



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana (PPGBM)

**VARIABILIDADE ALÉLICA DE *fim3* e *ptx* EM LINHAGENS DE *Bordetella pertussis* ISOLADAS NO DISTRITO FEDERAL E REGIÃO DURANTE 2012 – 2018**

**Victor Gomes de Paula**

**Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Amabile de Campos**

**Brasília**

**2024**



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana (PPGBM)

**VARIABILIDADE ALÉLICA DE *fim3* e *ptx* EM LINHAGENS DE *Bordetella pertussis* ISOLADAS NO DISTRITO FEDERAL E REGIÃO DURANTE 2012 – 2018**

**Victor Gomes de Paula**

**Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Amabile de Campos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília para a obtenção do título de Doutor em Biologia Microbiana

**Brasília**

**2024**



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana (PPGBM)

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Data da banca: 25/04/2024

Comissão examinadora:

---

Profa. Dra. Tatiana Amabile de Campos (UnB)

**Presidente**

---

Profa. Dra. Ana Flávia Alves Parente (UnB)

**1º Membro**

---

Profa. Dra. Bruna Fuga Araújo (UnB)

**2º Membro**

---

Prof. Dr. Miguel de Souza Andrade (Externo)

**3º Membro**

---

Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins (UnB)

**Suplente**



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana (PPGBM)

## **DEDICATÓRIA**

À minha amada, dedicada e virtuosa esposa. Por acreditar em mim. Por me motivar sempre. Por nunca ter soltado minha mão. Por toda abnegação em prol do meu sucesso. Sem sua sabedoria, ajuda, insistência e persistência eu não conseguiria. Seu amor sincero e genuíno é meu combustível diário para seguir sempre em frente.



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana (PPGBM)

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus que em sua abundante graça, misericórdia e amor incondicional me sustentou, capacitou e inspirou a chegar até aqui. De mim mesmo nada tenho, nada sou e nada posso. Devolvo tudo à Ele, porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas. Toda honra e glória sejam dadas ao meu Deus e pai, criador dos céus e da terra, dono de toda a ciência, sabedoria e conhecimento humano. Obrigado Senhor por tudo o que fizestes, tens feito, e por tudo que ainda vais fazer em minha vida e através de mim. Agradeço por tuas promessas proferidas a mim e à minha família. Só tenho a te agradecer, com todo o meu ser. Obrigado por me conceder esse título que usarei para o Teu louvor.

À minha esposa, Carla Queiroz de Paula por acreditar em mim mais do que eu mesmo. Por me fazer enxergar em meio às dificuldades o melhor caminho. Por me orientar, incentivar, não me deixar desistir. Por me dar e me fazer encontrar forças onde já não havia mais. Por respeitar e dividir minhas dores e ansiedades. Por simplesmente me amar.

Aos meus pais, Ernesto e Gisele de Paula pelas orações, incentivo, preocupações e por terem participado de tudo e contribuído com todo apoio emocional. Fico feliz e emocionado em deixá-los orgulhosos da minha trajetória profissional. Aos meus irmãos Rodrigo e Fernando de Paula por todo amor, carinho, respeito e parceria.

Ao meu amado Sogri (*in memoriam*), por ter vivido de perto e intensamente a reta final do meu doutorado. Obrigado por seu carinho, cuidado e zelo. Jamais me esquecerei dos mimos que o sr. me fazia na tentativa de minimizar minha dor e sofrimento quando todas as minhas energias haviam se exaurido. Te amo.

Aos meus irmãos em Cristo Jesus por todas as orações, sustento e suporte espiritual. Agradeço por me amarem assim como Jesus me amou e por não terem desistido de mim.

À minha querida amiga Marina Firmino, uma pessoa que chegou em minha vida pela porta do trabalho há mais de 10 anos e de uma forma totalmente despretensiosa, mas que ficou e ganhou um espaço precioso em meu coração. Muito obrigado por ser meu braço direito durante longos anos de luta em que



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana (PPGBM)

formamos juntos, profissionais farmacêuticos com ética, profissionalismo, rigor e qualidade. Obrigado por compartilhar experiências e dores inerentes ao processo de doutoramento. Agradeço ainda por todas as dicas, sugestões e verdadeiras aulas. Sua simplicidade e compaixão tornaram o processo mais leve.

À minha orientadora, Profa. Dra. Tatiana Amabile de Campos. O próprio nome (Amabile) faz jus e resume quem és, uma pessoa doce, amável, querida, que transmite bondade, carisma e afeto. Um privilégio enorme ter sido orientando da sra. e ter aprendido tanto, do mais simples conceito à temida biologia molecular. Obrigado por ter sido meu porto seguro durante a pandemia da COVID-19, poucos fariam o que a sra. fez por mim e minha família. Sou grato por toda compreensão e apoio, pois na dor, a sra. demonstrou ser a mais incrível e humana entre os seres humanos. Levarei a sra. em meu coração e ainda realizarei o sonho de trabalharmos juntos.

Aos Professores Marco Antonio Alves Cunha e Glória Maria Viana de Andrade. Os senhores são queridos amigos que a medicina me concedeu. Meus pediatras favoritos, com um vasto conhecimento, sabedoria e discernimento sobre a ciência e sobre a vida. Obrigado por me ajudarem tanto, por compartilharem conhecimentos e conselhos valiosos, por me co-orientarem durante esse trabalho a partir de suas experiências vividas durante a epidemia de coqueluche no Distrito Federal e também enquanto médicos pediatras e infectologistas. Um agradecimento especial ao Prof. Marco Antonio, um chefe que se tornou um amigo mais chegado que um irmão, um segundo pai, um homem de valor, de honra, de garra e de muita fibra. Mas também extremamente respeitoso, amável e que se doa ao próximo incondicionalmente. Agradeço por dividir o ofício diário da coordenação do curso de medicina, por me compreender, ouvir e ajudar na rotina, mas principalmente por me acolher, me ensinar, me acalmar e me ajudar com as análises estatísticas.

Ao UNICEPLAC, na figura da Reitora Profa. Kelly Santiago, uma amiga que a vida me deu há quase 15 anos e que Deus colocou em meu caminho para ressignificar minha vida profissional em um momento de extrema fragilidade e necessidade. Agradeço pela oportunidade e confiança em meu trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana, do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília por todo apoio acadêmico e administrativo durante o processo de doutoramento. Agradeço aos membros avaliadores da banca



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana (PPGBM)

de qualificação, os Professores Doutores Bruna Fuga Araújo, Ana Flávia Alves Parente e Gerson Nakazato, por todas as considerações e sugestões que contribuíram para a melhoria da qualidade desta tese.

Ao Instituto Adolfo Lutz, por disponibilizar a sorotipagem dos isolados de *Bordetella pertussis* circulantes no Distrito Federal.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal, por disponibilizar os isolados de *Bordetella pertussis*.

À Embrapa Cenargen, por realizar o sequenciamento genético dos genes *fim 3* e *ptx* dos isolados de *Bordetella pertussis*.

Aos colegas do Laboratório de Análise Molecular de Patógenos da Universidade de Brasília – LAMP, por todo apoio na parte experimental. Agradeço especialmente à minha querida colega e Professora Rayane Sarafim, por ter iniciado as pesquisas que resultaram nesta tese. Muito obrigado por tudo e principalmente pelo auxílio nas análises genômicas.

À todos que participaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e para a conquista deste título, meu muito obrigado.



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana (PPGBM)

## **EPÍGRAFE**

"Escrever não é como pintar, onde se acrescenta.  
Não é o que se põe na tela que o leitor vê.  
Escrever é mais como a escultura, onde se remove,  
se elimina para tornar o trabalho mais visível.  
Até as páginas removidas de certa forma permanecem."  
ELIE WIESEL (1928-2016)





Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana (PPGBM)

## RESUMO

A coqueluche é uma doença infecciosa do trato respiratório causada pela bactéria *Bordetella pertussis*, havendo um surto no Distrito Federal em 2014. A seleção de linhagens com epítomos diferentes das cepas vacinais é uma das hipóteses para explicar o surgimento de casos novos da doença. As fímbrias e a toxina pertussis são consideradas primordiais para a patogênese da coqueluche. O gene que coordena a expressão das fímbrias é o *fim3*. O promotor *ptxP* é responsável pela expressão do gene *ptx*, codificador da toxina PT. O objetivo deste trabalho foi identificar o perfil genotípico das linhagens de *B. pertussis* circulantes no Distrito Federal e entorno, entre 2012 e 2018 em relação aos genes *fim3* e *ptx* por tipagem molecular. Após o cultivo, extração do DNA e amplificação por PCR, realizou-se o sequenciamento dos genes *fim3* e *ptx* e finalmente a variação alélica foi identificada por MAST. Foi encontrada uma maior frequência do alelo de pouca distribuição mundial *fim3-24*, sendo este diferente da cepa vacinal, o alelo *fim3-1*. Além disso, foi identificada uma mudança de padrão alélico fimbrial durante o período de 2012 a 2014, sendo o *fim3-24* o predominante a partir de 2014, época essa da epidemia de coqueluche no DF. Todas as linhagens apresentaram o alelo do tipo *ptxP-3* e desse modo, diferiram da vacinal, que possui alelo *ptxP-2*. A presença de *ptxP-3* pode ter contribuído para o sucesso na colonização do hospedeiro pelos patógenos analisados, pois linhagens portadoras deste alelo apresentam maior virulência. Os dados indicaram também que o surto em 2014 no DF pode ter ocorrido com influência de *ptxP-3* visto que grande parte das mesmas amostras apresentaram seleção de alelos diferentes do vacinal também para o gene *fim3*. Logo, os dois genes podem ter contribuído no sucesso na circulação das bactérias na população do Distrito Federal. Em sua totalidade, os resultados sugerem a ocorrência de seleção de linhagens com perfil genético distinto da linhagem utilizada na vacina para a imunização de coqueluche no Brasil.

Palavras-chave: coqueluche; genes *fim3* e *ptx*; vacina; epidemia; tipagem molecular.



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana (PPGBM)

## ABSTRACT

Pertussis is an infectious disease of the respiratory tract caused by the bacterium *Bordetella pertussis*, with an outbreak in the Federal District in 2014. The selection of strains with epitopes different from the vaccine strains is one of the hypotheses to explain the emergence of new cases of the disease. Fimbriae and pertussis toxin are considered essential for the pathogenesis of pertussis. The gene that coordinates the expression of fimbriae is *fim3*. The *ptxP* promoter is responsible for the expression of the *ptx* gene, encoding the PT toxin. The objective of this work was to identify the genotypic profile of *B. pertussis* strains circulating in the Federal District and surrounding areas, between 2012 and 2018 in relation to the *fim3* and *ptx* genes by molecular typing. After cultivation, DNA extraction and PCR amplification, sequencing of the *fim3* and *ptx* genes was carried out and finally the allelic variation was identified by MAST. A higher frequency of the allele, which is not widely distributed worldwide, *fim3-24*, was found, which is different from the vaccine strain, the *fim3-1* allele. Furthermore, a change in the fimbrial allelic pattern was identified during the period from 2012 to 2014, with *fim3-24* being predominant from 2014 onwards, the period of the pertussis epidemic in the Federal District. All strains presented the *ptxP-3* type allele and thus differed from the vaccine strain, which has the *ptxP-2* allele. The presence of *ptxP-3* may have contributed to the successful colonization of the host by the pathogens analyzed, as strains carrying this allele present greater virulence. The data also indicated that the 2014 outbreak in the DF may have occurred with the influence of *ptxP-3* since a large part of the same samples presented selection of alleles different from the vaccine also for the *fim3* gene. Therefore, the two genes may have contributed to the successful circulation of bacteria in the population of the Federal District. In total, the results suggest the occurrence of selection of strains with a genetic profile different from the strain used in the vaccine for pertussis immunization in Brazil.

