



**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Pós-Graduação em Biologia Microbiana**

**ELLEN DE LIMA ROCHA**

**Caracterização clonal de cepas de  
*Bordetella pertussis* isoladas no  
Distrito Federal**

**Brasília-DF  
2015**

**Caracterização clonal de cepas de  
*Bordetella pertussis* isoladas no  
Distrito Federal**

**ELLEN DE LIMA ROCHA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de Biologia Microbiana do Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, para obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana.

Orientadora: Prof Dra. Tatiana Amabile de Campos

**Brasília-DF  
2015**

# **Caracterização clonal de cepas de *Bordetella pertussis* isoladas no Distrito Federal**

**ELLEN DE LIMA ROCHA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de Biologia Microbiana do Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, para obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana.

Orientadora: Tatiana Amabile de Campos

**Aprovada em:**

**Banca Examinadora:**

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ângela Patrícia Santana

Prof.<sup>a</sup> Dra. Beatriz Dolabela de Lima

Prof.<sup>a</sup> Dra. Tatiana Amabile de Campos

Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins

*A Deus acima de tudo por ser meu amado criador e alicerce!  
À minha amada família por permanecer ao meu  
lado, incentivando-me e apoiando-me sempre,  
mesmo diante das minhas maiores loucuras!*

## **Agradecimentos**

A Deus por sua divina proteção e por seu constante amparo;

À minha família pela dedicação e confiança depositadas em mim;

À minha orientadora, Tatiana Amabile de Campos, pela compreensão e sensibilidade oferecidas a mim em um momento de tamanha fragilidade;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana;

Aos meus amigos do LACEN-DF, companheiros de luta, que me incentivaram a desafiar os meus limites, que se mostraram tão prestativos sempre que precisei e que, apesar dos caminhos diferentes, estarão sempre no meu coração e em minhas orações;

Aos meus amigos do HRG que me abraçaram, incentivaram e tornaram possível a continuidade do meu trabalho;

À pesquisadora, Daniela Leite, do Instituto Adolfo Lutz-SP pela disponibilidade e prontidão em participar deste projeto, o que foi fundamental para sua conclusão;

À técnica administrativa, Luciana Medeiros, pela paciência e prontidão;

Às alunas, Laura Fernandes Gonçalves e JulianaGoes, por serem meu apoio, minhas mãos no laboratório e ajudar na execução da pesquisa;

A todos que colaboraram ao longo deste trajeto.

## RESUMO

*Bordetella pertussis* é uma bactéria Gram-negativa, restrita aos humanos, causadora da coqueluche, a doença evitável por vacina mais prevalente em todo o mundo. *Bordetella pertussis* é relativamente monomórfica em todo o mundo, no entanto, diversos países estão enfrentando diferentes evoluções epidemiológicas da doença. No Brasil, foi observado um aumento súbito de casos de coqueluche desde 2011. No Distrito Federal, 442 foram observados entre 2010 e 2014. O objetivo deste estudo foi caracterizar as cepas de *Bordetella pertussis*, isoladas no LACEN-DF de 2012 a 2014, por meio das técnicas de sorotipagem e PFGE, além de analisar os seguintes dados: faixa etária e residência dos pacientes com cultura positiva para o agente. Noventa duas cepas foram isoladas de julho de 2012 a agosto 2014: 69 estirpes foram isoladas de 16 regiões do Distrito Federal (DF), e 23, de Goiás (GO) e de Minas Gerais (MG). A maior prevalência observada foi entre os pacientes com 02-04 meses de idade (40/92), seguido com 0-01 mês de idade (28/92). A alta prevalência da infecção entre bebês com até 04 meses confirmou as observações realizadas no Brasil, em que foram registrados 4.921 casos nessa faixa etária. Todos os três sorotipos de *Bordetella pertussis* foram identificados entre os isolados. O sorotipo Fim2 foi o mais prevalente (53,23%), seguido por Fim3 (31,61%) e Fim2,3 (13,04%). Durante o período analisado, houve uma alteração da prevalência entre os sorotipos: de julho de 2013 a julho de 2014, o Fim3 foi o mais prevalente, no entanto, de agosto 2013 a agosto de 2014, o sorotipo mais prevalente foi Fim2. Os resultados da sorotipagem sugerem que o surto de coqueluche foi causado por dois clones diferentes de *Bordetella pertussis* em Brasília-DF durante o período analisado. De acordo com o PFGE, nos três anos analisados foram caracterizados 14 pulsotipos, com similaridade de 85% entre eles. Houve predomínio do pulsotipo BP.Xba.0039 (o predominante no Brasil), seguido pelo pulsotipo BP.Xba.0040. Além disto, foi observado o aumento da prevalência dos pulsotipos BP.Xba.0039 e BP.Xba.0040 e diminuição da diversidade genética a partir do segundo semestre de 2013. Estes dados sugerem a ocorrência da seleção de cepas circulantes de *B. pertussis* na área analisada.

Palavras-chave: *Bordetella pertussis*, Coqueluche, Sorotipos, PFGE.

## ABSTRACT

*Bordetella pertussis* is a Gram-negative human-restricted bacterium that causes whooping-cough or pertussis, which is the most prevalent vaccine-preventable disease worldwide. The introduction of the pertussis vaccination has affected the bacterial population and epidemiology of the disease. *Bordetella pertussis* is relatively monomorphic worldwide, but nevertheless, different countries are facing different epidemiological evolutions of the disease. In Brazil, a sudden increase of pertussis cases was observed since 2011. In Distrito Federal, 442 were observed from 2010 to 2014. The aim of this study was to characterize the *Bordetella pertussis* strains isolated at LACEN-DF during 2012 to 2014 through serotyping and PFGE techniques, besides analyzing the following data: group age and residence of the patients with positive culture for *Bordetella pertussis*. Ninety two strains were isolated from July 2012 to August 2014: 69 strains were isolated from 16 regions from Distrito Federal (DF), and 23 were from Goiás (GO) and Minas Gerais (MG). The most prevalence were observed among patients from patients with 02 to 04 months of age (40/92), followed by 0 to 01 month of age (28/92). The high prevalence of these infection among babies up to 04 months confirmed the observations in Brazil, in which were recorded 4921 cases in this age range. All the three *Bordetella pertussis* serotypes were identified among the isolates. Fim2 serotype were the most prevalent (53.23%), followed by Fim3 (31.61%) and Fim2,3 (13.04%). During the period analyzed, there was an alteration of the prevalent serotypes: from July 2013 to July 2014, Fim3 was the most prevalent however from August 2013 to August 2014 the most prevalent serotype was Fim2. Serotyping results suggest that the pertussis outbreak was caused by different two clones from *Bordetella pertussis* in Brasilia – DF. According to the PFGE in the three years analyzed were characterized 14 pulsetypes, with 85% similarity between them. BP.Xba.0039 and BP.Xba.0040 were the most prevalent pulsetype identified. Since August 2013, we observed the increase of BP.Xba.0039 and BP.Xba.0040 pulsetypes and the decrease of genetic diversity. These data suggests the selection occurrence of current strains of *B. pertussis* on the analyzed area.

Keywords: *Bordetella pertussis*, Whooping-cough, Serotypes, PFGE.

# SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	9
Lista de Quadros.....	12
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Agente Etiológico – <i>Bordetella pertussis</i> .....	15
1.1.1 Taxonomia e Descrição.....	15
1.1.2 Fatores de Virulência.....	17
1.1.3 Imunopatogênese.....	21
1.2 Manifestações clínicas.....	23
1.3 Diagnóstico Laboratorial.....	24
1.4 Tratamento.....	29
1.5 Epidemiologia da Coqueluche.....	30
1.6 Prevenção da coqueluche: Vacinação.....	34
1.7 Técnicas de Tipagem no Estudo Epidemiológico da <i>B. pertussis</i> .....	36
2 JUSTIFICATIVA.....	39
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo geral:.....	40
3.2 Objetivos específicos:.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Amostras bacterianas e cultivo.....	41
4.2 Sorotipagem.....	41
4.3 Descrição dos dados epidemiológicos.....	41
4.4 Perfil de macro-restrição por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 Dados Epidemiológicos da Distribuição da <i>B. pertussis</i> Isoladas pelo Lacen-DF.....	45
5.2 Sorotipagem.....	51

5.3	Perfil de Macro-restrição por PFGE.....	55
6	CONCLUSÕES.....	68
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70
	ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	77
	ANEXO B – Dados das cepas de <i>Bordetella pertussis</i> isolados no Distrito Federal e entorno durante o período de julho de 2012 a agosto de 2014. ....	78

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Representação da imunidade com *B. pertussis* em camundongos não imunizados. ....23
- Figura 2.** Aspecto colonial da *Bordetella pertussis* em meio Regan-Lowe .....26
- Figura 3.** Aspecto morfotintorial da *Bordetella pertussis* com a coloração de Gram.26
- Figura 4.** Técnica para coleta de secreção nasofaríngea para pesquisa de *Bordetella pertussis*.....29
- Figura 5.** Número de casos de Coqueluche nos Estados Unidos de 1922 a 2005 de acordo com dados do CDC. ....31
- Figura 6.** Cobertura vacinal com DTP em crianças em 2013. ....32
- Figura 7.** Casos de coqueluche notificados no Brasil de 2001 a 2012 de acordo com faixa etária.....33
- Figura 8.** Distribuição das faixas etárias de pacientes com cultura positiva para *Bordetella pertussis* no período de julho/2012 a agosto/2014. Faixa etária de 02 a 04 meses de idade: 39 cepas; faixa etária de 0 a 01 mês: 29 cepas; faixa etária de 05 a 06 meses: 06 cepas; faixa etária de 07 meses a 02 anos: 07 cepas; faixa etária de 03 e 05 anos: 01 cepa; faixa etária de 06 e 12 anos: 01 cepa; faixa etária de 12 anos: 09 cepas. ....46
- Figura 9.** Mapa de distribuição dos sorotipos de *Bordetella pertussis* no Distrito Federal de julho/2012 a agosto/2014 de acordo com a região. Observou-se o isolamento de 69 cepas de *Bordetella pertussis* oriundas de 16 regiões administrativas do Distrito Federal – Brasília (07 cepas), Brazlândia (01 cepa), Candangolândia (01 cepa), Ceilândia (08 cepas), Cruzeiro (01 cepa), Gama (01 cepa), Guará (07 cepa), Núcleo Bandeirante (03 cepas), Planaltina (10 cepas), Recanto das Emas (06 cepas), Riacho Fundo (03 cepas), Santa Maria (01 cepa), São Sebastião (02 cepas), Samambaia (07 cepas), Sobradinho (08 cepas) e Taguatinga (03 cepas). ....48

<b>Figura 10.</b> Mapa de distribuição dos sorotipos de <i>Bordetella pertussis</i> isoladas pelo LACEN-DF oriundas da região do entorno do DF. 23 culturas positivas foram oriundas do entorno do DF, sendo 20 isolamentos de Goiás (02 da Cidade Ocidental, 02 de Formosa, 01 de Ipameri, 02 de Luziânia, 03 do Novo Gama, 01 de Rio Verde, 03 de Santo Antônio do Descoberto, 05 de Valparaíso e 01 de Vila Boa,) e 03 isolamentos de Minas Gerais (01 de Bonfinópolis e 02 de Unai). .....	49
<b>Figura 11.</b> Distribuição dos sorotipos das 92 cepas de <i>Bordetella pertussis</i> isoladas pelo Lacen-DF no período de julho/2012 a agosto/2014.....	51
<b>Figura 12.</b> Distribuição dos sorotipos das 92 cepas de <i>Bordetella pertussis</i> isoladas pelo Lacen-DF no período de julho/2012 a agosto/2014 de acordo com a faixa etária dos pacientes. ....	52
<b>Figura 13.</b> Distribuição dos sorotipos de <i>Bordetella pertussis</i> de acordo com o período de isolamento das cepas.....	54
<b>Figura 14.</b> Dendrograma representativo de similaridade genética do perfil eletroforético de macrorestrição em Eletroforese em Gel de Campo Pulsado de cepas de <i>B. pertussis</i> isoladas do Distrito Federal e entorno em 2012. O dendrograma acima demonstra que, em 2012, houve circulação de pelo menos 09 pulsotipos de <i>B. pertussis</i> no DF e entorno com alta similaridade entre eles (86%).	56
<b>Figura 15.</b> Distribuição de Pulsotipos de <i>B. pertussis</i> em 2012 de acordo com a região. ....	57
<b>Figura 16.</b> Dendrograma representativo de similaridade genética do perfil eletroforético de macrorestrição em Eletroforese em Gel de Campo Pulsado de cepas de <i>B. pertussis</i> isoladas do Distrito Federal e Entorno em 2013. O dendrograma acima demonstra que, em 2013, houve circulação de pelo menos 07 pulsotipos de <i>B. pertussis</i> no DF e entorno com alta similaridade entre eles (86%) com predomínio do pulsotipo BP Xba 0039. ....	58
<b>Figura 17.</b> Distribuição de Pulsotipos de <i>B. pertussis</i> em 2013 de acordo com a região. ....	59

<b>Figura 18.</b> Dendrograma representativo de similaridade genética do perfil eletroforético de macrorestrição em Eletroforese em Gel de Campo Pulsado de cepas de <i>B. pertussis</i> isoladas do Distrito Federal e Entorno em 2014. O dendrograma acima demonstra que, em 2014, houve circulação de pelo menos 06 pulsotipos de <i>B. pertussis</i> no DF e entorno com alta similaridade entre eles (80%) com predomínio do pulsotipo BP Xba 0039, seguido do BP Xba 0040.....	60
<b>Figura 19.</b> Distribuição de Pulsotipos de <i>B. pertussis</i> em 2014 de acordo com a região. ....	61
<b>Figura 20.</b> Dendrograma representativo de similaridade genética do perfil eletroforético de macrorestrição em Eletroforese em Gel de Campo Pulsado de cepas de <i>B. pertussis</i> isoladas do Distrito Federal e Entorno no período de julho/2012 a agosto/2014. Foram encontrados 14 pulsotipos, com similaridade de 85% entre eles. Três cepas não foram caracterizadas, pois não houve recuperação a partir do estoque. ....	62
<b>Figura 21.</b> Distribuição dos Pulsotipos de <i>B. pertussis</i> no Distrito Federal durante o período de julho/2012 a agosto/2014. ....	63
<b>Figura 22.</b> Distribuição de Pulsotipos de <i>B. pertussis</i> encontrados oriundos da região do entorno do DF. ....	63
<b>Figura 23.</b> Frequência dos Pulsotipos no período de julho/2012 a agosto/2014. ....	64
<b>Figura 24.</b> Perfil de pulsotipos de <i>B. pertussis</i> encontrados pela PFGE de acordo com o semestre/ano de isolamento.....	65
<b>Figura 25.</b> Distribuição dos sorotipos de <i>B. pertussis</i> de acordo com os pulsotipos	66

## Lista de Quadros

- Quadro 1.** Características Bioquímicas para diferenciação das espécies do gênero *Bordetella*. .....27
- Quadro 2.** Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação, segundo região geográfica, de 2010-2015. ....33
- Quadro 3.** Casos de coqueluche confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net- de 2010 a 2014 no Distrito Federal. ....34
- Quadro 4.** Comparação entre os métodos comuns de tipagem molecular utilizados em estudo de cepas de *Bordetella pertussis*. ....37
- Quadro 5.** Pulsos utilizados na eletroforese em gel para a PFGE.....44

## Lista de Abreviaturas e Siglas

<b>AC</b>	AdenilatoCiclase
<b>AGG</b>	Aglutinógeno
<b>AMPc</b>	Adenosina 3',5'-Monofosfato Cíclico
<b>aP</b>	Vacina Acelular
<b>BM</b>	Banho-Maria
<b><i>Bvg</i></b>	<i>Bordetella Virulence Genes</i>
<b>C</b>	Base Nitrogenada Citosina
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>CDC</b>	Center For Disease Control And Prevention
<b>CT</b>	Citotoxina Traqueal
<b>CTAB</b>	Brometo de Cetiltrimetilamônio
<b>DIVEP</b>	Diretoria De Vigilância Epidemiológica
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>DTwP</b>	Vacina contra difteria, tétano e pertussis celular
<b>DTPw+Hib</b>	Difteria, tétano, coqueluche de células inteiras e <i>Haemophilus influenzae</i>
<b>dTpa</b>	Difteria, tétano e coqueluche, acelular, adulto e pediátrico a partir de 04 anos
<b>EDTA</b>	Ácido Etileno DiaminoTetra Acético
<b>FHA</b>	Hemaglutinina Filamentosa
<b>Fim</b>	Fímbrias
<b>GVEI</b>	Gerência de Vigilância Epidemiológica e Imunização
<b>IAL</b>	Instituto Adolfo Lutz
<b>IS</b>	Sequência de Inserção
<b>LACEN-DF</b>	Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal
<b>LOS</b>	Lipooligossacaródeo
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>min</b>	Minutos

<b>mL</b>	Mililitros (10 <sup>-3</sup> Litros)
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PFGE</b>	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
<b>Prn</b>	Pertactina
<b>DNT</b>	Toxina Dermonecrótica
<b>PTX</b>	Toxina Pertússica
<b>REP-PCR</b>	<i>Repetitive Extragenic Palindromic</i>
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>SDS</b>	Duodecil Sulfato de Sódio
<b>SES</b>	Secretaria do Estado de Saúde
<b>SINAN</b>	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
<b>SNP</b>	Polimorfismo de Único Nucleotídeo
<b>SP</b>	São Paulo
<b>SVS</b>	Subsecretaria de Vigilância à Saúde
<b>TSC</b>	Tampão de suspensão celular (Tris 100mM: EDTA 100mM, pH 8.0)
<b>Tris</b>	Hidroximetilaminometano
<b>UPGMA</b>	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b>wP</b>	Vacina com Célula Pertússica Inteira
<b>µL</b>	Microlitros (10 <sup>-6</sup> Litros)

# 1 INTRODUÇÃO

A Coqueluche é uma doença infecciosa aguda, endêmica, de transmissão respiratória e notificação compulsória em todo o território nacional (Ministério da Saúde, 2011). Apresenta altastaxas de transmissibilidade e capacidade de causar surtos e óbitos, sendo considerada a quinta maior causa de morte por doença vacinável em crianças abaixo de 05 anos de idade (Ulloa-Gutierrez, Boza, Carvajal-Riggioni, 2011).

Essa doença possui histórico ancestral recente e sua origem ainda é bastante discutida (Cherry, 2007). A primeira menção da doença foi um surto em 1414 na cidade de Paris, descrito em Moulton do *The Mirror da Saúde*, publicado em 1540 (Matoos e Cherry, 2005). A partir dos séculos XVI e XVII, as epidemias de coqueluche na Europa foram descritas com mais frequência na literatura, possivelmente sugerindo uma expansão da doença (Bart *et al*, 2014).Guilherme de Baillou descreveu uma epidemia de coqueluche em 1578 em Paris e, na metade do século XVIII, a coqueluche passou a ser bem reconhecida em todo território europeu. Com base em seus desenhos de hastes elípticas, Carl Burger na Universidade de Bonn-Alemanha, aparentemente observou a *Bordetella pertussis* em filmes com manchas de escarro em 1883. Outras observações de bacilos no muco respiratório surgiram, incluindo por Jules Bordet e OctaveGengou que em 1900 descreveu encontrar um novo "bacilo ovóide" no escarro de um bebê de 06 meses de idade com coqueluche. Bordet e Gengou também relataram o primeiro isolamento do agente infeccioso no Instituto Pasteur em Bruxelas em 1906(Cherry, 2007).

## 1.1 Agente Etiológico – *Bordetella pertussis*

### 1.1.1 Taxonomia e Descrição

O agente etiológico da coqueluche é a bactéria *Bordetella pertussis*. Um pequeno bacilo Gram-negativo(0,2-0,7 µm), pleomórfico, aeróbio, não-esporulado, imóvel, provido de cápsula (formas patogênicas) e de fímbrias (MS, 2009). Seu único reservatório natural é o homem (Matoos e Cherry, 2005), sendo que ainda não foi demonstrada a existência de portadores crônicos. A transmissão ocorre, principalmente, pelo contato direto entre a pessoa portadora ou doente e a pessoa

suscetível, por meio de gotículas de secreção da orofaringe eliminadas durante a fala, a tosse e/ou espirro. A transmissão por objetos recentemente contaminados com secreções de pessoas doentes pode ocorrer, porém é mais raro devido à dificuldade de o agente sobreviver fora do hospedeiro (MS, 2014).

A *Bordetella pertussis* pertence ao gênero *Bordetella* juntamente com outras oito espécies bacterianas: *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella holmesii*, *Bordetella hinzii*, *Bordetella avium*, *Bordetella petrii*, *Bordetella ansorpii* e *Bordetella trematum* (Kallonen e He, 2009). Dentre as espécies do gênero, quatro delas – *Bordetella pertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella holmesii* – têm sido associadas às infecções respiratórias em seres humanos e outros mamíferos (Matoo e Cherry, 2005). As outras são consideradas patógenos oportunistas, podendo ser isolados tanto do trato respiratório quanto de outras áreas (Mooi, He e Guiso, 2007; Park et al. 2012).

As três espécies *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* possuem relação evolutiva estreita e são referidas como “*Bordetella* clássicas” (Van der Zee et al, 1996). Estudo por meio de análise comparativa de sequências genômicas, indica que as linhagens de *B. pertussis* e *B. parapertussis* evoluíram a partir de uma linhagem de *B. bronchiseptica* ancestral (Parkhill, et al, 2003; Gerlach et al, 2001) e que a restrita diversidade genética entre essas espécies sugere uma origem evolutiva recente (Van der Zee et al, 1997). Porém, apesar da similaridade genotípica, essas bactérias possuem fenótipos diferentes e distinguem-se em relação à patogênese, incluindo especificidade do hospedeiro, severidade das doenças e duração da infecção (aguda versus crônica) (Parkhill et al, 2003), sendo que a *Bordetella pertussis* possui maior patogenicidade.

Acredita-se que a diferença entre as três espécies, incluída a patogenicidade apresentada pela *B. pertussis*, decorre de pequenas alterações na estrutura genômica destes micro-organismos. Quando comparadas, observa-se que a *B. bronchiseptica* possui maior genoma, seguido pela *B. parapertussis* e *B. pertussis* respectivamente. Porém, mesmo com material genético menor, a *B. pertussis* ganhou alguns genes exclusivos, provavelmente relacionados aos fatores de virulência apresentados apenas por ela. Como é raro eventos de transferência horizontal de genes na espécie devido à ausência de fagos e plasmídeos (Parkhill et al, 2003), o

principal mecanismo de variabilidade genética em *B. pertussis* é o acúmulo de polimorfismo de único nucleotídeo (SNPs) e posterior expansão clonal de linhagens mais adaptadas. Grande parte dos SNPs é encontrada em genes de virulência (Bart *et al*, 2014; Van Gent *et al*, 2012).

Além disso, a *B. pertussis* apresenta maior número de pseudogenes que podem ter sido originados de genes inativados por elementos de sequências de inserção (IS) presentes no genoma. As ISs estão envolvidas com o rearranjo de material genético e com a perda de genes na espécie, consequentemente envolvidos na adaptação e interação com seu único hospedeiro, o homem (Parkhill *et al*, 2003; Van der Zee *et al*, 1997).

É interessante o fato de que, quando genes que codificam certos fatores de virulência de *B. pertussis* são transferidos para a *B. parapertussis* por meio de técnicas genéticas, esse agente adquire a capacidade de reproduzir *in vitro* características semelhantes ao primeiro micro-organismo, sugerindo que a presença de genes de virulência e sua regulação podem constituir a principal diferença entre essas espécies geneticamente semelhantes (Koneman *et al*, 2008).

### 1.1.2 Fatores de Virulência

A *Bordetella pertussis* tipicamente expressa vários fatores de virulência que fazem parte do seu mecanismo de sobrevivência, como aderência e invasão, e desencadeia resposta imunológica no hospedeiro. (Fedele, Bianco, Ausiello, 2013). Os principais fatores de virulência desta espécie estão descritos a seguir.

A **hemaglutinina filamentosa** (FHA) é principal proteína de adesão, com peso molecular de aproximadamente 250 kDa e altamente imunogênica. Está presente na superfície bacteriana e participa do processo de adesão da *B. pertussis* às células ciliadas do sistema respiratório superior e aos macrófagos. Estudos indicam que a ligação FHA-macróforo possibilita a fagocitose da bactéria sem que haja o desencadeamento de surto oxidativo, o que caracteriza um mecanismo de evasão bacteriana ao sistema imunológico do hospedeiro, facilitando a sobrevivência intracelular da *B. pertussis* (persistência) (Koneman *et al*, 2008; Martinez e Trabulsi, 2008).

