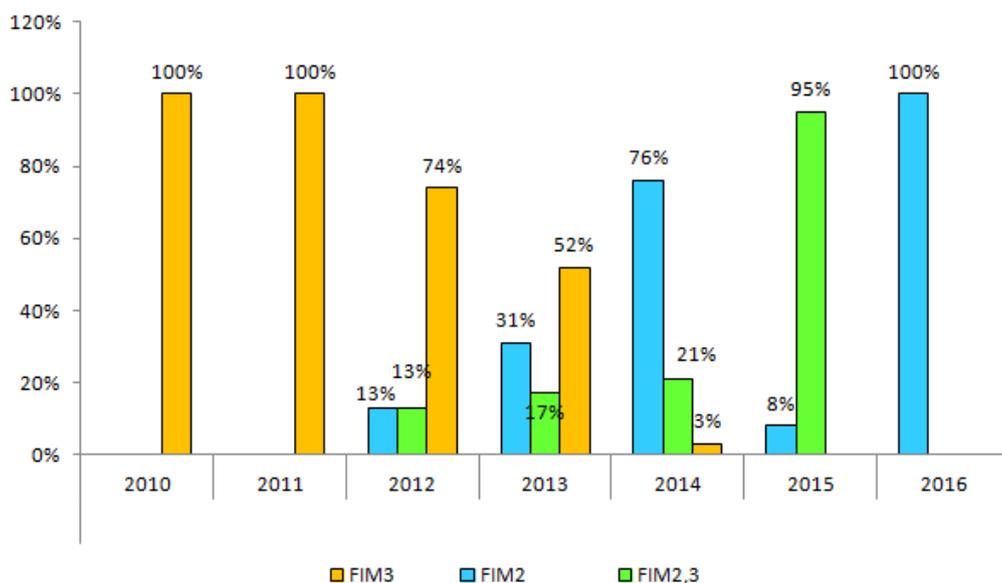


Gráfico 7. Sorotipos de *B. pertussis* circulantes na região Centro - Oeste, Brasil, 2010-2016.

O sorotipo Fim2,3 foi predominante na região Norte nos anos de 2014 e 2015 e na região Nordeste no ano de 2015. O sorotipo Fim2 e Fim2,3 circularam uniformemente na região Nordeste em 2014, quando em 2016, 100% dos sorotipos circulantes foram Fim2 nesta região (Gráfico 8).

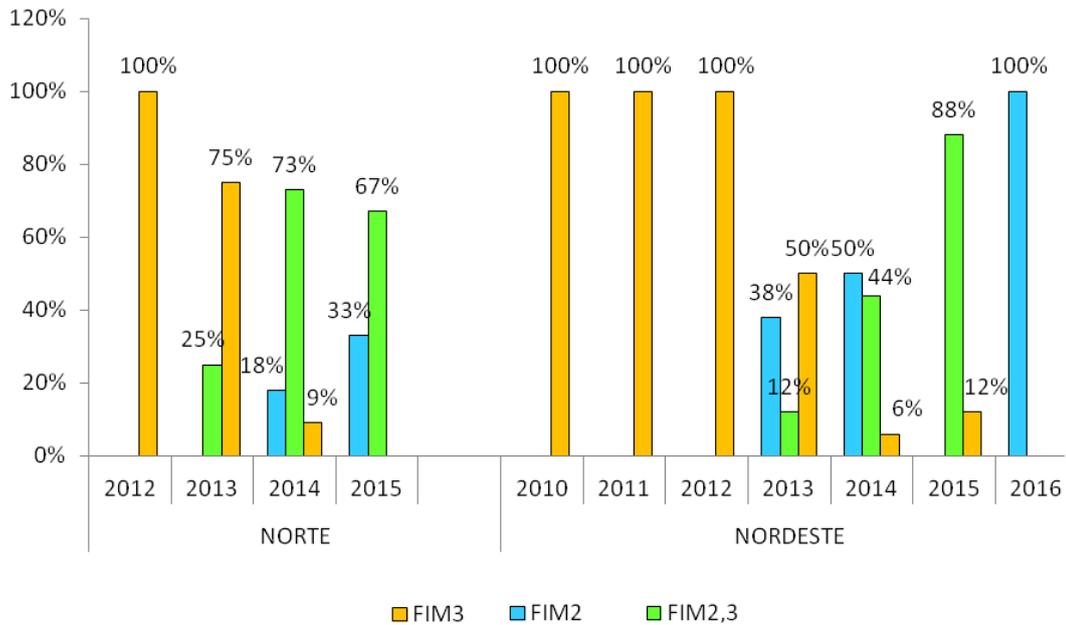


Gráfico 8. Sorotipos de *B. pertussis* circulantes nas regiões Norte e Nordeste, Brasil, 2010-2016.

4.1.2. PFGE

Para a metodologia de PFGE não existe um protocolo padronizado universal entre os laboratórios, diferindo muitas vezes na técnica (condições de eletroforese, período de migração, tempos de pulso, etc.) e na terminologia utilizada, e, portanto, os perfis de eletroforese (pulsotipos) determinados nesse estudo, seguem a nomenclatura padronizada pelo Instituto Adolfo Lutz (Leite et al., 2015).

Entre os 555 isolados de *B. pertussis* testados, 511 foram caracterizados e identificados em 110 perfis distintos de PFGE sendo os pulsotipos BpXba0039, BpXba0040, BpXba0098, BpXba0008, BpXba0088 e BpXba0028 os seis perfis predominantes em nossa população de estudo representando 59% de todos os isolados testados (Gráfico 9).

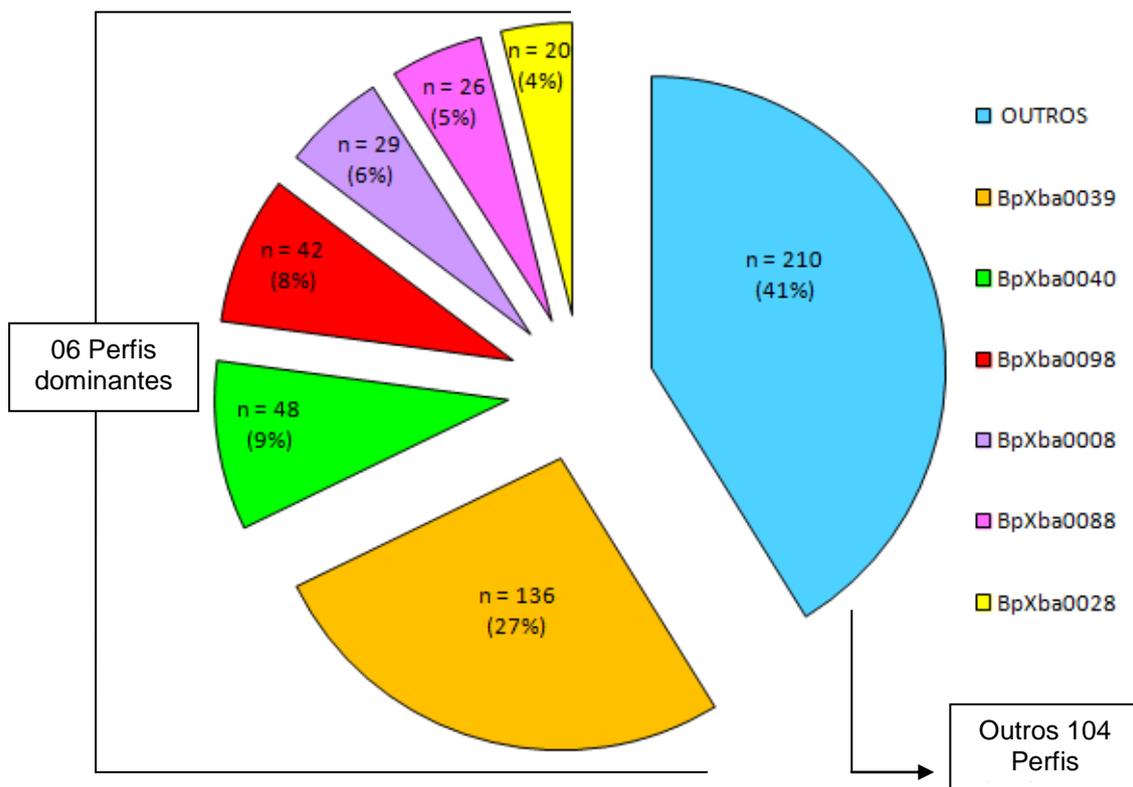


Gráfico 9. Pulsotipos predominantes de 511 isolados de *B. pertussis*, Brasil, 2010–2016.

A avaliação dos perfis mais predominantes realizada ano a ano, mostra diferenças na ordem de frequência e predominância. Nenhum dos seis pulsotipos circulou em todos os anos de estudo, embora o pulsotipo BpXba0039 tenha sido predominante no país desde 2012, sendo responsável por 27% de todos os 511 isolados estudados no período.

Os pulsotipos BpXba0028 e BpXba0008 tiveram maior circulação nos anos iniciais do estudo, sendo substituídos pelos pulsotipos BpXba0039 e BpXba0098 no período final. BpXba0040 e BpXba0088 mantiveram-se constantes por todos os anos avaliados com exceção de 2011 e 2012 respectivamente (Gráfico 10).