Keywords: whooping cough; *fim3* and *ptx* genes; vaccine; epidemic; molecular typing.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microscopia da <i>B. pertussis</i> .....	22
Figura 2 - Ágar Bordet-Gengou ou Regan-Lowe.....	22
Figura 3 - Fatores de virulência da <i>B. pertussis</i> .....	24
Figura 4 - Sistema regulatório BvgAS da <i>B. pertussis</i> .....	25
Figura 5 - BvgAS controla quatro classes de genes e três fases fenotípicas distintas..	26
Figura 6 - Estrutura quaternária da PT.....	28
Figura 7 - Imunomodulação via PT.....	28
Figura 8 - Estrutura da ACT.....	29
Figura 9 - Interação da ACT com a célula hospedeira.....	30
Figura 10 - Estrutura do injetossoma T3SS da <i>B. pertussis</i> .....	31
Figura 11 - Apresentação da hemaglutinina filamentosa da célula de <i>Bordetella sp.</i>	34
Figura 12 - Apresentação da fímbria da célula de <i>Bordetella sp.</i> .....	35
Figura 13 - Apresentação da pertactina da célula de <i>Bordetella sp.</i> .....	36
Figura 14 - Estrutura do lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas.....	37
Figura 15 - Representação esquemática das diferentes estruturas de LPS das espécies de <i>Bordetella sp.</i> .....	37
Figura 16 - Formação do biofilme - adesão bacteriana, maturação e dispersão.....	38
Figura 17 - Patogênese da coqueluche X resposta imune.....	39
Figura 18 - Casos notificados e incidência global da coqueluche - 1980 a 2022.....	43
Figura 19 - Cobertura vacinal completa contra coqueluche global X notificações entre 1980 a 2022.....	43
Figura 20 - Cobertura vacinal completa da vacina DTP3 a nível global, de países desenvolvidos e em desenvolvimento - 1980 a 2019.....	44
Figura 21 - Cobertura vacinal global da vacina DTP3 e por região da OMS, 1980 a 2019.....	45
Figura 22 - Crianças menores de 2 anos com vacinação completa, incompleta e não vacinadas com DTP, por região 1980 – 2019.....	46
Figura 23 - Casos notificados e incidência da coqueluche no Brasil - 1980 a 2022..	48
Figura 24 - Cobertura vacinal completa contra coqueluche no Brasil X notificações entre 1980 a 2022.....	48
Figura 25 - Casos confirmados no Distrito Federal notificados no SINAN entre 2001 e 2022.....	49
Figura 26 - Cobertura vacinal contra coqueluche no Distrito Federal entre 2001 e 2022.....	50
Figura 27 - Casos confirmados no DF notificados no SINAN entre 2012 e 2022.....	59
Figura 28 - Casos confirmados no Brasil, notificados ao SINAN entre 2013 e 2015.	60
Figura 29 - Distribuição no DF de casos notificados de infecção por <i>B. pertussis</i> por	



critério laboratorial por ano no SINAN.....	62
Figura 30 - Distribuição no DF de isolados de <i>B. pertussis</i> por ano – LACEN/DF....	62
Figura 31 - Regiões Administrativas do Distrito Federal.....	65
Figura 32 - Distribuição no DF de isolados de <i>B. pertussis</i> por Unidade de Saúde..	66
Figura 33 - Distribuição no DF de isolados de <i>B. pertussis</i> por faixa etária.....	67
Figura 34 - Distribuição no DF de isolados de <i>B. pertussis</i> por fases da vida.....	68
Figura 35 - Distribuição no DF de isolados de <i>B. pertussis</i> por gênero.....	70
Figura 36 - Distribuição no DF de sorotipos de isolados de <i>B. pertussis</i> .....	72
Figura 37 - Distribuição no DF de sorotipos de isolados de <i>B. pertussis</i> por Unidade de Saúde.....	73
Figura 38 - Distribuição no DF de sorotipos de isolados de <i>B. pertussis</i> por ano.....	74
Figura 39 - Sorotipos circulantes entre os 555 isolados de <i>B. pertussis</i> estudados no Brasil, 2010 a 2016.....	75
Figura 40 - Distribuição no DF de alelos 1, 3 e 24 do gene <i>fim3</i> de isolados de <i>B. pertussis</i> .....	78
Figura 41 - Distribuição no DF de alelos 1, 3 e 24 do gene <i>fim3</i> de isolados de <i>B. pertussis</i> por ano.....	79
Figura 42 - Distribuição no DF do alelo 3 do gene <i>ptx</i> de isolados de <i>B. pertussis</i> ...	81
Figura 43 - Distribuição no DF do alelo 3 do gene <i>ptx</i> de isolados de <i>B. pertussis</i> por ano.....	82



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana (PPGBM)

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Bordetella</i> e seus hospedeiros associados.....	22
Tabela 2 - Fatores de virulência de <i>B. pertussis</i> .....	23
Tabela 3 - <i>Primers</i> utilizados.....	56
Tabela 4 - Distribuições de isolados de <i>B. pertussis</i> – LACEN/DF versus SINAN.....	64
Tabela 5 - Relação entre o genótipo <i>ptx3</i> e <i>fim3</i> e os sorotipos de cepas isoladas de <i>B. pertussis</i> .....	84
Tabela 6 - Relação entre o genótipo <i>ptx3</i> e <i>fim3</i> e variáveis epidemiológicas.....	85



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana (PPGBM)

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilato ciclase
ACT	Toxina adenilato ciclase
AMP	Peptídeos antimicrobianos
aP	vacina acelular
BG	Agar Bordet-Gengou
<i>bipA</i>	Gene codificador de proteína da membrana plasmática externa
Bp137	Cepa 137 de <i>B. pertussis</i> utilizada pelo Instituto Butantan na fabricação de vacinas wP
<i>bsc</i>	Gene codificador de T3SS
BteA	Proteína efetora do sistema de secreção tipo III
Bvg <sup>-</sup>	Fase avirulenta
Bvg <sup>+</sup>	Fase virulenta
BvgA	Proteína reguladora
BvgAS	<i>Bordetella virulence genes</i>
<i>bvgAS</i>	Gene codificador de BvgAS
Bvg <sup>i</sup>	Fase intermediária
BvgR	Proteína que regula negativamente os genes <i>vrg</i>
BvgS	Cinase sensora
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CB	Centro de Bacteriologia
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CLRs	Centros de Laboratórios Regionais



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana (PPGBM)

CR3	receptor de complemento 3
CS Emas	REC Centro de Saúde Recanto das Emas
<i>cyaA-E</i>	Gene codificador de ACT
DATASUS	Departamento de informática do Sistema Único de Saúde do Brasil
DCs	Células dendríticas
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNT	Toxina dermonecrótica
DTP	Vacina contra difteria, tétano e coqueluche
DTP3	3 doses da vacina contra difteria, tétano e coqueluche
dTpa	Vacina acelular contra difteria, tétano e coqueluche
EUA	Estados Unidos da América
FHA	Hemaglutinina filamentosa
<i>fhaB</i>	Gene codificador de FHA
FhaC	proteína transportadora de hemaglutinina filamentosa
FIM	Fímbrias
<i>fim</i>	Gene codificador de FIM
Fim2	sorotipo fimbrial
<i>fim2</i>	gene codificador do sorotipo fimbrial Fim2
Fim3	sorotipo fimbrial
<i>fim3</i>	gene codificador do sorotipo fimbrial Fim3
fim3F	<i>primer</i> (5' – CCCCCGGACCTGATATTCTGATG)
fim3R	<i>primer</i> (5' – GCTGAGCGTGCTGAAGGACAAGAT)
FimB	subunidade fimbrial



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana (PPGBM)

<i>fimBCD</i>	operon codificador das subunidades fimbriais FimB, FimC e FimD
FimC	subunidade fimbrial
FimD	subunidade fimbrial
HB	Hospital de Base de Brasília
HFA	Hospital das Forças Armadas
HK	Domínio histidina cinase
HMIB	Hospital Materno Infantil de Brasília
Hpt	Domínio histidina fosfotransferase
HRAN	Hospital Regional da Asa Norte
HRC	Hospital Regional de Ceilândia
HRG	Hospital Regional do Gama
HRGU	Hospital Regional do Guará
HRPL	Hospital Regional de Planaltina
HRS	Hospital Regional de Sobradinho
HRSAM	Hospital Regional de Samambaia
HRSM	Hospital Regional de Santa Maria
HRT	HRT: Hospital Regional de Taguatinga
HTH	Domínio hélice-volta-hélice
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LACEN-DF	Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal
LAMP	Laboratório de Análise Molecular de Patógenos
LOS	Lipo-oligossacarídeo
LPS	Lipopolissacarídeos





**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana (PPGBM)

MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry
MAST	do inglês: Multi-Locus Antigen Sequence Typing
MCD	domínio terminal-C maduro da proteína FHA
NO	Óxido nítrico
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNI	Programa Nacional de Imunização
PRN	Pertactina
<i>prn</i>	Gene codificador de PRN
<i>PRN-AF</i>	<i>primer</i> (5' – GCCAATGTCACGGTCCAA)
<i>PRN-BR</i>	<i>primer</i> (5' – CGGATTCAGGCGCAACTC)
PT	Toxina pertussis
<i>ptx</i>	Toxina pertussis
<i>PTX-PF</i>	<i>primer</i> (5' – AATCGTCCTGCTCAACCGCC)
<i>PTX-PR</i>	<i>primer</i> (5' – GGTATACGGTGGCGGGAGGA)
<i>ptx-ptI</i>	Gene codificador de PT
<i>ptxA</i>	Gene que codifica a subunidade 1 da PT
<i>ptxP</i>	promotor do gene da toxina PT
<i>ptxS1</i>	primeiro gene do operon da toxina PT
<i>ptxS1F</i>	<i>primer</i> (5' – TCCTCCCGCCACCGTATACC)
<i>ptxS1R</i>	<i>primer</i> (5' – GTTCGGACCAGGCTGCCATG)
qPCR	PCR em tempo real
RAs	Regiões Administrativas
S1	Subunidade 1 da PT



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana (PPGBM)

SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNPs	polimorfismos de único nucleotídeo
STA Helena	Hospital Santa Helena
STA Lúcia	Hospital Santa Lúcia
T3SS	Sistema de secreção tipo III
TCT	Citotoxina traqueal
Th	Célula T auxiliares
TLR	Receptor do tipo toll
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
UnB	Universidade de Brasília
<i>vag loci</i>	Genes de virulência
VFT	Domínios N-terminal <i>venus flaytrap</i>
via TPS	via de secreção de dois parceiros
<i>vrg loci</i>	Genes de virulência reprimida
wP	vacina de célula inteira



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1 Breve histórico da coqueluche.....	21
1.2 Microbiologia das espécies de <i>Bordetella</i> .....	21
1.3 Fatores de virulência da <i>Bordetella pertussis</i> .....	23
1.3.1 Toxina pertussis.....	27
1.3.2 Toxina adenilato ciclase.....	29
1.3.3 Sistema de secreção tipo III.....	30
1.3.4 Citotoxina traqueal.....	32
1.3.5 Toxina dermonecrótica.....	32
1.3.6 Hemaglutinina filamentosa.....	33
1.3.7 Fímbrias.....	34
1.3.8 Pertactina.....	35
1.3.9 Lipopolissacarídeo.....	37
1.4 Patogênese de coqueluche.....	38
1.4.1 Imunidade inata e adaptativa.....	40
1.5 Manifestações Clínicas.....	41
1.5.1 Fase catarral.....	41
1.5.2 Fase paroxística.....	42
1.5.3 Fase convalescente.....	42
1.6 Epidemiologia Global e Cobertura Vacinal.....	42
1.7 Epidemiologia Brasil e Distrito Federal.....	47
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>51</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>52</b>
3.1 Objetivo geral.....	52
3.2 Objetivos específicos.....	52
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>53</b>
4.1 Coleta do material e obtenção das amostras.....	53
4.2 Identificação dos isolados de <i>B. pertussis</i> .....	53
4.3 Cultivo dos isolados de <i>B. pertussis</i> .....	54
4.4 Extração do DNA.....	54
4.5 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR de <i>fim3</i> e <i>ptx</i> .....	54
4.6 Sequenciamento dos genes <i>fim3</i> e <i>ptx</i> .....	55
4.7 Identificação dos genótipos por MAST.....	56
4.8 Sorotipagem dos isolados de <i>B. pertussis</i> .....	57
4.9 Análise da incidência e prevalência de <i>B. pertussis</i> no DF (SINAN).....	57
4.10 Aprovação por Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos.....	58