Os **aglutinógenos** (AGGs) são antígenos proteicos de superfície. Estudos realizados por Robinsont, Ashworth e Irons (1989) descreveram a existência de 14 aglutinógenos termolábeis no gênero *Bordetella*, sendo que 06 (AGG 1 – 6) foram descritos na espécie *B. pertussis*. A AGG1 foi considerada comum a todas as cepas de *B. pertussis*, enquanto que as AGG2 a AGG6 foram encontradas em várias combinações em diferentes cepas da espécie. Posteriormente, Mattoo e Cherry (2005) consideraram as AGG1, AGG2 e AGG3 as principais aglutininas e, atualmente, são utilizadas para determinação dos sorotipos.

As AGG2 e AGG3 possuem natureza fimbrial. Como várias bactérias Gram-negativas, a *B. pertussis* apresenta filamentos proteicos em sua superfície denominados **fímbrias** (Fim). Estudos sugerem que as fímbrias também medeiam o processo de adesão da bactéria às células epiteliais ciliadas do sistema respiratório e, semelhantemente às FHA, participam da persistência bacteriana durante a infecção suprimindo resposta inflamatória inicial (Melvin *et al*, 2014).

Outro fator de virulência expresso na superfície bacteriana é a **pertactina** (PRN), uma proteína também encontrada em outras espécies do gênero *Bordetella*. A PRN P69, específica da *B. pertussis*, possui originalmente peso molecular de 69 kDa (Koneman *et al*, 2008) e pertence à família de autotransportadores, que consiste em um domínio N-terminal passageiro e um domínio  $\beta$  C-terminal ( $\beta$ -barrel). O domínio  $\beta$  forma um poro na membrana externa por onde o domínio passageiro é transportado para a superfície celular e ancora a proteína à membrana externa (Martinez e Trabulsi, 2008; Melvin *et al*, 2014). Embora a função da PRN ainda não esteja evidente, estudos sugerem que participa da adesão ao epitélio respiratório do hospedeiro e da consequente invasão bacteriana. Essa proteína possui domínios (porção com o tripeptídeo Arginina-Glicina-Aspartato, regiões ricas em prolina e repetições ricas em leucina) que, em outras bactérias, são reconhecidos por receptores do hospedeiro, o que pode facilitar a ligação entre a célula bacteriana e a célula eucariótica (Mattoo e Cherry, 2005).

O **Lipopolissacarídeo** (LPS), uma endotoxina, também é encontrado na membrana externa da *B. pertussis*. Diferentemente de outros patógenos bacterianos, o LPS da *B. pertussis* não apresenta estruturas repetitivas de antígenos O, sendo então chamado de lipooligossacaródeo (LOS) (Koneman *et al*, 2008). É pirogênica,

mitogênica, tóxica e é capaz de ativar e induzir a produção do fator de necrose tumoral (TNF) por macrófagos (Mattoo e Cherry, 2005).

A **toxina dermonecrótica**(DNT), também conhecida como toxina termolábil, é uma toxina de 102 kDa encontrada em todas as cepas de *B. pertussis*. A DNT induz inflamação, vasoconstrição e lesão necrótica nas regiões colonizadas por essa bactéria, porém seu papel ainda não está claro nas alterações das reações fisiológicas do hospedeiro em resposta à infecção (MadanBaduet *al*, 2001).

A **citotoxina traqueal** é um pequeno fragmento de peptidoglicano, 921 kDa, da parede celular liberado durante a lise da célula bacteriana ou durante seu crescimento normal. Acredita-se ser responsável pela tosse característica da coqueluche por provocar cilioestasia e morte das células epiteliais ciliares (Martinez e Trabulsi, 2008; MadanBaduet *al*, 2001).

A **toxina pertússica** (PTX) é o principal fator de virulência da *B. pertussis* responsável por grande parte dos sintomas característicos da coqueluche (Martinez e Trabulsi, 2008). Trata-se de uma exotoxina proteica do tipo AB<sub>5</sub> com peso molecular de 105 kDa composta por uma subunidade A (S1) e um complexo pentamérico de cinco subunidades S2 a S5 denominado oligômero B (Tamura *et al*, 1983). A subunidade S1 é enzimaticamente ativa e catalisa a ADP-ribosilação da proteína G – que regulam a atividade da adenilato-ciclase – da célula hospedeira o que resulta no aumento intracelular do AMP cíclico e consequentemente contribuindo para disfunções celulares no hospedeiro, como sensibilização à histamina, linfocitose, aumento da secreção de insulina e estimulação de respostas imunológicas (Mattoo e Cherry, 2005). O oligômero B interage com glicoproteínas e glicolipídeos presentes na superfície de células eucarióticas, possibilitando a união da PT à superfície da célula-hospedeira e a ação da subunidade S1 (MadanBaduet *al*, 2001; Martinez e Trabulsi, 2008).

A expressão da PTX é codificada por um conjunto de cinco genes (ptxS1-S5), presentes em um *operon*. Esse *operon* está presente em *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*, porém os genes não são transcritos nas últimas duas espécies devido a mutações na sua região promotora (Arico e Rappuoli, 1987).

A *B. pertussis* expressa outra toxina, a **adenilatociclase** (AC), uma proteína bifuncional de 220 kDA com domínio hemolítico e catalítico (Bellalou, Ladant, Sakamoto, 1990; MadanBaduet *al*, 2001). Ela se insere na membrana plasmática de células fagocíticas do hospedeiro, formando poros que provocam lise celular. Essa toxina também promove aumento da produção de AMPc pela célula, por um mecanismo distinto apresentado pela toxina pertússica. A AC é ativada pela calmodulina intracelular e catalisa a conversão da adenosina trifosfato (ATP) em AMPc nas células eucarióticas. O acúmulo intracelular de AMPc pode suprimir a expressão da resposta imunológica local ao inibir a quimiotaxia e a fagocitose dos neutrófilos (Martinez e Trabulsi, 2008; Konemanet *al*, 2008; Mattoo e Cherry, 2005).

No decorrer do processo infeccioso, a expressão dos fatores de virulência da *B. pertussis* varia. Os fatores de virulência são regulados positivamente pelos produtos do operon *Bordetella virulence gene* (*bvgAS*) que codifica um sistema de transdução de sinal conhecido como BvgSA. O sistema BvgSA é constituído de dois componentes – o BvgA e o BvgS – responsáveis por regular as funções das células em resposta a estímulos ambientais. A BvgS é uma proteína sensora de 135 kDa capaz de detectar sinais do meio e repassá-los autofosforilando-se e, posteriormente, fosforilando a BvgA. A BvgA é uma proteína de 23 kDa que, quando recebe o grupo fosfato da BvgS, é ativada e se liga às sequências de DNA, ativando ou reprimindo a transcrição dos genes de outros fatores de virulência, exceto a citotoxina traqueal (regulada por outro sistema). Sabe-se que o sistema BvgSA é ativado à 37 °C e inibido à 25 °C ou na presença de sulfato de magnésio ou ácido nicotínico. (Boucheret *al*, 1997; Mattoo e Cherry, 2005; Melton e Weiss, 1989).

O sistema BvgSA controla 04 classes de genes – classes 1, 2, 3 e 4 – e 03 diferentes fases fenotípicas da *B. pertussis*. A fase Bvg<sup>+</sup> ocorre o BvgAS é totalmente ativada e caracteriza-se pela máxima expressão de genes que codificam as adesinas (genes de classe 2, que codificam FHA, Fim2 e Fim3 por exemplo) e toxinas (genes de classe 1, como os que codificam CA, PTX e sistema de secreção do tipo III), e mínima expressão de genes de classe 3 (que codifica apenas uma proteína da membrana externa caracterizada até o momento, de função ainda não esclarecida) e de classe 4 (representados pelo *loci vrg – virulence-repressed*

genes). A fase  $Bvg^+$  é necessária para causar infecção respiratória. A fase fenotípica  $Bvg^-$  ocorre quando o BvgAS está inativo e é caracterizada por expressão máxima dos genes de classe 4, associados ao aumento de expressão de proteínas de superfície e LPS, e expressão mínima de genes da classe 1, 2, e 3. A fase  $Bvg^+$  é necessária para o crescimento sob condições limitantes de nutrientes, tais como podem ser encontradas no ambiente. A fase  $Bvg^i$  ocorre quando o BvgAS está parcialmente ativo e a ela são atribuídas expressão máxima dos genes de classe 3 e expressão mínima dos genes de classe 1, 2 e 4 (Mattoo e Cherry, 2005; Melvin *et al*, 2014).

### 1.1.3 Imunopatogênese

A resposta imunológica contra a *B. pertussis* é iniciada a partir da colonização do trato respiratório superior onde ocorre o reconhecimento da *B. pertussis* pelas células epiteliais da mucosa e células do sistema imune inato, como as células dendríticas (CD) e os macrófagos. A colonização e o reconhecimento decorrem da interação entre receptores específicos das células dos hospedeiros e padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), principalmente adesinas (FHA, PRN, Fim, entre outras). (Higgs *et al*, 2012; Fedele, Bianco, Ausiello, 2013).

Acredita-se que concomitantemente à entrada da *B. pertussis* no trato respiratório ocorra a fagocitose das bactérias pelos macrófagos, neutrófilos e células natural killer (NK) e a produção de IFN- $\gamma$  e IL-17 para recrutar mais células de defesa para o local infectado. As células dendríticas, também presentes, processam e expõem fragmentos da bactéria – antígenos – para apresentá-los aos linfócitos T. A produção de IL-12 pelas células imunes inatas resulta na polarização para a resposta mediada por células T auxiliares do tipo 1 (Th1), enquanto que a liberação de IL-1 e IL-23 promove diferenciação para resposta do tipo Th17 – processos responsáveis pelo mecanismo de proteção contra a infecção por *B. pertussis* (Higgs, Ross, Mills, 2012).

Contudo, em infecções primárias, essas respostas mediadas por células T (Th1 e Th17) são suprimidas pela secreção de IL-10 por células do sistema imune inato. As células T reguladoras (Treg) também são supressoras. Isto é, no epitélio mucoso, algumas adesinas, como as AC e FHA, atuam como supressores da

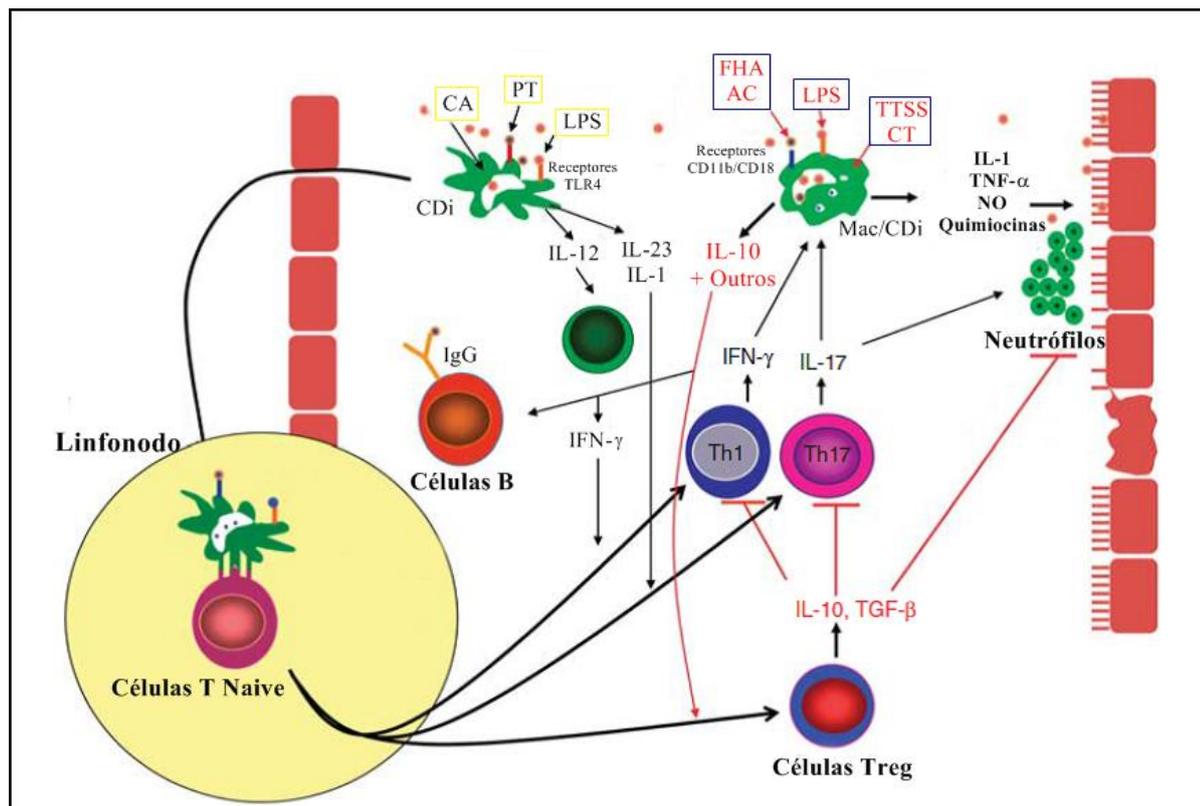
resposta imune local por meio do bloqueio da liberação de (IL-12) e indução da produção de IL-10 pelas APC, caracterizando um mecanismo de evasão do sistema imunológico do hospedeiro e favorecendo a persistência do patógeno no hospedeiro (Fedele, Bianco, Ausiello, 2013; Higgs, Ross, Mills, 2012).

A citotoxina traqueal, em sinergia com LOS e PTX, desencadeia uma resposta pró-inflamatória por meio da liberação de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e fator de necrose tumoral – TNF) pelos macrófagos, favorecendo a eliminação do micro-organismo, porém mediando a patologia local e sendo responsável por vários danos sistêmicos e neurológicos característicos da doença (Fedele, Bianco, Ausiello, 2013; Higgs, Ross, Mills, 2012).

O IFN- $\gamma$ , secretado inicialmente por CD e células natural killer (NK) e, posteriormente, por células Th1, estimula o recrutamento e ativação de macrófagos e neutrófilos para o local da infecção e estimula células B a produzirem anticorpos opsonizantes e fixadores de complemento. Os macrófagos ativados eliminam a *B. pertussis* intracelular por meio da produção de NO ou intermediários de oxigênio reativos.

É importante, então, ressaltar que a proteção ou a patogenicidade envolvidas na infecção por *B. pertussis* dependerá das vias de sinalização ativadas durante o reconhecimento e do perfil de citocinas liberadas no local da colonização. Além disso, a ligação da *B. pertussis* com o epitélio respiratório, a existência de lesões locais e a absorção de toxina depende da alteração dos mecanismos de defesa do hospedeiro e dos mecanismos de evasão apresentados pela bactéria (Gentile, 2010).

A seguir, um modelo representando a resposta imunológica mediante infecção por *B. pertussis* camundongos (Figura 01).



**Figura 1.** Representação da imunidade com *B. pertussis* em camundongos não imunizados.

Mac: macrófagos; CDi: células dendríticas imaturas; IL: interleucina; TTSS: sistema de secreção do tipo III; IgG: imunoglobulina; NO: óxido nítrico; TNF: fator de necrose tumoral; TGF: fator de transformação do crescimento; TLR4: Receptor *Toll-like* tipo 4.

Fonte: Modificado de Higgs, Ross, Mills, 2012.

## 1.2 Manifestações clínicas

A coqueluche possui um período de incubação de 5 a 10 dias, podendo variar de 4 a 21 dias, e raramente, até 42 dias (MS, 2014). Após período de incubação – fase assintomática após exposição e infecção pela *B. pertussis* – a doença, em indivíduos não imunizados, tipicamente é observada em mais três estágios: (i) fase catarral caracterizada por febre baixa, coriza e tosse, semelhantes a um resfriado comum com duração de 7 a 14 dias; (ii) fase paroxística com acessos paroxísticos de tosse, guincho inspiratório e vômitos pós tosse com duração de 2 a 6 semanas; (iii) fase de convalescença, caracterizada pelo desaparecimento dos guinchos com persistência da tosse que pode durar semanas ou meses (Gentile, 2010; Guiso, 2014; MS, 2014).

O período de maior transmissibilidade ocorre na fase catarral, caindo de 95% na 1ª semana da fase catarral para 50% na semana seguinte, sendo praticamente

nula na próxima, embora, ocasionalmente, já tenham sido isoladas bactérias na 10ª semana de doença (MS, 2014).

Várias complicações podem estar associadas à infecção por *B. pertussis*. A complicação mais comum é a pneumonia, responsável por mais de 90% das mortes em crianças menores de 03 anos, que podem ser causadas por *Bordetella* ou superinfecção com outras bactérias (o que é mais frequente). Também são relatadas: otite média, atelectasia, a ruptura alveolar (enfisema ou pneumotórax), distúrbios do sono ou nutrição, desidratação, alcalose metabólica, hemorragia (como epistaxe, melena, hematoma subdural), convulsões, encefalopatia, coma e morte (Gentile, 2010).

A evolução da coqueluche está relacionada com a idade do paciente, com a imunocompetência e condições coexistentes. Crianças e indivíduos não imunizados estão mais propensos a apresentar a forma clássica da doença (Spector e Maziarz, 2013). Em indivíduos não adequadamente vacinados ou vacinados há mais de 05 anos, a coqueluche pode manifestar-se sob forma atípica com tosse persistente, porém, sem paroxismos, guincho característico ou vômito pós-tosse (MS, 2014).

Em lactentes, há um risco significativo de morte (6-9%) ou encefalopatia dano cerebral. A doença é mais grave em crianças menores de 06 meses, particularmente, em recém-nascidos prematuros, não imunizados ou com a imunização incompleta (Gentile, 2010).

### **1.3 Diagnóstico Laboratorial**

O diagnóstico de coqueluche pode ser desafiador devido às apresentações atípicas da doença, principalmente entre adolescentes e adultos, e às dificuldades encontradas na coleta e no processamento das amostras, como disponibilidade de recursos materiais, transporte e capacitação dos profissionais envolvidos em todas as etapas do diagnóstico laboratorial.

Além disso, o acesso aos métodos laboratoriais é problemático tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Em alguns países, onde aparentemente a infecção por *B. pertussis* está controlada, poucos laboratórios estão equipados para realizar o diagnóstico por rotina. Poucos laboratórios mantêm

o meio de inoculação necessário (curto prazo de validade pós-preparo) e kits para coleta e transporte da amostra clínica (Mattoo e Cherry, 2005).

### 1.3.1.1 Cultura

A cultura é considerada o teste padrão-ouro para a confirmação do diagnóstico de coqueluche, além de o isolamento do patógeno ser necessário para testes de sensibilidade aos antimicrobianos e tipagem molecular para controle epidemiológico (CDC, 2015). É uma técnica altamente específica (100%), porém com sensibilidade inferior com variação de 12 a 60% (MS, 2014; Dragstedet *al*, 2004), dependendo de fatores como: antibioticoterapia prévia, estágio da doença, idade, estado vacinal, coleta de espécime, condições de transporte do material, tipo e qualidade do meio de isolamento e transporte, presença de outras bactérias na nasofaringe, tipo de swab, tempo da coleta até o processamento da amostra (MS, 2014; Konemanet *al*, 2008).

A *B. pertussis* é uma bactéria fastidiosa e de difícil cultivo. A cultura visa o isolamento desse patógeno pelo processamento da amostra de secreção de nasofaringe coletado por meio de swab de alginato de cálcio com haste fina e flexível. Os swabs de algodão ou rayon não devem ser utilizados, pois contêm ácidos graxos tóxicos para a *B. pertussis*, já o swab de Dracon é aceitável (Mattoo e Cherry, 2005). Após coletada e quando o plaqueamento imediato não é possível, a amostra deve ser inoculada em meio de transporte Regan-Lowe (meio enriquecido de nutrientes) com cefalexina (antibiótico presente no meio a fim de diminuir contaminação de outros microrganismos) e pré-incubada a 35-37 °C com umidade por até 48 horas (Regan e Lowe, 1977; Konemanet *al*, 2008).

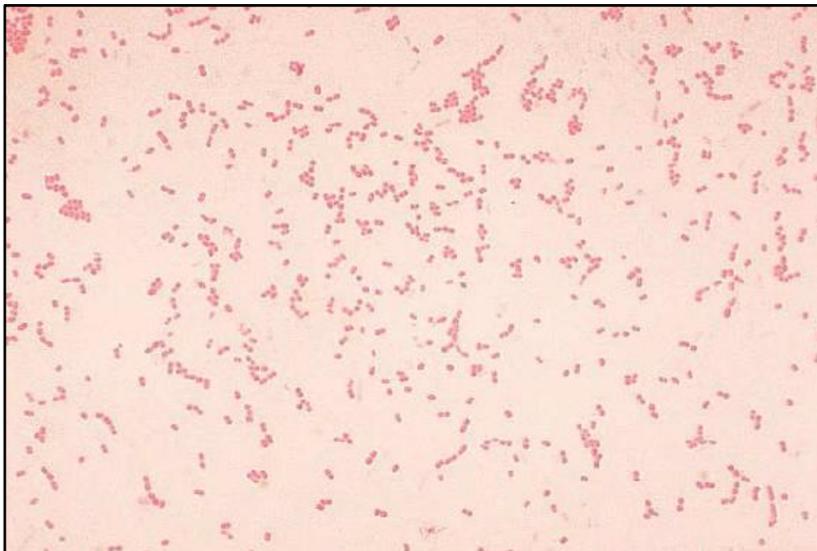
Até o término desse período, a amostra deve ser inoculada em placa de isolamento primário de ágar Regan-Lowe (RL) e incubada a 35-37 °C em ambiente úmido. A cultura pode levar de 07 a 12 dias para confirmar ou não o crescimento da bactéria. (CDC, 2015; Konemanet *al*, 2008; MS, 2014; Regan e Lowe, 1977)

A diferenciação de outras espécies e identificação presuntiva da *B. pertussis* é realizada por meio de suas características bioquímicas (Quadro 1). Em meio RL, as colônias de *B. pertussis* são pequenas, em forma de cúpula, brilhantes e brancas acinzentadas (Figura 2). À coloração de Gram, apresentam-se como bacilos Gram-

negativos pleomórficos (pequenos cocobacilos) (Figura 3), são oxidase negativos e inertes a muitos testes bioquímicos de identificação (Koneman *et al*, 2008).



**Figura 2.** Aspecto colonial da *Bordetella pertussis* em meio Regan-Lowe  
Fonte: IAL-SP, 2010



**Figura 3.** Aspecto morfotintorial da *Bordetella pertussis* com a coloração de Gram.  
Fonte: IAL-SP, 2010

<b>Quadro1. Características Bioquímicas para diferenciação das espécies do gênero <i>Bordetella</i>.</b>			
<b>Característica</b>	<b><i>B. pertussis</i></b>	<b><i>B. parapertussis</i></b>	<b><i>B. bronchiseptica</i></b>
Oxidase	+	-	+
Catalase	+	+	+
Motilidade	-	-	+
Redução do Nitrato	-	-	+
Urease	-	+ (24 horas)	+ (4 horas)
Citrato	-	+	+
Crescimento em:			
Ágar Bordet-Gengou	2-6 dias	1-3 dias	1-2 dias
Ágar Regan-Lowe	3-6 dias	2-3 dias	1-2 dias
Ágar Sangue	Nenhum Crescimento	1-3 dias	1-2 dias
Ágar Chocolate	Nenhum Crescimento	1-3 dias	+
Ágar MacConkey	Nenhum Crescimento	V	+

+, reação positiva; -, reação negativa; v, reação variável.

Fonte: Koneman *et al*, 2008

Vale ressaltar que o resultado de cultura positivo para *B. pertussis* fecha o diagnóstico de coqueluche, porém esse não é o único critério de confirmação utilizado. São reconhecidos os seguintes critérios: (i) critério laboratorial – correspondente a todo caso suspeito de coqueluche e que tenha isolamento por cultura ou identificação por PCR de *B. pertussis*; (ii) critério clínico-epidemiológico – todo caso suspeito e que teve contato com caso confirmado de coqueluche pelo critério laboratorial, entre o início do período catarral e até 3 semanas após o início do período paroxístico da doença; (iii) Critério clínico. O critério clínico, para indivíduos com idade inferior a 6 meses corresponde a todo indivíduo que apresente tosse de qualquer tipo há 10 dias ou mais associada a dois ou mais dos sintomas tosse paroxística, guincho inspiratório, vômitos pós-tosse, cianose, apneia e/ou engasgo; já para indivíduos com idade igual ou superior a 6 meses engloba todo indivíduo que apresente tosse de qualquer tipo há 14 dias ou mais associada a dois

ou mais dos sintomas tosse paroxística, guincho inspiratório e/ou vômitos pós-tosse. (MS, 2014).