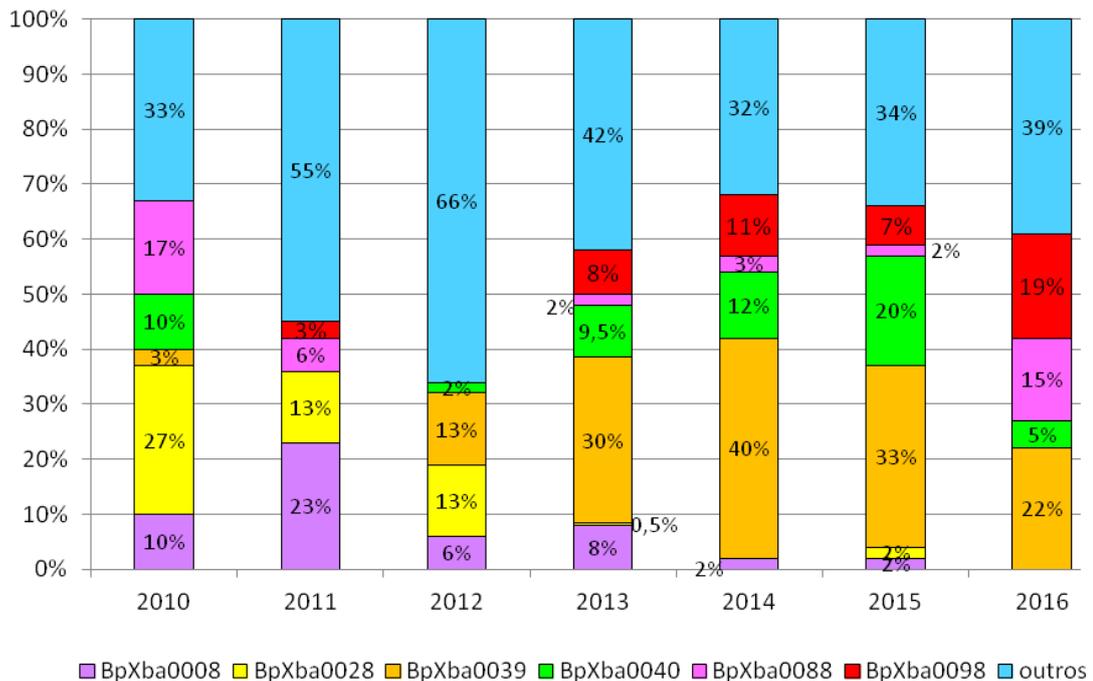
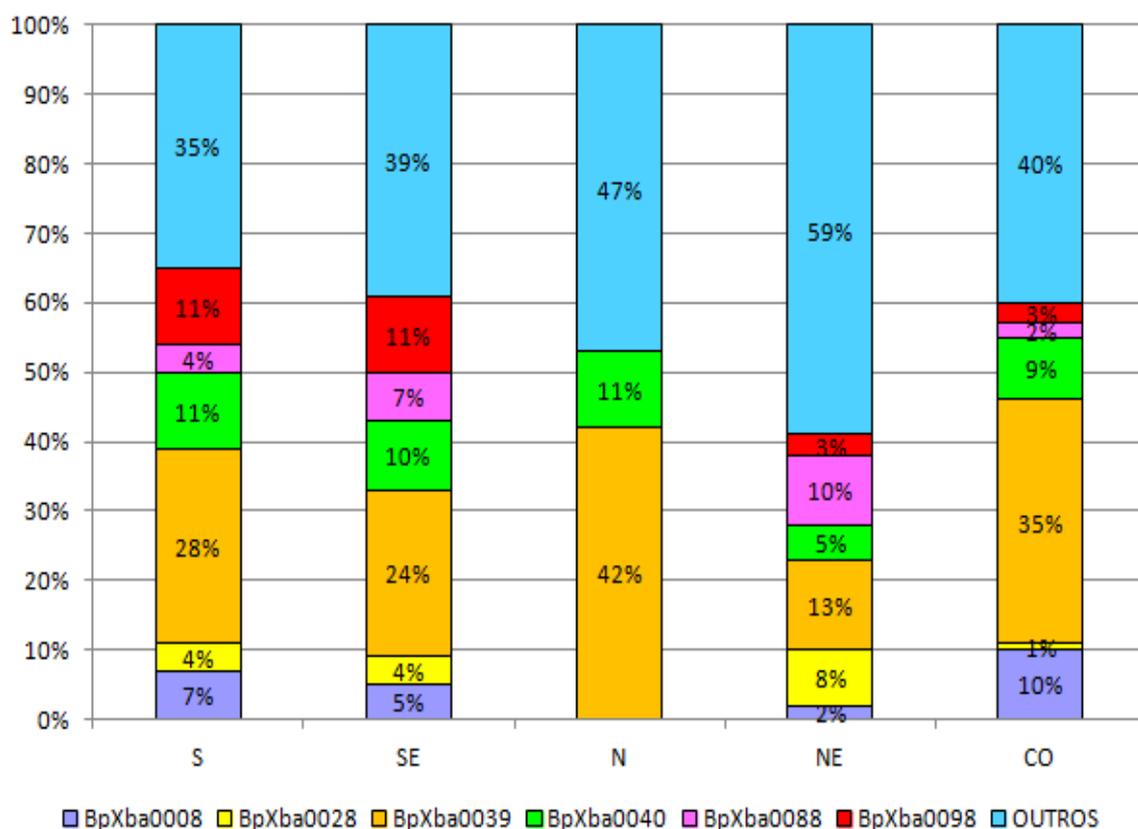


Gráfico 10. Distribuição dos pulsotipos predominantes de *B. pertussis*, por ano de estudo, Brasil, 2010–2016.

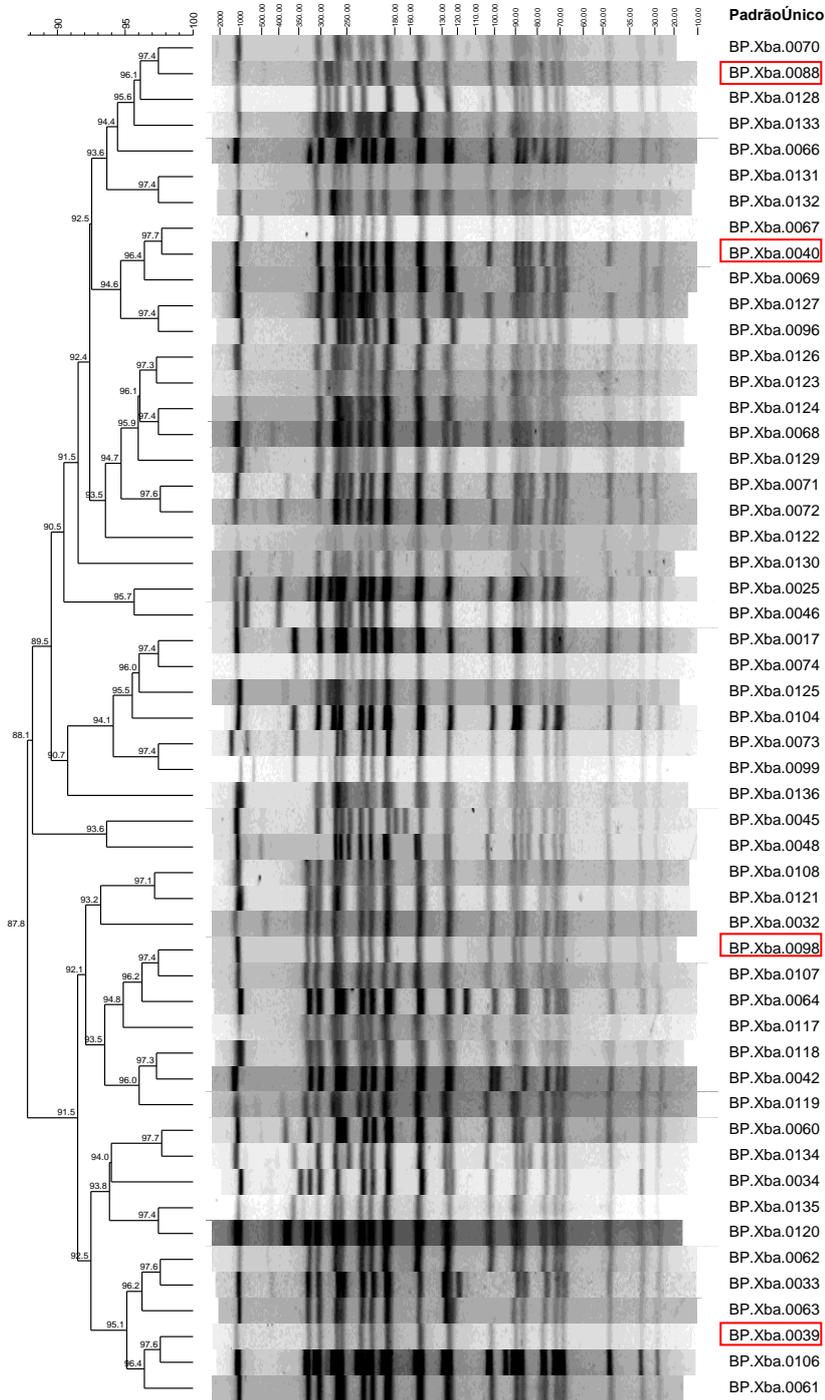
Em relação a diversidade dos pulsotipos circulantes nas regiões geográficas, 35, 33 e 31 perfis distintos circularam no Centro-Oeste, Sul e Nordeste, respectivamente. A maior diversidade de perfis foi encontrada na região Sudeste com 66 pulsotipos circulantes e a menor na região Norte, com 10 perfis distintos, relacionados possivelmente ao maior e menor número de isolados estudados, respectivamente. O gráfico 11 mostra que entre os seis pulsotipos predominantes, o pulsotipo BpXba0039 foi o que teve maior circulação em todas as regiões do país.



S= Sul; SE= Sudeste; N= Norte; NE= Nordeste; CO = Centro-Oeste

Gráfico 11. Distribuição dos pulsotipos predominantes nas regiões do Brasil, 2010–2016.

Uma análise do dendrograma com os 511 isolados determinou oito agrupamentos, classificados como clusters A-H, com 90% de similaridade. O cluster A agrupou 359 isolados em 53 perfis distintos, representando 70% (359/511) de todos isolados testados. O cluster B agrupou 130 isolados em 36 perfis, ou seja 25% (130/511) dos isolados. Os clusters classificados como C,D,E,F, G e H agruparam 14 isolados (3%) em 13 perfis distintos e os 2% restantes (oito isolados) foram caracterizados em oito perfis distintos e não foram agrupados em nenhum cluster. Entre os seis pulsotipos predominantes, os pulsotipos BpXba0039, BpXba0040, BpXba0088 e BpXba0098 foram agrupados no Cluster A e os pulsotipos BpXba0008 e BpXba0028 no Cluster B (Figura 9).



Cluster A

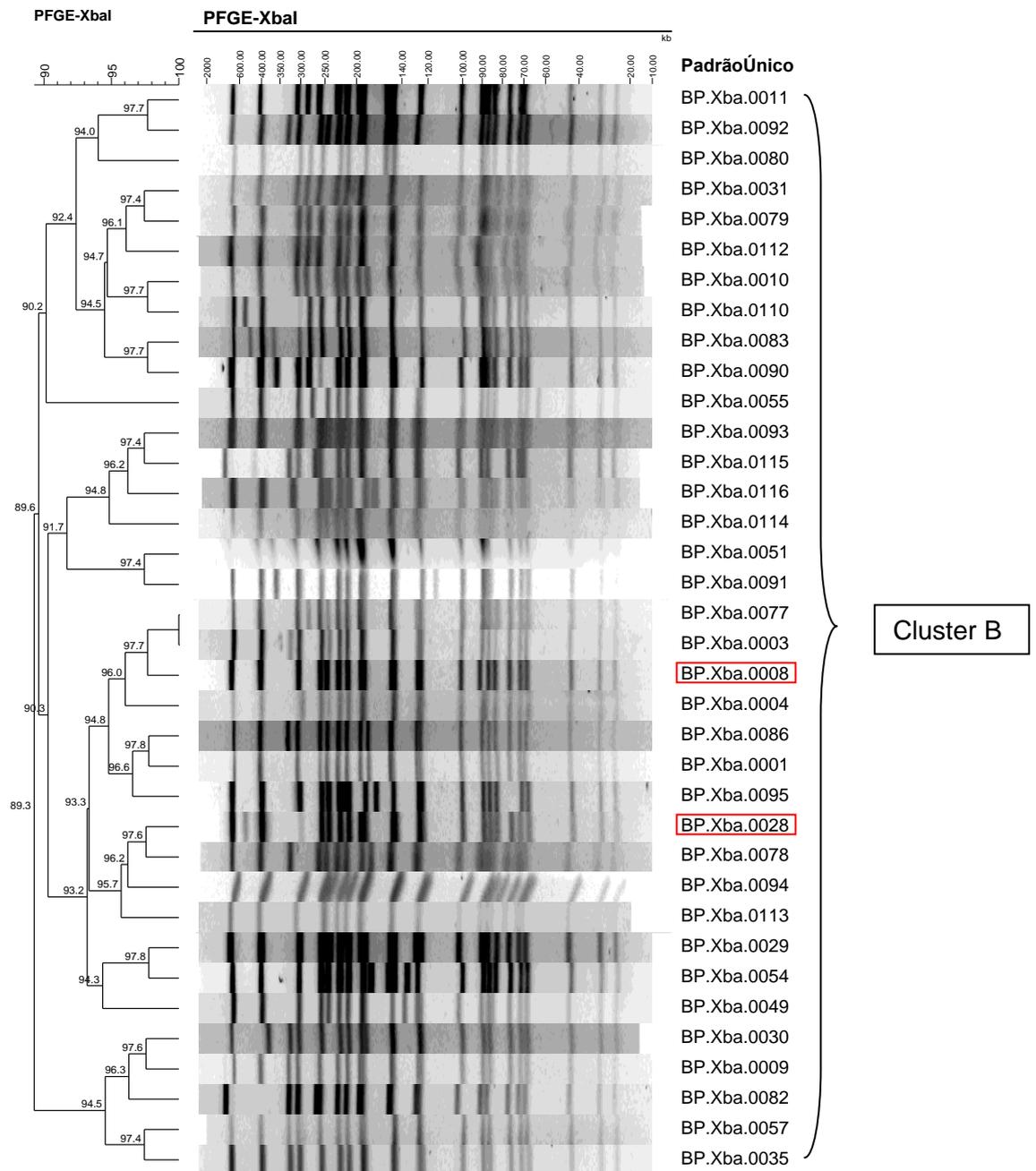


Figura 9. Dendrograma dos perfis de PFGE (pulsotipos) circulantes no Brasil, agrupados nos clusters A e B. Clusters A e B foram determinados pelo método UPGMA com 1,25% de configurações de tolerância e otimização.