<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
5.1 Dados epidemiológicos.....	59
5.1.1 Descrição do aumento de incidência de coqueluche em 2014 no Distrito Federal, no Brasil e em outros países.....	59
5.1.2 Análise dos isolados bacterianos do LACEN e IAL.....	61
5.1.3 Perfil epidemiológico da coqueluche no Distrito Federal.....	64
5.1.4 Dados demográficos da coqueluche no Distrito Federal.....	66
5.1.5 Sorotipos de <i>B. pertussis</i> circulantes no Distrito Federal.....	70
5.2 Variabilidade alélica de <i>fim3</i> e <i>ptx</i> .....	76
5.2.1 Distribuição alélica de <i>fim3</i> .....	77
5.2.2 Distribuição alélica de <i>ptx</i> .....	80
5.2.3 Correlação entre genótipo <i>ptx3-fim3</i> com sorotipos de cepas isoladas de <i>B. pertussis</i> - LACEN/DF e as variáveis epidemiológicas.....	84
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>86</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>87</b>
<b>8 ANEXOS</b> .....	<b>101</b>
8.1 Anexo 1 – Casos de coqueluche confirmados notificados no SINAN.....	101
8.2 Anexo 2 – Confirmação da aprovação por CEP/CONEP - Plataforma Brasil.....	102
<b>9 APÊNDICES</b> .....	<b>103</b>
9.1 Apêndice 1 –Tabela com o extrato dos dados epidemiológicos e genotípicos dos isolados de <i>B. pertussis</i> .....	103
9.2 Apêndice 2 –Tabelas de contingência 2x2 usadas para verificar as associações e resultados brutos de <i>Odds Ratio</i> e Qui-quadrado.....	106
9.3 Apêndice 3 – Artigo da tese publicado.....	127

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Breve histórico da coqueluche

Historicamente conhecida como "tosse dos 100 dias", a coqueluche pertence ao nicho de doenças infecciosas que acometem o trato respiratório. É classificada como uma doença respiratória aguda grave, extremamente contagiosa causada pela bactéria *Bordetella pertussis*, descrita inicialmente durante a epidemia de Paris, em 1578 por Guillaume De Baillou (HOTEZ, 2019; KILGORE et al., 2016; NGUYEN; SIMON, 2018; NIEVES; HEININGER, 2016).

Os primeiros achados morfológicos da *Bordetella pertussis* ocorreram em 1883 descritos por Carl Burger, que identificou em uma amostra de escarro de um paciente diagnosticado clinicamente com coqueluche a presença de bactérias em forma de bastonetes. Posteriormente em 1900, Jules Bordet confirmou os achados de Burger (1883) ao buscar tratamento para sua filha de 5 meses diagnosticada com coqueluche e visualizar microscopicamente pequenos bacilos Gram-negativos no escarro. Bordet e Gengou (1906 apud CHERRY, 2015), pela primeira vez na história, conseguiram cultivar e isolar a *Bordetella pertussis* em 1906 (CHERRY, 2015; KILGORE et al., 2016).

### 1.2 Microbiologia das espécies de *Bordetella*

*Bordetella pertussis* é classificada morfológicamente como um cocobacilo Gram-negativo pleomórfico (figura 1), que apresenta ótimo crescimento em condições de aerobiose, em temperatura mesofílica de 35°C +/- 2°C em meio de cultivo ágar Bordet-Gengou ou Regan-Lowe (figura 2) (PROCOP et al., 2018).

Atualmente existem 10 espécies de *Bordetella* descritas e classificadas na família *Alcaligenaceae* (*B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. parapertussis* associada a bovinos, *B. brochiseptica*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. petri*, e *B. ansorpii*). Todas as espécies são geneticamente distintas e associadas a diferentes hospedeiros, conforme a tabela 1 (KILGORE et al., 2016; LEBER, 2014; PROCOP et al., 2018).

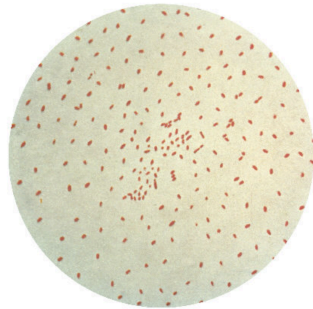


Figura 1 - Microscopia da *B. pertussis*  
Fonte: (MADIGAN et al., 2016)

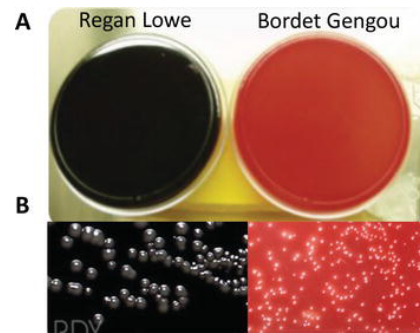


Figura 2 - Ágar Bordet-Gengou ou Regan-Lowe  
Fonte: (HOZBOR, 2018)

**Tabela 1** - Espécies de *Bordetella* e seus hospedeiros associados

Espécies de <i>Bordetella</i>	Hospedeiros associados
<i>B. pertussis</i>	Apenas humanos
<i>B. parapertussis</i>	Humano, ovelha, cabra, porco
<i>B. parapertussis</i> associada a Bovinos	Gado
<i>B. bronchiseptica</i>	Humano, porco, gato, cachorro, coelho
<i>B. avium</i>	Humano, pássaro
<i>B. hinzii</i>	Humano, pássaro
<i>B. holmesii</i>	Humano
<i>B. trematum</i>	Humano
<i>B. petrii</i>	Humano
<i>B. ansorpii</i>	Humano

Fonte: Adaptado de (KILGORE et al., 2016)

A espécie *B. pertussis* é o principal agente causador da coqueluche, porém, não é o único. Há relatos na literatura de outras espécies como a *B. parapertussis* e *B. holmesii*, que podem causar sintomas de tosse semelhantes à coqueluche (MOOI et al., 2012; NIEVES; HEININGER, 2016).

Entretanto, a diferenciação entre as espécies se dá a partir das características fenotípicas e de seu crescimento. São bactérias imóveis, fastidiosas e inativas na maioria das provas bioquímicas. A *B. pertussis* é catalase e oxidase positiva, enquanto que a *B. parapertussis* é menos fastidiosa, oxidase negativa, urease positiva e expressa uma pigmentação marrom quando cultivada em meio Regan-Lowe ou Mueller-Hinton (LEBER, 2014; PROCOP et al., 2018).

*B. holmesii* pode ser diferenciada das demais espécies por não produzir hemólise no meio de cultura com sangue de carneiro como as outras duas, além de não ser fastidiosa e crescer em meios rotineiros de laboratórios clínicos, bem como também serem produtoras da pigmentação marrom como a *B. parapertussis* (PITTET; POSFAY-BARBE, 2016).

### 1.3 Fatores de virulência da *Bordetella pertussis*

A patogênese da coqueluche é resultante de uma gama de fatores de virulência da *B. pertussis* que interagem de maneira coordenada desde a colonização, até a infecção do paciente, sob controle de um sistema de regulação que controla a expressão desses fatores de virulência em resposta ao ambiente. Dentre os diversos fatores de virulência descritos na tabela 2 e figura 3, destacam-se **toxinas**, **estruturas celulares de superfície (adesinas)** e **proteínas metabólicas** (OLIVEIRA, 2018; PINTO; MERKEL, 2017).

**Tabela 2** - Fatores de virulência de *B. pertussis*

Toxinas	Adesinas	Proteínas metabólicas
Toxina pertussis (PT)	Fímbrias (FIM),	BrkA
Toxina adenilato ciclase (ACT)	Hemaglutinina filamentosa (FHA)	BapC
Toxina dermonecrótica (DNT)	Pertactina (PRN)	BatB
Citotoxina traqueal (TCT)	Lipo-oligossacarídeos (LOS)	
	Sistema de secreção tipo III (T3SS)	

Fonte: Adaptado de (GUIISO, 2015).

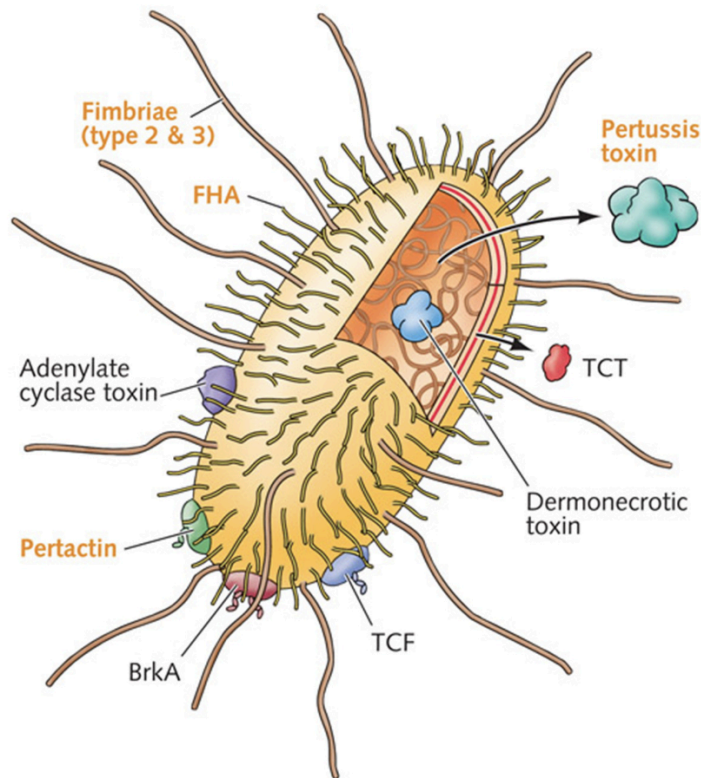


Figura 3 - Fatores de virulência da *B. pertussis*  
 Fonte: (LOFTUS, 2018)

As toxinas compreendem, a toxina pertussis (PT), toxina adenilato ciclase (ACT), toxina dermonecrotica (DNT) e citotoxina traqueal (TCT). Dentre as estruturas celulares de superfície, existem as fímbrias (FIM), hemaglutinina filamentososa (FHA), pertactina (PRN), lipo-oligossacarídeos (LOS) e sistema de secreção tipo III (T3SS). Já dentre as proteínas metabólicas, evidenciam-se a BrkA, BapC e BatB (BELCHER et al., 2021; KILGORE et al., 2016; NIEVES; HEININGER, 2016; OLIVEIRA, 2018; PINTO; MERKEL, 2017).

Os fatores de virulência da *B. pertussis* são transcritos em sua maioria a partir dos genes do locus BvgAS (*bordetella virulence genes*), um sistema regulatório composto por dois componentes (BvgA e o BvgS), responsáveis por controlar mais de 200 diferentes genes (BELCHER et al., 2021; CHEN; STIBITZ, 2019; DUPRÉ et al., 2015). BvgA é uma proteína reguladora de resposta típica que funciona como um ativador transcricional ligante de DNA. Possui um domínio receptor (Rec) e um domínio hélice-volta-hélice (HTH). BvgS é uma cinase sensora localizada no periplasma da *B. pertussis* contendo polidomínios: dois domínios N-terminal *venus flytrap* (VFT1 e VFT2), um domínio PAS localizada no interior da célula (citoplasma), um domínio histidina cinase (HK), um domínio receptor (Rec) e um



domínio histidina fosfotransferase (Hpt) conforme descrito na figura 4 (DECKER et al., 2012; MELVIN et al., 2014; OLIVEIRA, 2018).