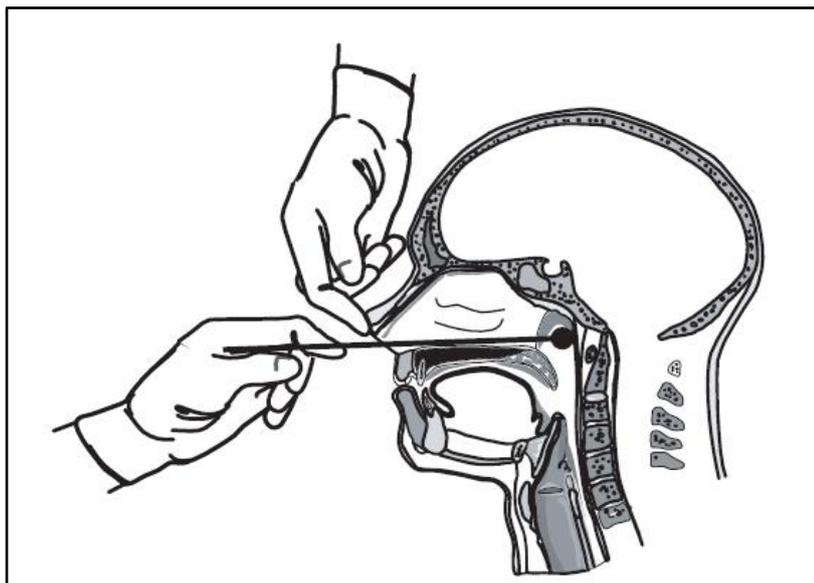
### **1.3.1.2 Reação em cadeia dapolimerase(PCR)**

A reação em cadeia dapolimerase é uma importante ferramenta molecular para o diagnóstico de coqueluche. Ela detecta sequências de DNA presentes no cromossomo da *Bordetella pertussis* de maneira rápida e, diferentemente da cultura, não exige bactérias viáveis na amostra em análise. A PCR apresenta alta sensibilidade, principalmente na primeira semana da doença sintomática, porém com o passar das semanas a presença de DNA da bactéria na nasofaringe do hospedeiro diminui e pode levar a um resultado falso-negativo (CDC, 2015).

A sequência de inserção *IS481* tem sido o principal alvo de escolha já que é encontrada em várias cópias no DNA da *B. pertussis*, tornando a técnica bastante sensível. No entanto, esse alvo possui homologia com *B. holmesii* que pode gerar resultados falso-positivos. Por essa razão, em conjunto com a *IS*, um gene da região codificadora da subunidade 1 da PTX (*ptxS1*) foi incluída no teste (Tattiet *al*, 2008; Tattiet *al*, 2011; Templeton *al*, 2003).

Outros genes alvos associados com *IS481* têm sido descritos e utilizados para aumentar a sensibilidade e precisão analítica do método, discriminar falso-positivo e falso-negativo, além de possibilitar, em alguns casos, a identificação de outras espécies de *Bordetella* (Qinet *al*, 2007).

O método de coleta é semelhante ao da cultura, embora o swab de alginato de cálcio não seja recomendado para coleta de amostras que serão testadas por PCR. O swab para PCR deverá ser transportado em tubo estéril seco até o laboratório. (CDC, 2015) Abaixo, observa-se o método para a coleta da secreção de nasofaringe (Figura 4).



**Figura 4.** Técnica para coleta de secreção nasofaríngea para pesquisa de *Bordetella pertussis*  
Fonte: CDC, 2015.

Os diagnósticos por Sorologiae por teste direto com anticorpo imunofluorescentetêm sido descritos, porém não se dispõe, até o momento, de testes adequados e padronizados. Não sendo, portanto, recomendados como método de diagnóstico (MS, 2014; CDC, 2015).

### 1.3.1.3 Diagnóstico diferencial

A confirmação laboratorial da coqueluche é importante para diagnóstico diferencial já que outros patógenos também causam sintomas semelhantes, podendo causar a síndrome coqueluchoide, entre os quais a *Bordetella parapertussis*, *Mycoplasmapneumoniae*, *Chlamydiatrachomatis*, *Chlamydiapneumoniae* e Adenovírus (1, 2, 3 e 5). (Gregory, 2006; MS, 2014)

## 1.4 Tratamento

O diagnóstico precoce da coqueluche e o tratamento dos casos podem diminuir a severidade dos sintomas e limitar o período de transmissão. Embora o tratamento com antimicrobianos nem sempre seja eficaz em amenizar a severidade das manifestações clínicas, ele é fundamental para redução da transmissibilidade e para o controle da coqueluche (Matoo e Cherry, 2005; CDC, 2015). Para o tratamento, três antibióticos da classe dos macrolídeos são recomendados: azitromicina, claritromicina e eritromicina. Anteriormente a 2005, o tratamento era

realizado com eritromicina, porém, pelo esquema completo de administração ser mais duradouro (06 em 06 horas de 07 a 14 dias), era de difícil adesão, e apresenta efeitos adversos com maior frequência (Matoo e Cherry, 2005; CDC, 2015; MS, 2014). Atualmente, a droga de primeira escolha recomendada pelo Ministério da Saúde no Brasil é a azitromicina (MS, 2014) cuja administração ocorre 01 vez ao dia por 05 dias. O antibiótico de segunda escolha é a claritromicina, administrada de 12 em 12 horas durante 07 dias. Ambos são macrolídeos recentes que demonstraram a mesma eficácia da eritromicina no tratamento e na quimioprofilaxia da coqueluche, além de facilitarem a adesão dos pacientes ao tratamento e, especialmente, à quimioprofilaxia dos contatos íntimos (MS, 2014).

Existem poucos relatos sobre *Bordetella pertussis* resistente aos macrolídeos e, até o momento, não há evidências de que cepas eritromicina-resistentes estejam envolvidas com a emergência da doença no mundo nos últimos anos (Matoo e Cherry, 2005). Na impossibilidade da administração de macrolídeos, por resistência do patógeno ou intolerância do paciente, recomenda-se a utilização do antibiótico trimetoprim-sulfametoxazol (MS, 2014; Matoo e Cherry, 2005; CDC, 2015).

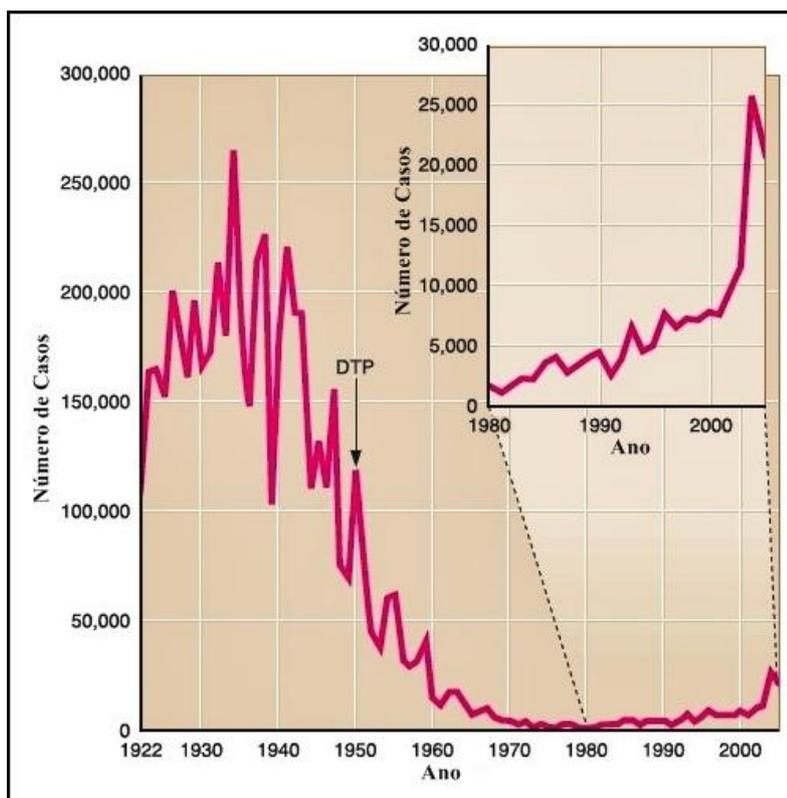
Além do tratamento com o antibiótico, a depender da gravidade da doença, tornam-se necessárias a oxigenoterapia, a aspiração de secreção oronasotraqueal, assistência ventilatória não invasiva ou, em casos mais graves, ventilação mecânica, assim como drenagem de decúbito, hidratação e/ou nutrição parenteral (MS, 2014).

## 1.5 Epidemiologia da Coqueluche

Previamente à introdução da vacina, em meados do século XX, a coqueluche era considerada a principal causa de morte infantil pelo mundo (Roushe Murphy, 2007). Nos Estados Unidos, por exemplo, a alta incidência, 157 casos para 100 000 habitantes, e mortalidade da doença, cerca de 1 morte para 10 casos, provocava, anualmente, mais mortes do que sarampo e pólio juntas (Clark, 2014). De 1926 a 1930, ainda nos Estados Unidos, foram reportadas 36 013 mortes associadas à coqueluche (Cherry, 2007).

Com a introdução da vacina durante os anos 1950-1960, e conseguinte aumento da cobertura vacinal pelos países, a prevalência da doença declinou significativamente (<90%) em países industrializados (WHO, 2015), inclusive nos

Estados Unidos (Figura 5). Porém, a partir da década de 1990, foi observada a reemergência da infecção por *Bordetella pertussis* em vários países com elevados índices de vacinação populacional. Atualmente, a coqueluche tornou-se a doença evitável por vacina de maior prevalência em países desenvolvidos (Cherry, 2007; Clark, 2014; Kallonen et al., 2009).



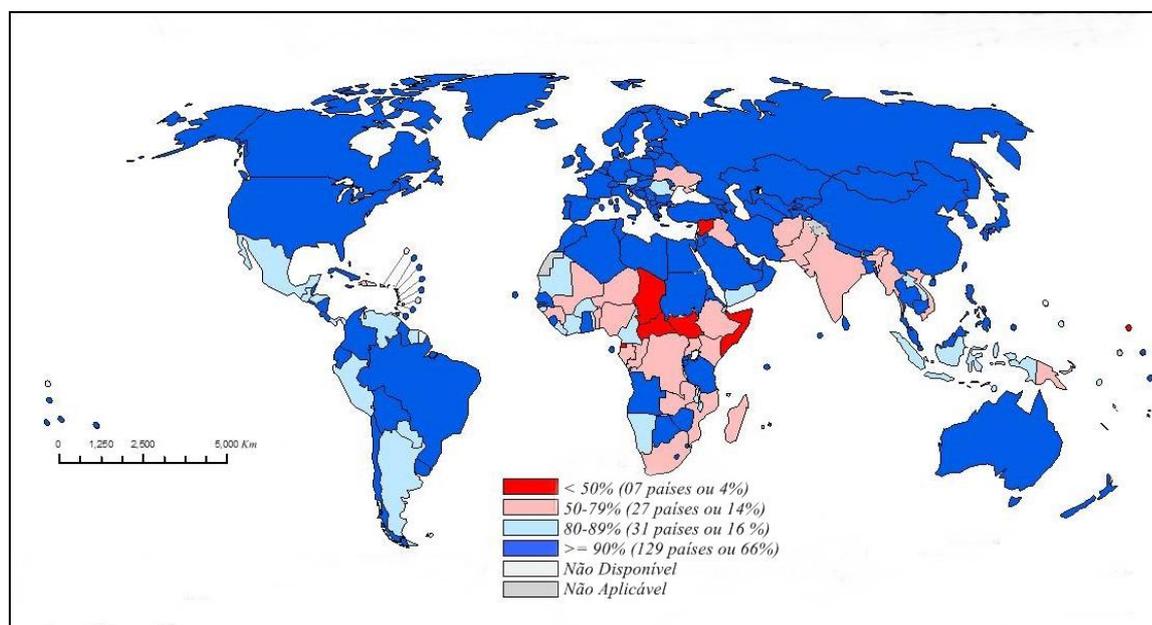
**Figura 5.** Número de casos de Coqueluche nos Estados Unidos de 1922 a 2005 de acordo com dados do CDC.

Fonte: Cherry, 2007.

Outro fato observado foi a persistência de períodos interepidêmicos de, em alguns trabalhos, 2-5 anos (Clarks, 2014; Cherry, 2007), em outros, 6 anos (Fisman et al., 2011). Pela periodicidade, sugere-se que, apesar da vacina prevenir a coqueluche ou sua severidade, a transmissão da *Bordetella pertussis* continua (Clarks, 2014).

A Organização Mundial da Saúde estima que, em 2008, ocorreram 16 milhões de casos de coqueluche no mundo, sendo 95% em países em desenvolvimento. Entre estes casos, cerca de 195 000 pacientes morreram pela doença (WHO, 2010).

Em países com elevada cobertura vacinal, a coqueluche é comumente observada em adolescentes e adultos (Kallonen e He, 2009) os quais têm sido considerados fontes da infecção em recém-nascidos cuja morbidade e mortalidade são mais altas (Guiso, 2014; Mcintyre e Wood, 2009). Conclui-se, então, que a coqueluche é ainda uma importante causa de mortalidade infantil e uma preocupação de saúde pública mesmo em países com alta cobertura vacinal. No mapa a seguir, está apresentado o mapa mundial da cobertura vacinal da DTP em crianças no ano de 2013 (Figura 6).

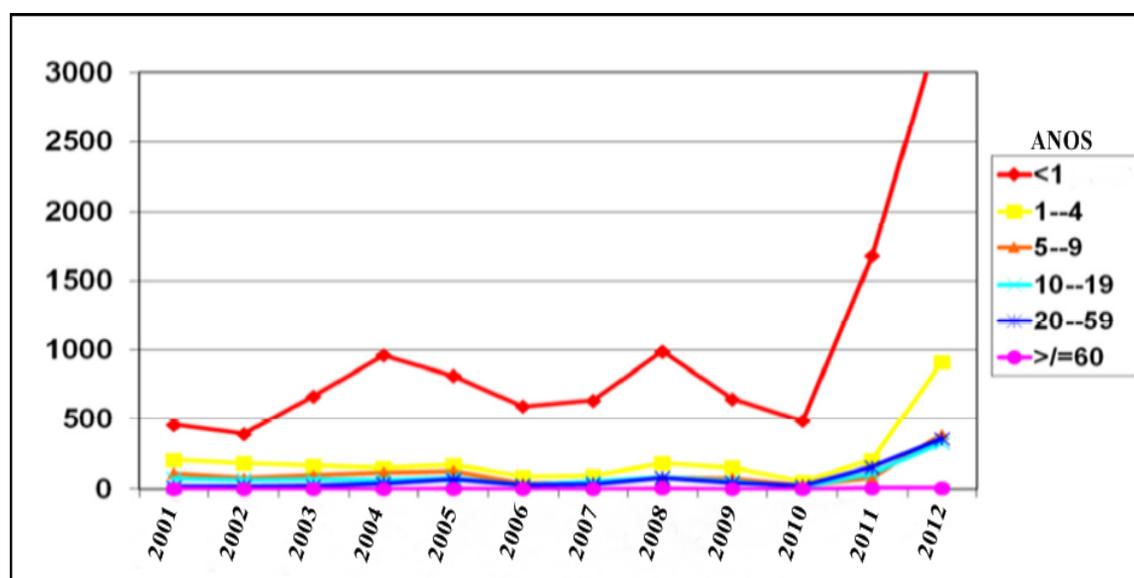


**Figura 6.** Cobertura vacinal com DTP em crianças em 2013.

Fonte: WHO/UNICEF Revisão de Estimativa Vacinal em 2013, julho de 2014.

No Brasil, desde 1990, verificou-se significativa redução na incidência dos casos de coqueluche. No início daquela década, a incidência era de 10,6 casos para cada 100 mil habitantes e a cobertura vacinal de cerca de 70%. Quando as coberturas se elevaram para valores próximos a 95 e 100%, entre 1998 e 2000, a incidência foi reduzida para 0,9 casos para cada 100 mil habitantes (MS, 2014). Em 2010, a incidência já era de 0,32 casos para cada 100 mil habitantes. Entretanto, em meados de 2011, observou-se um aumento súbito do número de casos da doença, que ultrapassou o limite superior esperado (MS, 2014). Em 2012, o número de casos, registrados por semana epidemiológica, manteve-se em níveis superiores ao esperado (MS, 2014). Abaixo estão demonstrados os dados de casos de *Bordetella pertussis* no Brasil de 2001 a 2012 de acordo com a faixa etária (Figura 7) e o número de casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de

Notificação, segundo região geográfica durante os anos de 2010 a 2015 no Brasil (Quadro2).



**Figura 7.** Casos de coqueluche notificados no Brasil de 2001 a 2012 de acordo com faixa etária.

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2014.

**Quadro2. Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação, segundo região geográfica, de 2010-2015.**

	2010	2011	2012	2013	2014	1º semestre 2015
<b>Região Norte</b>	33	93	271	370	464	178
<b>Região Nordeste</b>	78	407	687	934	2806	414
<b>Região Sudeste</b>	167	1167	2596	3418	3034	578
<b>Região Sul</b>	107	334	1394	1334	1446	334
<b>Região Centro-Oeste</b>	42	69	232	481	723	191
<b>Total</b>	427	2070	5180	6537	8473	1695

Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de informação de Agravos de Notificação – SINAN NET, 29/07/2015.

O Distrito Federal, de acordo com o informe técnico- Nº 1 – GVEI/DIVEP/SVS/SES de 14 de fevereiro de 2013, no período de 01 janeiro a 31 de dezembro de 2012, também foi observado um aumento do número de casos notificados e confirmados da doença em relação aos anos anteriores (SESDF, 2013). Abaixo segue a tabela de casos de coqueluche confirmados e notificados no

Sistema de Informação de Agravos de Notificação de 2010 a 2014 no Distrito Federal(SINAN, 2015) (Quadro3).

**Quadro3.** Casos de coqueluche confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net- de 2010 a 2014 no Distrito Federal.

2010	2011	2012	2013	2014	Total
19	28	86	170	301	604

Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de informação de Agravos de Notificação – SINAN NET, 29/07/2015.

Várias hipóteses que explicam o aumento da incidência da coqueluche estão sendo investigadas. As principais sugestões são: mudanças genéticas e fenotípicas das cepas de *Bordetella pertussis*; diminuição do potencial das vacinas em induzir imunidade e sua duração; aumento e melhoria da vigilância epidemiológica, incluindo reconhecimento, por parte do profissional de saúde, das manifestações atípicas da doença, principalmente em adultos e vacinados; e melhoria na capacidade de diagnóstico laboratorial com a introdução de técnicas moleculares (Cherry, 2007; Bamberger ES, Srugo I, 2008).

## 1.6 Prevenção da coqueluche: Vacinação

A vacina contra coqueluche tem sido integrante do Programa Alargado de Imunização da OMS desde a criação do programa em 1974. Em 2008, cerca de 82% das crianças do mundo receberam 03 doses da vacina o que evitou, segundo estimativas da OMS aproximadamente 687 000 mortes (WHO, 2010).

Existem dois tipos de vacinas contra coqueluche: uma composta por células de *B. pertussis* inteiras (wP) e a vacina acelular (aP). A wP, primeira a ser desenvolvida, foi introduzida na metade do século XX e trata-se de uma suspensão de células de *B. pertussis* inteiras e inativadas. Geralmente, encontra-se disponível em combinação com vacinas contra difteria e tétano. A imunização induzida pela wP é efetiva, porém tem sido associada a reações adversas como febre, agitação, vômitos e, inclusive, convulsões (Cherry, 2007). Essas reações tendem a aumentar com a idade e o número de doses, portanto, esta vacina não é recomendada para imunização de adolescentes e adultos (WHO, 2015).

O segundo tipo de vacina produzida contra coqueluche, a aP, introduzida na década de 1980, é composta por 01 a 05 fatores de virulência purificados e inativados da bactéria em diferentes combinações (as Ptx, Prn, FHA – e as duas fimbrias – Fim2 e Fim3) (Kallonen T, He Q, 2009). Ela apresenta menos reações adversas do que a wP, mas tem sido associada a menor duração da imunidade entre os vacinados (Smits K, 2013). Embora venha sendo gradualmente substituindo a wP em países desenvolvidos, a aP apresenta um alto custo de desenvolvimento e produção (WHO, 2010).

Diferentes estratégias de imunização têm sido adotadas pelos países a fim de diminuir a incidência de casos de coqueluche. A OMS recomenda uma série inicial de 03 doses subsequentes da vacina a serem administradas na idade de 06 semanas, na idade de 10-14 semanas e de 14-18 semanas. Deve-se obedecer a um intervalo de 04-08 semanas entre as doses, sendo que a última deve ser concluída até os 06 meses de idade. Além dessas, a administração de uma dose de reforço é recomendada para crianças entre 01-06 anos (WHO, 2010; Zeepet *al*, 2011; Nitsch-Osuchet *al*, 2013). Estudo indica que a dose de reforço na fase pré-escolar da criança restaura a percentagem de proteção para acima de 50% (Carollo Met *al*, 2014). Outra medida adotada é a vacinação de adolescentes e adultos tanto para diminuir o número de casos quanto para diminuir as fontes de transmissão da bactéria para crianças, porém o custo-benefício precisa ser avaliado pela vacina aP ter um valor elevado (WHO, 2010; Nitsch-Osuchet *al*, 2013). A vacinação de familiares e adultos próximos à criança também é importante, bem como de profissionais da saúde. (Bamberger ES, 2008; Nitsch-Osuchet *al*, 2013).

A imunização de gestantes com a aP tem se mostrado importante ferramenta no combate contra a coqueluche. A vacinação da mãe permite a produção de anticorpos que atravessam a barreira placentária e persistem circulantes no recém-nascido por 36-55 dias o que pode conferir proteção a ele. (Terranella A *et al*, 2013; Shakib JH *et al*, 2010).

O Brasil introduziu um cronograma de 03 doses primárias de wP mais um reforço aos 15 meses em 1977 (DTwP – difteria, tétano e pertussis celular). Em 2004, a administração de uma dose reforço foi adotada para crianças de 04 a 06 anos de idade. A partir de 2012, foi inserida a vacina pentavalente com wP que atua

contra difteria, tétano, coqueluche, *Haemophilus influenzae* do tipo b e hepatite B. Atualmente, a pentavalente é administrada em um calendário de 03 doses primárias aos 02, 04 e 06 meses de idade. São realizadas também mais duas doses de reforço de DTwP aos 15 meses de idade e aos 04 anos de idade. (WHO, 2014)

O aumento de casos fatais entre crianças levou o país a incorporar ao programa nacional de imunização a administração da aP em mulheres grávidas a partir de 2014. Essa vacinação deve ser efetuada a cada gestação, preferencialmente, entre as 27<sup>a</sup> e 36<sup>a</sup> semanas, podendo ser administrada até 20 dias da data provável do parto. Ocorre também vacinação dos profissionais de saúde que atuam em maternidades e em unidades de internação neonatal, atendendo recém-nascidos e crianças menores de 01 ano (MS, 2014; WHO, 2014).

### **1.7 Técnicas de Tipagem no Estudo Epidemiológico da *B. pertussis***

Diversas técnicas de tipagem têm sido descritas a fim de classificar e rastrear mudanças evolutivas nas populações de *Bordetella pertussis*, principalmente, na tentativa de explicar o aumento do número de casos de coqueluche em uma época de alta cobertura vacinal.

Historicamente, a sorotipagem apresentou importante papel na classificação desse agente infeccioso. Trata-se de uma técnica fenotípica baseada nas expressões fimbriais apresentadas pelas cepas (Kallonen T, He Q, 2009). Os sorotipos são definidos a partir de reações com antissoros específicos e podem ser classificados em Fim2, Fim3 e Fim2,3 (Leite D *et al.*, 2012). Apesar de ser uma técnica bastante utilizada, ela apresenta capacidade limitada na determinação de semelhanças e diferenças filogenéticas dos diferentes isolados por possuírem menor poder discriminatório (Vilchez G, Alonso G, 2009). Por essa razão, a sorotipagem tem sido complementada por métodos genotípicos como *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), *multi-locus sequence typing* (MLST), *multiple-LOCUS VARIABLE-number tandem repeat analysis* (MLVA), entre outros (Advani A, Van DER, Heide HGJ, Hallander HO, Mooi FR., 2009; Mooi FR, 2010) (Quadro 4).