4.2. Detecção da expressão da proteína pertactina

4.2.1. ELISA

Entre os 555 isolados de *B. pertussis* analisados, 467 apresentaram valores de DO na faixa entre 0,6 - 2,5, sendo considerados positivos, ou seja, expressaram a proteína pertactina. Cinco isolados apresentaram valores dentro da faixa de resultado negativo (DO entre 0,2 – 0,5), ou seja, não expressaram a proteína pertactina, e então foram re-testados, confirmando os resultados como negativos.

Oitenta e três isolados apresentaram resultados inconclusivos, isto é, com valores de DO entre 0,5-0,6 e foram então re-testados mais duas vezes. Após os três testes, 80 foram classificados como positivos e três classificados como negativos ou deficientes em pertactina.

A triagem por esse método resultou em 547 isolados que expressaram a proteína pertactina e oito isolados foram classificados como negativos ou deficientes em pertactina.

4.2.2. PCR

Os isolados que foram classificados como deficientes para pertactina pela triagem por ELISA (oito), foram submetidos à técnica de PCR para confirmar os resultados. Essa metodologia foi realizada para detectar a inserção de IS481 dentro do gene *prn* e/ou identificar mutação na região promotora deste gene, por serem prováveis causas da deficiência.

Em relação a inserção de IS481 tanto na região 3' como na região 5', todos os oito isolados testados apresentaram o tipo selvagem, ou seja, nenhuma inserção foi observada dentro do gene da pertactina. Quando testados para mutação na região promotora do gene *prn*, apenas um isolado (coluna 5) revelou mutação nesta região, apresentando tamanho de

fragmento de 0,7 Kb conforme comparado a cepa padrão (coluna 2) (Figura 10). Com a mutação nessa região, a transcrição não ocorre e a proteína não é produzida.



Figura 10. Eletroforese em gel de agarose do produto amplificado para a região promotora do gene da pertactina. PM = padrão de peso molecular em quilobases (Kb); 1= cepa padrão H936 tipo selvagem (450 pb); 2= cepa padrão H920 mutante (0,7 Kb); 3 = isolado n° 16349; 4 = isolado n° 52857; 5 = isolado n° 20140; 6 = isolado n° 22946; 7 = isolado n° 24416; 8 = isolado n° 73228; 9 = isolado n° 73230; 10 = isolado n° 73243; 11 = cepa *E. coli* (controle negativo); 12 = água (H₂O). As setas indicam os dois tamanhos de fragmentos esperados para selvagens(450 pb) e mutantes (0,7 Kb).

4.2.3. Immunoblotting

Os oito isolados que apresentaram resultados negativos no teste de ELISA foram avaliados por *immunoblotting* como mais um teste confirmatório.

O gel de *immunoblotting* só comporta o número máximo de oito amostras por vez, dessa maneira os oito isolados foram divididos em dois géis. Na figura 11, das cinco amostras testadas, quatro detectaram

anticorpos anti proteína pertactina (69 kDa) (colunas 3,4, 6 e 7) e um isolado, amostra n° 22946 (coluna 5), apresentou um resultado duvidoso (perfil de banda muito fraco) e manteve esse mesmo resultado inconclusivo após duas repetições.

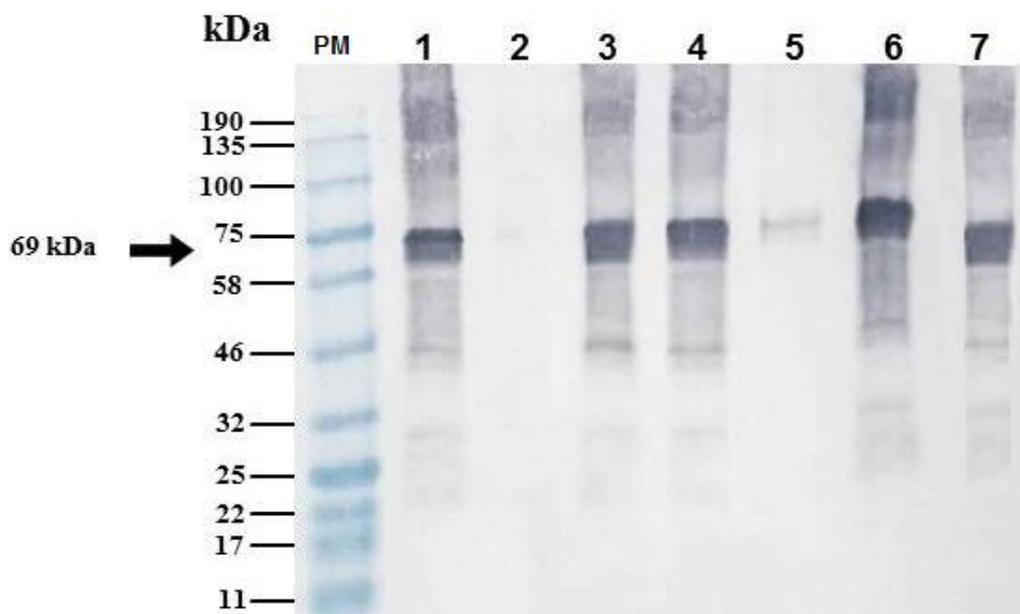


Figura 11. Eletroforese de proteínas para detectar a expressão da pertactina em cinco isolados de *B. pertussis*, Brasil. PM = padrão de peso molecular em quilodaltos (kDa); coluna 1= cepa padrão H936 tipo selvagem (PRN positivo); 2 = cepa padrão H920 mutante (PRN deficiente); 3 = isolado n° 73228; 4 = isolado n° 16349; 5 = isolado n° 22946; 6 = isolado n° 73243; 7 = isolado n° 24416. Seta indica o peso molecular de 69 kDa da pertactina.

Na figura 12, pode-se observar que as três amostras testadas (colunas 3, 4 e 5) não apresentaram nenhum perfil de banda, isto é, não detectaram anticorpos anti proteína pertactina (69 kDa).

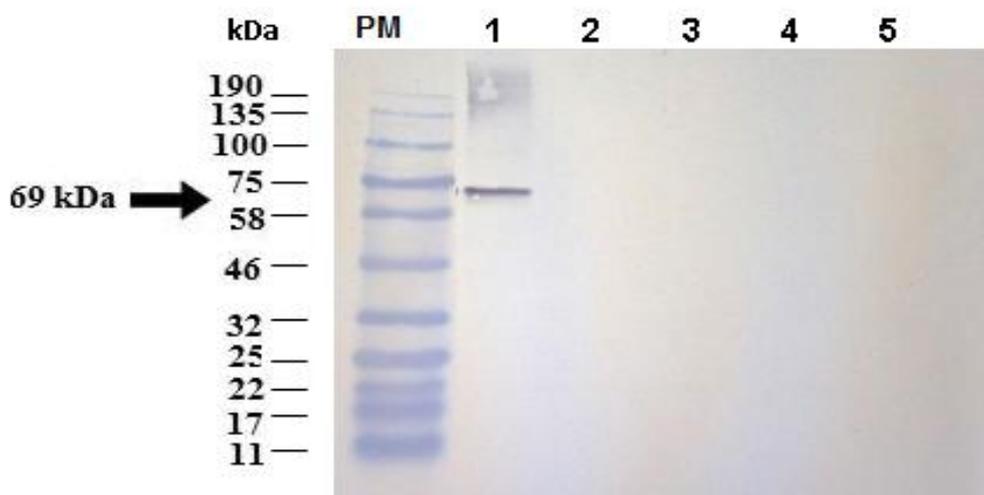


Figura 12. Eletroforese de proteínas para detectar a expressão da pertactina em três isolados de *B. pertussis*, Brasil. PM = padrão de peso molecular em quilodaltos (kDa); **coluna 1**= H936 cepa padrão tipo selvagem (PRN positivo); **2** = cepa padrão H920 mutante (PRN deficiente); **3** = isolado n° 20140; **4** = isolado n° 52857; **5** = isolado n° 73230. Seta indica o peso molecular de 69 kDa da pertactina.

4.3. Sequenciamento de Sanger

Para determinação de possíveis alvos genéticos para a deficiência da pertactina, os oito isolados que apresentaram resultado negativo por ELISA e que foram testados por PCR e *immunoblotting*, foram submetidos ao sequenciamento de Sanger.

O sequenciamento não detectou nenhuma deficiência no gene da pertactina nos oito isolados testados. Quando comparados aos 18 perfis alélicos disponíveis no *GenBank*, o sequenciamento revelou que esses isolados carregavam o alelo *prn2*, o tipo mais prevalente em isolados recentes.

Na tabela 6 podemos observar um compilado dos resultados dos oito isolados selecionados como possíveis deficientes em pertactina.

A triagem por ELISA identificou oito isolados deficientes em pertactina, mas apenas três foram confirmados por *immunoblotting* (isolados n°s 20140/2013, 52857/2013 e 73230/2015). Dos três isolados confirmados por *immunoblotting*, somente o isolado n° 20140/2013 confirmou uma mutação na região promotora do gene *prn*, detectado pela PCR, enquanto que, os outros dois isolados (52857/2013 e 73230/2015), não apresentaram uma explicação genética óbvia para a sua deficiência pela PCR.

De acordo com a faixa etária, os três isolados deficientes foram de crianças menores de dois anos. O isolado n° 20140/2013 foi de uma criança de um mês de idade, ainda não imunizada, proveniente do Distrito Federal. Os isolados n°s 52857/2013 e 73230/2015 eram de crianças de seis meses e dois anos de idade, respectivamente, sem informações acerca do status vacinal e provenientes do Estado de Pernambuco, região nordeste do país.

Em relação aos perfis circulantes, o isolado n° 20140/2013 foi caracterizado pelo sorotipo Fim3 predominante na região central neste ano e pulsotipo BpXba0040, um dos seis perfis predominantes no país. Os isolados n°s 52857/2013 e 73230/2015 foram caracterizados como sorotipo Fim2,3 em plena ascensão na região em 2015 e pulsotipos BbXba0004 e BpXba0039, sendo o primeiro de menor expressividade no país e o segundo o principal pulsotipo circulante no Brasil, respectivamente.

Nos cinco isolados restantes, triados por ELISA, (n°s 16349/2012, 22946/2014, 24416/2015, 73228/2015 e 73243/2015) não foi possível confirmar a deficiência em pertactina pelas técnicas de PCR, *immunoblotting* e sequenciamento de Sanger.

Tabela 6. Compilado dos resultados obtidos dos oito isolados selecionadas para pesquisa da pertactina.