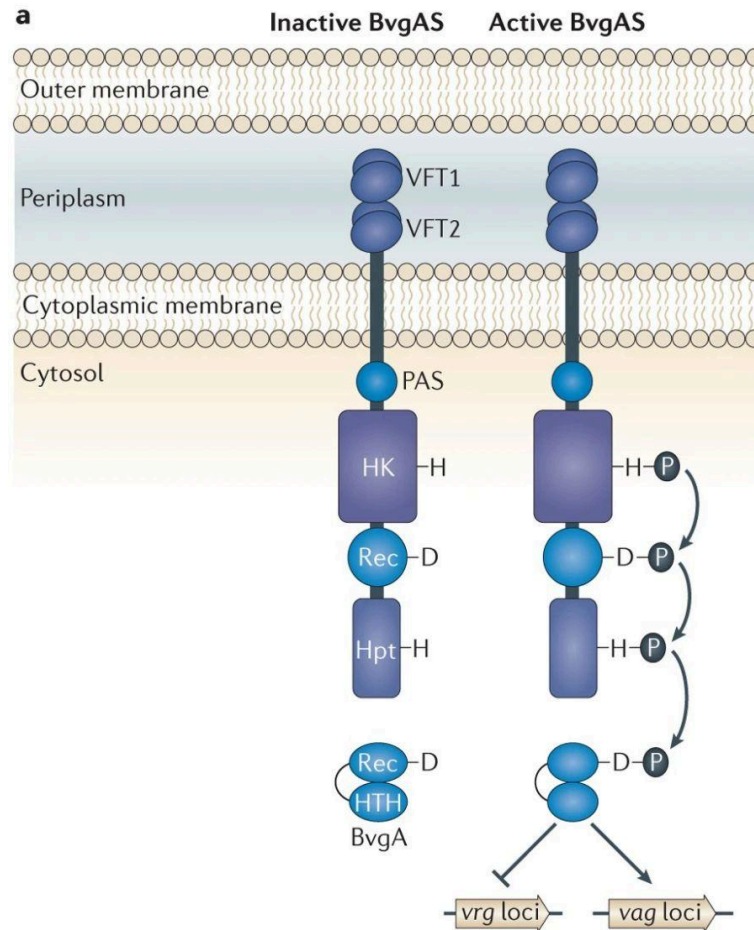


Figura 4 - Sistema regulatório BvgAS da *B. pertussis*  
Fonte: (MELVIN et al., 2014)

*B. pertussis* quando cultivada em meio de cultura padrão, a 37°C ativa o sistema regulatório BvgAS e utiliza ATP para autofosforilar a sensor cinase (BvgS). O processo inicia-se (figura 4) a partir da adição de fosfato à uma histidina conservada no domínio HK, retransmitindo-o para o domínio receptor, depois para uma histidina no domínio Hpt e finalmente para a proteína BvgA. Uma vez fosforilada, BvgA se ligará às sequências específicas de DNA para ativar a transcrição dos genes de virulência (*vag loci*) ou reprimir a transcrição dos genes que precisam ser reprimidos (*vrg loci*) a partir da proteína BvgR, que regula negativamente os genes *vrg* (MELVIN et al., 2014; MOON et al., 2017; OLIVEIRA, 2018).

Os genes regulados pelo sistema BvgAS pertencem a quatro classes que conferem três diferentes fases fenotípicas (figura 5). A classe 1 é composta pelos genes *operon ptx-ptl*, *cyaA-E* e o *operon bsc* que codificam respectivamente (PT, ACT e T3SS). A expressão máxima desses genes é conhecida como fase Bvg<sup>+</sup>, ou também fase virulenta, e se dá quando o BvgAS está totalmente ativo. Os genes da classe 2 incluem *fhaB*, *fim* e *bvgAS* que codificam FHA, FIM e o próprio BvgAS, respectivamente, todos expressos ao máximo nas fases Bvg<sup>+</sup> e intermediária (Bvg<sup>i</sup>). Os genes da classe 3 (*bipA*) codificam uma proteína da membrana plasmática externa da *B. pertussis*, porém, sua função ainda é desconhecida, sendo expressa ao máximo na fase Bvg<sup>i</sup>. Por fim, os genes da classe 4 conhecidos como genes de virulência reprimida (*vrg loci*) são expressos na fase Bvg<sup>-</sup>, também chamada de fase avirulenta e incluem genes responsáveis pela síntese de flagelos que conferem motilidade para *B. bronchiseptica* (BOULANGER et al., 2013; DORJI et al., 2018; MELVIN et al., 2014; NOVÁK et al., 2020; OLIVEIRA, 2018).

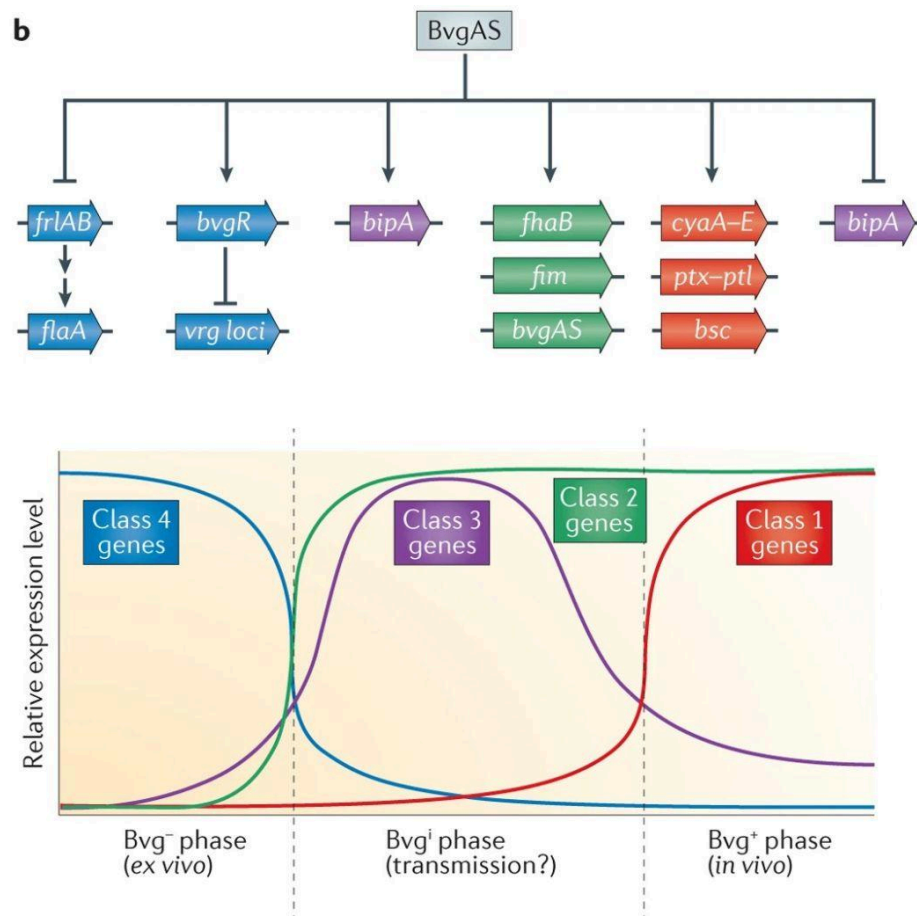


Figura 5 - BvgAS controla quatro classes de genes e três fases fenotípicas distintas  
Fonte: (MELVIN et al., 2014)

### 1.3.1 Toxina pertussis

A interação patógeno-hospedeiro é imunomodulada pelos fatores de virulência da *B. pertussis*, principalmente pelas adesinas e toxinas (BELCHER et al., 2021). A PT foi um dos primeiros fatores de virulência de *B. pertussis* descritos e caracterizados pela literatura como um dos principais responsáveis pela patogênese da coqueluche ao induzir linfocitose em seus hospedeiros (MORSE; MORSE, 1976; PITTMAN, 1984). Porém, já está elucidado que o mecanismo patogênico da *B. pertussis* é resultante da ação conjunta dos seus fatores de virulência (LOCHT; ANTOINE; JACOB-DUBUISSON, 2001).

A PT contém domínios A e B em sua estrutura com diferentes funções, pertencente à classe AB de toxinas. O domínio A é composto por uma subunidade (S1) responsável pela atividade catalítica da toxina e o domínio B é formado por um pentâmero de cinco subunidades (S2, S3, S4 e S5), responsável pela ligação às superfícies celulares. Portanto, a PT é uma holotoxina do tipo AB<sub>5</sub> de ADP-ribosilação (figura 6) (BELCHER et al., 2021; MELVIN et al., 2014; OLIVEIRA, 2018; STEIN et al., 1994).

A holotoxina PT é capaz de ligar-se a quaisquer glicoproteínas de membrana. Após a ligação da PT em seu receptor (sialoglicoproteína), ocorre sua entrada no interior da célula hospedeira via endocitose, em direção ao complexo de Golgi pela via transportadora endocítica e posteriormente para o retículo endoplasmático (RE) (figura 7). A subunidade A sai do RE e no citoplasma catalisa a transferência de ADP-ribose de NAD<sup>+</sup> a proteínas G inibitórias. A modificação da proteína G elimina a sua função inibitória de inibir a atividade da adenilato ciclase, resultando em níveis aumentados de AMP cíclico (cAMP) na célula e conseqüentemente no bloqueio de outras enzimas e vias reguladas pela proteína G, ocasionando na desregulação da resposta imune (BELCHER et al., 2021; EL BAYÂ; BRÜCKENER; SCHMIDT, 1999; LOCHT; COUTTE; MIELCAREK, 2011; MELVIN et al., 2014; OLIVEIRA, 2018).

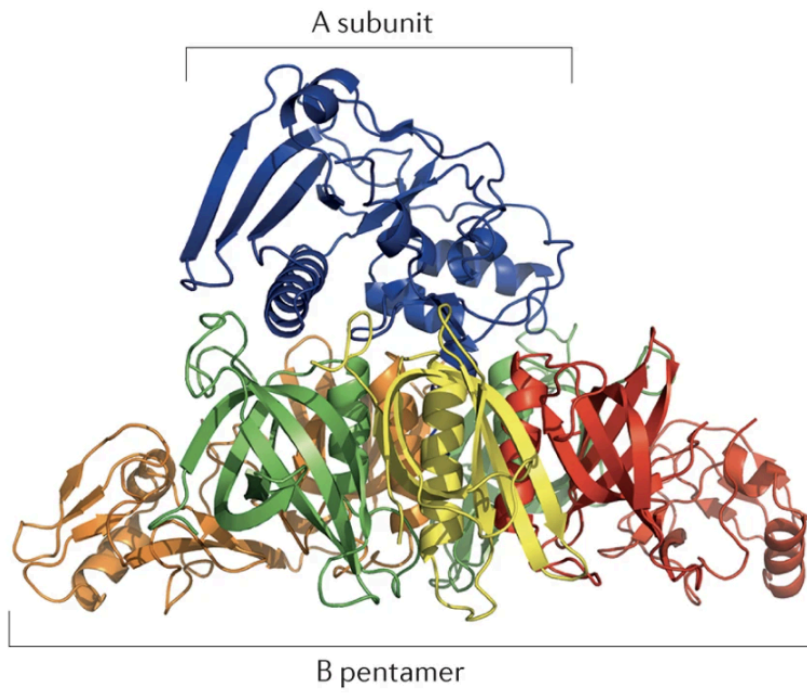


Figura 6 - Estrutura quaternária da PT  
 Fonte: (MELVIN et al., 2014)