**Quadro4.** Comparação entre os métodos comuns de tipagem molecular utilizados em estudo de cepas de *Bordetella pertussis*.

<b>Métodos</b>	<b>Características Gerais</b>	<b>Reprodutibilidade</b>	<b>Poder Discriminatório</b>
<b>Sorotipagem</b>	Expressão das fímbrias	Médio	Baixo
<b>MAST</b>	Sequenciamento de genes-alvo	Alta	Médio
<b>MLVA</b>	Análise de sítios polimórficos em regiões de repetição em <i>Tandem</i>	Alta	Médio
<b>PFGE</b>	Polimorfismo genômico pela macro-restrição baseada na XbaI	Médio	Alto

Fonte: He Q, 2014

O desenvolvimento de métodos moleculares tem promovido novas ferramentas para aprimoramento da vigilância e detecção e monitoramento de surtos. Cada técnica tem vantagens e limitações. Variam com relação à rapidez de resposta, ao poder discriminatório, ao custo, à reprodutibilidade e à laboriosidade. A escolha do método a ser utilizado dependerá do objetivo e das condições da investigação epidemiológica (Sabat AJ, 2013).

A análise do polimorfismo genético por meio do PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - Eletroforese em Gel de Campo Pulsado) é considerada padrão ouro para estudos epidemiológicos da coqueluche por apresentar maior poder discriminatório e maior versatilidade (Leite D *et al.*, 2012; Vilchez G, Alonso G, 2009). Porém, o PFGE é uma técnica mais laboriosa e demanda tempo para obtenção dos resultados (Advani A, Van DER, Heide HGJ, Hallander HO, Mooi FR., 2009; He Q, 2014; Vilchez G, Alonso G, 2009).

Contudo, a estudos tem mostrado que a *B. pertussis* é extremamente monomórfica. Embora as cepas tenham apresentado mudanças de perfis ao longo do período vacinal, essas mudanças não têm sido associadas a aquisições gênicas,

mas sim, principalmente, a pequenas mutações adquiridas ao longo do tempo denominadas de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) (Mooi FR, 2010).

## 2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a marcante elevação da prevalência de casos de coqueluche no Brasil e no mundo, é importante investigar o cenário atual da doença no Distrito Federal e entorno. Assim, estudos que visem à identificação do perfil epidemiológico da doença são essenciais para o delineamento de estratégias para seu controle e erradicação. Neste sentido, metodologias de tipagem bacteriana são ferramentas de grande aplicabilidade e de ampla utilização.

Apesar de ser historicamente reconhecida para estudos de mapeamento epidemiológico, a técnica de sorotipagem apresenta dificuldades na diferenciação de clones bacterianos. Assim, a análise conjunta da sorotipagem e técnicas de tipagem molecular possibilita a identificação mais precisa e robusta dos clones bacterianos associados ao surto permitindo o seu mapeamento epidemiológico molecular. Estas abordagens permitem a identificação da cadeia epidemiológica de transmissão da coqueluche constituindo uma ferramenta útil para avaliação e atualização de políticas públicas para controle e erradicação da doença no DF e Brasil.

Neste projeto, identificamos os clones de *B. pertussis* veiculados no DF no período de 2012 a 2014 por meio de sorotipagem e PFGE.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral:

Realizar caracterização epidemiológica molecular e clonal de todas as cepas de *Bordetella pertussis* isoladas, no Distrito Federal, de pacientes com suspeita de coqueluche durante o período de 2012 a agosto de 2014.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Descrever dados de prevalência de acordo com faixa etária e residência dos pacientes com cultura positiva para *B. pertussis* período em avaliação;
- Determinar os sorotipos de *Bordetella pertussis* circulantes no Distrito Federal durante período em avaliação;
- Definir o perfil epidemiológico molecular das cepas circulantes no período por meio da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE);
- Identificar o perfil clonal dos surtos de *Bordetella pertussis* causadoras de coqueluche em Brasília no período por meio da análise conjunta dos dados de epidemiologia molecular e sorotipagem.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho pesquisa, CAAE 43098415.6.1001.5553, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FEPECS/SES-DF – de acordo com o parecer consubstanciado número 1.056.702 de 11 de maio de 2015 (Anexo A).

### 4.1 Amostras bacterianas e cultivo

No presente estudo, foram utilizadas cepas de *B. pertussis* isoladas no Distrito Federal e em período de julho 2012 a agosto de 2014. O isolamento das cepas foi realizado no Laboratório Central de Saúde Pública do DF (LACEN-DF), instituto responsável pela vigilância e pesquisa de *B. pertussis* no Distrito Federal.

As amostras de pacientes com suspeita de coqueluche ou contato de pacientes com suspeita foram enviadas ao LACEN-DF, pelas Unidades de Saúde do Distrito Federal, em tubos contendo o meio de transporte Regan-Lowe com cefalexina e com oswab de alginato de cálcio com haste flexível, contendo a secreção coletada, inserido no meio.

Todas as cepas isoladas foram incluídas no estudo. Um total de 92 cepas isoladas de amostras de swab de nasofaringe foi investigado. As cepas, previamente estocadas à  $-70^{\circ}\text{C}$ , foram semeadas em agar Regan-Lowe e incubadas a  $35-37^{\circ}\text{C}$  em atmosfera úmida por 3-4 dias para crescimento bacteriano.

### 4.2 Sorotipagem

A sorotipagem foi realizada pelo Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz/SP (IAL/SP), instituição pública responsável pela realização da sorotipagem de todas as cepas de *B. pertussis* enviadas pelo LACEN-DF. A técnica utilizada para sorotipagem é a microaglutinação realizada com os antígenos fimbriais 2 e 3, que caracterizam os sorotipos.

### 4.3 Descrição dos dados epidemiológicos

A descrição dos dados epidemiológicos foi realizada de acordo com faixa etária e residência dos pacientes com cultura positiva para *B. pertussis* pelo LACEN-

DF no período em estudo. Para este fim, foi utilizado o software IBM SPSS Statistic 20. Os dados foram apresentados por meio de figuras e tabelas.

#### **4.4 Perfil de macro-restrição por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)**

A PFGE e o perfil de macro-restrição das cepas foram realizados pelo Laboratório de Doenças Entéricas do IAL/SP, instituição pública de referência nacional para a tipagem molecular de *B. pertussis* no Brasil, onde tal processo possui padronização e validação. A PFGE foi desenvolvida baseada no protocolo descrito por ADVANI A, DONNELLY D, HALLANDER H (2004).

Após o cultivo das cepas em meio Ágar Carvão (OXOID) suplementado com 10% sangue de carneiro ou cavalo e cefalexina (40 µg/mL) em estufa a 35 °C ± 2 por 3-5 dias, uma colônia foi selecionada e utilizada para a obtenção de cultura confluyente para o preparo de *plugs* de agarose.

Para a suspensão bacteriana e confecção dos blocos de agarose contendo as amostras de DNA foram seguidas as seguintes etapas:

- Preparou-se o tampão TE (Tris 10mM:EDTA 1 mM,pH 8,0);
- Preparou-se agarose SeaKem Gold a 1% em tampão TE e a manteve em BM à 55 °C – 60 °C;
- Preparou-se o tampão de suspensão celular – TSC (Tris 100mM: EDTA 100mM, pH 8.0);
- Distribuiu-se TSC em tubos ajustáveis a colorímetro, turbidímetro ou espectrofotômetro;
- Prepararam-se as suspensões bacterianas de modo a obter uma DO de 0.52-0.60, em DadeMicroscan Turbidity Meter ou 20% de transmitância em colorímetro ou DO 640nm de aproximadamente 1.40 em espectrofotômetro;
- Prepararam-se os moldes reutilizáveis dos blocos de agarose, vedando a base com fita adesiva e enumerando cada poço com o número correspondente às amostras;

- Transferir 400 $\mu$ l da suspensão celular a cada eppendorff para as amostras;
- Adicionaram-se 20 $\mu$ l de uma suspensão de Proteinase K (solução estoque 20 mg/ml), agitando suavemente;
- Adicionaram-se 400 $\mu$ l de agaroseSeakemgold 1% mantida em BM, misturando-se suavemente;
- Imediatamente, depositou-se a mistura nos poços do molde de blocos de agarose;
- Deixou-se solidificar por 10-15min.

Para a lise das células no bloco de agarose, 5mL de solução de lise (Tris 50mM: EDTA 50mM, pH 8.0: sarcosyl 1%) foram distribuídos em cada tubo acrescentando 25 $\mu$ l de Proteinase K (20mg/mL). Os moldes dos blocos foram abertos e colocados no tubo cônico contendo a solução de lise. Esse permaneceu na incubadora com 125 rpm por 1.5-2.0h a 54 °C.

Ao término da etapa de lise, a solução de lise de cada tubo foi retirada e foram acrescentados 15mL de água destilada, lavando de 2 a 3 vezes rapidamente. Novamente, acrescentaram-se 15mL de água destilada e incubou-se por 15 min na incubadora com agitação. Após incubação, a água dos blocos foi eliminada e adicionou-se 15mL de tampão TE, transferindo para incubadora com agitação por 20 min – procedimento realizado por 4 vezes. Ao decantar o último lavado, acrescentaram-se 5mL de tampão TE.

Após a lavagem dos blocos de agarose, adicionaram-se 200 $\mu$ L de tampão 1X XbaI, em tubos cônicos de 1500  $\mu$ L, previamente identificados com o número das amostras onde foram inseridos 1mm de cada bloco de agarose nos tubos correspondentes. Os tubos foram incubados em BM 55 °C – 60 °C à 37 °C por 15 min. De cada um, removeu-se o tampão e 200 $\mu$ L de tampão 1X XbaI e 5 $\mu$ L XbaI da enzima de restrição foram acrescentados. Tudo foi incubado em BM a 37 °C por 1,5 hora.

Para a preparação do gel de agarose, misturou-se agarose SeaKemGold a 1% em TBE 0,5 X, mantendo a solução em BM à 50 °C. Os blocos de agarose (plugs) foram retirados dos tubos após digestão do DNA e colocados sobre os pentes para a

corrida. Após a secagem dos plugs, por aproximadamente 15min, acrescentou-se a agarose com TBE no molde para o gel, fechando os poços com a agarose. Aguardaram-se 20-30 min para a completa solidificação da agarose, antes de colocar na cuba de eletroforese. Em seguida, colocaram-se 2L de tampão TBE 0,5X dentro da cuba. Para a eletroforese foram utilizados dois pulsos:

<b>Quadro5. Pulsos utilizados na eletroforese em gel para a PFGE.</b>		
<b>Eletroforese</b>	<b>Pulso 1</b>	<b>Pulso 2</b>
<b>Tempo inicial</b>	5 seg	8 seg
<b>Tempo Final</b>	6 seg	35 seg
<b>Tempo de corrida</b>	11h	13h
<b>Ângulo</b>	120°	120°
<b>Gradiente</b>	6.0V/cm	6.0V/cm
<b>Temperatura</b>	14 °C	14 °C
<b>Fator</b>	Linear	Linear

Após o término da corrida eletroforética, corou-seo gel com brometo de etídio (10 mg/mL em 400 mL de água destilada) por 30 minutos. Descorou-se o gel em, aproximadamente, 250 mL de água estilada por 30 minutos e a imagem capturada.

A análise das imagens foi realizada por meio do programa Bionumerics versão 5.1 (Applied Maths, Keijkstraat, Belgium) pela observação dos fragmentos de restrição após corrida eletroforética, comparando o padrão de restrição entre as amostras. Para a construção do dendrograma de similaridade genética, utilizou-se o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

## 5 RESULTADO E DISCUSSÃO

Um total de 92 cepas de *B. pertussis* isoladas pelo LACEN-DF entre no período de julho 2012 a agosto de 2014 foi analisado.

### 5.1 Dados Epidemiológicos da Distribuição da *B. pertussis* Isoladas pelo LACEN-DF

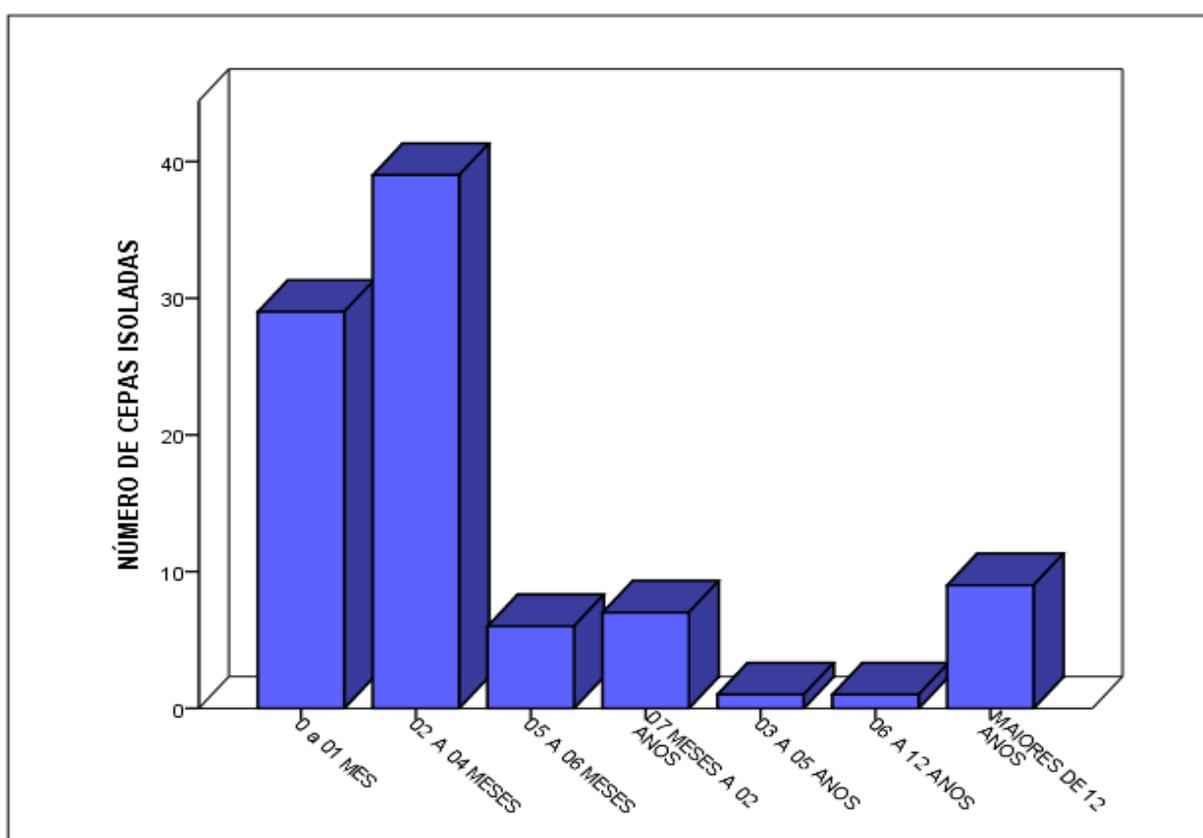
De acordo com a distribuição por faixa etária, houve predomínio de culturas positivas na faixa de 02 a 04 meses de idade (39/92), seguido pela faixa de 0 a 01 mês (29/92), sendo que, aproximadamente, 70% (68/92) dos casos se concentraram nesses dois grupos. Também houve isolamento de 06 cepas em pacientes na faixa etária de 05 a 06 meses, 07 cepas em pacientes de 07 meses a 02 anos, 01 cepa em pacientes entre 03 e 05 anos, 01 cepa em paciente entre 06 e 12 anos e 09 cepas em pacientes maiores de 12 anos (Figura 8).

A maior prevalência dos casos positivos faixa etária de 0 a 01 mês, provavelmente, deve-se à baixa imunidade apresentada por esse grupo, uma vez que a primeira dose da vacina contra coqueluche é oferecida apenas aos 02 meses de idade. Contudo, esse cenário poderá sofrer alterações devido à introdução da administração da vacina aP em gestantes a partir de 2014 (MS, 2014) cujo objetivo é a passagem de anticorpos maternos ao feto via transplacentária.

Em estudo realizado no Rio Grande do Sul, Trevizan e Coutinho (2008) observaram que, apesar dos índices crescentes e elevados de cobertura vacinal, houve o aumento progressivo da notificação e confirmação de casos a partir do ano 2000 em diferentes faixas etárias, embora mais acentuado na faixa etária de menores de 01 ano. A elevação da ocorrência de coqueluche em adultos e adolescentes tem sido associada à provável diminuição da imunidade induzida pela vacinação ao longo dos anos (Trevizan e Coutinho, 2008).

Nos Estados Unidos, Terranella *et al* (2013) afirma que a maior taxa de incidência (160/100 000) também ocorreu em crianças com idade inferior a 02 meses, com o declínio de incidência em crianças maiores devido à maior cobertura vacinal (Terranella *et al*, 2013). Contudo no início dos anos 2000, houve aumento no número de casos e a incidência em adolescentes começou a aumentar

desproporcionalmente quando comparado ao aumento observado em crianças (Skoffet *al*, 2012). Como citado anteriormente, tem-se atribuído o aumento do número de casos em adolescentes e adultos à imunidade não duradoura da vacina. Razão pela qual alguns pesquisadores põem em discussão, como medida de controle da incidência da coqueluche, a importância da vacinação de adolescentes e adultos (Loeffelholz M, 2012).

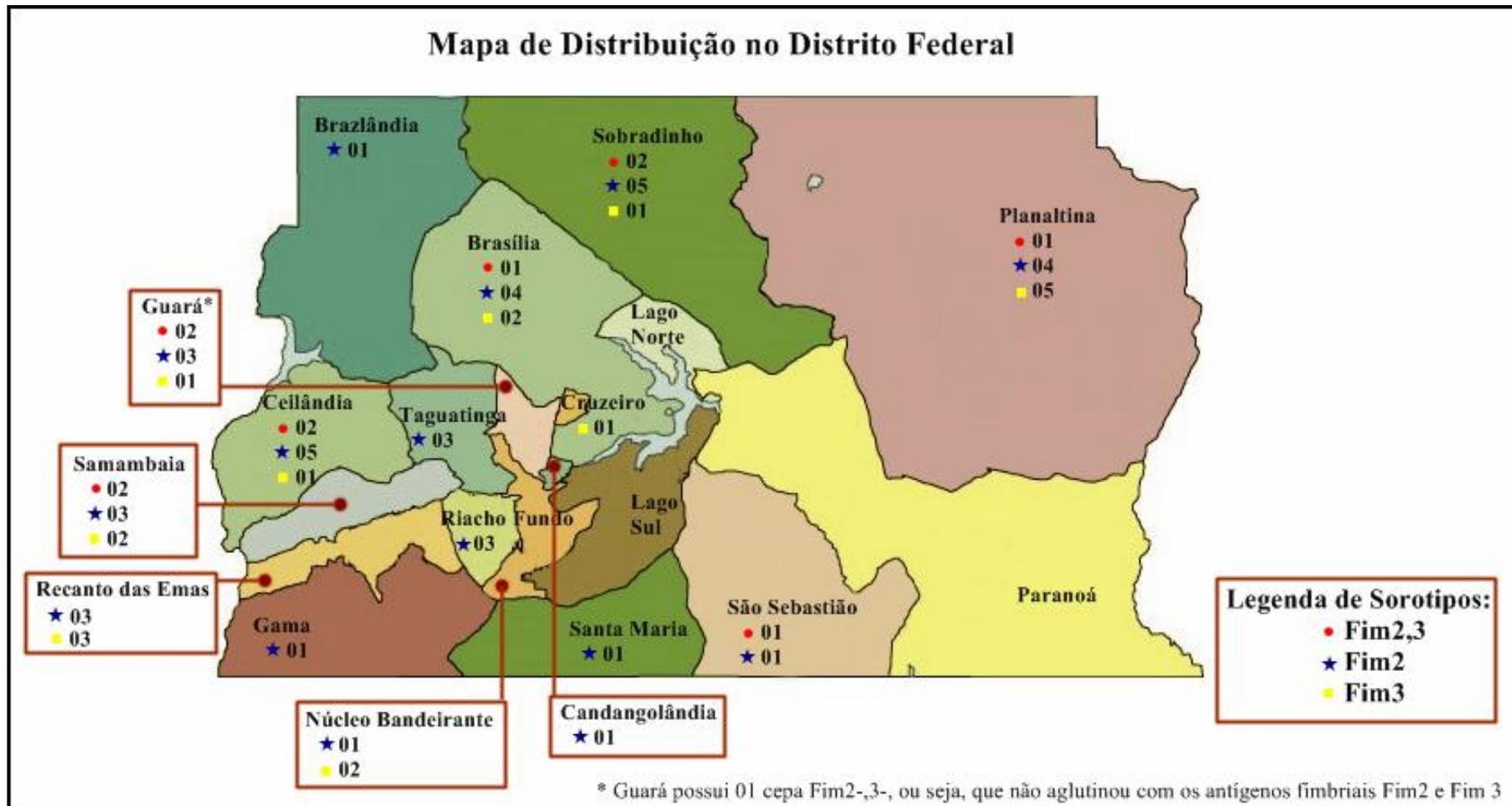


**Figura 8.** Distribuição das faixas etárias de pacientes com cultura positiva para *Bordetella pertussis* no período de julho/2012 a agosto/2014. Faixa etária de 02 a 04 meses de idade: 39 cepas; faixa etária de 0 a 01 mês: 29 cepas; faixa etária de 05 a 06 meses: 06 cepas; faixa etária de 07 meses a 02 anos: 07 cepas; faixa etária de 03 e 05 anos: 01 cepa; faixa etária de 06 e 12 anos: 01 cepa; faixa etária de 12 anos: 09 cepas.

Em relação à região geográfica, observou-se o isolamento de 69 cepas de *Bordetella pertussis* em 16 regiões administrativas do Distrito Federal – Brasília (07 cepas), Brazlândia (01), Candangolândia (01), Ceilândia (08), Cruzeiro (01), Gama (01), Guará (07), Núcleo Bandeirante (03), Planaltina (10), Recanto das Emas (06),

Riacho Fundo (03), Santa Maria (01), São Sebastião (02), Samambaia (07), Sobradinho (08) e Taguatinga (03) (Figura 09).

Além desses isolamentos, 23 culturas positivas foram oriundas do entorno do DF, sendo 20 isolamentos de Goiás (02 da Cidade Ocidental, 02 de Formosa, 01 de Ipameri, 02 de Luziânia, 03 do Novo Gama, 01 de Rio Verde, 03 de Santo Antônio do Descoberto, 05 de Valparaíso e 01 de Vila Boa,) e 03 isolamentos de Minas Gerais (01 de Bonfinópolis e 02 de Unaí)(Figura 10). As 23 culturas positivas do entorno são referentes às notificações realizadas pela vigilância epidemiológica do DF devido aos pacientes provenientes de outros estados terem sido atendidos em unidades de saúde do DF e não correspondem ao número total de casos ocorridos nos respectivos estados (GO e MG) que possuem equipe de vigilância própria.



**Figura 9.** Mapa de distribuição dos sorotipos de *Bordetella pertussis* no Distrito Federal de julho/2012 a agosto/2014 de acordo com a região. Observou-se o isolamento de 69 cepas de *Bordetella pertussis* oriundas de 16 regiões administrativas do Distrito Federal – Brasília (07 cepas), Brazlândia (01 cepa), Candangolândia (01 cepa), Ceilândia (08 cepas), Cruzeiro (01 cepa), Gama (01 cepa), Guarará (07 cepa), Núcleo Bandeirante (03 cepas), Planaltina (10 cepas), Recanto das Emas (06 cepas), Riacho Fundo (03 cepas), Santa Maria (01 cepa), São Sebastião (02 cepas), Samambaia (07 cepas), Sobradinho (08 cepas) e Taguatinga (03 cepas).



**Figura 10.** Mapa de distribuição dos sorotipos de *Bordetella pertussis* isoladas pelo LACEN-DF oriundas da região do entorno do DF. 23 culturas positivas foram oriundas do entorno do DF, sendo 20 isolamentos de Goiás (02 da Cidade Ocidental, 02 de Formosa, 01 de Ipameri, 02 de Luziânia, 03 do Novo Gama, 01 de Rio Verde, 03 de Santo Antônio do Descoberto, 05 de Valparaíso e 01 de Vila Boa,) e 03 isolamentos de Minas Gerais (01 de Bonfinópolis e 02 de Unai).