N° Isolado / Ano	Idade	Localização	Sorotipo	PFGE	ELISA	PCR	Immunoblotting	Variante alélico de <i>prn</i>
16349/2012	SI	Bahia	Fim3	BpXba0104	Negativo	Positivo	Positivo	<i>prn2</i>
20140/2013	01 mês	Distrito Federal	Fim3	BpXba0040	Negativo	Negativo	Negativo	<i>prn2</i>
52857/2013	06 meses	Pernambuco	Fim2,3	BpXba0004	Negativo	Positivo	Negativo	<i>prn2</i>
22946/2014	57 anos	Pernambuco	Fim2	BpXba0071	Negativo	Positivo	Inconclusivo	<i>prn2</i>
24416/2015	09 anos	Distrito Federal	Fim2,3	BpXba0039	Negativo	Positivo	Positivo	<i>prn2</i>
73228/2015	01 ano	Pernambuco	Fim2,3	BpXba0108	Negativo	Positivo	Positivo	<i>prn2</i>
73230/2015	02 anos	Pernambuco	Fim2,3	BpXba0039	Negativo	Positivo	Negativo	<i>prn2</i>
73243/2015	10 meses	Pernambuco	Fim2,3	BpXba0088	Negativo	Positivo	Positivo	<i>prn2</i>

SI = sem informação; *prn* = pertactina; Fim = fimbria; N° = número

5. DISCUSSÃO

Na era pré-vacinal, a morbidade e mortalidade por coqueluche foram muito elevadas. Vacinas de suspensões bacterianas inativadas pelo calor foram desenvolvidas nos anos 30 e, subsequentemente, a introdução da vacinação nos anos 50 e 60 em muitos países reduziu substancialmente a circulação da pertussis. No entanto, dúvidas em relação à segurança das vacinas começaram a ser expressas e diversos efeitos colaterais foram atribuídos ao uso dessa vacina, principalmente associados à presença de endotoxinas em sua composição. Com intuito de amenizar esses efeitos, nos anos 70 e 80 foram produzidas as vacinas acelulares, menos reatogênicas e introduzidas gradualmente em diversos países da Europa, Estados Unidos e Japão (Hodder e Mortimer, 1992; Zeddeman et al., 2014; Loch, 2018).

Com a introdução de vacinas acelulares, diversas questões têm sido levantadas em relação ao número crescente de casos de coqueluche, principalmente em adolescentes e adultos, observados em muitos países que fizeram a substituição da vacina celular pelas acelulares. O rápido enfraquecimento da imunidade induzida pela vacina acelar pode ser uma das razões para o aumento de casos em vários países. Razões imunológicas podem explicar o efeito protetor em curto prazo das aPs com a evidência de que essas vacinas não são eficazes contra a colonização e não impedem a transmissão da *B. pertussis* (Esposito e Principi, 2018; Loch, 2018).

Além disso, apesar de uma cobertura global de vacinação entre 85% a 99% em muitos países, a coqueluche ainda não foi controlada em nenhum lugar, persistindo a circulação na população humana em ciclos epidêmicos de 3 a 5 anos. Na última década a doença causou um ressurgimento surpreendente em vários países, mesmo naqueles com uma alta cobertura vacinal (Hegerle e Guiso, 2013; Loch, 2018). Razões para o ressurgimento incluem maior conscientização e melhores testes diagnósticos, falta de

reforços vacinais, incompatibilidade antigênica entre as vacinas e cepas circulantes e falta de proteção contra a transmissão da *B. pertussis* (Loch, 2018).

Os ciclos epidêmicos da doença são caracterizados pela imunidade populacional que aumenta e diminui ao longo do tempo. Com o aumento das coberturas vacinais, a doença para de circular entre os pré-escolares, a população adquire imunidade e a incidência da doença diminui posteriormente. Com o tempo, a imunidade populacional diminui (por exemplo, devido à introdução de bebês não imunes nascidos na população; e perda da imunidade no grupo de adolescentes e adultos). Assim, a epidemia ocorre quando um número suficiente de suscetíveis se acumula até um certo "limiar epidêmico", levando ao ressurgimento da doença. Após um período epidêmico, são necessários vários anos para que a proporção de pessoas suscetíveis aumente para um nível que facilite uma nova onda de disseminação da doença em uma população (Fine e Clarkson, 1982; Edwards e Decker, 2013; Gill et al., 2017).

No Brasil, as coberturas vacinais, desde meados da década de 1990, mantiveram-se elevadas para o conjunto de vacinas no âmbito nacional, em geral superando a meta de 95% estabelecida pelo PNI, para crianças menores de um ano de idade (Domingues e Teixeira, 2013; Datasus, 2018) As vacinas de células inteiras usadas no país, podem oferecer proteção por aproximadamente 12 anos e por haver um reforço vacinal entre 4 e 6 anos de idade, as crianças vacinadas passam a ficar protegidas na sua adolescência, o que pode ter proporcionado incidências mais baixas da doença, registradas durante os anos 2000 (Fernandes, 2017).

As crianças vacinadas na década de 90 no país, tornaram-se adultas na década de 2010, e então passaram a ser novamente suscetíveis à doença com a queda de imunidade, tornando-se fontes de infecção para os menores de um ano suscetíveis, que adoecem e são notificados pelo

sistema de vigilância. O aumento do número de suscetíveis, pode ter ocasionado o surgimento do período epidêmico registrado no país entre os anos de 2011 a 2014 (Fernandes, 2017), o que pode ter influenciado a substituição do perfil imunogênico da *B. pertussis* que predominou no país por mais de 20 anos.

O sorotipo Fim3 predominou no país nas décadas de 90 e 2000. Estudos de pesquisadores brasileiros relataram a dominância desse perfil imunogênico. Gonçalves et al., (2007) analisaram 67 cepas de *B. pertussis* isoladas no Brasil entre 1988-2002 revelando uma predominância do sorotipo Fim3 em 86% das cepas analisadas, enquanto o sorotipo Fim2 representou 4% delas; 10% foram consideradas não tipáveis. Leite et al., (2012) apresentaram resultados semelhantes em estudo realizado com 91 cepas isoladas no Estado de São Paulo nos anos de 2006 a 2008, sendo 97% das cepas analisadas pertencentes ao sorotipo Fim3.

A partir de 2011 o perfil dominante Fim3 foi gradativamente sendo substituído pelo Fim2 e Fim2,3, nas regiões Sul e Sudeste do país. Nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste a substituição ocorreu a partir de 2013 e desde 2014 todas as regiões do país apresentaram o predomínio dos sorotipos Fim2 e Fim2,3 em mais de 75% das cepas analisadas. Estudo semelhante ao nosso, realizado por Rocha et al., (2017) na região central do país, nos anos de 2012 a 2014, também revelou uma inversão da prevalência do sorotipo. Em 2012, o sorotipo mais frequente foi Fim3 decaindo gradativamente em 2013 com clara substituição pelo perfil Fim2 em 2014.

A substituição gradual dos sorotipos coincidiu justamente com o início do ciclo epidêmico observado no país a partir de 2011, com aumento da incidência da doença até 2014, sendo considerado o ano epidêmico do período. A partir de 2015 a incidência da doença diminuiu e o país entrou novamente em um período considerado endêmico, com a dominância do

sorotipo Fim2,3 desde então, sugerindo que este possa permanecer predominante pelos próximos anos, até que se crie novamente um limiar de suscetíveis, com a ocorrência de um novo ciclo epidêmico e então uma possível substituição do perfil imunogênico.

Mudanças na prevalência dos sorotipos também já foram relatados em outros países. Na Finlândia, a vacina acelular tem sido usada desde 2005, e não contém antígenos Fim2 / 3 purificados. A frequência do Fim3 foi cerca de 50% em 2005, aumentou para 100% em 2007 e manteve-se até 2009. Entre 2013 e 2015, as frequências dos isolados Fim3 e Fim2 foram de 20% e 80%, respectivamente (He, 2016). Na Sérvia, antes da introdução da vacinação de células inteiras, os sorotipos prevalentes eram Fim2 e Fim2,3. Após a vacinação, a frequência do sorotipo Fim2,3 diminuiu, e embora o sorotipo Fim3 tenha começado a aparecer, Fim2 tem sido o sorotipo mais prevalente no país (Dakic et al., 2010). No Reino Unido, antes da vacinação em massa, os sorotipos Fim2, Fim3 e Fim2,3 circularam no país, enquanto o sorotipo Fim3 predominou em anos posteriores à introdução da vacina acelular. Alterações semelhantes de sorotipos circulantes também foram observadas em países como Canadá, França, Rússia e Suécia (Dorji et al., 2018).

Embora a identificação do sorotipo seja importante para a caracterização primária das cepas, métodos moleculares com maior reprodutibilidade e poder discriminatório, como a PFGE, podem ser mais úteis em investigações epidemiológicas, pois essa técnica oferece um perfil de restrição reproduzível de grandes fragmentos de DNA bacteriano. Infelizmente a comparação dos perfis moleculares entre países continua difícil pela falta de padronização da técnica entre os laboratórios, o que dificulta, por exemplo, a identificação de cepas pandêmicas.

Com base no perfil eletroforético dos isolados de *B. pertussis*, 110 perfis foram observados neste estudo, e embora nenhum perfil tenha se

mantido constante ao longo do período houve a predominância do perfil BpXba0039 e outros cinco perfis que compuseram a maioria dos isolados testados entre 2010 a 2016. Esses resultados foram semelhantes aos relatados por Rocha et al., (2017) que detectaram 14 perfis circulantes na região centro-oeste do país com o aumento da prevalência do perfil BpXba0039 entre os anos de 2012 a 2014, também detectado em nosso estudo, representando 27% de todos os isolados analisados desde 2012. Outros estudos também mostraram que um pequeno número de perfis de PFGE geralmente compõe a maioria das cepas de *B. pertussis* circulantes. Martins et al., (2017) detectaram cinco pulsotipos circulantes na região central do Estado de São Paulo e observaram a substituição do pulsotipo BpXba0028, predominante em 2012, pelos tipos BpXba0039 e BpXba0040. Este estudo, assim como o nosso, também revelou a predominância do padrão BpXba0039, que aumentou gradativamente de 2012 (12,5%) para 2013 (55,6%) e 2014 (75%).

Esses resultados podem sugerir que as cepas com padrão predominante no PFGE podem ter um alto potencial de disseminação de uma pessoa para outra e a capacidade de escapar do sistema imune do hospedeiro e da vacinação.

Dados similares foram descritos nos EUA com análise de 5.262 amostras entre 2000 a 2012. Foram descritos 199 perfis de PFGE e o perfil mais comum foi responsável por 35% a 46% dos isolados testados de 2000 a 2009. Em contraste com os isolados coletados neste período, a predominância de perfis mudou rapidamente entre os isolados coletados durante o período de 2010 a 2012, e um perfil diferente predominou a cada ano (Cassiday et al., 2016).

Na Europa, quatorze perfis de PFGE foram identificados, sendo dois deles os perfis mais comuns, mostrando um crescente aumento em contraste a outros perfis que estão diminuindo. Curiosamente, o perfil mais

comum, não foi encontrado na Suécia, enquanto outros perfis foram comumente encontrados entre os isolados suecos, sugerindo uma mudança na população de *B. pertussis* neste país (Barkoff et al., 2018). Em Israel, quatro perfis de restrição foram isolados entre 2007-2008, denominados A, B, C e D. Durante os anos de 2009–2012 os perfis A e B predominaram (26% e 50% respectivamente) com o desaparecimento dos perfis C e D. Além disso, novas cepas distintas emergiram e foram denominadas E, F, G, H e I (Bamberger et al., 2015).