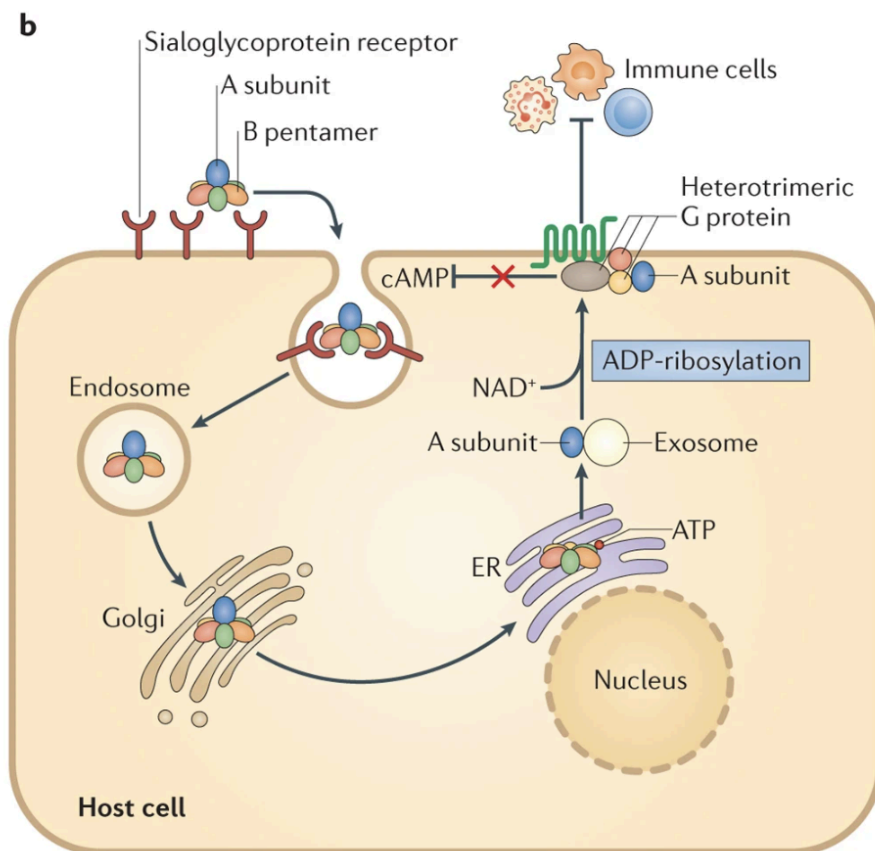


Figura 7 - Imunomodulação via PT  
 Fonte: (MELVIN et al., 2014)

### 1.3.2 Toxina adenilato ciclase

A ACT é uma proteína altamente imunogênica, pertencente à família das toxinas RTX (*repeats in toxin*). As RTX são compostas por repetições de domínios de unidade, o que confere à proteína sua estrutura característica, sendo responsável por vários aspectos da patogênese da coqueluche (MELVIN et al., 2014; NOVAK et al., 2017; VOJTOVA; KAMANOVA; SEBO, 2006).

A estrutura da ACT (figura 8) apresenta dois módulos funcionais, um domínio amino C-terminal de adenilato ciclase (AC), que contém as repetições de RTX, composto aproximadamente por 400 aminoácidos, responsável pela ligação à célula alvo, e um domínio N-terminal adenilato ciclase que converte ATP em cAMP (adenosina monofosfato cíclico, ou AMP cíclico). Os domínios são interligados por segmentos hidrofóbicos (BAUCHE et al., 2006; CARBONETTI, 2010; MELVIN et al., 2014; OLIVEIRA, 2018).

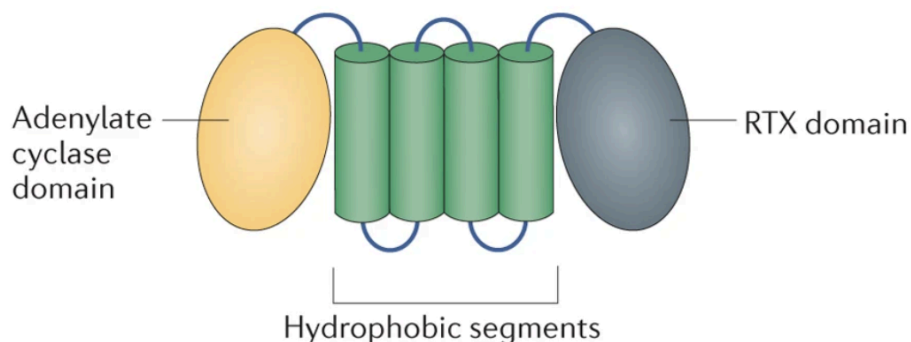


Figura 8 - Estrutura da ACT  
Fonte: (MELVIN et al., 2014)

O mecanismo de interação entre a ACT e a célula hospedeira se dá pelo reconhecimento da ACT pelo receptor de complemento 3 (CR3), expresso na membrana plasmática de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (figura 9). Poros seletivos para cátions são formados na membrana plasmática da célula hospedeira pelos segmentos hidrofóbicos da ACT, o que permite a translocação do domínio AC para interior da célula pela ligação à calmodulina - uma proteína citosólica responsável por catalisar a síntese de cAMP a partir do ATP intracelular (CARBONETTI, 2010; GUERMONPREZ et al., 2001; GUIZO, 2017; MELVIN et al., 2014).

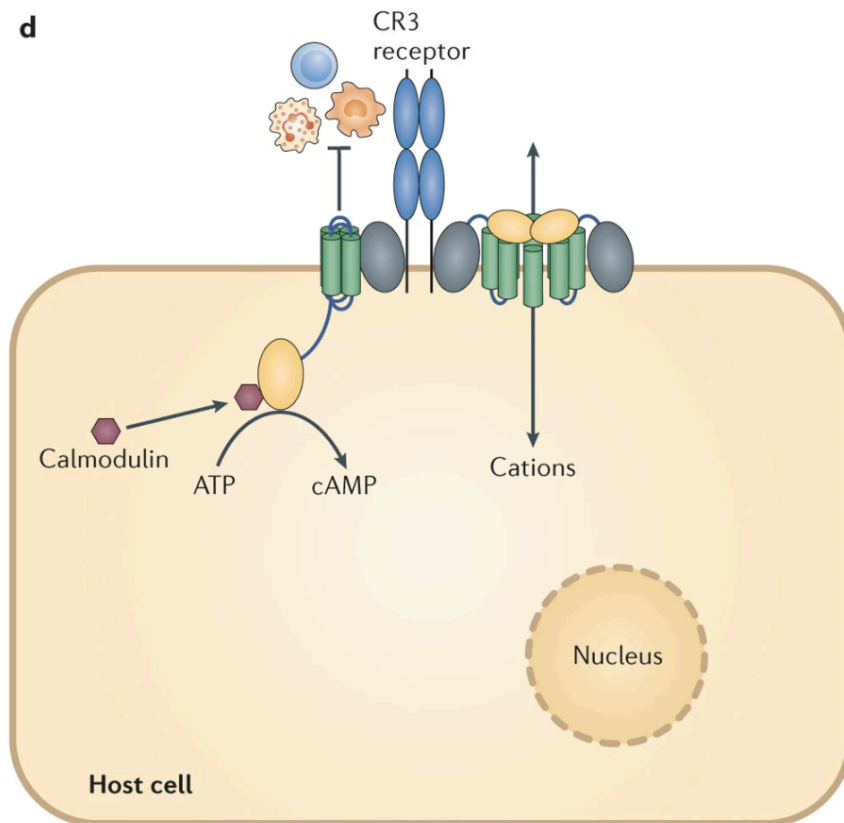


Figura 9 - Interação da ACT com a célula hospedeira  
Fonte: (MELVIN et al., 2014)

Portanto, a atividade da adenilato ciclase promove o aumento na produção de cAMP pela célula hospedeira, interrompendo as vias de sinalização celular. A combinação de efeitos da intoxicação por ACT e a formação de poros na membrana, resultam na virulência da *B. pertussis*, visto que a bactéria será capaz de inibir a fagocitose dependente do complemento, induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias e suprimir citocinas pró-inflamatórias, além de inibir o recrutamento de outras células do sistema imunológico (CARBONETTI, 2010; GUO et al., 2005; KAMANOVA et al., 2008; NOVAK et al., 2017).

### 1.3.3 Sistema de secreção tipo III

O T3SS, está presente em muitas bactérias, sendo altamente conservado em Gram-negativas (HUECK, 1998). O T3SS da *B. pertussis* é extremamente evoluído e muito se assemelha a uma agulha (figura 10), presente na superfície externa da célula bacteriana. Possui primordial participação na patogenicidade da *B. pertussis*, pois atua como uma nanomáquina de injeção de proteínas de virulência

(injetossoma), consideradas efetoras, do interior da célula bacteriana para o interior da célula hospedeira por meio de um conduto que abrange as duas membranas bacterianas e a membrana plasmática da célula-alvo (KAMANOVA, 2020; KUWAE et al., 2006, 2016; NOTTI; STEBBINS, 2016; RADICS; KÖNIGSMAIER; MARLOVITS, 2014).

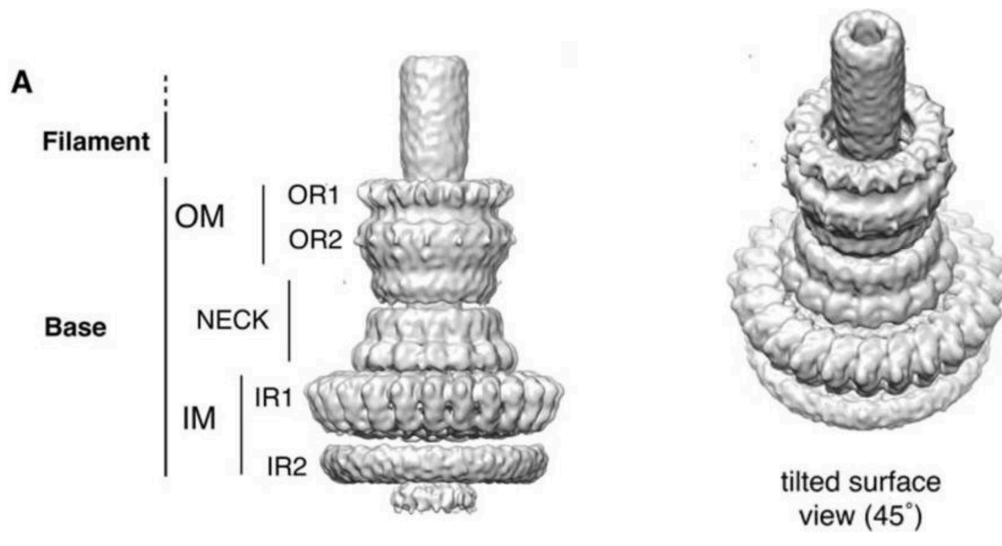


Figura 10 - Estrutura do injetossoma T3SS da *B. pertussis*  
Fonte: (GALÁN et al., 2014)

Dentre as proteínas efetoras do T3SS da *Bordetella pertussis*, quatro foram inicialmente descritas (BopB, BopD, BopN e Bsp22) (KUWAE et al., 2003; YUK et al., 2000). BopB e BopD formam poros na membrana plasmática da célula hospedeira como um canal de efetores. BteA, também conhecido como BopC, é um dos efetores do T3SS *B. bronchiseptica* e demonstrou causar necrose de certos tipos de células *in vitro* (KUWAE et al., 2006). Um estudo mais recente realizado com *B. bronchiseptica* demonstrou a ação do BteA nos mecanismos de sinalização do citoesqueleto de actina, induzindo necrose de certos tipos de células, mas também a inibição da fagocitose por macrófagos (KUWAE et al., 2016).

Em *B. pertussis*, uma substituição específica de aminoácidos na proteína BteA parece diminuir sua citotoxicidade (BAYRAM et al., 2020). BopN, foi relatado como sendo necessário para a citotoxicidade de BteA em certas linhagens de células epiteliais (ABE; NISHIMURA; KUWAE, 2017; BELCHER et al., 2021).