É possível notar que houve prevalência de isolamento de cepas de *Bordetella pertussis* de amostras provenientes de Planaltina-DF (10/92), seguido de Ceilândia e Sobradinho (ambas com 08/92). Porém a análise dos dados referentes à localidade do isolamento requer cautela. Não é possível concluir que houve maior número de casos nessa região sem uma investigação epidemiológica específica a qual não é objetivo do presente trabalho.

No entanto, existem problemas a serem abordados mediante o dado em discussão como a subnotificação de casos, a sensibilidade da equipe de vigilância e dos profissionais da área e o método de diagnóstico laboratorial disponível.

Nos Estados Unidos, estima-se que os números reais de doença e morte referentes ao agravo coqueluche sejam 2 a 3 maiores do que o número de casos notificados (Cortese MM *et al*, 2008). Infere-se, então, que a sensibilidade do sistema de vigilância pode interferir consideravelmente nos dados obtidos. Um sistema de vigilância efetivo aumenta a capacidade de notificação e, inclusive, a capacidade de confirmação laboratorial já que se espera maior coleta de amostras em tempo hábil e recebimento dessas pelo laboratório.

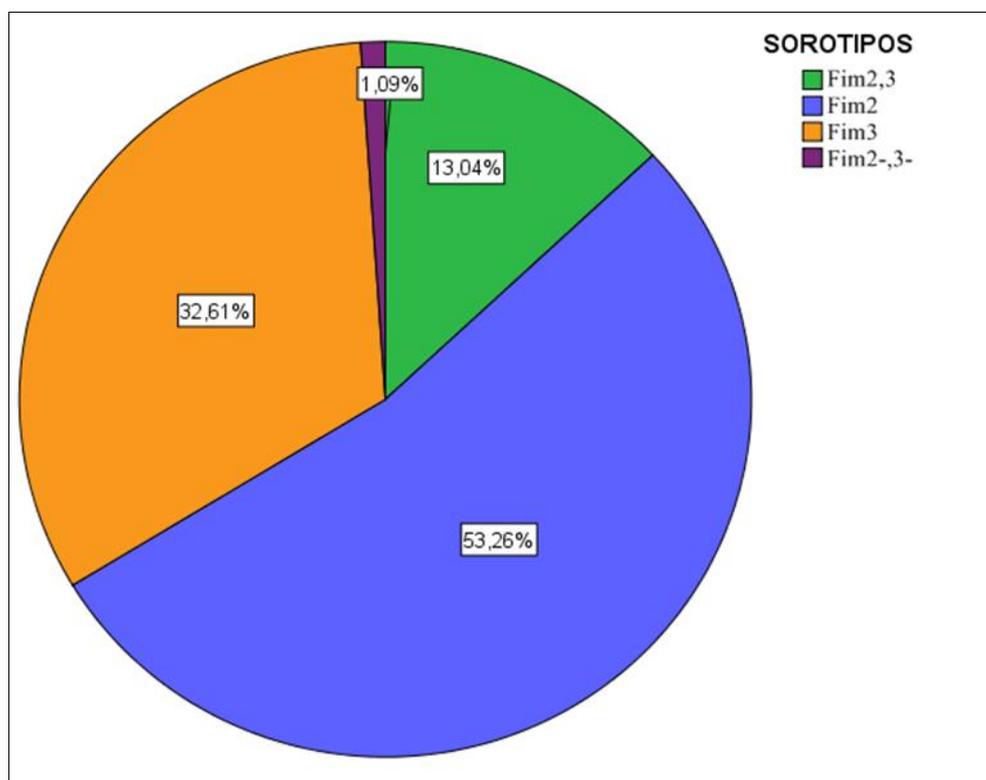
A escolha da ferramenta para diagnóstico laboratorial utilizada é outro aspecto a ser abordado. A técnica disponível para diagnóstico laboratorial da coqueluche no DF pelo Lacené a cultura. Estudos mostram que a cultura possui especificidade de 100% e sensibilidade de 58%, enquanto que a PCR possui especificidade de 93% e sensibilidade de 97% (DragstedDM *et al*, 2004). Logo, pode-se concluir que, por meio da cultura podem ser liberados resultados falso-negativos e o número de casos de coqueluche pode ser maior do que o número de culturas positivas para *B. pertussis* no DF.

No primeiro semestre de 2014, de acordo com SINAN-NET – 2015, foram confirmados 136 casos de coqueluche notificados no Distrito Federal e, no mesmo período, houve isolamento de 27 cepas do agente etiológico. Diante do exposto, verifica-se a necessidade de implantação do método de diagnóstico pela PCR, especificamente o da PCR em tempo real para melhoria da investigação dos casos suspeitos de coqueluche. Essa ferramenta tem fornecido muitos benefícios, como o

seu resultado altamente sensível e a sua rapidez de resposta à vigilância epidemiológica, facilitando o controle e prevenção da doença (Loeffelholz M, 2012).

## 5.2 Sorotipagem

Durante o período analisado, houve isolamento dos três sorotipos de *Bordetella pertussis*: Fim2, Fim3 e Fim2,3. Prevaleceu o sorotipo Fim2 (53,23% - 49/92), seguido dos sorotipos Fim3 (32,61% - 30/92) e Fim2,3 (13,04% - 12/92). Uma cepa aglutinou apenas com o antissoro espécie-específico para *Bordetella pertussis*, mas não aglutinou com os antígenos fimbriais Fim2 e Fim3. Fenótipos com a ausência das fímbrias do tipo 2 e tipo 3 são denominados Fim2<sup>-</sup>,3<sup>-</sup>. (Figura 11).

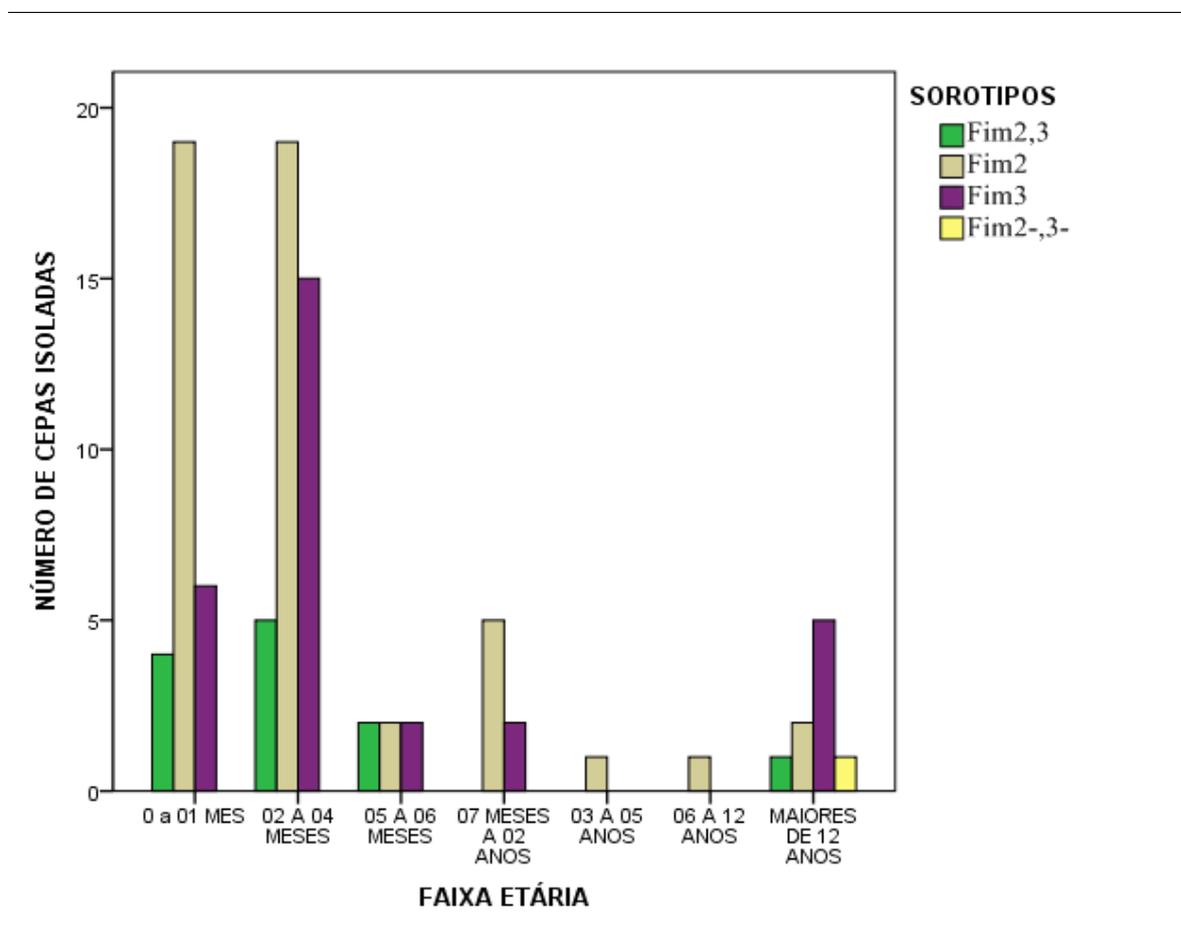


**Figura 11.** Distribuição dos sorotipos das 92 cepas de *Bordetella pertussis* isoladas pelo Lacen-DF no período de julho/2012 a agosto/2014

Este fato difere do encontrado por Leite *et al* (2012) em estudo realizado em São Paulo no qual a predominância das cepas de *B. pertussis* pertenceu ao sorotipo Fim3 (Leite D *et al.*, 2012). Resultado também observado em países da Ásia (Zhang, Liu *et al.*, 2010) e Europa – regiões com longo histórico vacinal (Kallonen T, He, 2009). Estudos relatam a predominância do sorotipo Fim3 em populações

vacinadas, enquanto sorotipos Fim2 ou Fim2,3 predominam em populações não vacinadas (Kallonen T, He, 2009; Hallander HO *et al.*, 2005; Preston NW, 1985). Vale ressaltar que o DF apresenta alta cobertura vacinal (GVEI/DIVEP/SVS/SES, 2013).

Além disso, o sorotipo Fim2 foi o mais frequente em todas as faixas etárias, exceto na faixa dos maiores de 12 anos (Figura 12), o que é contraditório com os estudos que afirmam a prevalência desse sorotipo em populações não vacinadas já que, no Distrito Federal, tem-se uma boa cobertura vacinal. Sugere-se, então, uma avaliação mais aprofundada sobre o desempenho da política vacinal ou da própria vacina utilizada na região.



**Figura 12.** Distribuição dos sorotipos das 92 cepas de *Bordetella pertussis* isoladas pelo Lacen-DF no período de julho/2012 a agosto/2014 de acordo com a faixa etária dos pacientes.

É importante considerar a maior dificuldade de isolamento do agente em adultos, dificultando a comparação real entre os sorotipos nas diferentes idades. Nakamura *et al* (2011) afirma que a concentração de DNA de *B. pertussis* presente no swab de nasofaringe depende altamente da idade do paciente. Relata que

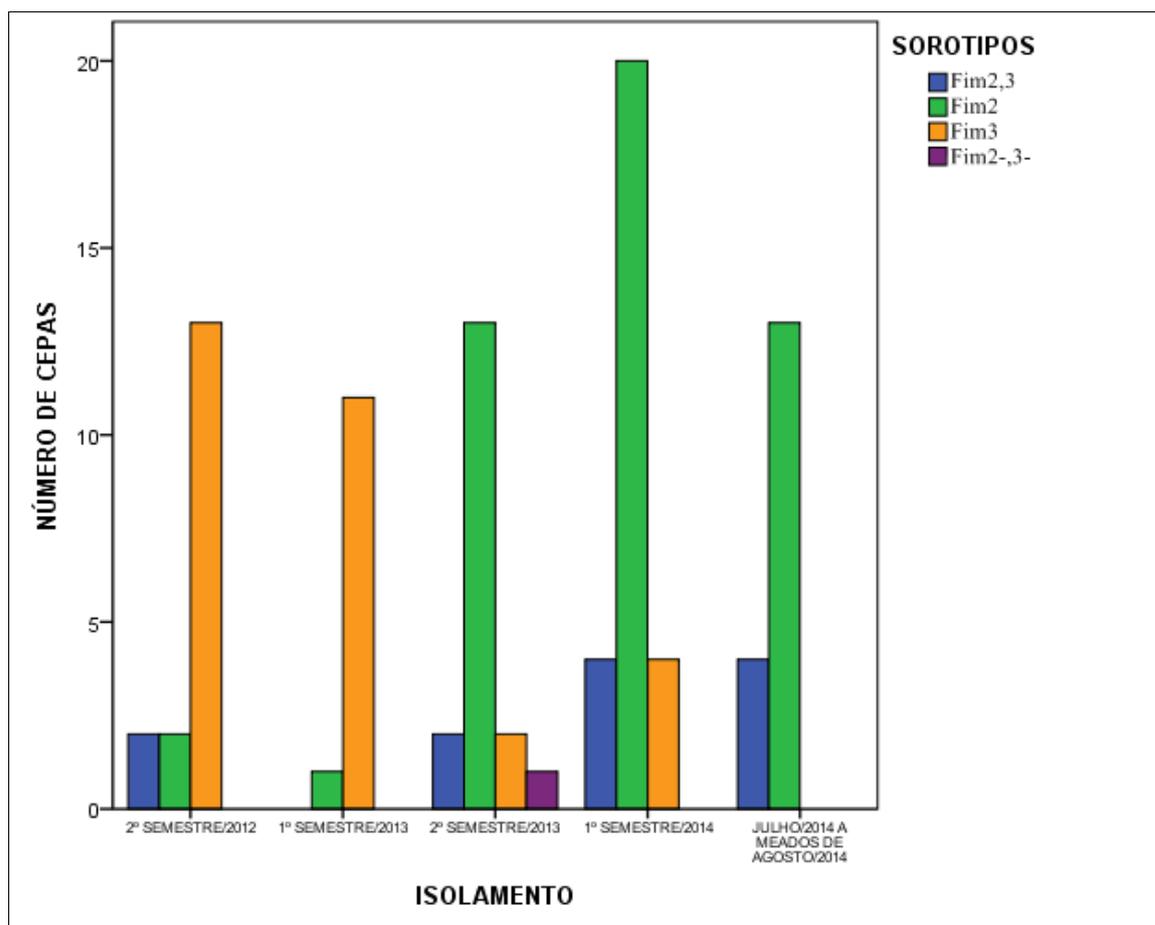
adultos possuem níveis bastante baixos DNA e micro-organismos tanto durante as fases iniciais quanto nas finais da doença, o que explicaria o número de cultura negativa em casos de coqueluche em adultos o que também corrobora com a necessidade da utilização da PCR em tempo real como método de diagnóstico laboratorial (Nakamura *et al*, 2011).

Contudo, a ressurgência da coqueluche tem sido observada em vários países como descrito anteriormente. Atribui-se o ressurgimento à falha vacinal, à baixa imunidade protetora e pouco duradoura, à diferença das cepas circulantes, dentre outros fatores (Lynfield R, Schaffner W, 2014), porém a verdadeira causa permanece em discussão. Uma das características pela qual se atribui à diferença genética é que, em alguns países, os alelos de antígenos expressos pelas cepas de *Bordetella pertussis* em circulação possuem diferenças daqueles expressos pelas cepas de vacinas de onde foram derivados (Mooi FR, Van Der Maas NA, De Melker HE, 2014; Schmidtke AJ *et al.*, 2012),

Em relação à severidade da doença e o sorotipo da *Bordetella pertussis* existem controvérsias. Uma associação entre o sorotipo Fim2 e a severidade da coqueluche foi descrita no Reino Unido (Van Buynder PG *et al.*, 1999), porém em estudo realizado na Suécia não foi encontrada associação entre o tipo de fímbria e as manifestações clínicas da doença (Advani A *et al.*, 2007).

Outro ponto a ser observado é a distribuição dos sorotipos por área geográfica como pode ser observado na figura 9 e 10. No DF, houve prevalência do sorotipo Fim2 (39/68), seguido do sorotipo Fim3 (18/68) e Fim2,3 (11/68), enquanto que, das cepas oriundas do entorno do DF, houve prevalência do sorotipo Fim3 (12/23), seguido do sorotipo Fim2 (10/23) e Fim2,3 (1/23). Em relação à distribuição pelas regiões administrativas do DF, o sorotipo Fim2 foi encontrado em 15 regiões, o sorotipo Fim3 em 9 e o Fim2,3 em apenas 7. Pela análise do mapa (figura 9), percebe-se o sorotipo Fim2 disperso em uma grande área do DF.

Sobre os sorotipos e a época de isolamento, os resultados obtidos foram de acordo com a figura 13.



**Figura 13.** Distribuição dos sorotipos de *Bordetella pertussis* de acordo com o período de isolamento das cepas.

No segundo semestre de 2012, houve isolamento dos três sorotipos com prevalência do sorotipo Fim3 (Fim2 – 2/17; Fim3 – 13/17; Fim2,3 – 2/17). No primeiro semestre de 2013, especificamente em janeiro, houve apenas o isolamento de Fim2 (1/12) e Fim3 (11/12), porém, de fevereiro/2013 a junho/2013, a cultura de *B. pertussis* foi interrompida por falta de material no LACEN-DF para realização da técnica. A partir de julho de 2013, o exame foi restabelecido e durante o segundo semestre/2013, pode-se observar a inversão de prevalência dos sorotipos, com predomínio do sorotipo Fim2 sobre os outros dois sorotipos. Essa característica permaneceu sem alteração no restante do período em estudo.

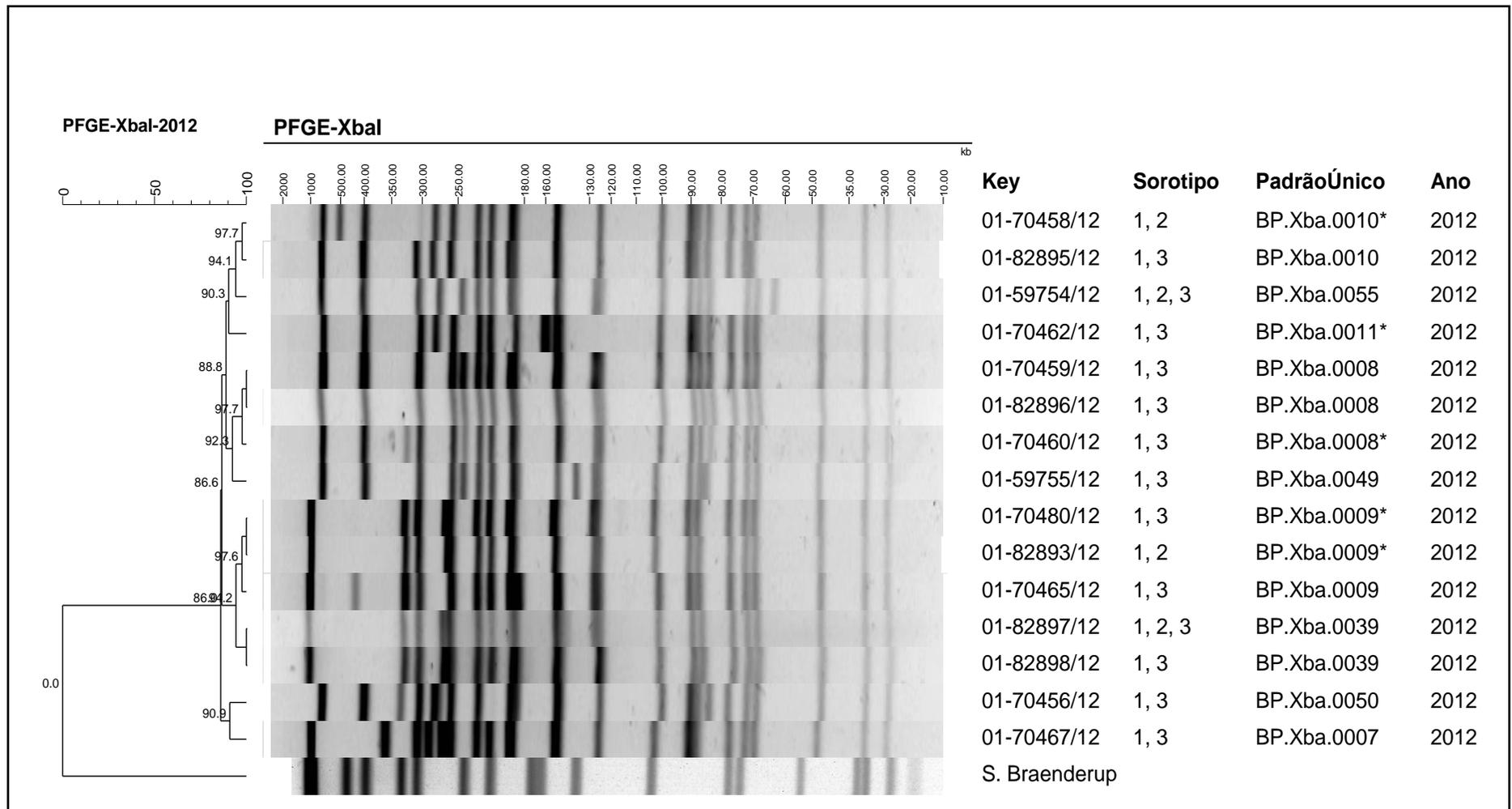
O isolamento de 17 cepas no período de julho e agosto de 2014 sugere a tendência de aumento no número de casos de coqueluche no segundo semestre de 2014 (período não estudado). De acordo com dados do SINAN (Tabela 3), o número de casos confirmados de coqueluche passou de 170 em 2013 para 301 em 2014.

### 5.3 Perfil de Macro-restrição por PFGE

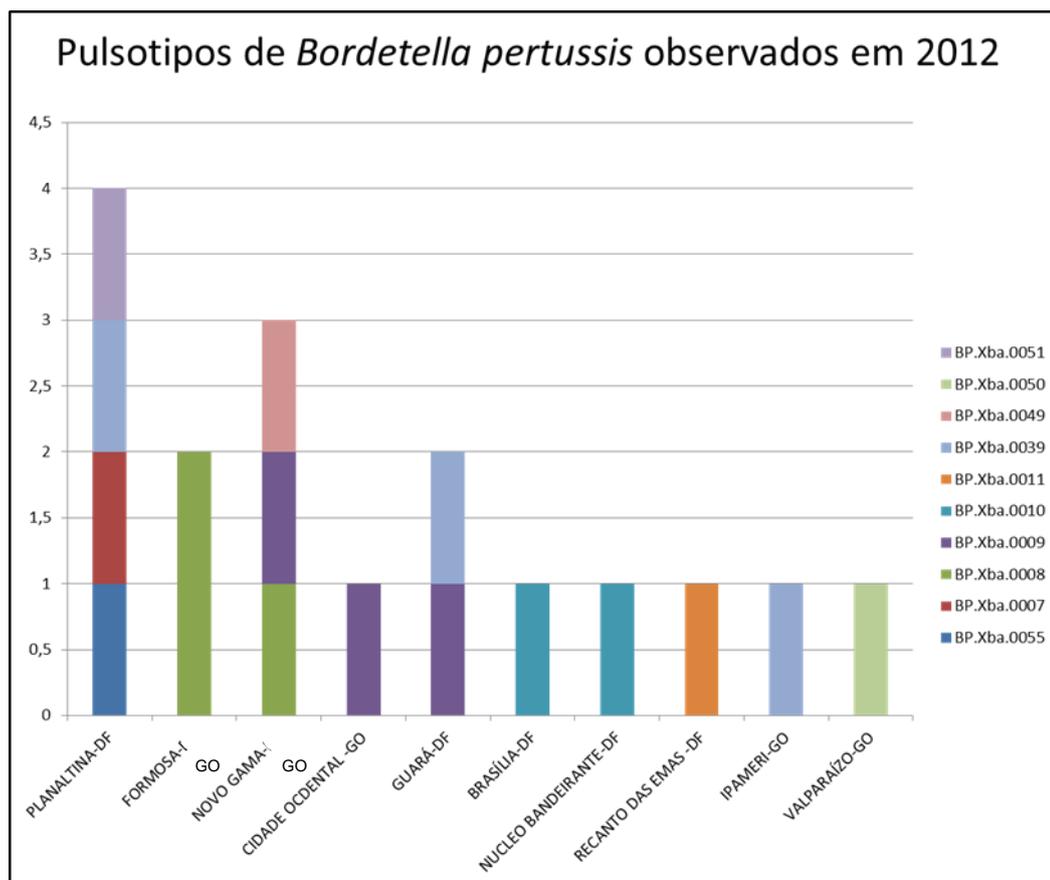
A tipagem de *B. pertussis* por meio da PFGE é considerada padrão-ouro devido ao seu poder discriminatório e reprodutibilidade.