Durante a era pré-vacinal e após a introdução das vacinas celulares, a circulação de cepas de *B. pertussis* com antígenos vacinais modificados ou ausentes foram descritas mundialmente, usando diferentes técnicas de tipagem e sequenciamento do genoma total. No entanto, essas alterações não afetaram a eficácia da vacina celular contra a coqueluche (Bouchez et al., 2015). Porém, o uso de vacinas aP foi claramente associado a uma maior circulação dessas cepas. Tem-se observado uma proporção crescente de isolados clínicos deficientes em pertactina, um dos principais antígenos incluído na maioria das vacinas acelulares. A pressão imunológica das vacinações com o surgimento de mutantes provavelmente seja a principal causa desse fenômeno, como sugerido pela evidência de que a evolução da população de *B. pertussis* variou entre os países e estava estritamente associada à cobertura vacinal e ao tipo de vacina utilizada em cada país (Esposito e Principi, 2018; Loch, 2018).

Variações genéticas dos genes que codificam as proteínas incluídas nas vacinas acelulares foram observadas com maior frequência do que aquelas que codificam outros genes da *B. pertussis*. As principais alterações ocorreram nos alelos dos genes da toxina pertussis, fímbrias e pertactina (Esposito e Principi, 2018). Até o momento, foram identificados 18 alelos da pertactina sendo que os alelos *prn1* ou *prn7* estão presentes na maioria das cepas vacinais os quais eram os perfis predominantes na era pré-vacinal. No entanto, essas cepas foram gradualmente substituídas por cepas do tipo

“não vacinal”, principalmente *prn2* e em menor grau *prn3*, após a introdução da vacinação (Dakic et al., 2010).

A análise do perfil alélico dos isolados selecionados neste estudo revelou o perfil *prn2* em 100% deles. Esse perfil é o tipo mais prevalente em isolados recentes e o aumento na prevalência dessas cepas está associado ao ressurgimento desse patógeno em muitos países como Argentina, França, EUA, Reino Unido, Holanda, Polônia, Finlândia, Suécia e Rússia (Wagner et al., 2015). Nosso resultado é consistente com a teoria das mudanças conduzidas pela vacina uma vez que é distinto do perfil alélico da cepa usada para a produção da vacina brasileira que carrega o alelo *prn7* em sua composição (Akamatsu et al., 2015). O Irã utiliza vacina de células inteiras desde 1949 e assim como no Brasil, apresentou polimorfismo dos fatores de virulência com predominância dos alelos *ptxP3* / *ptxA1* / ***prn2*** / *fim2-1* / *fim3-2* que são diferentes da cepa vacinal *ptxP1* / *ptxA2* / ***prn1*** / *fim2-1* / *fim3-2* (Heravi et al., 2018). Esse perfil genético predominante é comparável aos resultados de outros países que têm longas histórias de vacinação acelular contra a coqueluche como França, Holanda, Finlândia e EUA que apresentam alelos dominantes, *ptxA2*, *ptxP3* e ***prn2*** em relação ao tipo vacinal que transportam *ptxA1*, *ptxP1* e ***prn1*** (Heravi et al., 2018).

Nosso estudo não detectou uma quantidade relevante de isolados deficientes em pertactina, no país. Entre os 555 isolados estudados, apenas três deles (0,5%) puderam ser consideradas como possíveis deficientes na sua produção. Foi possível detectar a ruptura na região promotora do gene da pertactina pela PCR, em um dos isolados, causando sua deficiência e nos isolados detectados pela técnica de *immunoblotting*, podemos supor que a não expressão do gene possa ser devido a uma mutação no gene *BvgAS*, uma vez que este é o sistema regulador para a expressão de muitos dos fatores de virulência, entre eles a pertactina.

De acordo com relatos da literatura, o surgimento de cepas deficientes em pertactina foi direcionado pela substituição das vacinas celulares pelas acelulares em diversos países do mundo. Nossos resultados são concordantes com os estudos apresentados em países nos quais as vacinas de células inteiras ainda estão em uso. Assim como no Brasil, Polônia e Sérvia tem utilizado vacinas de células inteiras há mais de 30 anos, e nenhuma cepa deficiente em pertactina foi detectada nesses países (van Gent et al., 2015).

Na Dinamarca, uma vacina acelular contendo apenas o componente *ptx* foi introduzida no início de 1997, e até 2014 nenhuma cepa deficiente em pertactina tinha sido detectada (Zeddeman et al., 2014). Em 2012 duas marcas de vacina acelular combinada de poliovírus inativado e DTaP (DTaP-IPV) que não continham pertactina em sua composição foram introduzidas no Japão, onde se observou uma diminuição significativa em isolados deficientes em pertactina dentro da população de *B. pertussis*. Porém, em dezembro de 2015 uma nova marca da vacina DTaP-IPV contendo pertactina foi introduzida neste país e se a hipótese da evolução conduzida pela vacina estiver correta, os isolados com deficiência de pertactina devem aumentar novamente em um futuro próximo (Hiramatsu et al., 2017).

Em países que usam vacinas acelulares, como a Austrália e os EUA, mais de 80% das cepas de *B. pertussis* isoladas de pacientes não produzem pertactina. Na Holanda, onde as vacinas celulares foram substituídas pelas acelulares cerca de 10 anos depois do que nos EUA, 15% das cepas recentemente isoladas foram relatadas como deficientes (Hovingh et al., 2018).

No Japão, a primeira cepa pertactina negativa foi isolada em 1997, marcando o início do aumento de cepas deficientes na população japonesa para mais de 30% durante a primeira década do século 21 (Zomer et al., 2018).

Estudo realizado em seis países europeus revelou uma taxa de 3,4% de cepas deficientes entre os anos de 2007 a 2012. As cepas pertactina deficientes encontradas neste estudo foram principalmente da Noruega e Suécia, onde as aPs para a série primária foram introduzidos em 1996 e 1998, respectivamente, mais cedo do que no Reino Unido (em 2000), Finlândia e Holanda (ambos em 2005). A França e Noruega tiveram momentos semelhantes na substituição das vacinas, por volta do ano 2004 e apresentam uma porcentagem relativamente alta de cepas deficientes em pertactina (Zeddeman et al., 2014).

É importante ressaltar que as manifestações clínicas da coqueluche causada por *B. pertussis* pertactina deficiente ou pertactina positiva são virtualmente indistinguíveis, indicando que a deficiência da pertactina não altera a gravidade da doença. No entanto, esses isolados mostram maior condicionamento e / ou tempo de infecção prolongado em populações de hospedeiros animais imunizados com aPs. Estudos em camundongos sugeriram que cepas deficientes em pertactina têm uma vantagem competitiva sobre cepas produtoras de pertactina para colonizar o trato respiratório de camundongos vacinados com vacinas acelulares, enquanto que na ausência de vacinação, esta vantagem competitiva não foi aparente (Zomer et al., 2018; Loch, 2018).

Outro ponto importante a ser levantado diz respeito ao tipo de reposta imune induzida após a infecção natural e a administração de ambas as vacinas. Estudos recentes mostraram claramente que a resposta imune conferida pelas aPs difere significativamente daquela devida a infecção natural ou wP. Tanto a infecção natural quanto a wP induzem uma resposta imune Th1 / Th17 que é particularmente importante devido à sua resposta imune de esterilização da mucosa. Por outro lado, as aPs induzem uma resposta majoritariamente Th2, menos efetiva na esterilização da mucosa. Logo, as vacinas acelulares têm menor capacidade de prevenir a infecção e reduzir a transmissão (Esposito e Principi, 2018). Esse fato pode ser um dos

fatores responsáveis pelo aumento dos níveis de coqueluche em todas as faixas etárias em muitos países e à grave implicação de aumento da incidência em lactentes. A reemergência da coqueluche observada no Brasil nos últimos anos possivelmente está mais relacionada à (i) dificuldade em manter adequada e homogênea a cobertura vacinal; (ii) a melhoria nos métodos de diagnóstico; (iii) a maior percepção pela área médica e vigilância epidemiológica e não relacionada a uma mudança antigênica, uma vez que a vacinação com vacina de células inteiras permaneceu a mesma no país nos últimos 30 anos.

Deve-se notar que este estudo foi baseado em métodos de triagem iniciais, que não englobaram todos os possíveis mecanismos para a perda da expressão da proteína pertactina e / ou outros antígenos vacinais. As limitações em relação à caracterização genética completa de *B. pertussis*, serão sanadas futuramente, com a realização da técnica de sequenciamento do genoma total.

Também devemos salientar a diferença entre o número de amostras analisadas neste estudo, por região e por vezes, por Estado. O Brasil é um país de dimensões continentais e por esse motivo difere em questões populacionais, ambientais, sócio-políticas e econômicas, o que pode impactar diretamente em diversas áreas, entre elas, a saúde. Existem vários desafios em relação a estimativa no número de casos de coqueluche e no conhecimento da real carga da doença no país. Primeiro, porque muitos Estados têm infraestrutura de vigilância limitada, o que não facilita o relato e a coleta oportuna de casos suspeitos de coqueluche. Em segundo lugar, a infraestrutura laboratorial de muitos LACENs, para realizar o diagnóstico de coqueluche de rotina é limitado, e os testes de diagnóstico molecular, como a PCR em Tempo Real não estão disponíveis de maneira uniforme. Esses fatos podem ser observados no nosso estudo em relação aos Estados das regiões Norte e Nordeste do país, que tiveram um número de amostras analisadas inferiores as demais regiões do Brasil, podendo refletir possíveis

deficiências nas áreas relacionadas a vigilância epidemiológica e capacitação laboratorial destas regiões, resultando em menor número de amostras coletadas e isolamento bacteriano. E por fim, a notificação de casos pode ser dificultada em áreas com poucos profissionais de saúde treinados para a identificação clínica da doença.

De qualquer maneira, o monitoramento contínuo dos isolados circulantes de *B. pertussis* no país continuará sendo realizado pelas técnicas de sorotipagem e PFGE pois geram informações fundamentais para detectar pequenas alterações na epidemiologia da doença. Esses dados fornecem uma visão geral da coqueluche no país e, em conjunto com atividades de vigilância podem fornecer informações úteis para embasar as discussões sobre as melhores estratégias de vacinação, com foco na redução no risco de transmissão para lactentes menores de seis meses de idade.

6. CONCLUSÕES

Embora este estudo tenha identificado alguns isolados deficientes em pertactina, sua ocorrência não foi relevante, confirmando observações prévias de que a deficiência da pertactina seja provavelmente impulsionada pelo uso das vacinas acelulares.

Desde as décadas de 90 e 2000 os isolados de *B. pertussis* eram predominantemente caracterizados como sorotipo Fim3.

No período estudado, houve uma substituição gradual do sorotipo predominante pelos sorotipos Fim2 e Fim2,3, o que pode estar relacionado a característica cíclica da doença.

A determinação dos perfis genéticos circulantes revelou uma grande diversidade entre eles, sendo a região Sudeste a que apresentou a maior distinção dos pulsotipos circulantes enquanto a região Norte a de menor diferenciação, o que pode possivelmente estar relacionado ao maior e menor número de isolados estudados, respectivamente.

O ensaio imunoenzimático - ELISA foi uma importante ferramenta para realizar a triagem inicial para a deficiência no gene da pertactina.

Os ensaios de PCR e *immunoblotting* foram metodologias complementares capazes de confirmar a deficiência no gene da pertactina.

Pelo sequenciamento de Sanger não foi possível detectar possíveis alvos genéticos relacionados a deficiência no gene da pertactina, porém a metodologia caracterizou os isolados selecionados como *prn2*, o tipo mais prevalente nos isolados circulantes em diversos países, independente do tipo de vacina e do esquema de imunização utilizado.