#### 1.3.4 Citotoxina traqueal

A TCT é um carboidrato monômero dissacarídeo-tetrapeptídeo presente na parede celular da *B. pertussis*, produzida durante a remodelação do peptidoglicano (COOKSON; TYLER; GOLDMAN, 1989). Muitas bactérias Gram-negativas são capazes de reciclar a TCT pela permease AmpG presente no citoplasma, com exceção da *B. pertussis* que apresenta ineficiência nesse processo devido a defeitos na AmpG e acaba por liberar grande quantidade de TCT no periplasma bacteriano, com posterior liberação para o meio extracelular (HEISS et al., 1993; KESSIE et al., 2020; PARK, 2001; UEHARA; PARK, 2004).

O alto teor de TCT sérico atua sinergicamente com as LPS, sendo capaz de induzir uma resposta pró-inflamatória a partir de citocinas e interleucinas (como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) no hospedeiro e superexpressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), resultando no dano tecidual das células ciliadas do trato respiratório superior. Vale lembrar que dentre os diversos fatores de virulência da *B. pertussis*, a TCT é o único fator não regulado pelo sistema BvgAS (FLAK; GOLDMAN, 1999; KESSIE et al., 2020; MELVIN et al., 2014).

#### 1.3.5 Toxina dermonecrótica

A DNT é um polipeptídeo de cadeia simples de 1.464 aminoácidos. A região responsável pela ligação da toxina à superfície celular das células-alvo é a região N-terminal, composta por 30 aminoácidos (FUKUI-MIYAZAKI et al., 2011; KASHIMOTO et al., 1999).

A região C-terminal composta por aproximadamente 300 aminoácidos possui um domínio enzimaticamente ativo com atividade de transglutaminase que ativa as pequenas GTPases da família Rho, por meio da desamidação ou poliaminação. As GTPases são essenciais para diversas funções celulares como mobilidade celular, transcrição e reorganização do citoesqueleto, indicando que ela age diretamente na célula hospedeira (BELCHER et al., 2021; MASUDA et al., 2000; TERUYA et al., 2020).

Entretanto, pouco se sabe sobre o papel biológico da DNT na patogênese da coqueluche, visto que a toxina não é secretada, porém, permanece no citoplasma da *B. pertussis*. O nome dermonecrótico deu-se visto que a toxina detinha a capacidade



de induzir lesões necróticas nos tecidos de cobaias experimentais e animais de laboratório (COWELL; HEWLETT; MANCLARK, 1979; KASHIMOTO et al., 1999; MATSUZAWA et al., 2002; MELVIN et al., 2014).

### 1.3.6 Hemaglutinina filamentosa

A FHA é uma proteína de adesão da *B. pertussis* presente na superfície da membrana plasmática da célula bacteriana e sua principal função é garantir a adesão da *B. pertussis* nas células do trato respiratório do hospedeiro. A FHA é uma proteína grande, filamentosa, longa e fina, em forma de bastonete que associada à proteína transportadora de FHA denominada FhaC, funciona como um membro protótipo da via de secreção de dois parceiros (via TPS) (BELCHER et al., 2021; CLANTIN et al., 2004; GUÉDIN et al., 1998; LEO; GRIN; LINKE, 2012; MELVIN et al., 2014).

A FHA é sintetizada inicialmente como uma proteína precursora de aproximadamente 370 kDa denominada FhaB, que passa por um processamento de remoção do pró-domínio carboxi-terminal (identificado em amarelo na figura 11) para produzir a proteína madura FHA de 250 kDa, sendo posteriormente transportada até a membrana externa da *B. pertussis* pela FhaC. O domínio maduro da FHA classificado como MCD, é o responsável pela especificidade da função de adesão da *B. pertussis* a células epiteliais ciliadas e pela persistência durante a infecção, possivelmente participando da modulação direta ou indireta do sistema imunológico do hospedeiro (DE GOUW et al., 2011; JACOB-DUBUISSON; LOCHT; ANTOINE, 2001; MAZAR; COTTER, 2006, 2007; MELVIN et al., 2014).

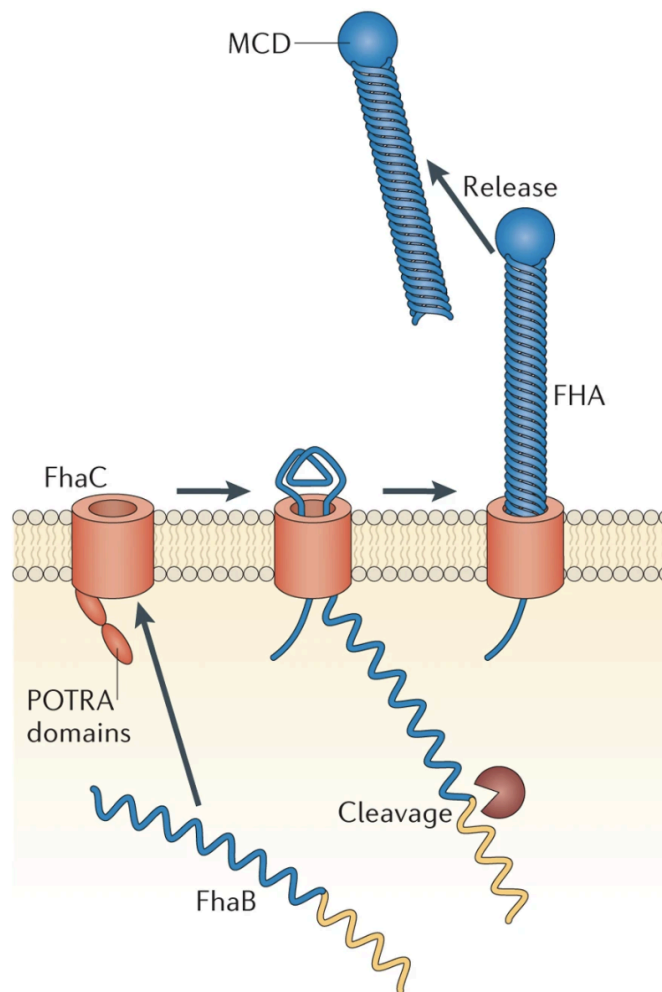


Figura 11 - Apresentação da hemaglutinina filamentososa da célula de *Bordetella* sp.  
Fonte: (MELVIN et al., 2014)

### 1.3.7 Fímbrias

O gênero *Bordetella* é capaz de produzir pili do tipo I, também conhecidos como fímbrias, que estão envolvidas na adesão às células ciliadas e na modulação da resposta imune do hospedeiro. A espécie *pertussis* é capaz de produzir dois sorotipos fimbriais distintos (Fim2 e Fim3), codificados pelos genes *fim2* e *fim3*. As fímbrias são organizadas em subunidades (FimB, FimC e FimD) e codificadas pelo operon *fimBCD* (BELCHER et al., 2021; EDWARDS; GROATHOUSE; BOITANO, 2005; MELVIN et al., 2014; WILLEMS; VAN DER HEIDE; MOOI, 1992).

A subunidade FimB é uma proteína do tipo chaperona que auxilia na montagem das fímbrias Fim2 e Fim3 com a participação da subunidade FimC que é por sua vez, uma proteína do tipo usher, ou seja, uma proteína de membrana responsável por transpor as fímbrias para a superfície da célula bacteriana. FimD é

a subunidade da fímbria localizada na extremidade com as propriedades de adesina propriamente dita (figura 12) (BELCHER et al., 2021; CARBONETTI, 2010, 2016; GUEVARA et al., 2016; SCHELLER et al., 2015).

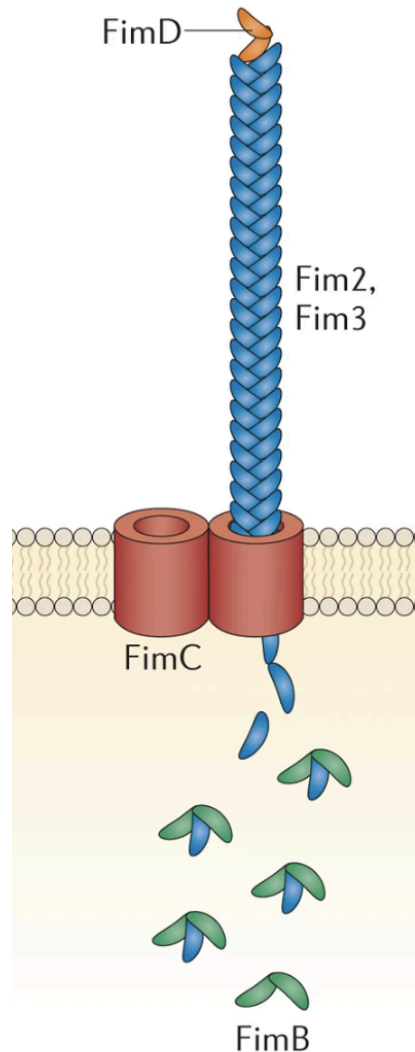


Figura 12 - Apresentação da fímbria da célula de *Bordetella sp.*  
Fonte: (MELVIN et al., 2014)

### 1.3.8 Pertactina

A PRN é um tipo de proteína transmembrana autotransportadora da *B. pertussis*. Os autotransportadores são compostos por uma única cadeia polipeptídica que contém um domínio N-terminal de transporte e um domínio C-terminal que fica exposto na superfície celular conforme representado na figura 13

(EDWARDS; GROATHOUSE; BOITANO, 2005; HENDERSON et al., 2004; LEO; GRIN; LINKE, 2012).

O domínio de transporte é responsável por guiar a proteína através da membrana bacteriana, enquanto o domínio exposto na superfície celular é responsável por exercer sua função biológica, que no caso da pertactina é a adesão ao epitélio respiratório ciliado do hospedeiro. O papel exato da PRN na patogênese da *Bordetella* ainda parece ser desconhecido, entretanto, na espécie *bronchiseptica* está relacionada a resistência a depuração mediada por neutrófilos e na promoção da persistência no trato respiratório inferior (INATSUKA et al., 2010; JUNKER; BESINGI; CLARK, 2009; NICHOLSON; BROCKMEIER; LOVING, 2009).

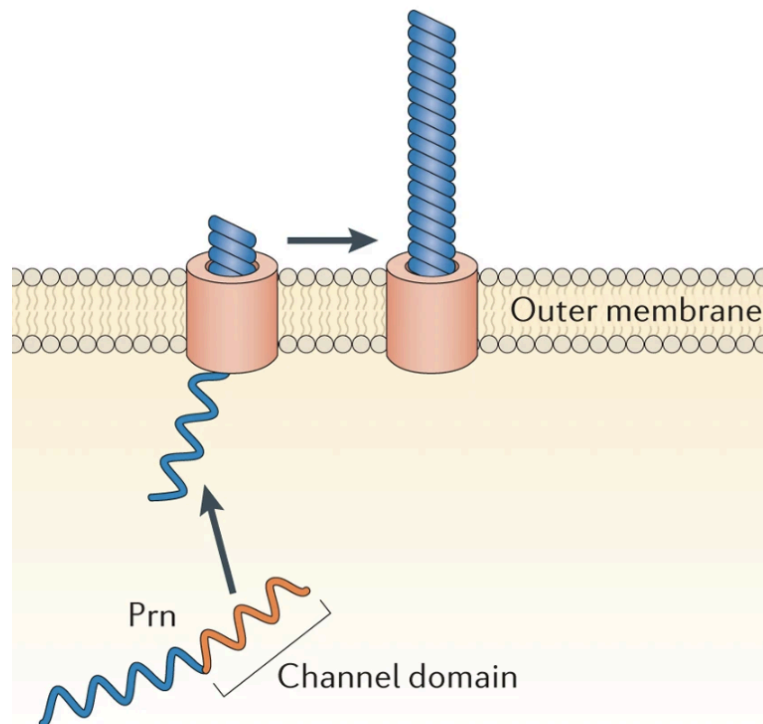


Figura 13 - Apresentação da pertactina da célula de *Bordetella sp.*  
Fonte: (MELVIN et al., 2014)

### 1.3.9 Lipopolissacarídeo

Os LPS são classificados como endotoxinas bacterianas e as principais estruturas que compõem a membrana externa das bactérias Gram-negativas. Estruturalmente são constituídas por três partes: o Lipídio A, o núcleo ou cerne oligossacarídeo e a cadeia polissacarídica O, ou antígeno O (figura 14) (CAROFF; KARIBIAN, 2003; NOVIKOV; MARR; CAROFF, 2019).