O dendrograma gerado a partir da análise da PFGE das amostras isolados em 2012 demonstrou que, nesse ano, houve circulação de pelo menos 09 pulsotipos de *B. pertussis* no DF e entorno, porém com alta similaridade entre eles (86%) (Figura 14). Observamos a circulação dos pulsotipo (Figura 15):

- BP.Xba.0051 em Planaltina – DF;
- BP.Xba.0050 em Valparaíso – GO;
- BP.Xba 0049 em Novo Gama – GO;
- BP.Xba 0039 em Planaltina – DF, Guará – DF e em Ipameri – GO;
- BP.Xba.0011 em Recanto das Emas – DF;
- BP.Xba.0010 em Brasília – DF e Núcleo Bandeirante – DF;
- BP.Xba.0009 em Novo Gama – GO, Cidade Ocidental – GO e Guará – DF;
- BP.Xba.0008 em Formosa – GO e Novo Gama – GO;
- BP.Xba.0007 em Planaltina – DF;
- BP.Xba.0055 em Planaltina – DF.



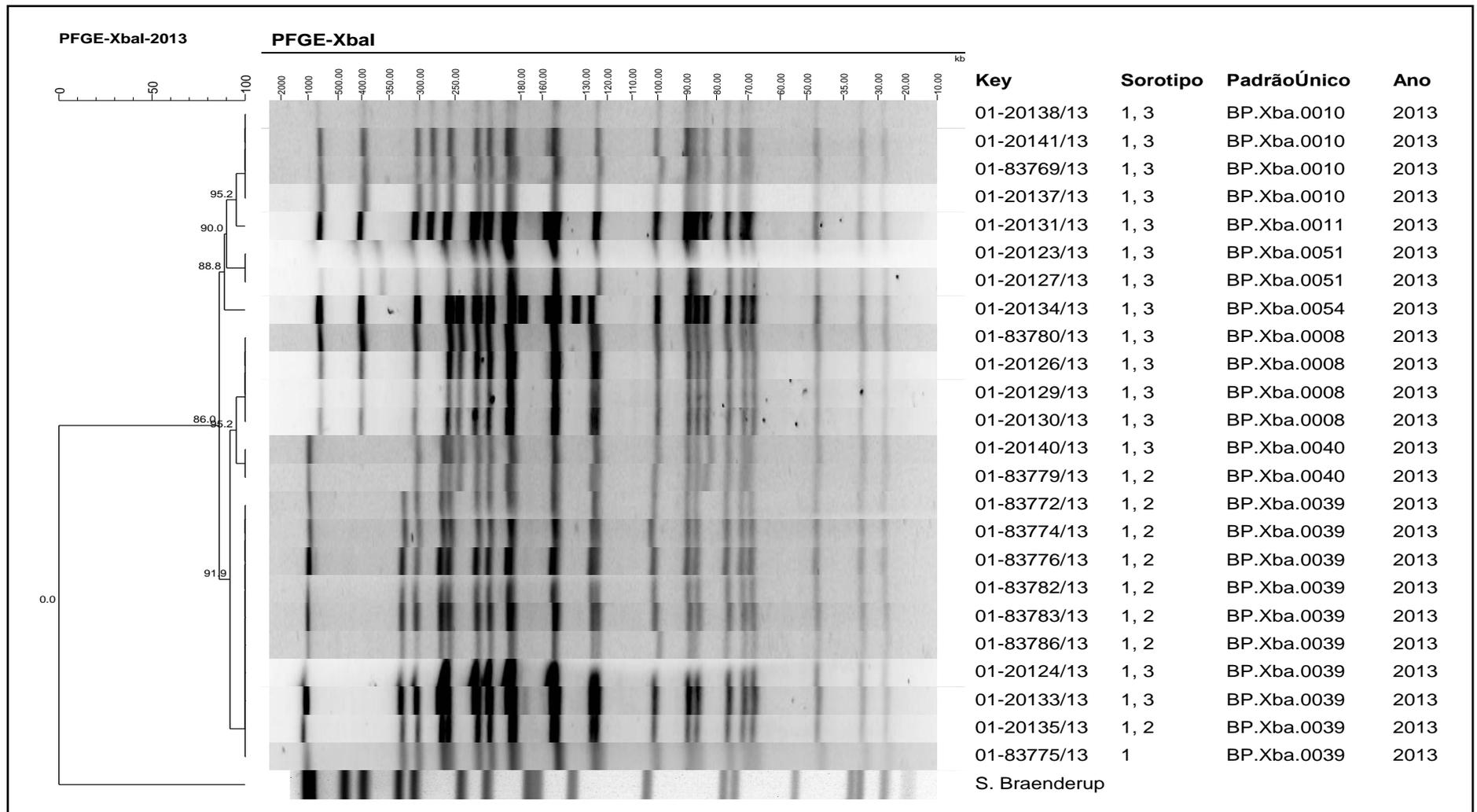
**Figura 14.** Dendrograma representativo de similaridade genética do perfil eletroforético de macrorestrição em Eletroforese em Gel de Campo Pulsado de cepas de *B. pertussis* isoladas do Distrito Federal e entorno em 2012. O dendrograma acima demonstra que, em 2012, houve circulação de pelo menos 09 pulsotipos de *B. pertussis* no DF e entorno com alta similaridade entre eles (86%).



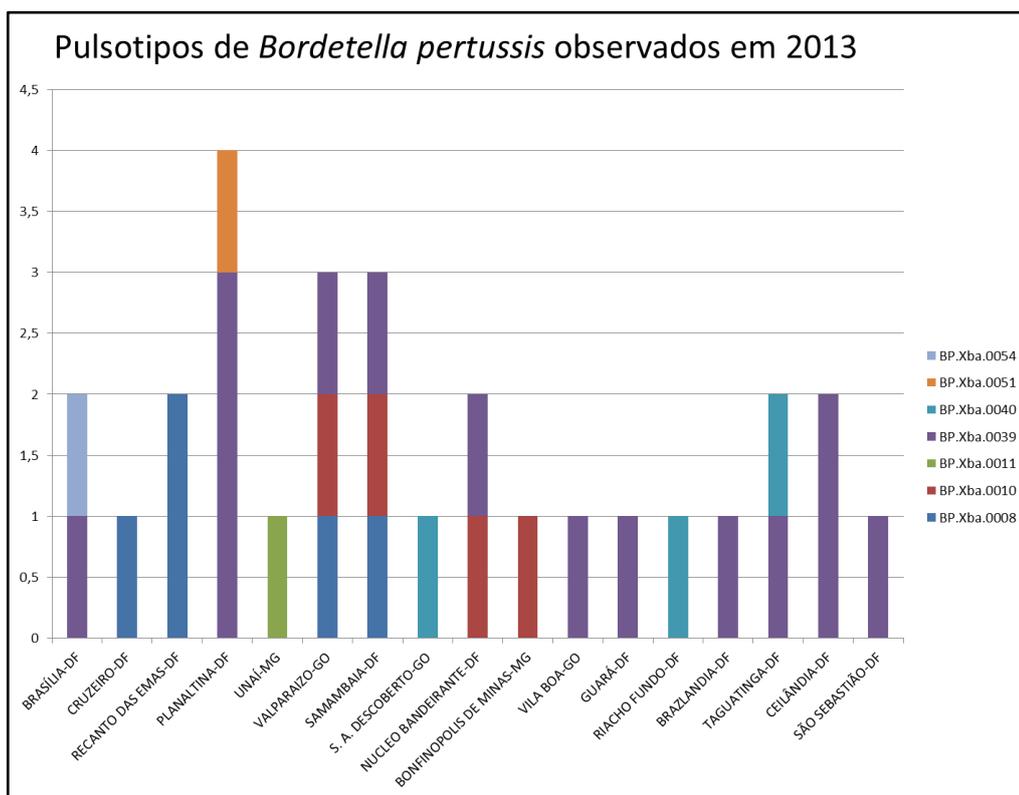
**Figura 15.** Distribuição de Pulsotipos de *B. pertussis* em 2012 de acordo com a região.

Em 2013, houve a circulação de, pelo menos, 07 pulsotipos de *B. pertussis* com alta similaridade entre eles (86%) e predomínio do pulsotipo BP Xba 0039 (Figura 16). Os pulsotipo encontrados foram (Figura 17):

- BP.Xba.0054 em Brasília – DF;
- BP.Xba.0051 em Planaltina – DF;
- BP.Xba.0040 em Santo Antônio do Descoberto – GO;
- BP.Xba.0039 em Brasília – DF, Planaltina – DF, Valparaíso – GO, Samambaia – DF, Núcleo Bandeirante – DF, Vila Boa – GO, Guará-DF, Brazlândia – DF, Taguatinga –DF, Ceilândia – DF e São Sebatião – DF;
- BP.Xba.0011 em Unai – MG;
- BP.Xba.0010 em Valparaíso – GO, Samambaia – DF, Núcleo Bandeirante – DF e Bonfinópolis de Minas – MG;
- BP.Xba.0008 em Cruzeiro – DF, Recanto das Emas – DF, Valparaíso – GO e Samambaia – DF.



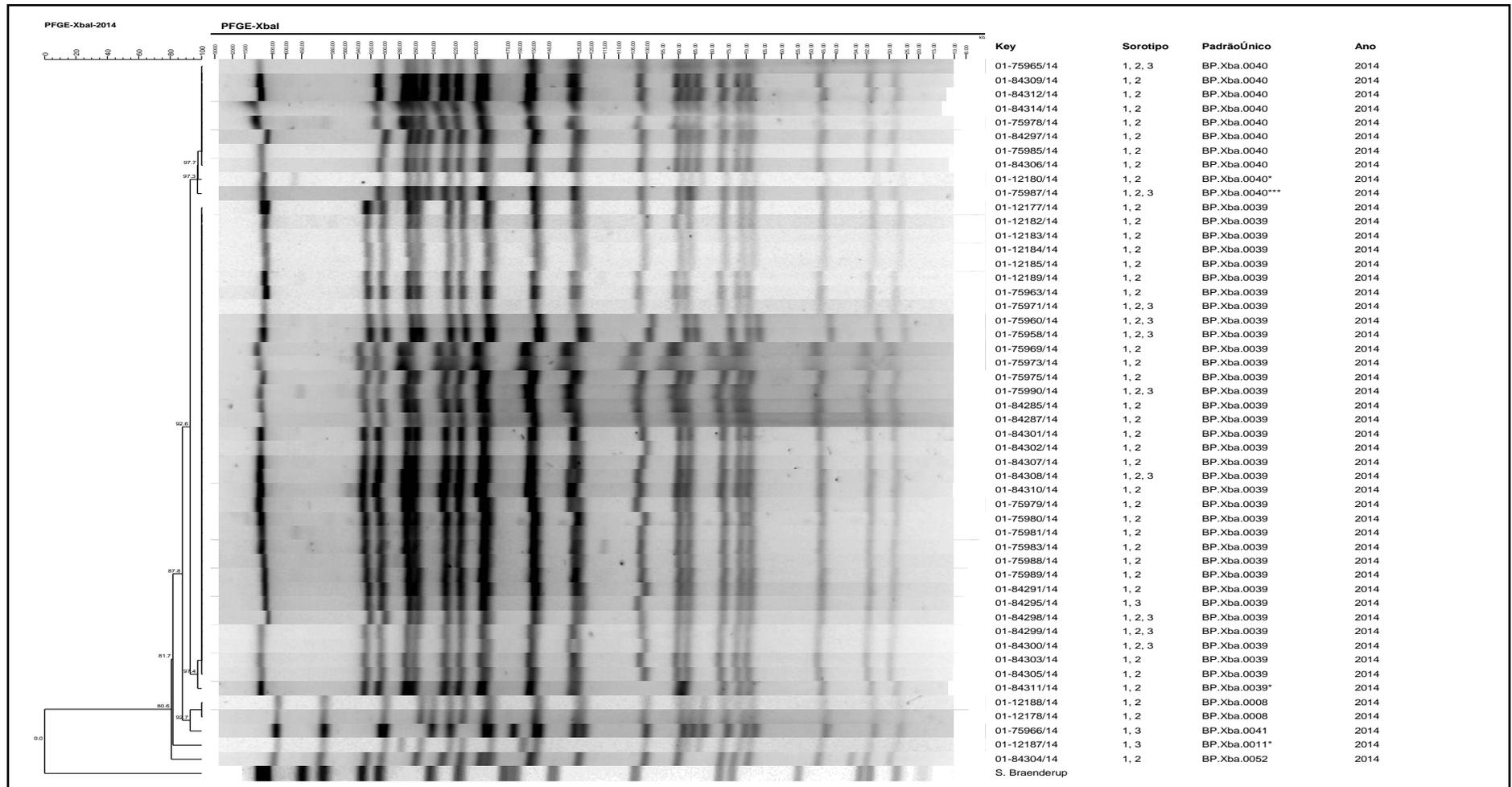
**Figura 16.** Dendrograma representativo de similaridade genética do perfil eletroforético de macrorestrição em Eletroforese em Gel de Campo Pulsado de cepas de *B. pertussis* isoladas do Distrito Federal e Entorno em 2013. O dendrograma acima demonstra que, em 2013, houve circulação de pelo menos 07 pulsotipos de *B. pertussis* no DF e entorno com alta similaridade entre eles (86%) com predomínio do pulsotipo BP Xba 0039.



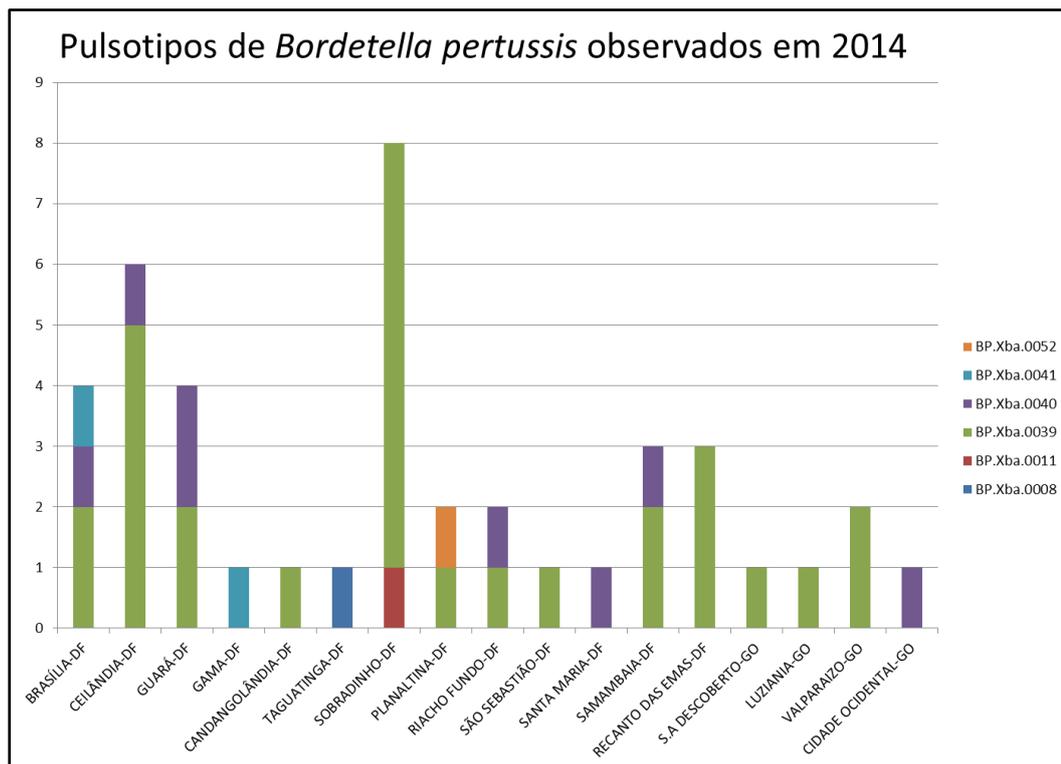
**Figura 17.** Distribuição de Pulsotipos de *B. pertussis* em 2013 de acordo com a região.

O dendrograma dos perfis de PFGE das cepas isoladas em 2014 observou que, pelo menos, 06 pulsotipos de *B. pertussis* circularam na região durante esse ano. Porém os pulsotipos apresentaram alta similaridade entre eles (80%), com predomínio do pulsotipo BP Xba 0039, seguido do BP Xba 0040 (Figura 18). Os diferentes perfis encontrados foram (Figura 19):

- BP.Xba.0052 em Planaltina – DF;
- BP.Xba.0041 em Brasília – DF e Gama – DF;
- BP.Xba.0040 em Brasília – DF, Ceilândia – DF, Guará – DF, Riacho Fundo – DF, Santa Maria – DF, Samambaia – DF e Cidade Ocidental – GO;
- BP.Xba.0039 em Brasília – DF, Ceilândia – DF, Guará – DF, Candangolândia – DF, Sobradinho – DF, Planaltina – DF, Riacho Fundo – DF, São Sebastião – DF, Samambaia – DF, Recanto das Emas – DF, Santo Antônio do Descoberto – GO, Luziânia – GO e Valparaíso – GO;
- BP.Xba.0011 em Sobradinho – DF;
- BP.Xba.0008 em Taguatinga – DF.



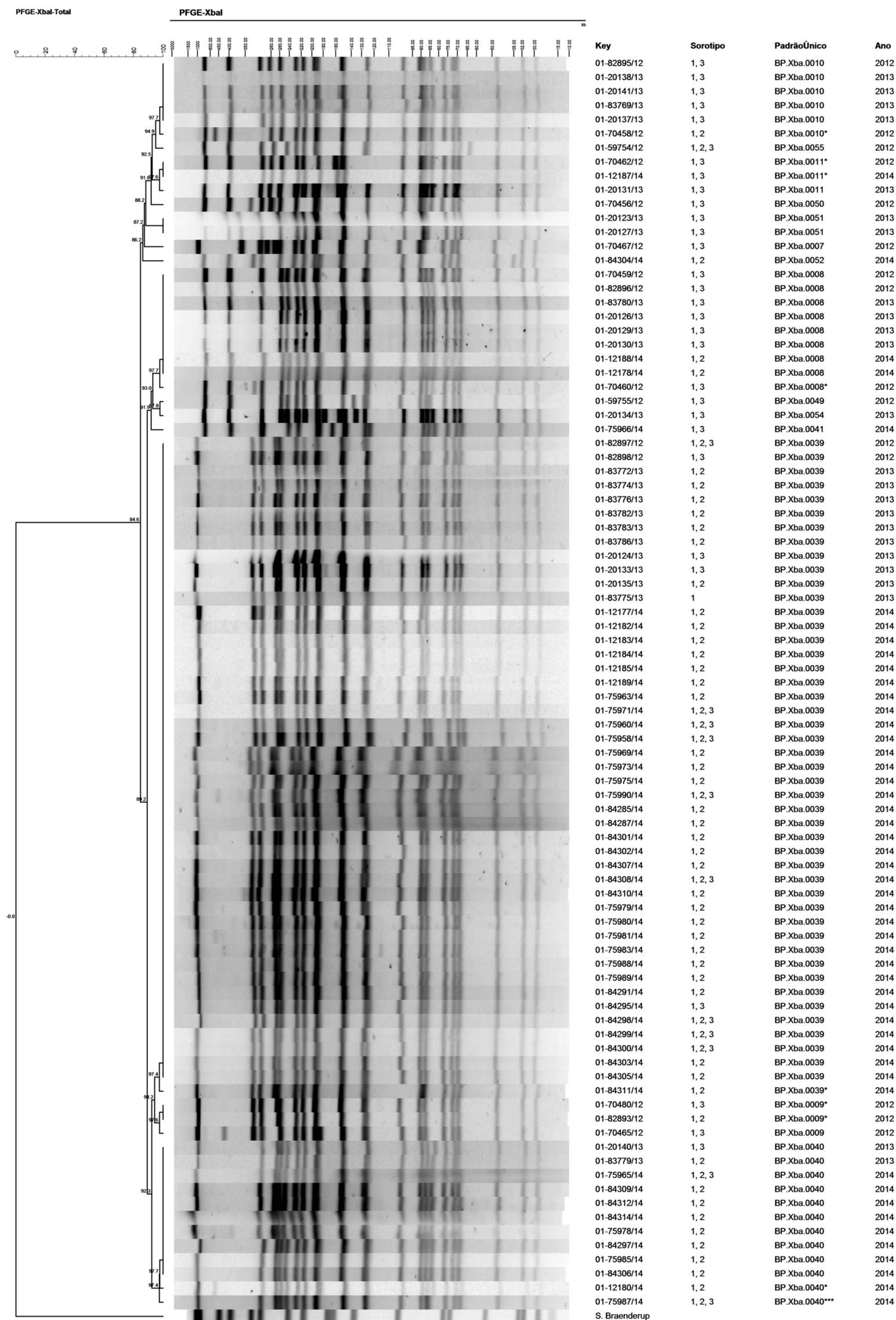
**Figura 18.** Dendrograma representativo de similaridade genética do perfil eletroforético de macrorestrição em Eletroforese em Gel de Campo Pulsado de cepas de *B. pertussis* isoladas do Distrito Federal e Entorno em 2014. O dendrograma acima demonstra que, em 2014, houve circulação de pelo menos 06 pulsotipos de *B. pertussis* no DF e entorno com alta similaridade entre eles (80%) com predomínio do pulsotipo BP Xba 0039, seguido do BP Xba 0040.



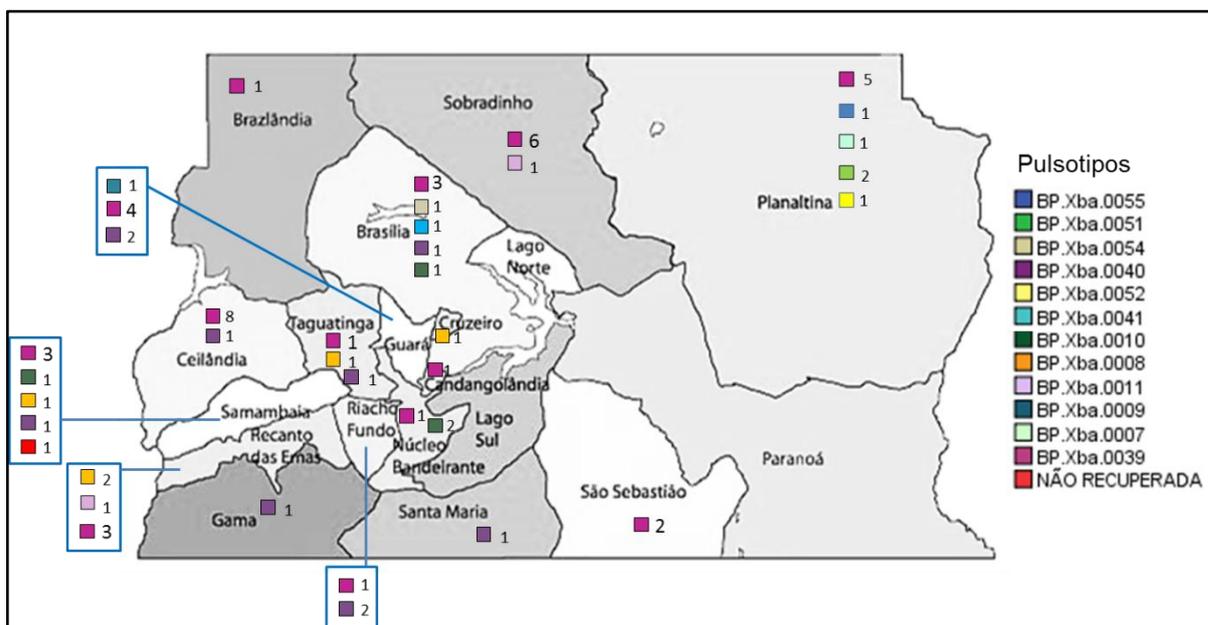
**Figura 19.** Distribuição de Pulsotipos de *B. pertussis* em 2014 de acordo com a região.

Durante todo o período avaliado, observamos 14 pulsotipos de *B. pertussis* com similaridade de 85% entre eles (Figura 20) circulantes no DF e entorno (Figuras 21 e 22). Três cepas não foram caracterizadas, pois não houve recuperação a partir do estoque.