7. REFERÊNCIAS

Advani A, Donnelly D, Hallander H. Reference system for characterization of *Bordetella pertussis* pulsed-field gel electrophoresis profiles. J Clin Microbiol. 2004; 42(7):2890–2897.

Akamatsu MA, Nishiyama Jr MY, Morone M, Oliveira UC, Bezerra MFB, Sakauchi MA et al. Whole-Genome Sequence of a *Bordetella pertussis* Brazilian Vaccine Strain. Genome Announc. 2015; 3(1):e01570-14.

Antoine R, Raze D, Loch C. Genomics of *Bordetella pertussis* toxins. Int J Med Microbiol. 2000; 290:301–305.

Arico B, Scarlato V, Monack D M, Falkow S, Rappuoli R. Structural and genetic analysis of the bvg locus in *Bordetella* species. Mol Microbiol. 1991; 5(10):2481-2491.

Ashworth IAE, Robinson A. Pertussis vaccines , p. 1-19. In Zuckerman AJ. Recent developments in prophylactic immunization, vol 12. Kluwer Academic Publishers. 1989.

Aslanabadi A, Ghabili K, Shad K, Khalili M, Sajadi MM. Emergence of whooping cough: notes from three early epidemics in Persia. Lancet Infect Dis. 2015; 15:1480–1484.

Bamberger E, Raya BA, Cohen L, Golan-Shany O, Davidson S, Geffen Y et al. Pertussis resurgence associated with pertactin-deficient and genetically divergent *Bordetella pertussis* isolates in Israel. Pediatr Infect Dis J. 2015; 34(8):898-900.

Baptista PN, Magalhães V, Rodrigues LC, Rocha MA, Pimentel AM. Source of infection in household transmission of culture-confirmed pertussis in Brazil. *Pediatr Infect Dis J.* 2005; 24: 1027-1028.

Barkoff A-M, Mertsola J, Pierard D, Dalby T, Hoegh SV, Guillot S et al. Surveillance of circulating *Bordetella pertussis* strains in Europe during 1998 to 2015. *J Clin Microbiol.* 2018; 56:e01998-17.

Ben Fraj I, Kechrid A, Guillot S, Bouchez V, Brisse S, Guiso N, Smaoui H. Pertussis epidemiology in Tunisian infants and children and characterization of *Bordetella pertussis* isolates: results of a 9 - year surveillance study, 2007 to 2016. *J Med Microbiol.* 2019; 68(2):241-247.

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: 1289-1291

Bisgard KM, Pascual B, Ehresmann KR, Miller CA, Cianfrini C, Jennings CE, et al. Infant pertussis: who is the source? *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23:985–998.

Bouchez V, Hegerle N, Strati F, Njamkepo E, Guiso N. New Data on Vaccine Antigen Deficient *Bordetella pertussis* Isolates. *Vaccines.* 2015; 3(3):751–770.

Bowden K. Multi-locus sequence typing (MLST) for *Bordetella pertussis* isolate DNA. CCID/NCIRD/MVPDB. Pertussis/Diphtheria Laboratory. Doc N° PDL-600-P01. Controlled Copy. 2015.

Brasilia. Decreto nº 78.231, de 12 de agosto de 1976. Dispõe sobre a organização das ações de Vigilância Epidemiológica, sobre o Programa Nacional de Imunizações, estabelece normas relativas à notificação compulsória de doenças, e dá outras providências. Diário Oficial da União - Seção 1 - 13/8/1976, Página 1073.

Breakwell L, Kelso P, Finley C, Schoenfeld S, Goode B, Misegades LK, et al. Pertussis Vaccine Effectiveness in the Setting of Pertactin-Deficient Pertussis. *Pediatrics*. 2016; 137(5): e20153973.

Calvert A, Heath PT. Pertussis. *Medicine*. 2017; 45(12):735-738.

Cassiday PK, Skoff TH, Jawahir S, Tondella ML. Changes in Predominance of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profiles of *Bordetella pertussis* Isolates, United States, 2000–2012. *Emerg Infect Dis*. 2016; 22(3):442-448.

Chen Z, He Q. Immune persistence after pertussis vaccination. *Hum Vaccin Immunother*. 2017; 13(4):744–756.

Cherry JD. Pertussis in the preantibiotic and prevaccine era, with emphasis on adult pertussis. *Clin Infect Dis*. 1999; 28(suppl 2):S107-S111.

Cherry JD, Paddock CD. Pathogenesis and histopathology of pertussis: implications for immunization. *Expert Rev Vaccines*. 2014; 13(9):1115–1123.

Dakic G, Kallonenb T, Elomaab A, Pljesaa T, Vignjevic-Krastavcevic M, He Q. *Bordetella pertussis* vaccine strains and circulating isolates in Serbia. *Vaccine*. 2010; 28:1188–1192.

Datasus. disponível em <http://labnet.datasus.gov.br>. Acessado em 04 de outubro de 2018.

de Celle`s MD, Magpantay FMG, King AA, Rohan P. The pertussis enigma: reconciling epidemiology, immunology and evolution. *Proc R Soc B*. 2016; 283:20152309.

de Gouw D, Diavatopoulos DA, Bootsma HJ, Hermans PWM, Mooi FR. Pertussis: a matter of immune modulation. *FEMS Microbiol Rev*. 2011; 35(3):441–474.

Domingues CMAS, Teixeira AMS. Coberturas vacinais e doenças imunopreveníveis no Brasil no período 1982-2012: avanços e desafios do Programa Nacional de Imunizações. *Epidemiol Serv Saúde*. 2013; 22(1):9-27.

Dorji D, Mooi F, Yantorno O, Deora R, Graham RM, Mukkur TK. *Bordetella pertussis* virulence factors in the continuing evolution of whooping cough vaccines for improved performance. *Med Microbiol Immunol*. 2018; 207:3–26.

Edwards KM, Decker MD. Pertussis vaccines. In: Plotkin S, ed. *Vaccines*. Philadelphia PA: Elsevier; 2013; 447–492.

Esposito S, Principi N. Prevention of Pertussis: An unresolved problem. *Hum Vaccin Immunother*. 2018; 14(10):2452-2459.

Fedele G, Stefanelli P. Commentary Pertussis in infants and the resurgence of a vaccine preventable disease: what to do? *Ann Ist Super Sanità*. 2017; 100(2):100–103.

Fernandes EG. Avaliação de custo-efetividade da introdução da vacina tríplice acelular do adulto (dTpa) no calendário de imunização de adultos do Programa Nacional de Imunizações no Brasil. São Paulo, 2017. Tese (doutorado) apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Fernandes EG, Sartori AMC, de Soárez PC, Carvalhanas TRMP, Rodrigues M, Novaes HMD. Challenges of interpreting epidemiologic surveillance pertussis data with changing diagnostic and immunization practices: the case of the state of São Paulo, Brazil. *BMC Infect Dis*. 2018; 18:126.

Fine PEM, Clarkson JA. The recurrence of whooping cough: possible implications for assessment of vaccine efficacy. *The Lancet*. 1982; 666-669.

Gangarosa EJ, Galazka AM, Wolfe CR, Phillips LM, Gangarosa RE, Miller E, et al. Impact of anti-vaccine movements on pertussis control: the untold story. *Lancet*. 1998; 351(31):356–361.

Genbank - NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Último acesso em 28 de setembro de 2018.

Gentile A. Infección por *Bordetella pertussis*. *Bordetella pertussis* infection. *Arch Argent Pediatr*. 2010; 108(1):78–81.

Gill C, Rohani P, Thea DM. The relationship between mucosal immunity, nasopharyngeal carriage, asymptomatic transmission and the resurgence of *Bordetella pertussis*. *F1000Research*. 2017; 6:1568-1582.

Gonçalves CR, Vaz TMI, Medeiros MIC, Castro MTF, Rocha MMM, Melles CEA et al. Phenotypical and genotypical characterization of *Bordetella pertussis* strains isolated in São Paulo, Brazil, 1988-2002. *Rev Inst Med Trop*. 2007; 49(2):123-125.

Green MR, Sambrook J. *BioRad Semi Dry Transblot System and Molecular Cloning - A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4 th ed. 2012.

Gross R, Keidel K, Schmitt K. Resemblance and divergence: the “new” members of the genus *Bordetella*. *Med Microbiol Immunol*. 2010; 199(3):155–163.

He Q. Evolution of *Bordetella pertussis*. *Pediatr Infect Dis J*. 2016; 35(8):915–917.

Hegerle N, Guiso N. Epidemiology of whooping cough and typing of *Bordetella pertussis*. *Future Microbiol.* 2013; 8(11):1391–1403.

Heravi FS, Nikbin VS, Lotfi MN, Badiri P, Ahmadi NJ, Zahraei SM et al. Strain variation and antigenic divergence among *Bordetella pertussis* circulating strains isolated from patients in Iran. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018; 37(10):1893-1900.

Hewlett EL, Burns DL, Cotter PA, Harvill ET, Merkel TJ, Quinn CP, et al. Pertussis Pathogenesis—What We Know and What We Don't Know. *J Infect Dis.* 2014; 209(1):982–985.

Higgs R, Higgins SC, Ross PJ, Mills KHG. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunol.* 2012; 5(5):485-500.

Hijnen M, He Q, Schepp R, van Gageldonk P, Mertsola J, Mooi FR, et al. Antibody responses to defined regions of the *Bordetella pertussis* virulence factor pertactin. *Scand J Infect Dis.* 2008;40:94–104.

Hiramatsu Y, Miyaji Y, Otsuka N, Arakawa Y, Shibayama K, Kamachi K. Significant Decrease in Pertactin-Deficient *Bordetella pertussis* Isolates, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2017; 23(4):699-701.

Hodder SL, Mortimer Jr EA. Epidemiology of Pertussis and Reactions to Pertussis Vaccine. *Epidemiologic Reviews.* 1992; 14:243-267.

Hovingh ES, Mariman R, Solans L, Hijdra D, Hamstra H-J, Jongerius I et al. *Bordetella pertussis* pertactin knock-out strains reveal immunomodulatory properties of this virulence factor. *Emerg Microbes Infect.* 2018; 7:39-51.

Inatsuka CS, Xu Q, Vujkovic-Cvijin I, Wong S, Stibitz S, Miller JF, et al. Pertactin is required for *Bordetella* species to resist neutrophil-mediated clearance. *Infect Immun*. 2010; 78(7):2901–2909.

Jongerius I, Schuijt TJ, Mooi FR, Pinelli E. Complement evasion by *Bordetella pertussis*: implications for improving current vaccines. *J Mol Med*. 2015; 93:395–402.

Kent A, Heath PT. Pertussis. *Medicine*. 2014; 42(1):8–10.

Kilgore PE, Salim AM, Zervos MJ, Schmitt H-J. Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clin Microbiol Rev*. 2016; 29(3):449–486.

Klein NP. Licensed pertussis vaccines in the United States history and current state. *Hum Vaccin Immunother*. 2014; 10(9):2684–2690.

Kuchar E, Karlikowska-Skwarnik M, Han S, Nitsch-Osuch A. Pertussis: history of the disease and current prevention failure. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 934:77-82.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680-685.

Leite D, Cassiday PK, Tatti KM, Vaz TM, Tondella ML. Serotypes and genetic profiles of *Bordetella pertussis* strains isolated in the city of São Paulo, 2006-2008. *J Pediatr (Rio J)*. 2012;88(4):357-360.

Leite D, Blanco RM, Melo LCV, Fiório 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; 1: 196-202.