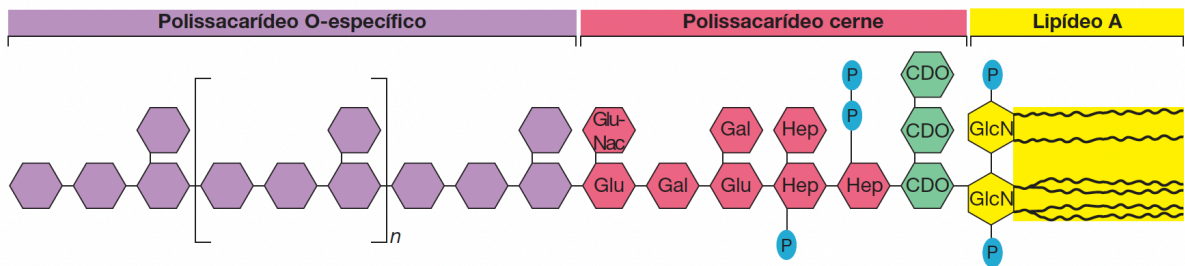


Figura 14 - Estrutura do lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas.  
Fonte: (MADIGAN et al., 2016)

Os LPS são diferentes entre as espécies de *Bordetella*. *B. pertussis* produz um lipídio A penta-acilado que está ligado a um trissacarídeo de núcleo complexo (figura 15). *B. bronchiseptica* produz um lipídio A hexa-acilado que está ligado a um trissacarídeo de núcleo complexo semelhante, e repetições de antígeno O. *B. parapertussis* de humanos produz um lipídio A hexa-acilado que está ligado a uma estrutura central alterada e repetições de antígeno O. Por não apresentar as repetições de Antígeno-O, LPS de *B. pertussis* é também conhecido como lipo-oligossacarídeo (LOS) (MELVIN et al., 2014; OLIVEIRA, 2018; PRESTON et al., 1999, 2006; SPERANDEO; MARTORANA; POLISSI, 2017).

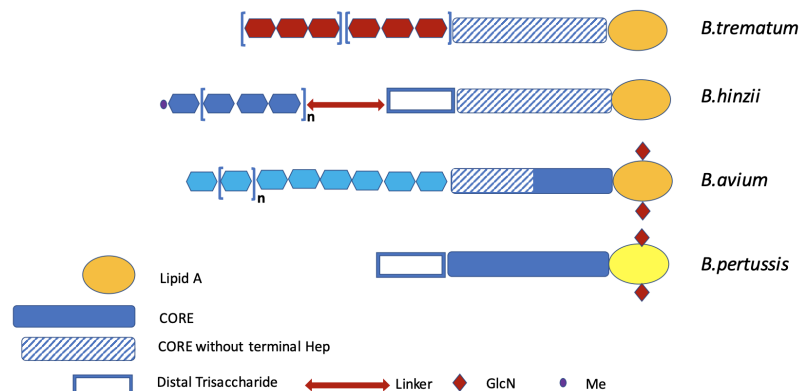


Figura 15 - Representação esquemática das diferentes estruturas de LPS das espécies de *Bordetella* sp.  
Fonte: (NOVIKOV; MARR; CAROFF, 2019)

A participação dos LPS na patogênese da *Bordetella* foi descrito inicialmente pela espécie *B. pertussis*, a partir de danos causados nas células traqueais ciliadas pela síntese de óxido nítrico (NO) em sinergia com a ação da TCT (FLAK; GOLDMAN, 1999; NOVIKOV; MARR; CAROFF, 2019; UCIEKLAK; KOJ; NIEDZIELA, 2020).

#### 1.4 Patogênese de coqueluche

Os biofilmes conceitualmente são constituídos por comunidades microbianas sésseis, formadas por células bacterianas agregadas, ou aglomeradas entre si, envolvidas por uma matriz extracelular composta por exopolissacarídeos, ácidos nucléicos, proteínas, lipídeos e outras biomoléculas. As bactérias sésseis são aquelas que apresentam uma aderência forte às superfícies, muitas vezes irreversíveis, conferindo a elas resistência contra fatores externos e a ação da resposta imunológica (FLEMMING et al., 2016; KARYGIANNI et al., 2020).

A virulência multifatorial da *B. pertussis* é a responsável pelo desenvolvimento da patogênese da coqueluche, iniciada pela colonização bacteriana no trato respiratório superior do indivíduo. A formação do biofilme (figura 16) é considerada por muitos pesquisadores como um fator de patogenicidade determinante para a persistência de cepas de *B. pertussis* no trato respiratório (CATTELAN et al., 2017; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; OLIVEIRA, 2018).

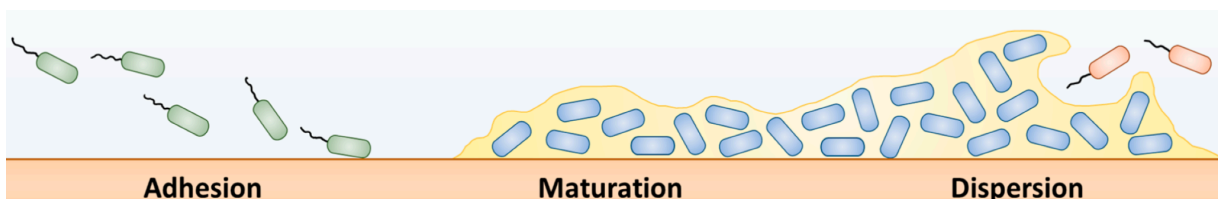


Figura 16 - Formação do biofilme - adesão bacteriana, maturação e dispersão  
Fonte: (BEITELSHEES et al., 2018)

Apesar de ainda não estar totalmente elucidado todos os mecanismos virulentos da *B. pertussis*, acredita-se que após o hospedeiro sofrer exposição às cepas bacterianas por meio de perdigotos liberados por um indivíduo infectado, o processo infeccioso inicia-se a partir da adesão bacteriana às células epiteliais da

mucosa nasal, ao epitélio traqueal e/ou células pulmonares, mediante ação da FHA, PRN, TCF, FIM, BteA, ACT, PT (figura 17a) (BELCHER et al., 2021; DE GOUW et al., 2011; MELVIN et al., 2014; OLIVEIRA, 2018).

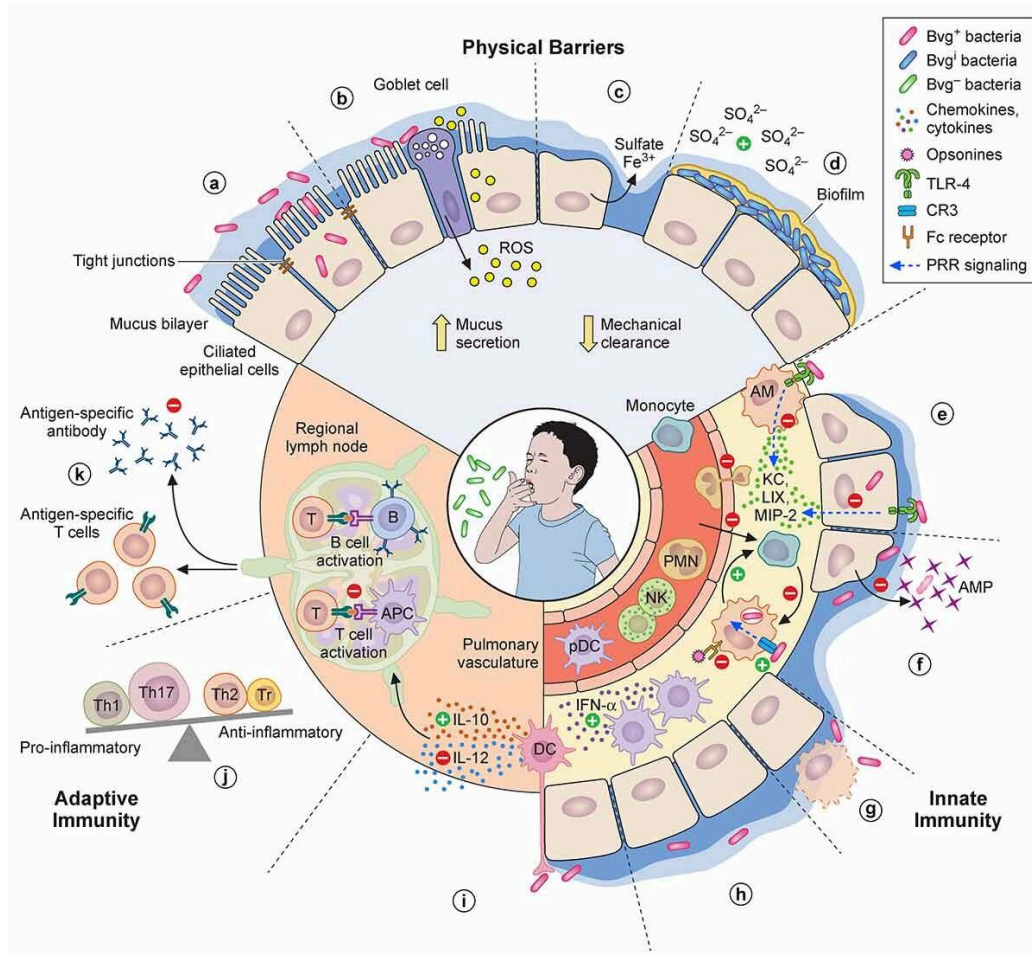


Figura 17 - Patogênese da coqueluche X resposta imune  
Fonte: (BELCHER et al., 2021)

A segunda etapa da patogênese da coqueluche consiste na multiplicação da *B. pertussis* no local da infecção e consequente dano tecidual no trato respiratório inferior e superior com manifestações sistêmicas, devido à resistência bacteriana à remoção mucociliar promovida pelas células epiteliais e ação das células inflamatórias. A seguir, a TCT é internalizada pelas células epiteliais e, juntamente com o LOS, induz a liberação de NO pelas células infectadas, sendo o NO e as ROS os principais destruidores das células epiteliais. ACT e BteA também podem contribuir para a ruptura da barreira epitelial (figura 17b) (BELCHER et al., 2021; KILGORE et al., 2016; OLIVEIRA, 2018).

Uma vez rompida a barreira epitelial e as glândulas submucosas disparadas, o ferro pode ser liberado na superfície das células epiteliais pelo exsudato

plasmático (figura 17c). Em resposta à infecção, o epitélio respiratório pode produzir mucinas altamente sulfatadas. O sulfato pode ser liberado das mucinas por glicosiltransferases de *B. pertussis* e bactérias comensais, o que pode induzir a fase Bvg<sup>i</sup> e, portanto, desencadear a formação de biofilme (figura 17d), permitindo assim a colonização de longo prazo (BELCHER et al., 2021; NIEUW AMERONGEN et al., 1998; RIVERA-CHÁVEZ; MEKALANOS, 2019; ROBERTSON; WRIGHT, 1997).