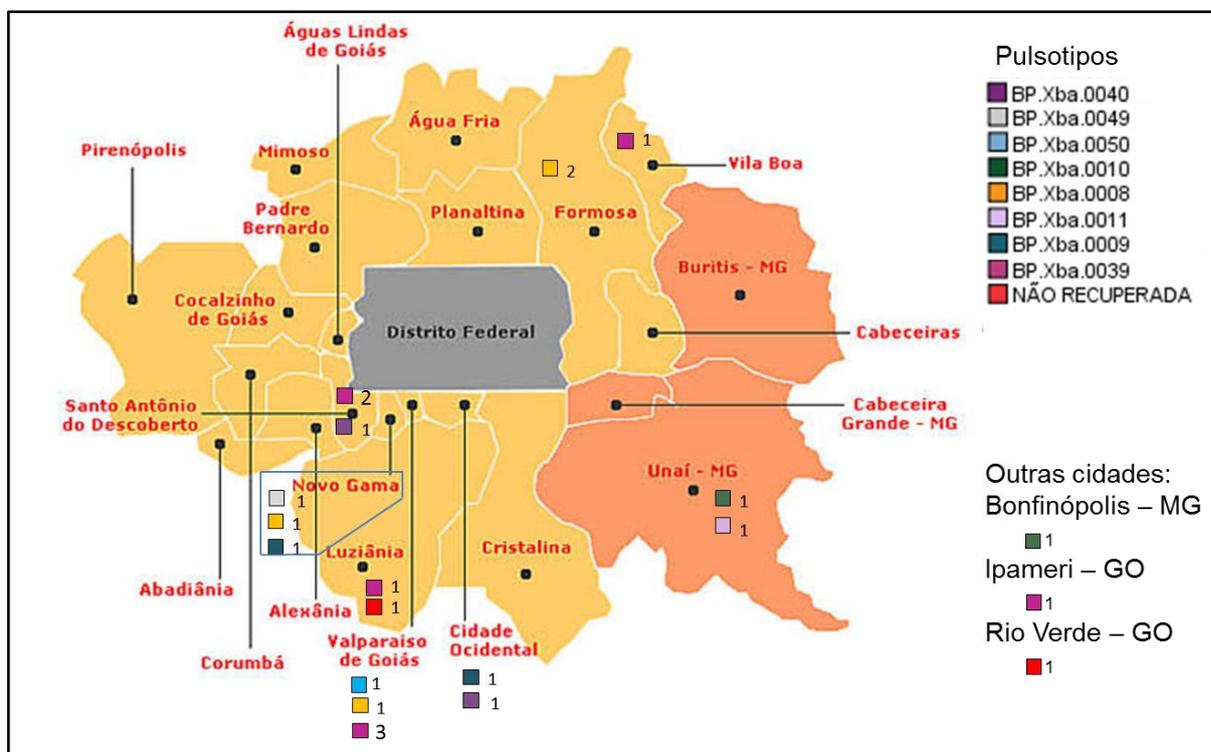
Estudo realizado por Leite *et al* (2012), em São Paulo – SP, de 2006 a 2008, observou a presença de 14 perfis de eletroforese em campo pulsado de *B. pertussis* circulantes com elevado grau de similaridade genética entre elas (Leite D *et al.*, 2012). Porém não há como comparar os resultados do DF e de São Paulo, pois os protocolos utilizados foram diferentes. Na realidade, essa é uma grande dificuldade encontrada, já que não há um protocolo universal para padronizar as condições de execução da técnica, estudos epidemiológicos comparativos são prejudicados.



**Figura 20.** Dendrograma representativo de similaridade genética do perfil eletroforético de macrorestrição em Eletroforese em Gel de Campo Pulsado de cepas de *B. pertussis* isoladas do Distrito Federal e Entorno no período de julho/2012 a agosto/2014. Foram encontrados 14 pulsotipos, com similaridade de 85% entre eles. Três cepas não foram caracterizadas, pois não houve recuperação a partir do estoque.



**Figura 21.** Distribuição dos Pulsotipos de *B. pertussis* no Distrito Federal durante o período de julho/2012 a agosto/2014.



**Figura 22.** Distribuição de Pulsotipos de *B. pertussis* encontrados oriundos da região do entrono do DF.

Durante o período analisado, observamos a prevalência do pulsotipo BP.Xba.0039, seguido do pulsotipo BP.Xba.0040 (Figura 23), padrão observado a partir do segundo semestre de 2013 (Figura 24).

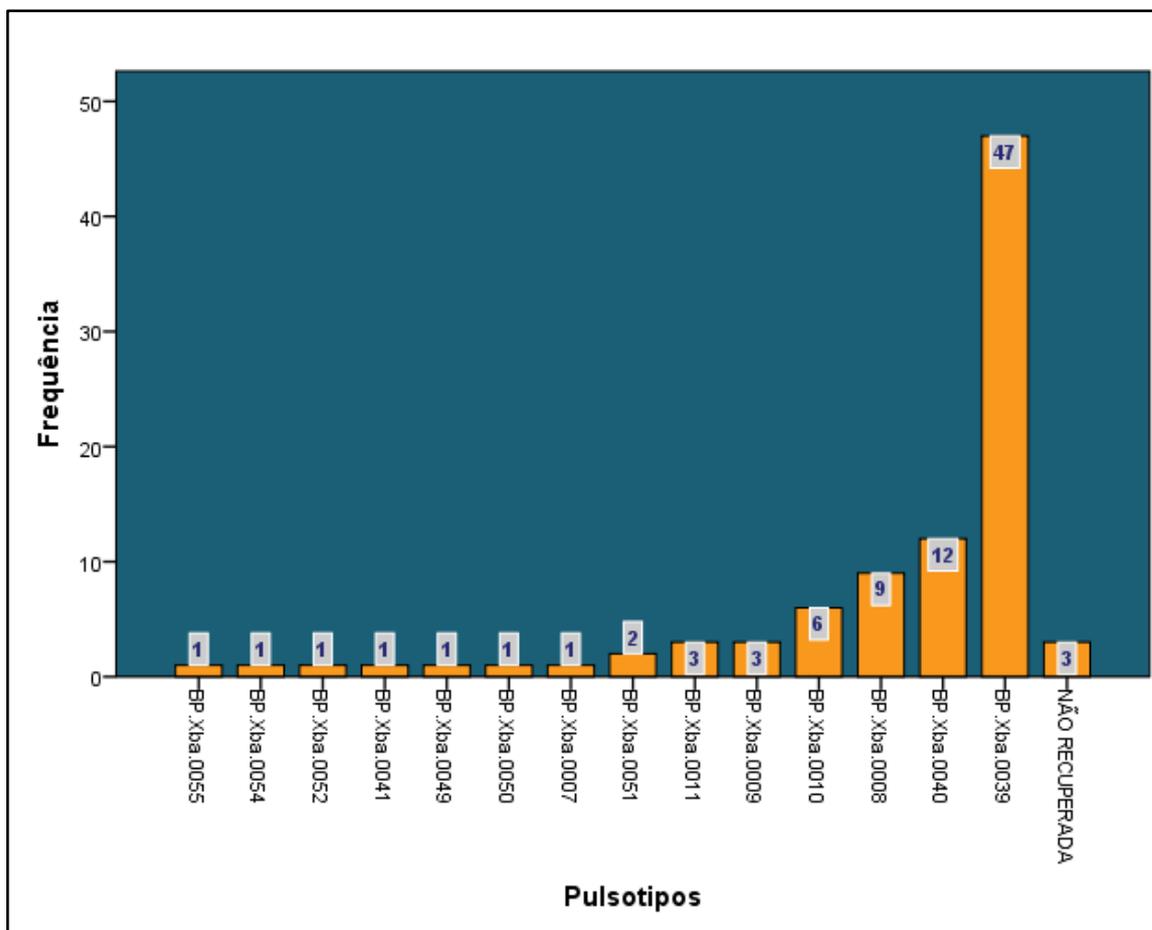
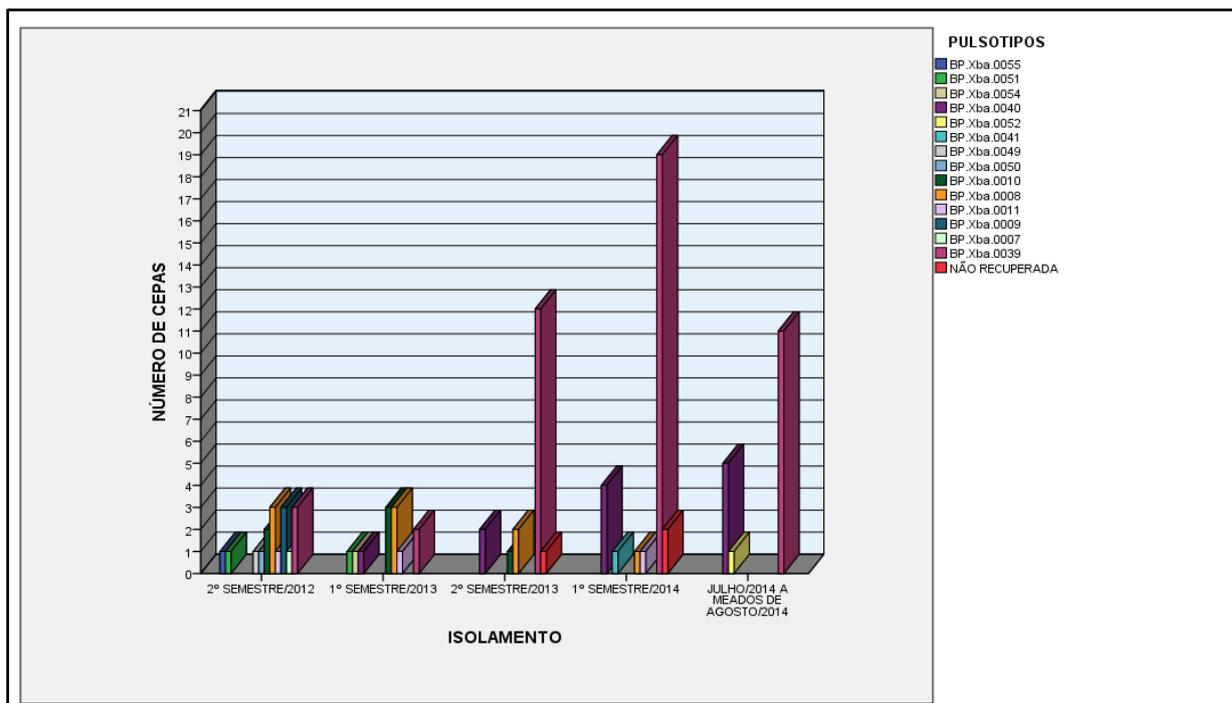


Figura 23. Frequência dos Pulsotipos no período de julho/2012 a agosto/2014.



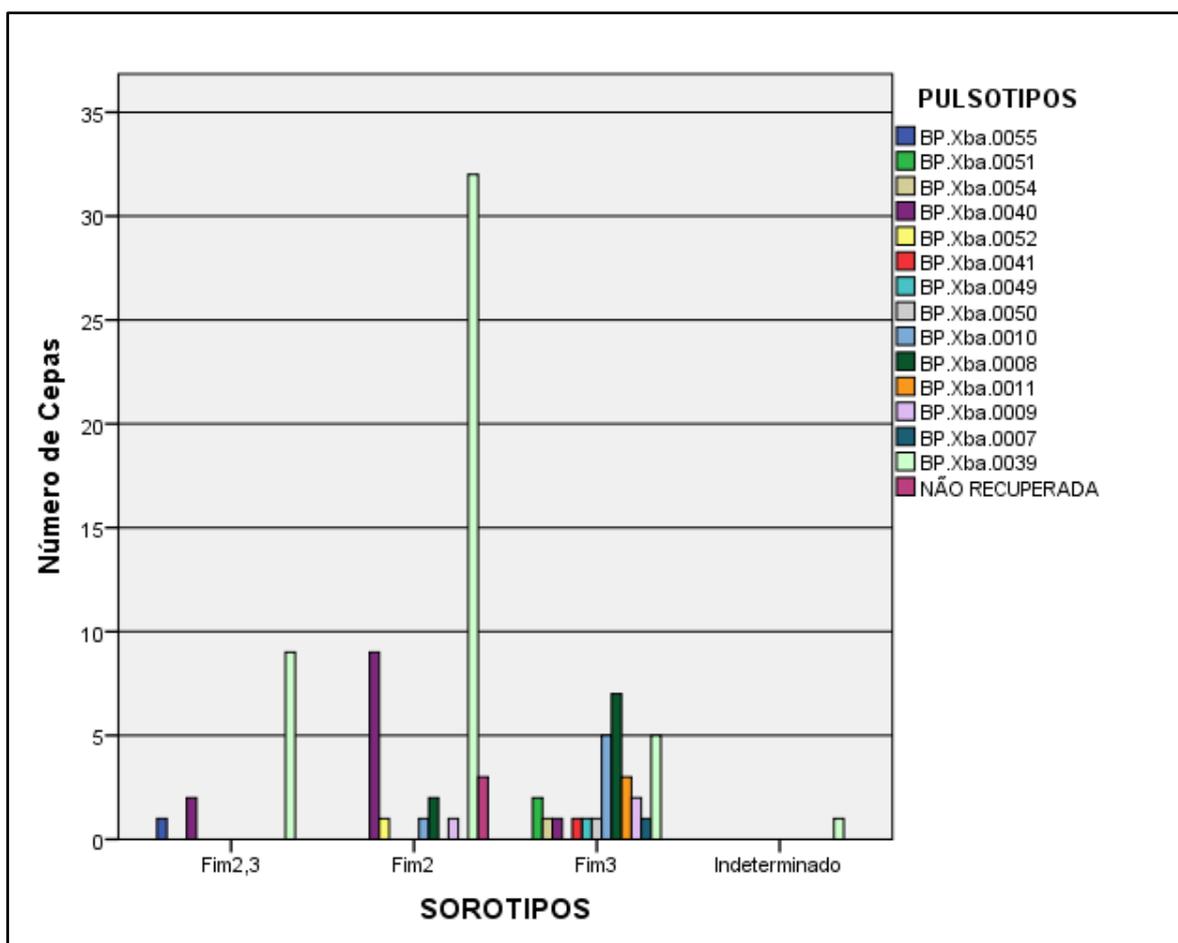
**Figura 24.** Perfil de pulsotipos de *B. pertussis* encontrados pela PFGE de acordo com o semestre/ano de isolamento.

Mesmo que o maior número de isolamentos tem ocorrido a partir do segundo semestre de 2013, foi em 2012 que observamos maior variabilidade de pulsotipos (Figura 24). Apesar de sua natureza genética monomórfica, observa-se uma variação de clones de *B. pertussis* ao longo do período analisado e um processo de seleção pelo pulsotipo BP.Xba.0039, principalmente no ano de 2014, período em que o esse pulsotipo passou a ser notoriamente predominante. Segundo informações do Instituto Adolfo Lutz – SP, o pulsotipo BP.Xba.0039 é o predominante no país (Comunicação oral, IAL/SP) o que corresponde ao cenário do DF. Não se pode afirmar a sua relação com o processo seletivo, mas deve-se investigar o impacto da introdução da vacina aP no calendário das gestantes no Brasil.

Em 2011, especialistas do Advisory Committee on Immunization Practices do CDC recomendaram a vacinação em mulheres gestantes previamente não imunizadas, no terceiro trimestre. Essa recomendação foi corroborada em 2012 (ACOG, 2012) e aceita pela OMS. Em 2013, a Federação brasileira das associações de ginecologia e obstetrícia trouxe essa recomendação em seu Manual de Orientação Vacinação da Mulher (FEBRASGO, 2013). Porém, somente em novembro de 2014, a vacinação com a aP em gestantes foi introduzida no Calendário Nacional de Vacinação da gestante no Brasil (MS, 2015).

Além disso, sugiro uma investigação genética para especificar e caracterizar os atributos evolutivos pertencentes ao perfil predominante que possibilitaram a sua dispersão no território brasileiro.

Não houve relação entre os sorotipos e os pulsotipos de *B. pertussis* encontrados, sugerindo que as variações dos pulsotipos e a prevalência do pulsotipo BP Xba 0039 não estão relacionadas com a expressão fimbrial das cepas de *B. pertussis* circulantes no DF (Figura 25).



**Figura 25.** Distribuição dos sorotipos de *B. pertussis* de acordo com os pulsotipo.

É importante o contínuo monitoramento das mudanças nos perfis das populações de *B. pertussis* e o estudo do seu impacto na prevenção e incidência da coqueluche para o controle da doença. Pode-se afirmar que a PFGE continua uma ferramenta molecular útil para tipagem de *B. pertussis*, contudo são necessários padronização da técnica e estabelecimento de uma nomenclatura universal (He Q, 2014), tornando os parâmetros comparáveis mundialmente a fim de melhorar as ferramentas de investigação, aperfeiçoar o processo de comparação, avaliação e

vigilância no que envolve a temática da controle/persistência da coqueluche no mundo.

## 6 CONCLUSÕES

Neste estudo, avaliamos noventa duas cepas que foram isoladas de julho de 2012 a agosto 2014 pelo Lacen-DF.

Observou-se o isolamento de 69 cepas de *Bordetella pertussis* provenientes de 16 regiões administrativas do Distrito Federal – Brasília (07 cepas), Brazlândia (01 cepa), Candangolândia (01 cepa), Ceilândia (08 cepas), Cruzeiro (01 cepa), Gama (01 cepa), Guará (07 cepas), Núcleo Bandeirante (03 cepas), Planaltina (10 cepas), Recanto das Emas (06 cepas), Riacho Fundo (03 cepas), Santa Maria (01 cepa), São Sebastião (02 cepas), Samambaia (07 cepas), Sobradinho (08 cepas) e Taguatinga (03 cepas) – e 23 oriundas do entorno do DF, sendo 20 isolamentos de Goiás (02 da Cidade Ocidental, 02 de Formosa, 01 de Ipameri, 02 de Luziânia, 03 do Novo Gama, 01 de Rio Verde, 03 de Santo Antônio do Descoberto, 05 de Valparaíso e 01 de Vila Boa,) e 03 isolamentos de Minas Gerais (01 de Bonfinópolis e 02 de Unaí).

De acordo com a distribuição por faixa etária, houve predomínio de culturas positivas na faixa de 02 a 04 meses de idade (39/92), seguido pela faixa de 0 a 01 mês (29/92), sendo que, aproximadamente, 70% (68/92) dos casos se concentraram nesses dois grupos.

Foram encontrados três sorotipos de *Bordetella pertussis*: Fim2(53,23% - 49/92), Fim3 (32,61% - 30/92) e Fim2,3(13,04% - 12/92). O sorotipo Fim2 foi o mais frequente em todas as faixas etárias, exceto na faixa dos maiores de 12 anos. Pela técnica de PFGE foram detectados 14 pulsotipos de *B. pertussis*, com similaridade de 85% entre eles. Foi observado o predomínio do pulsotipo BP.Xba.0039, seguido do pulsotipo BP.Xba.0040.

Os resultados da sorotipagem sugerem que o surto de coqueluche foi causado por três clones diferentes de *Bordetella pertussis*, enquanto que o de PFGE sugere pelo menos 14 clones em Brasília – DF. Observou-se também a existência de um processo seletivo pelo pulsotipo BP Xba 0039 durante período em estudo.

Os resultados obtidos por meio da determinação dos sorotipos e perfis genéticos das cepas de *B. pertussis* isoladas no período avaliado são importantes

para o monitoramento da doença e fornece dados para comparação e avaliação do impacto das estratégias vigentes e futuras de prevenção da coqueluche. Por meio dos resultados obtidos, sugiro avaliação do impacto da introdução da vacina aP no calendário das gestantes no Brasil em 2014 e uma investigação genética para especificar e caracterizar os atributos evolutivos pertencentes ao perfil predominante que possibilitaram a sua dispersão no território brasileiro.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Advani A, Van der Heide HGJ, Hallander HO, Mooi FR. Analysis of Swedish *Bordetella pertussis* isolates with three typing methods: characterization of an epidemic lineage. J Microbiol Methods [Internet]. 2009 Sep;78(3):297–301. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701209001948>

Advani A, Donnelly D, Hallander H. Reference system for characterization of *Bordetella pertussis* pulsed-field gel electrophoresis profiles. J Clin Microbiol [Internet]. 2004 Jul;42(7):2890–7. Available from: <http://jcm.asm.org/cgi/content/long/42/7/2890>

Advani A, Gustafsson L, Carlsson R-M, Donnelly D, Hallander HO. Clinical outcome of pertussis in Sweden: association with pulsed-field gel electrophoresis profiles and serotype. APMIS [Internet]. 2007 Jun;115(6):736–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17550382>

ACOG Committee Opinion No. 521: Update on immunization and pregnancy: tetanus, diphtheria, and pertussis vaccination. Obstet Gynecol. 2012 Mar;119(3):690–1. doi: 10.1097/AOG.0b013e31824e1327

Arico B, Rappuoli R. *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. J Bacteriol [Internet]. 1987;169(6):2847–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC212198/pdf/jbacter00196-0535.pdf>

Bamberger ES, Sruogo I. What is new in pertussis? Eur J Pediatr [Internet]. 2008;167(2):133–9. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2151776/pdf/431\\_2007\\_Article\\_548.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2151776/pdf/431_2007_Article_548.pdf)

Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, et al. Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. MBio [Internet]. 2014 Jan;5(2):e01074. Available from: <http://mbio.asm.org/cgi/content/long/5/2/e01074-14>

Bellalou J, Ladant D, Sakamoto H. Synthesis and secretion of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase as a 200-kilodalton protein. Infect Immun [Internet]. 1990;58(5):1195–200. Available from: <http://iai.asm.org/content/58/5/1195.full.pdf>

Boucher PE, Murakami K, Ishihama A, Stibitz S. Nature of DNA binding and RNA polymerase interaction of the *Bordetella pertussis* BvgA transcriptional activator at the fha promoter. J Bacteriol [Internet]. 1997;179(5):1755–63. Available from: <http://jb.asm.org/content/179/5/1755.full.pdf>

Brasil. Guia de Vigilância em Saúde [Internet]. 2014. 812 p. Available from: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_unificado.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_unificado.pdf)

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria N° 104 De 25 De Janeiro De 2011. 2011;Diário oficial da União N°18, SEÇÃO 1 PGS 37 E 38 . Available from: [http://ftp.medicina.ufmg.br/osat/legislacao/Portaria104\\_12092014.pdf](http://ftp.medicina.ufmg.br/osat/legislacao/Portaria104_12092014.pdf)

BRASIL. Ministério Da Saúde (MS). Secretaria De Vigilância Em Saúde – Sistema De Informação De Agravos De Notificação – SINAN NET. Coqueluche - Casos de coqueluche confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net- de 2010 a 2014 no Distrito Federal. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acesso em: 25/01/2015.

BRASIL. Ministério Da Saúde (MS). Tire suas dúvidas sobre a vacinação contra a coqueluche. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2014/11/tire-suas-duvidas-sobre-a-vacinacao-contr-a-coqueluche>. Acesso em: 08/08/2015.

Carollo M, Pandolfi E, Tozzi AE, Buisman AM, Mascart F, Ausiello CM. Humoral and B-cell memory responses in children five years after pertussis acellular vaccine priming. *Vaccine*. 2014;32(18):2093–9.

Center For Disease Control And Prevention (CDC). Chapter 10: Pertussis. *VPD Surveillance Manual*, 2015.

Cherry JD. Historical Perspective on Pertussis and Use of Vaccines To Prevent It. *Microbe*. 2007;2(3):139–44.

Clark TA. Changing pertussis epidemiology: everything old is new again. *J Infect Dis* [Internet]. 2014;209(7):978–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24626532>

Cortese MM *et al*. Pertussis hospitalizations among infants in the United States, 1993 to 2004. *Pediatrics*. 2008; 121(3):484–92.

Dragsted DM, Dohn B, Madsen J, Jensen JS. Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. *J Med Microbiol*. 2004;53(8):749–54.

FEBRASGO. Vacinação da mulher: manual de orientação. Federação Brasileira de Associações de Ginecologia e Obstetrícia. Nilma Antas Neves. São Paulo. 2013..

Fedele G, Bianco M, Ausiello CM. The virulence factors of *Bordetella pertussis*: Talented modulators of host immune response. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013;61(6):445–57.