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):1012-1016.

Locht C. Pertussis: Where did we go wrong and what can we do about it? *J Infect*. 2016; 72:S34–S40.

Locht C. Will we have new pertussis vaccines? *Vaccine*. 2018; 36:5460-5469.

Loeffelholz MJ. *Bordetella*, p. 780–786. In Murray PR, Baron EJ Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. (ed) *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 2003.

Martin SW, Pawloski L, Williams M, Weening K, DeBolt C, Qin X, et al. Pertactin-negative *Bordetella pertussis* strains: Evidence for a possible selective advantage. *Clin Infect Dis*. 2015; 60(2):223–227.

Martins A, Pôrto SF, Delafiori CR, Martins LM, Camargo CH, Leite D. Caracterização da coqueluche na região centro-oeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2017;76:e1725.

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.

McLafferty M, Marcus DR, Hewlett EL. Nucleotide sequence and characterization of a repetitive DNA element from the genome of *Bordetella pertussis* with characteristics of an insertion sequence. *J Gen Microbiol*. 1988; 134:2297–2306.

Melvin JA, Scheller EV, Miller JF, Cotter PA. Bordetella pertussis pathogenesis: current and future challenges. Nat Rev Microbiol. 2014; 12(4): 274–288.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais. 4. ed. Brasília - DF. 2014a. 160 p.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações. Brasil. Informe Técnico para Implantação da Vacina Adsorvida Difteria, Tétano e Coqueluche (Pertussis Acelular) Tipo adulto - dTpa. 2014b.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Imunizações. Brasil. Aspectos históricos dos calendários de vacinação e avanços dos indicadores de coberturas vacinais, no período de 1980 a 2013. Boletim Epidemiológico. 2015; 46(30).

Ministério da Saúde. Brasil. Nota informativa sobre mudanças no calendário nacional de vacinação para o ano de 2017. 2016.

Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/Coqueluche/11196-situacao-epidemiologica-dados>. Acessado em 28 de março de 2018.

Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, van der Heide HGJ, Gaastra W, Willems RJL. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/Pertactin and pertussis toxin in the Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. Infect Immun. 1998; 66(2):670–675.

Mooi, FR. *Bordetella pertussis* and vaccination: The persistence of a genetically monomorphic pathogen. Infect Genet Evol. 2010; 10:36–49.

Mooi FR, Zeddeman A, van Gent M. The pertussis problem: Classical epidemiology and strain characterization should go hand in hand. *J Pediatr*. 2015; 91(4):315–317.

Nieves DJ, Heininger U. *Bordetella pertussis*. *Microbiol Spectr*. 2016; 4(3):EI10

Nguyen VTN, Simon L. Pertussis: The Whooping Cough. *Prim Care Clin Office Pract* . 2018; 45:423–431.

Oakley CL. Jules Jean Baptiste Vincent Bordet. *Biogr Mems Fell R Soc*. 1962; 8:18–25.

Oliveira DR, Leite D, Berezin E, Renoier EIM, Rosa FM, Lobo FCB et al. Coqueluche, p.72-84. In *Guia de Vigilância em Saúde*. 2° ed. vol único. Brasília - DF. Brasil. 2017.

Otsuka N, Han H-J, Toyozumi-Ajisaka H, Nakamura Y, Arakawa Y, Shibayama K, et al. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. *PLoS One*. 2012; 7(2):e31985.

PAHO - Pan American Health Organization. Final report of the XIX Technical Advisory Group (TAG) Meeting on Vaccine-preventable Diseases of the Pan American Health Organization. Buenos Aires, Argentina; 2011. p. 1–31, 2011. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2011/vaccination-tag19-2011-FinalReport-Eng.pdf>. Acessado em 18 de maio de 2018.

Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet*. 2003; 35(1):32–40.

Pawloski LC, Queenan AM, Cassiday PK, Lynch AS, Harrison MJ, Shang W, et al. Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clin Vaccine Immunol*. 2014; 21(2):119–125.

Pinell-Mcnamara VA, Acosta AM, Pedreira MC, Carvalho AF, Pawloski L, Tondella ML, et al. Expanding pertussis epidemiology in 6 Latin America countries through the Latin American Pertussis Project. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23:S94–S100.

Pittman B. *Bordetella*. p. 308–315. In Lennete EH, Spaulding EH, Truant JP. *Manual of Clinical Microbiology* 2nd ed. Vol 01. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1974.

Preston NW, Te Punga WA. The relation between agglutinin production by pertussis vaccines and their immunising potency in mice. *J Path Bact*. 1959; 78:209-215.

Robinson A, Ashworth LAE, Irons LI. Serotyping *Bordetella pertussis* strains. *Vaccine*. 1989; 7:491-494.

Rocha EL, Leite D, Camargo CH, Martins LM, Silva RSN, Martins VP, et al. The characterization of *Bordetella pertussis* strains isolated in the Central-Western region of Brazil suggests the selection of a specific genetic profile during 2012–2014 outbreak. *Epidemiol. Infect*. 2017; 145(7):1392-1397.

Safadi MAP. Control of pertussis in infants: time has finally come? *Expert Rev. Vaccines*. 2015; 14(6):781–783

Sanden GN, Weyant RS. *Bordetella*. p.662-671. In Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Volume two. The Proteobacteria. Part C, The Alpha-, Beta-, Delta- and Epsilonproteobacteria. 2005.

Sealey KL, Belcher T, Preston A. *Bordetella pertussis* epidemiology and evolution in the light of pertussis resurgence. *Infect Genet Evol.* 2016; 40:136–143.

Sedighi I, Karimi A, Amanati A. Old disease and new challenges: Major obstacles of current strategies in the prevention of pertussis. *Iran J Pediatr.* 2016; 26(4): e5514.

Smallridge WE, Rolin OY, Jacobs NT, Harvill ET. Different effects of whole-cell and acellular vaccines on *Bordetella* transmission. *J Infect Dis.* 2014; 209(15):1981–1988.

Souder E, Long SS. Pertussis in the era of new strains of *Bordetella pertussis*. *Infect Dis Clin N Am.* 2015; 29:699–713.

Tozzi AE, Celentano LP, degli Atti MLC, Salmaso S. Diagnosis and management of pertussis. *CMAJ.* 2005; 172(4):509-515.

van Beek LF, de Gouw D, Eleveld MJ, Bootsma HJ, de Jonge MI, Mooi FR, et al. Adaptation of *Bordetella pertussis* to the respiratory tract. *J Infect Dis.* 2018; 217(12):1987-1996.

van Gent M, van Loo IHM, Heuvelman KJ, de Neeling AJ, Teunis P, Mooi FR. Studies on Prn variation in the mouse model and comparison with epidemiological data. *Plos One.* 2011; 6(3):e18014.

van Gent M, Heuvelman CJ, van der Heide HG, Hallander HO, Advani A, Guiso N et al. Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998–2012. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015; 34:821–830.

van Loo IHM, Heuvelman KJ, King AJ, Mooi FR. Multilocus Sequence Typing of *Bordetella pertussis* Based on Surface Protein Genes. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(6): 1994–2001.

Vaz-de-Lima LR, Martin MD, Pawloski LC, Leite D, Rocha KC, de Brito CA, et al. Serodiagnosis as adjunct assay for pertussis infection in São Paulo, Brazil. *Clin Vaccine Immunol*. 2014;21(5):636-640.

Vodzak J, Queenan AM, Souder E, Evangelista AT, Long SS. Clinical manifestations and molecular characterization of pertactin-deficient and pertactin-producing *Bordetella pertussis* in children, Philadelphia 2007–2014. *Clin Infect Dis*. 2017; 64(1):60-66.

Wagner B, Melzer H, Freymüller G, Stumvoll S, Rendi-Wagner P, Paulke-Korinek M, et al. Genetic Variation of *Bordetella pertussis* in Austria. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0132623.

Weiss A A, Hewlett EL. Virulence factors of *Bordetella Pertussis*. *Ann Rev Microbiol*. 1986; 40:661–686.

WHO. Pertussis vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. 2015;90(35):433–60.

WHO/IVB database, 2017. Disponível em: https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/pertussis/en/. Acessado em 18 de junho de 2018.

Williamson P, Matthews R. Epitope mapping the Fim2 and Fim3 proteins of *Bordetella pertussis* with sera from patients infected with or vaccinated against whooping cough. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1996; 13(2):169-178.

Wirsing von König CH, Riffelmann M, Coenye T. *Bordetella* and related genera, p. 838–850. In Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology* 11th ed. American Society for Microbiology, Washington D.C. 2015.

Worthington ZEV, Rooijen NV, Carbonetti NH. Enhancement of *Bordetella parapertussis* infection by *Bordetella pertussis* in mixed infection of the respiratory tract. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011; 63(1):119–128.

Zeddeman A, van Gent M, Heuvelman CJ, van der Heide HG, Bart MJ, Advani A, et al. Investigations into the emergence of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in six European countries, 1996 to 2012. *Euro Surveill*. 2014;19(33):pii=20881. Disponible em: <http://www.eurosurveillance.org/>

Zlomy M. Rediscovering Pertussis. *Front Pediatr*. 2016; 4:52-61.

Zomer A, Otsuka N, Hiramatsu Y, Kamach K, Nishimura N, Ozaki T et al. *Bordetella pertussis* population dynamics and phylogeny in Japan after adoption of acellular pertussis vaccines. *Microbial Genomics*. 2018; 4:1-14.

ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES 

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DAS CEPAS CIRCULANTES DE *Bordetella pertussis* NO BRASIL. EXISTEM NOVAS VARIANTES NO PAÍS?

Pesquisador: Daniela Leite

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 42590415.8.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: Instituto Adolfo Lutz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.041.943

Data da Relatoria: 16/04/2015

Apresentação do Projeto:

Idem ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 14/04/2015.

Objetivo da Pesquisa:

Idem ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 14/04/2015.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Idem ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 14/04/2015.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nada a acrescentar.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Análise ética com base no parecer consubstanciado do CEPIAL de 14/04/2015 e no documento "Carta resposta" da pesquisadora responsável ao CEPIAL de 14/04/2015.

A seguir, os documentos apresentados e de acordo.

1. Declaração de ciência da Portaria DG/IAL 16, de 22 de dezembro de 2010, sobre Normas de temporalidade das amostras biológicas e dos produtos armazenados no IAL.

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.248-902
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3085-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.041.943

2. Declaração de ciência e comprometimento com a Portaria DG/IAL – 25, de 07 de outubro de 2014, que altera o Regimento do Comitê de Coleções Biológicas do Instituto Adolfo Lutz.

Recomendações:

Em próxima edição do protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil, ao submeter o documento "Declaração", Indicar local e data.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo de pesquisa instruído de acordo com a Resolução CNS 466/2012 e coerente com as normas Institucionais.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa foi aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012 pelo colegiado do CEP/IAL com base nas deliberações da reunião ordinária de 16 de abril de 2015.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o Item transcrito integralmente a seguir.

IX - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou a CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-902

UF: SP Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3085-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.041.943

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEPAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

SAO PAULO, 29 de Abril de 2015

Assinado por:
Luz Marina Trujillo
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-902
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3085-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: cepal@iat.sp.gov.br

Anexo 2 - Protocolo da metodologia de eletroforese em gel por campo pulsado (PFGE)

1. Preparo da cultura bacteriana

- ❖ As cepas de *B. pertussis* devem ser semeadas em placas de ágar carvão para obter um crescimento confluyente. Incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 3 a 5 dias;
- ❖ A cepa de *Salmonella* Braenderup H9812, utilizada como marcador, deve ser semeada em placa de TSA ou ágar comum para obter um crescimento confluyente. Incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 14 a 18 horas.

2. Preparo da suspensão bacteriana e confecção dos blocos (plugs) de agarose

- ❖ Acertar o agitador/incubadora para $54\text{ }^{\circ}\text{C}$; 125-150 rpm;
- ❖ Ligar o espectrofotômetro e acertar a leitura para 640 nm;
- ❖ Preparar tampão TE (Tris 10 mM pH 8,0 / EDTA 1 mM pH 8,0);
- ❖ Preparar agarose SeaKem Gold a 1% em tampão TE;
- ❖ Mantê-la em Banho-Maria (BM) à $50 - 55\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- ❖ Preparar tampão de suspensão celular – CSB (Tris 100 mM pH 8,0 / EDTA 100 mM pH 8,0);
- ❖ Distribuir a suspensão celular em tubos ajustáveis ao espectrofotômetro;
- ❖ Preparar as suspensões bacterianas de modo a obter uma D.O. de 0,6 em espectrofotômetro a 640 nm. Checar a concentração pelo menos duas vezes. (Suspensão do marcador *S. Braenderup* obter D.O. de 1,0 nm em espectrofotômetro a 610 nm);
- ❖ Preparar os moldes reutilizáveis dos blocos de agarose, vedando a base com fita adesiva. Numerar cada poço com o número correspondente às amostras;
- ❖ Transferir 300 μl das suspensões celulares para microtubos de 1,5 ml devidamente numerados;
- ❖ Adicionar 15 μl de uma suspensão de Proteinase K (solução estoque 20 mg/ml) obtendo-se uma concentração final de 0,5 mg/ml. Misturar gentilmente;

- ❖ Adicionar 300 µl da agarose Sekem Gold a 1% mantida em BM 50 – 55 °C. Misturar suavemente, evitando a formação de bolhas;
- ❖ Imediatamente depositar a mistura em três poços do molde de blocos de agarose, evitando a formação de bolhas. Preparar três blocos por amostra;
- ❖ Deixar solidificar por 10-15 minutos em temperatura ambiente ou 5 minutos em geladeira. Não exceder esse tempo para não ressecar os “plugs”.

NOTA: A agarose utilizada para a preparação dos plugs pode ser reutilizada de 2 a 3 vezes e deve ser mantida em temperatura ambiente; o excedente da solução de proteinase K deve ser descartado depois de descongelada.

3. Lise das células no bloco de agarose

- ❖ Rotular tubos cônicos de polipropileno, de 50 ml, com o número das amostras;
- ❖ Distribuir em cada tubo 5 ml de solução de lise (EDTA 0,5 M pH 8,0 contendo 1% de sarcosyl e 25 µl de proteinase K (20 mg/ml). Para 10 amostras adicionar 250 µl de proteinase K em 50 ml de solução de lise;
- ❖ Abrir o molde dos blocos, retirando a fita adesiva e transferir o bloco para o tubo cônico contendo a solução de lise. Assegurar que os blocos fiquem submersos na solução de lise. Colocar os três blocos de cada amostra em um único tubo de lise;
- ❖ Colocar os tubos de lise em incubadora a 54 °C com agitação vigorosa e constante (150 rpm) por 1:30 - 2:00 horas.

4. Lavagem dos blocos de agarose

- ❖ Diminuir a temperatura da incubadora com agitação para 50 °C;
- ❖ Retirar os tubos da incubadora e, cuidadosamente, descartar a solução de lise de cada tubo, com o auxílio de uma tampa perfurada para não perder os blocos;
- ❖ Acrescentar 10-15 ml de água destilada ou Milli Q pré-aquecida a 50- 55 °C e lavar 2 a 3 vezes rapidamente. Novamente acrescentar 15 ml de água

destilada ou Milli Q e levar a incubadora com agitação por 15 min. Repetir o procedimento por duas vezes;

- ❖ Eliminar a água dos blocos e adicionar 10-15 ml de tampão TE pré-aquecida a 50- 55 °C. Levar a incubadora com agitação por 15 min
- ❖ Repetir o procedimento por quatro vezes;
- ❖ Decantar o último lavado e acrescentar 5-10 ml de tampão TE em temperatura ambiente. Manter em geladeira até o momento de uso.

5. Digestão do DNA nos blocos de agarose

- ❖ Preparar a solução de digestão para uma concentração final da enzima *Xba*I de 30 U/ μ l; tampão da enzima a 1X; BSA 1X ; água estéril, para um volume final de 200 μ l por amostra;
- ❖ Realizar cálculo seguindo a recomendação do fabricante;
- ❖ Distribuir 200 μ l da mistura em microtubos de 1,5 ml, previamente identificados com o número das amostras;
- ❖ Pegar um bloco de agarose, mantido em TE, a 4 °C, contendo o DNA lisado de cada amostra, e com auxílio de bisturi ou lamínula, cortar uma porção de aproximadamente 1-2 mm e colocar no tubo correspondente contendo a mistura da solução;
- ❖ Incubar em Banho Maria 37 °C por 18 - 24 h.

6. Preparação do gel de agarose

- ❖ Preparar 2 litros de tampão TBE 0,5X conforme abaixo:

TBE 10X	100 ml
H ₂ O Milli Q ou destilada (q.s.p.)	2000 ml

- ❖ Colocar o tampão na cuba de eletroforese e ligar o cooler para ir resfriando até a temperatura de 14 °C;
- ❖ Preparar agarose SeaKem Gold a 1% em TBE 0,5X (volume de 100 ml para gel pequeno e 150 ml para gel grande);

- ❖ Preparar o suporte para gel com o pente adequado, não esquecer de nivelar;
- ❖ Retirar os blocos dos tubos e colocar sobre os pentes, não esquecendo que a amostra padrão ocupará três dentes (início, meio e fim);
- ❖ Retirar o excesso de tampão com papel de filtro absorvente;
- ❖ Colocar o pente no molde do gel;
- ❖ Confirmar que os blocos estejam alinhados;
- ❖ Verter cuidadosamente a agarose (resfriada a 50 - 55 °C);
- ❖ Fechar os poços com agarose (opcional);
- ❖ Aguardar 20-30 minutos para a completa solidificação da agarose, retirar o pente antes de colocar na cuba de eletroforese.

7. Preparo para a eletroforese

- ❖ Colocar o esquadro negro, que limita o suporte do gel de agarose, na sua devida marca dentro da cuba;
- ❖ Observar se o tampão TBE 0,5X alcançou a temperatura desejada (14 °C);
- ❖ Colocar o suporte do gel de agarose previamente preparado com os blocos digeridos, dentro do esquadro negro;
- ❖ Ligar o equipamento seguindo as instruções de uso do equipamento e os procedimentos indicados para cada espécie bacteriana.

Condições para *Bordetella* utilizando CHEFF DR III:

Bloco 1	Bloco 2
Pulso inicial: 5 segundos	Pulso inicial: 8 segundos
Pulso final: 6 segundos	Pulso final: 35 segundos
Tempo: 11 horas	Tempo: 13 horas
Corrente: 6 volts	Corrente: 6 volts

Na utilização do **CHEFF DR II** o tempo de corrida deve ser aumentado em 1 hora, ficando o Bloco 1 com 11,4 horas e o Bloco 2 com 13,6 horas.

8. Procedimento para análise do gel

- ❖ Após o término da corrida eletroforética, retirar o gel de agarose, corar com brometo de etídio (50 µl da solução estoque (10 mg/ml) em 500 ml de água destilada) por 30 minutos;
- ❖ Descorar o gel em água estilada por três vezes trocando a água a cada 20 minutos;
- ❖ Capturar a imagem em Gel Doc ou um sistema fotodocumentação equivalente;
- ❖ Guardar a imagem em um arquivo "tiff";
- ❖ Analisar a imagem de acordo com o programa Bionumerics.

9. Soluções

➤ TE (Tris 10 mM: EDTA 1 mM, pH 8,0):

Tris-HCl 1 M, pH 8,0	10 ml
EDTA 0,5 M, pH 8,0	2 ml
H ₂ O Milli Q (qsp)	1000 ml

Nota: o TE é usado para a preparação da agarose SKG e para lavar os plugs após a lise.

➤ Agarose Seakem Gold (SKG) 1% em TE:

- Pesar 1g de SKG em frasco apropriado;
- Adicionar 100 ml de TE e agitar suavemente;
- Retirar a tampa, colocar parafilme e dissolver sob aquecimento (em forno micro-ondas ou BM fervente);
- Colocar o frasco ou tubo em BM a 55-60 °C por no mínimo 15 minutos;
- Manter no BM até o momento do uso.

- **CSB (“Cell Suspension Buffer” - Tampão para Suspensão Celular) (Tris 100 mM: EDTA 100 mM, pH 8,0):**

Tris 1 M pH 8,0	10 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	20 ml
H ₂ O Milli Q (q.s.p.)	100 ml

- **Tampão de lise Celular (EDTA 50mM, pH 8,0 + 1% de sarcosyl + 0,1 mg/ml de Proteinase K):**

EDTA 0,5 M pH 8,0	5 ml
Sarcosyl a 10%	5 ml
Tris 1 M pH 8,0	2,5 ml
Proteinase K (20 mg/mL)	250 µl
H ₂ O Milli Q (q.s.p.)	50 ml

Adicionar 25 µl de Proteinase K a 20 mg/ml para cada 5 ml de buffer de lise celular no momento do uso (concentração final de 0,1 mg/ml).

- **Proteinase K (20 mg/ml):**

Proteinase K em pó	100 mg
H ₂ O Milli Q	5 ml

Dissolver, distribuir em tubos eppendorf (**500 µl faz 12 amostras**) e armazenar a **-20 °C (Utilizar máscara para pesar, e limpar a balança após a pesagem).**

➤ **Tris-HCl 1M, pH 8,0:**

Tris-HCl	157,6 g
----------	---------

Dissolver em 800 ml de H₂O Milli Q, esfriar em temperatura ambiente, ajustar o pH com ± 50 ml de NaOH 10 N, completar o volume para 1000 ml com H₂O Milli Q e autoclavar a 121° por 15 minutos.

➤ **EDTA 0,5 M, pH 8,0:**

Na ₂ EDTA.2H ₂ O	186,12 g
--	----------

Dissolver em 800 ml de H₂O Milli Q, ajustar o pH com ± 30 pastilhas de NaOH (ou 50 ml de NaOH 10 N), adicionando lentamente, completar o volume para 1000 ml com H₂O Milli Q e autoclavar a 121 °C por 15 minutos.

➤ **Sarcosyl (N-lauroilsarcosina, sal dissódico) a 10%:**

Sarcosyl (Sigma L-9150)	10 g
H ₂ O Milli Q	90 ml

Adicionar cuidadosamente o Sarcosyl à água em um recipiente estéril e dissolver suavemente por aquecimento a 50-60 °C (**Utilizar máscara para pesar**).

➤ **Tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 10X (Tris-base 890 mM:EDTA 25 mM: H₃BO₃ 890 mM):**

Tris-Base	108 g
Ac. bórico (H ₃ BO ₃)	55 g
EDTA 0,5 M	40 ml
H ₂ O Milli Q	1000 ml

➤ **Brometo de Etídeo**

Solução estoque = 10 mg/ml

Diluir 1:10.000 com H₂O Milli Q (10 µl em 100 mL de H₂O), concentração final de 1 µg/ml para corar os géis. A mesma solução, mantida em recipiente escuro ao abrigo da luz, pode ser usada para corar 6 a 8 géis antes de ser descartada, de acordo com as normas de biossegurança da Instituição.