Fisman DN, Tang P, Hauck T, Richardson S, Drews SJ, Low DE, et al. Pertussis resurgence in Toronto, Canada: a population-based study including test-incidence feedback modeling. *BMC Public Health* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011;11(1):694. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2458/11/694>

Gerlach G, von Wintzingerode F, Middendorf B, Gross R. Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Microbes Infect* [Internet]. 2001 Jan;3(1):61–72. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457900013538>

Gregory DS. Pertussis: A disease affecting all ages. *Am Fam Physician* [Internet]. 2006;74(3):420–6. Available from: <http://www.aafp.org/afp/2006/0801/p420.pdf>

Guiso N. *Bordetella pertussis*: why is it still circulating? *J Infect* [Internet]. 2014 Jan;68 Suppl 1:S119–24. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163445313002892>

Hallander HO, Advani A, Donnelly D, Gustafsson L, Carlsson R-M. Shifts of *Bordetella pertussis* variants in Sweden from 1970 to 2003, during three periods marked by different vaccination programs. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2005 Jun;43(6):2856–65. Available from: <http://jcm.asm.org/content/43/6/2856.abstract>

He Q. Molecular Typing of *Bordetella pertussis* Isolates Circulating in Different Vaccinated Populations. *Exp Rev Immunol Vaccine Informat*. 2014;1(1):37–46.

Higgs R, Higgins SC, Ross PJ, Mills KHG. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;5(5):485–500. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2012.54>

Kallonen T, He Q. *Bordetella pertussis* strain variation and evolution postvaccination. *Expert Rev Vaccines* [Internet]. Taylor & Francis; 2009 Jul 1;8(7):863–75. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/erv.09.46>

KONEMAN *et al.* Koneman Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008.

Leite D, Cassidy PK, Tatti KM, Vaz TMI, 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):2006–8.

Loeffelholz M. Towards improved accuracy of *Bordetella pertussis* nucleic acid amplification tests. *J Clin Microbiol*. 2012;50(7):2186–90.

Lynfield R, Schaffner W. Can we conquer coqueluche? *J Infect Dis* [Internet]. 2014 Apr;209 Suppl (suppl\_1):S1–3. Available from: [http://jid.oxfordjournals.org/cgi/content/long/209/suppl\\_1/S1](http://jid.oxfordjournals.org/cgi/content/long/209/suppl_1/S1)

Madan Babu M, Bhargavi J, Singh Saund R, Kumar Singh S. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Curr Sci* [Internet]. 2001;80(12):1512–22. Available from: <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/madanm/pdfs/1512.pdf>

Martinez MB, Martinez e Trabulsi LR. *Bordetella pertussis*. In: Martinez e Trabulsi LR, AlterthmF, editores. *Microbiologia*. 5 ed. São Paulo: Atheneu;2008.P257-261.

Mattoo S, Cherry JD. Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Su. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:326–82.

Mcintyre P, Wood N. Pertussis in early infancy: disease burden and preventive strategies. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2009; 22. 215-223.

Melton AR, Weiss AA. Environmental regulation of expression of virulence determinants in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1989;171(11):6206–12.

Melvin JA, Scheller EV, Miller JF, Cotter PA. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;12(4):274–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24608338>

Mooi FR, Van Der Maas NAT, De Melker HE. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin. *Epidemiol Infect* [Internet]. Cambridge University Press; 2014 Apr;142(4):685–94. Available from: [http://journals.cambridge.org/abstract\\_S0950268813000071](http://journals.cambridge.org/abstract_S0950268813000071)

Mooi Fr, He Q, Guiso N. *Bordetella*: Molecular Microbiology. [s.l.] Horizon Scientific Press (2007); p. 18–9.

Mooi FR. *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2010 Jan;10(1):36–49. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134809002226>

Nakamura Y, Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, Otsuka N, Saito R, Tsuruoka J, et al. Marked difference between adults and children in *Bordetella pertussis* DNA load in nasopharyngeal swabs. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(3):365–70.

Nitsch-Osuch A, Korzeniewski K, Kuchar E, Zielonka T, Życińska K, Wardyn K. Epidemiological and immunological reasons for pertussis vaccination in adolescents and adults. *Respir Physiol Neurobiol* [Internet]. 2013 Jun;187(1):99–103. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569904813000384>

Park J, Zhang Y, Buboltz AM, Zhang X, Schuster SC, Ahuja U, et al. Comparative genomics of the classical *Bordetella* subspecies: the evolution and exchange of virulence-associated diversity amongst closely related pathogens. *BMC Genomics.* 2012;13(1):545.

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.

Preston NW. Essential immunogens in human pertussis: the role of fimbriae. *Dev Biol Stand.* 1985;61:137–41.

Qin X, Galanakis E, Martin ET, Englund J a. Multitarget PCR for diagnosis of pertussis and its clinical implications. *J Clin Microbiol.* 2007;45(2):506–11.

Regan J, Lowe F. Enrichment medium for the isolation of *Bordetella*. *J Clin Microbiol.* 1977;6(3):303–9.

Robinson A, Ashworth L, Irons L. Serotyping *Bordetella pertussis* strains. *Vaccine* [Internet]. 1989 Dec;7(6):491–4. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0264410X89902703>.

Roush SW, Murphy TV, Vaccine-Preventable Disease Table Working Group. Historical comparisons of morbidity and mortality for vaccine-preventable diseases in the United States. *J. Am. Med. Assoc.* 2007; 298, 2155-2163.

Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijn J, Laurent F, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill* [Internet]. 2013;18(4):20380. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V18N04/art20380.pdf>

Shakib JH *et al.* Pertussis Antibodies in Postpartum Women and Their Newborns. *Journal of perinatology: official journal of the California Perinatal Association.* 2010;30(2):93-97. doi:10.1038/jp.2009.138.

Schmidtke AJ, Boney KO, Martin SW, Skoff TH, Lucia Tondella ML, Tatti KM. Population diversity among *Bordetella pertussis* isolates, United States, 1935-2009. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(8):1248–55.

Secretaria Do Estado De Saúde Do Distrito Federal (SES/DF). Informe técnico N° 1 – GVEI/DIVEP/SVS/SES de 14 de fevereiro de 2013.

Skoff TH *et al.* Early Impact of the US Tdap vaccination program on pertussis trends. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2012;166:344–9.

Smits K, Pottier G, Smet J, Dirix V, Vermeulen F, De Schutter I, et al. Different T cell memory in preadolescents after whole-cell or acellular pertussis vaccination. *Vaccine.* 2013;32(1):111–8.

Spector TB, Maziarz EK. Pertussis. *Med Clin North Am* [Internet]. 2013 Jul;97(4):537–52. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025712513000278>

Tamura M, Nogimori K, Yajima M, Ase K, Ui M. A role of the B-oligomer moiety of islet-activating protein, pertussis toxin, in development of the biological effects on intact cells. *J Biol Chem* [Internet]. 1983;258(11):6756–61. Available from: <http://www.jbc.org/content/258/11/6756.full.pdf>

Tatti KM, Wu K-H, Tondella ML, Cassidy PK, Cortese MM, Wilkins PP, et al. Development and evaluation of dual-target real-time polymerase chain reaction assays to detect *Bordetella* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. Elsevier; 2008 Jul;61(3):264–72. Available from: <http://www.dmidjournal.com/article/S0732889308001545/fulltext>

Templeton KE, Scheltinga SA, Zee A Van Der, Diederens BMW, Kruijssen AM, Goossens H, et al. Evaluation of Real-Time PCR for Detection of and Discrimination *Bordetella holmesii* for Clinical Diagnosis. *Society* [Internet]. 2003;41(9):4121–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC193783/pdf/0151.pdf>

Terranella A, Asay GRB, Messonnier ML, Clark TA, Liang JL. Pregnancy Dose Tdap and Postpartum Cocooning to Prevent Infant Pertussis: A Decision Analysis. *Pediatrics* [Internet]. 2013;131(6):e1748–56. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2012-3144>

Trevizan S, Coutinho SE. [Epidemiological profile of pertussis in Rio Grande do Sul State, Brazil: a study of the correlation between incidence and vaccine coverage]. *Cad Saude Publica* [Internet]. 2008;24(1):93–102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18209837> \n <http://www.scielo.br/pdf/csp/v24n1/08.pdf>

Ulloa-Gutierrez R, Boza R, Carvajal-Riggioni Det al. Pertussis: should we improve intensive care management or vaccination strategies? *Expert Rev Vaccines*. 2011; 10:49-53.

Van Buynder PG, Owen D, Vurdien JE, Andrews NJ, Matthews RC, Miller E. *Bordetella pertussis* surveillance in England and Wales: 1995-7. *Epidemiol Infect*. 1999;123(3):403–11.

Van der Zee a, Groenendijk H, Peeters M, Mooi FR. The differentiation of *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* from humans and animals as determined by DNA polymorphism mediated by two different insertion sequence elements suggests their phylogenetic relationship. *Int J Syst Bacteriol* [Internet]. 1996;46(3):640–7. Available from: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/46/3/ij-s-46-3-640.pdf?expires=1443150442&id=id&accname=guest&checksum=7E6DB822B7F2B1B34E085518A8795E54>

Van Der Zee A, Mooi F, Van Embden J, Musser J. Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella spp.*: Phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences. *J Bacteriol* [Internet]. 1997;179(21):6609–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC179586/pdf/1796609.pdf>

Van Gent M, Bart MJ, van der Heide HGJ, Heuvelman KJ, Mooi FR. Small Mutations in *Bordetella pertussis* Are Associated with Selective Sweeps. *PLoS One*. 2012;7(9).

Vílchez G, Alonso G. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Rev la Soc Venez Microbiol* [Internet]. Sociedad Venezolana de Microbiología. 2009;29(1):6–12. Available from: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562009000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

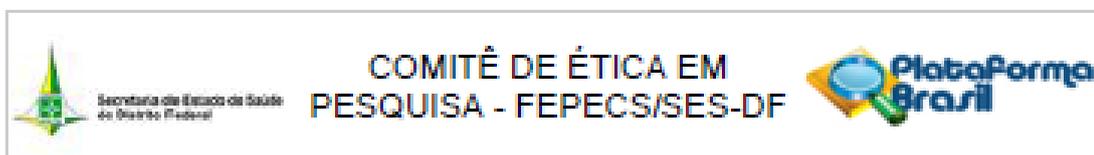
World Health Organization (WHO). Biologicals: Pertussis. Atualizado em Maio, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/pertussis/en/>. Acesso em 24/05/2015

World Health Organization (WHO). Pertussis vaccines: WHO position paper. Weekly Epidemiological Record n° 40, 85:385–400, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/wer/2010/wer8540.pdf>. Acesso em: 05/05/2013.

World Health Organization (WHO). WHO SAGE pertussis working group Background paper SAGE April 2014. Disponível em: [http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2014/april/1\\_Pertussis\\_background\\_FINAL4\\_web.pdf](http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2014/april/1_Pertussis_background_FINAL4_web.pdf). Acesso em: 25/01/2015.

Zhang L, Xu Y, Zhao J, Kallonen T, Cui S, Xu Y, et al. Effect of vaccination on *Bordetella pertussis* strains, China. Emerg Infect Dis [Internet]. 2010;16(11):1695–701. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3294513/pdf/10-0401\\_finalR.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3294513/pdf/10-0401_finalR.pdf)

## ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** CARACTERIZAÇÃO CLONAL DE CEPAS DE *Bordetella pertussis* ISOLADAS NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL, NO PERÍODO DE JULHO/2012 A MEADOS DE AGOSTO/2014

**Pesquisador:** Ellen de Lima Rocha

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 43098415.6.1001.5553

**Instituição Proponente:** Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.056.702

**Data da Relatoria:** 11/05/2015

**Apresentação do Projeto:**

Já descrito anteriormente

**Objetivo da Pesquisa:**

Já descrito anteriormente

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Já descrito anteriormente

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Já descrito anteriormente

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Já descrito anteriormente

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências foram sanadas satisfatoriamente

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

**Bairro:** ASA NORTE

**CEP:** 70.710-604

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3325-4955

**Fax:** (33)3325-4955

**E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com

**ANEXO B – Dados das cepas de *Bordetella pertussis* isolados no Distrito Federal e entorno durante o período de julho de 2012 a agosto de 2014.**

Cepa	Sorotipo	Pulsotipo	Residência	Faixa Etária	Isolamento
BP1	1,2,3	BP.Xba.0055	PLANALTINA-DF	02 A 04 MESES	2º SEMESTRE/2012
BP2	1,3	BP.Xba.0049	NOVO GAMA-GO	05 A 06 MESES	2º SEMESTRE/2012
BP3	1,3	BP.Xba.0050	VALPARAISO-GO	0 a 01 MES	2º SEMESTRE/2012
BP4	1,2	BP.Xba.0010	BRASILIA-DF	02 A 04 MESES	2º SEMESTRE/2012
BP5	1,3	BP.Xba.0008	FORMOSA-GO	MAIORES DE 12 ANOS	2º SEMESTRE/2012
BP6	1,3	BP.Xba.0011	RECANTO DAS EMAS-DF	02 A 04 MESES	2º SEMESTRE/2012
BP7	1,3	BP.Xba.0008	FORMOSA-GO	0 a 01 MES	2º SEMESTRE/2012
BP8	1,3	BP.Xba.0009	NOVO GAMA-GO	0 a 01 MES	2º SEMESTRE/2012
BP9	1,3	BP.Xba.0007	PLANALTINA-DF	02 A 04 MESES	2º SEMESTRE/2012
BP10	1,2	BP.Xba.0009	CIDADE OCIDENTAL-GO	MAIORES DE 12 ANOS	2º SEMESTRE/2012
BP11	1,3	BP.Xba.0009	GUARA-DF	02 A 04 MESES	2º SEMESTRE/2012
BP12	1,3	BP.Xba.0010	NUCLEO BANDEIRANTE-DF	02 A 04 MESES	2º SEMESTRE/2012
BP13	1,3	BP.Xba.0008	NOVO GAMA-GO	02 A 04 MESES	2º SEMESTRE/2012
BP14	1,2,3	BP.Xba.0039	GUARA-DF	05 A 06 MESES	2º SEMESTRE/2012
BP15	1,3	BP.Xba.0039	PLANALTINA-DF	05 A 06 MESES	2º SEMESTRE/2012
BP16	1,3	BP.Xba.0051	PLANALTINA-DF	02 A 04 MESES	2º SEMESTRE/2012
BP17	1,3	BP.Xba.0039	IPAMERI-GO	02 A 04 MESES	2º SEMESTRE/2012
BP18	1,3	BP.Xba.0008	CRUZEIRO-DF	MAIORES DE 12 ANOS	1º SEMESTRE/2013
BP19	1,3	BP.Xba.0051	PLANALTINA-DF	02 A 04 MESES	1º SEMESTRE/2013
BP20	1,3	BP.Xba.0008	RECANTO DAS EMAS-DF	0 a 01 MES	1º SEMESTRE/2013
BP21	1,3	BP.Xba.0008	RECANTO DAS EMAS-DF	MAIORES DE 12 ANOS	1º SEMESTRE/2013
BP22	1,3	BP.Xba.0011	UNAI-MG	07 MESES A 02 ANOS	1º SEMESTRE/2013

BP23	1,3	BP.Xba.0054	BRASILIA-DF	0 a 01 MES	1º SEMESTRE/2013
BP24	1,3	BP.Xba.0039	PLANALTINA-DF	07 MESES A 02 ANOS	1º SEMESTRE/2013
BP25	1,2	BP.Xba.0039	VALPARAISO-GO	02 A 04 MESES	1º SEMESTRE/2013
BP26	1,3	BP.Xba.0010	SAMAMBAIA-DF	02 A 04 MESES	1º SEMESTRE/2013
BP27	1,3	BP.Xba.0010	UNAI-MG	MAIORES DE 12 ANOS	1º SEMESTRE/2013
BP28	1,3	BP.Xba.0040	S. A. DESCOBERTO-GO	02 A 04 MESES	1º SEMESTRE/2013
BP29	1,3	BP.Xba.0010	NUCLEO BANDEIRANTE-DF	02 A 04 MESES	1º SEMESTRE/2013
BP30	1,3	BP.Xba.0010	BONFINOPOLIS DE MINAS-MG	0 a 01 MES	2º SEMESTRE/2013
BP31	1,2	BP.Xba.0039	PLANALTINA-DF	02 A 04 MESES	2º SEMESTRE/2013
BP32	1,2	BP.Xba.0039	VILA BOA-GO	02 A 04 MESES	2º SEMESTRE/2013
BP33	1	BP.Xba.0039	GUARA-DF	MAIORES DE 12 ANOS	2º SEMESTRE/2013
BP34	1,2	BP.Xba.0039	PLANALTINA-DF	02 A 04 MESES	2º SEMESTRE/2013
BP35	1,2	BP.Xba.0040	RIACHO FUNDO-DF	05 A 06 MESES	2º SEMESTRE/2013
BP36	1,3	BP.Xba.0008	SAMAMBAIA-DF	MAIORES DE 12 ANOS	2º SEMESTRE/2013
BP37	1,2	BP.Xba.0039	SAMAMBAIA-DF	02 A 04 MESES	2º SEMESTRE/2013
BP38	1,2	BP.Xba.0039	BRAZLANDIA-DF	0 a 01 MES	2º SEMESTRE/2013
BP39	1,2	BP.Xba.0039	NUCLEO BANDEIRANTE-DF	0 a 01 MES	2º SEMESTRE/2013
BP40	1,2,3	BP.Xba.0039	BRASILIA-DF	MAIORES DE 12 ANOS	2º SEMESTRE/2013
BP41	1,2	BP.Xba.0039	TAGUATINGA-DF	0 a 01 MES	2º SEMESTRE/2013
BP42	1,2	BP.Xba.0008	VALPARAISO-GO	02 A 04 MESES	2º SEMESTRE/2013
BP43	1,2,3	BP.Xba.0039	CEILANDIA-DF	0 a 01 MES	2º SEMESTRE/2013
BP44	1,2	BP.Xba.0040	TAGUATINGA-DF	0 a 01 MES	2º SEMESTRE/2013
BP45	1,2	NÃO RECUPERADA	LUZIANIA-GO	0 a 01 MES	2º SEMESTRE/2013
BP46	1,2	BP.Xba.0039	SÃO SEBASTIAO-DF	06 A 12 ANOS	2º SEMESTRE/2013
BP47	1,2	BP.Xba.0039	CEILANDIA-DF	0 a 01 MES	2º SEMESTRE/2013
BP48	1,2	BP.Xba.0039	S. A. DESCOBERTO-GO	02 A 04 MESES	1º SEMESTRE/2014
BP49	1,2	BP.Xba.0039	SOBRADINHO-DF	07 MESES A 02 ANOS	1º SEMESTRE/2014
BP50	1,2	NÃO RECUPERADA	SAMAMBAIA-DF	07 MESES A 02 ANOS	1º SEMESTRE/2014

BP51	1,3	BP.Xba.0011	SOBRADINHO-DF	02 A 04 MESES	1º SEMESTRE/2014
BP52	1,2	BP.Xba.0008	TAGUATINGA-DF	MAIORES DE 12 ANOS	1º SEMESTRE/2014
BP53	1,2	BP.Xba.0039	SOBRADINHO-DF	07 MESES A 02 ANOS	1º SEMESTRE/2014
BP54	1,2	BP.Xba.0039	CEILANDIA-DF	02 A 04 MESES	1º SEMESTRE/2014
BP55	1,2,3	BP.Xba.0040	SAMAMBAIA-DF	02 A 04 MESES	1º SEMESTRE/2014
BP56	1,3	BP.Xba.0041	BRASILIA-DF	02 A 04 MESES	1º SEMESTRE/2014
BP57	1,2	BP.Xba.0039	GUARA-DF	07 MESES A 02 ANOS	1º SEMESTRE/2014
BP58	1,2,3	BP.Xba.0039	SAMAMBAIA-DF	02 A 04 MESES	1º SEMESTRE/2014
BP59	1,2	BP.Xba.0039	BRASILIA-DF	07 MESES A 02 ANOS	1º SEMESTRE/2014
BP60	1,3	BP.Xba.0039	CEILANDIA-DF	02 A 04 MESES	1º SEMESTRE/2014
BP61	1,2	NÃO RECUPERADA	RIO VERDE-GO	0 a 01 MES	1º SEMESTRE/2014
BP62	1,2	BP.Xba.0040	GUARA-DF	0 a 01 MES	1º SEMESTRE/2014
BP63	1,2	BP.Xba.0039	BRASILIA-DF	02 A 04 MESES	1º SEMESTRE/2014
BP64	1,2	BP.Xba.0039	CEILANDIA-DF	0 a 01 MES	1º SEMESTRE/2014
BP65	1,2	BP.Xba.0039	RECANTO DAS EMAS-DF	0 a 01 MES	1º SEMESTRE/2014
BP66	1,2	BP.Xba.0039	LUZIANIA-GO	0 a 01 MES	1º SEMESTRE/2014
BP67	1,2	BP.Xba.0040	RIACHO FUNDO-DF	02 A 04 MESES	1º SEMESTRE/2014
BP68	1,2,3	BP.Xba.0040	GUARA-DF	02 A 04 MESES	1º SEMESTRE/2014
BP69	1,2	BP.Xba.0039	RIACHO FUNDO-DF	02 A 04 MESES	1º SEMESTRE/2014
BP70	1,2	BP.Xba.0039	PLANALTINA-DF	02 A 04 MESES	1º SEMESTRE/2014
BP71	1,2,3	BP.Xba.0039	SOBRADINHO-DF	0 a 01 MES	1º SEMESTRE/2014
BP72	1,2	BP.Xba.0039	CEILANDIA-DF	05 A 06 MESES	1º SEMESTRE/2014
BP73	1,2	BP.Xba.0039	RECANTO DAS EMAS-DF	0 a 01 MES	1º SEMESTRE/2014
BP74	1,2	BP.Xba.0039	GUARA-DF	0 a 01 MES	1º SEMESTRE/2014
BP75	1,3	BP.Xba.0039	VALPARAISO-GO	02 A 04 MESES	1º SEMESTRE/2014
BP76	1,2	BP.Xba.0040	SANTA MARIA-DF	0 a 01 MES	JULHO/2014 A MEADOS DE AGOSTO/2014
BP77	1,2,3	BP.Xba.0039	SAO SEBASTIAO-DF	0 a 01 MES	JULHO/2014 A MEADOS DE AGOSTO/2014
BP78	1,2,3	BP.Xba.0039	SOBRADINHO-DF	05 A 06 MESES	JULHO/2014 A MEADOS DE AGOSTO/2014

BP79	1,2,3	BP.Xba.0039	S. A. DESCOBERTO-GO	0 a 01 MES	JULHO/2014 A MEADOS DE AGOSTO/2014
BP80	1,2	BP.Xba.0039	SOBRADINHO-DF	02 A 04 MESES	JULHO/2014 A MEADOS DE AGOSTO/2014
BP81	1,2	BP.Xba.0039	SAMAMBAIA-DF	02 A 04 MESES	JULHO/2014 A MEADOS DE AGOSTO/2014
BP82	1,2	BP.Xba.0039	RECANTO DAS EMAS-DF	0 a 01 MES	JULHO/2014 A MEADOS DE AGOSTO/2014
BP83	1,2	BP.Xba.0052	PLANALTINA-DF	02 A 04 MESES	JULHO/2014 A MEADOS DE AGOSTO/2014
BP84	1,2	BP.Xba.0039	SOBRADINHO-DF	02 A 04 MESES	JULHO/2014 A MEADOS DE AGOSTO/2014
BP85	1,2	BP.Xba.0040	CIDADE OCIDENTAL-GO	02 A 04 MESES	JULHO/2014 A MEADOS DE AGOSTO/2014
BP86	1,2	BP.Xba.0039	SOBRADINHO-DF	03 A 05 ANOS	JULHO/2014 A MEADOS DE AGOSTO/2014
BP87	1,2,3	BP.Xba.0039	CEILANDIA-DF	02 A 04 MESES	JULHO/2014 A MEADOS DE AGOSTO/2014
BP88	1,2	BP.Xba.0040	BRASILIA-DF	0 a 01 MES	JULHO/2014 A MEADOS DE AGOSTO/2014
BP89	1,2	BP.Xba.0039	VALPARAISO-GO	0 a 01 MES	JULHO/2014 A MEADOS DE AGOSTO/2014
BP90	1,2	BP.Xba.0039	CANDANGOLANDIA-DF	02 A 04 MESES	JULHO/2014 A MEADOS DE AGOSTO/2014
BP91	1,2	BP.Xba.0040	GAMA-DF	0 a 01 MES	JULHO/2014 A MEADOS DE AGOSTO/2014
BP92	1,2	BP.Xba.0040	CEILANDIA-DF	0 a 01 MES	JULHO/2014 A MEADOS DE AGOSTO/2014