TCT ao induzir a lise das células epiteliais ciliadas e a superprodução de muco, permite que as bactérias evitem a depuração mucociliar. A atividade enzimática da ACT tem como alvo as vias reguladoras das células e também desorganiza o epitélio alterando as junções apertadas. O T3SS também induz citotoxicidade no epitélio respiratório embora BteA de *B. pertussis* seja menos potente que o de *B. bronchiseptica* (BAYRAM et al., 2020; HASAN et al., 2018; KESSIE et al., 2020; KUWAE et al., 2006, 2016).

#### 1.4.1 Imunidade inata e adaptativa

Além das modificações de superfície e formação de biofilme para diminuir sua visibilidade pelo sistema imunológico, *B. pertussis* desenvolveu estratégias para evadir dos mecanismos de defesa imune inata e remodelar as respostas imunes inatas e adaptativas. Células residentes, monócitos infiltrados e células dendríticas (DCs) imaturas são as primeiras células imunes a detectar moléculas de *B. pertussis* por meio do reconhecimento por TLR e NOD e receptores semelhantes a NOD (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; HOVINGH et al., 2017).

As toxinas da *B. pertussis*, em especial a PT, suprimem o recrutamento inicial de células imunes. Ela previne indiretamente a quimiotaxia de neutrófilos ao inibir a produção de quimiocinas que atraem neutrófilos por macrófagos alveolares e células epiteliais após interrupção da sinalização de TLR-4 (figura 17e) (ANDREASEN; CARBONETTI, 2008). A ACT pode induzir a reprogramação de monócitos infiltrados ou macrófagos alveolares para tipos de células semelhantes a monócitos menos bactericidas e de vida curta. Enquanto PT, FHA e PRN amortecem a atividade antimicrobiana dos fagócitos, incluindo estresse oxidativo e liberação de peptídeos antimicrobianos (AMP) (figura 17f) (BELCHER et al., 2021).

Para evitar ainda mais a depuração por fagócitos profissionais, fatores de virulência de *B. pertussis*, como ACT, podem desencadear a apoptose de fagócitos.



Vários fatores de virulência podem contribuir para o acúmulo de DCs que expressam IFN- $\alpha$  nos pulmões que medeiam a supressão precoce da diferenciação de células Th17 (figura 17h). DCs intraepiteliais (e outras células mieloides) são reprogramadas para regular positivamente a produção de IL-10 e diminuir a produção de IL-12, a fim de favorecer a diferenciação de células T reguladoras, células Th2 e Th17 sobre células Th1 (ADKINS et al., 2014; AHMAD et al., 2016; CHEUNG et al., 2009; DIETERICH; RELMAN, 2011; WU et al., 2016).

DCs intoxicadas com ACT são prejudicadas em sua capacidade de estimular células T. A chegada de DCs potencialmente tolerogênicas aos linfonodos de drenagem pode alterar as respostas imunes protetoras celulares contra *B. pertussis*. Além disso, a PT é capaz de suprimir as respostas de anticorpos séricos (figura 17 j,k) (BELCHER et al., 2021).

## 1.5 Manifestações Clínicas

A manifestação clássica da coqueluche é mais comumente presente em lactentes e crianças pequenas não imunizadas, sendo classificada em três estágios ou fases: catarral, paroxística e convalescente. O tempo médio de duração da doença é de 6 a 12 semanas podendo durar mais em alguns casos, entretanto, os sintomas normalmente aparecem após um período de incubação de 7 a 10 dias em média, podendo variar entre 5 a 28 dias (BRASIL, 2022; CHERRY, 2015; NIEVES; HEININGER, 2016).

### 1.5.1 Fase catarral

A fase catarral da doença é considerada uma síndrome clínica leve e inespecífica com duração de 1 a 2 semanas. Inicia-se com manifestações respiratórias e sintomas como febre pouco intensa, não sendo muito comum, mal-estar geral, congestão nasal, rinorréia (coriza), dor de garganta e tosse leve e seca semelhante a um resfriado comum. Gradualmente instala-se surtos de tosse cada vez mais frequentes e intensos. Segue-se então o agravamento da tosse e inicia-se a fase paroxística (BRASIL, 2022; FRY; CAMPBELL; AMIRTHALINGAM, 2021; NIEVES et al., 2011; NIEVES; HEININGER, 2016).

### 1.5.2 Fase paroxística

A fase paroxística dura de 2 a 6 semanas, é caracterizada por ataques súbitos de tosse, incontroláveis, intensos e repetitivos, de 5 a 10 ou mais tosses fortes durante uma única expiração, seguidas de um súbito esforço inspiratório levando a um som característico chamado de guincho, oriundo do estreitamento da glote. Os acessos de tosse podem ser tão intensos que a pessoa não consegue inspirar, apresenta protrusão da língua, congestão facial e, eventualmente, cianose, que pode ser seguida de apneia e vômitos. O vômito pós-tussígeno é um fenômeno comum. Entre os ataques, o paciente parece relativamente bem (KILGORE et al., 2016; NIEVES; HEININGER, 2016).

À medida que a doença progride, os episódios de paroxismos de tosse geralmente aumentam em frequência, podendo chegar a 30 em 24 horas, e em gravidade, principalmente à noite. A frequência e a intensidade dos episódios de tosse paroxística aumentam nas duas primeiras semanas e, depois, diminuem paulatinamente (BRASIL, 2022).

### 1.5.3 Fase convalescente

O estágio de convalescença, que geralmente dura de 1 a 12 semanas, é caracterizado por uma diminuição na frequência e gravidade dos episódios de tosse, convulsão e vômito, e dão lugar a episódios de tosse comum. Durante o período de recuperação, infecções respiratórias virais sobrepostas podem desencadear uma recorrência transitória de paroxismos. Pacientes com coqueluche clássica causada por infecção primária apresentam leucocitose associada a linfocitose (BRASIL, 2022; NIEVES; HEININGER, 2016).

## 1.6 Epidemiologia Global e Cobertura Vacinal

A coqueluche é uma doença global classificada como uma doença endêmica, por frequentemente haver surtos esporádicos em diversos continentes ao redor do mundo, com maior prevalência em países em desenvolvimento (KILGORE et al., 2016). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2008 cerca de mais de 148 mil casos foram confirmados em todo o mundo, com mortes de crianças

menores de 5 anos. Em 2014 estima-se que houve mais de 186 mil casos de coqueluche. Já em 2018 foram registrados mais de 169 mil e em 2021 cerca de mais de 29 mil casos de coqueluche (figura 18) (WHO, 2010, 2018, 2023a, 2023b).

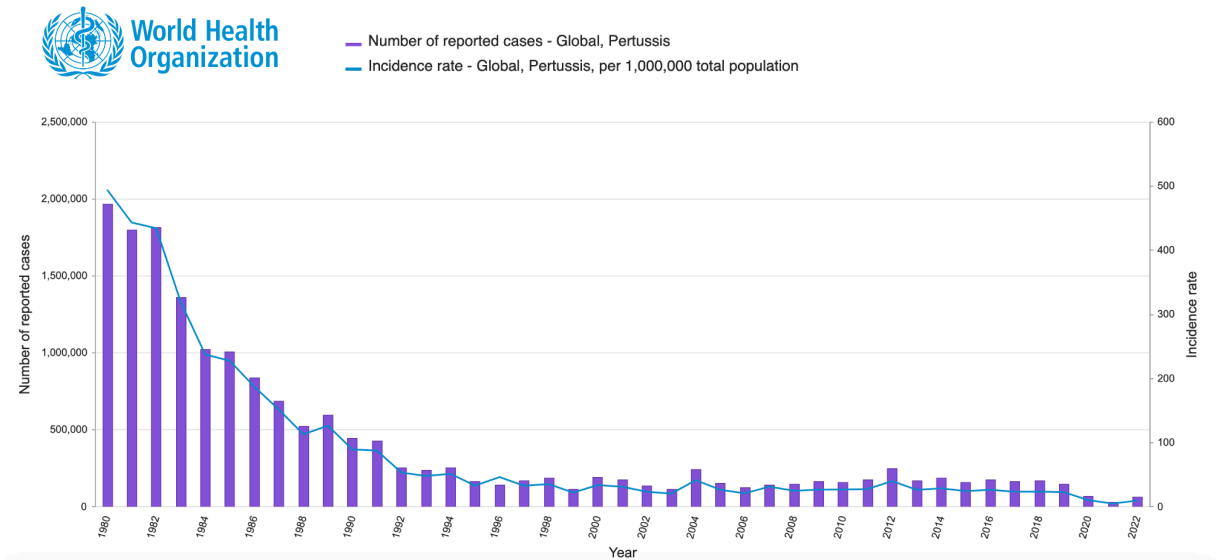


Figura 18 - Casos notificados e incidência global da coqueluche - 1980 a 2022.  
Fonte: (WHO, 2023b)

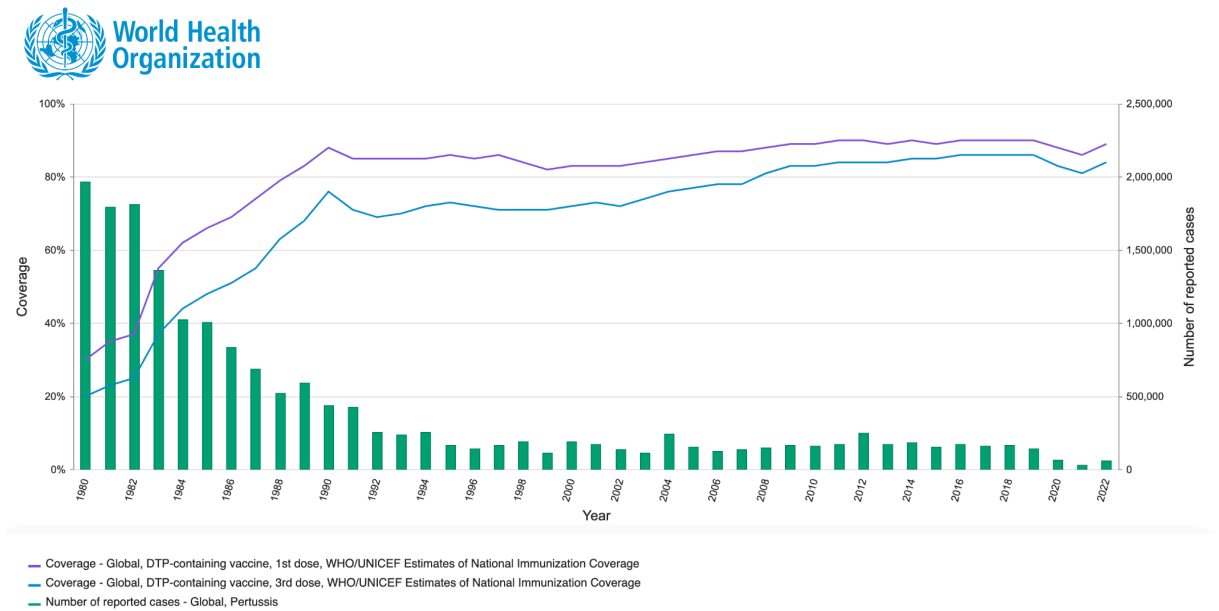


Figura 19 - Cobertura vacinal completa contra coqueluche global X notificações entre 1980 a 2022.  
Fonte: (WHO, 2023c)

Apesar de ser uma doença endêmica, a coqueluche teve sua incidência global diminuída drasticamente após a chegada da vacina na década de 1950. A taxa

global da cobertura vacinal em 2012 era de 84%, subindo para 86% em 2019 e em 2021 caiu para 81% (figura 19) (WHO, 2010, 2018, 2023c). Entretanto, apesar da alta taxa de cobertura vacinal mundial de três doses contra difteria, tétano e coqueluche (DTP3), ou seja, ciclo de vacinação completo, em muitos países tem-se observado o ressurgimento da coqueluche durante a última década, sendo registrados surtos epidêmicos entre 3 a 5 anos (figura 20) (CLARK, 2014; KILGORE et al., 2016; MACINA; EVANS, 2021).

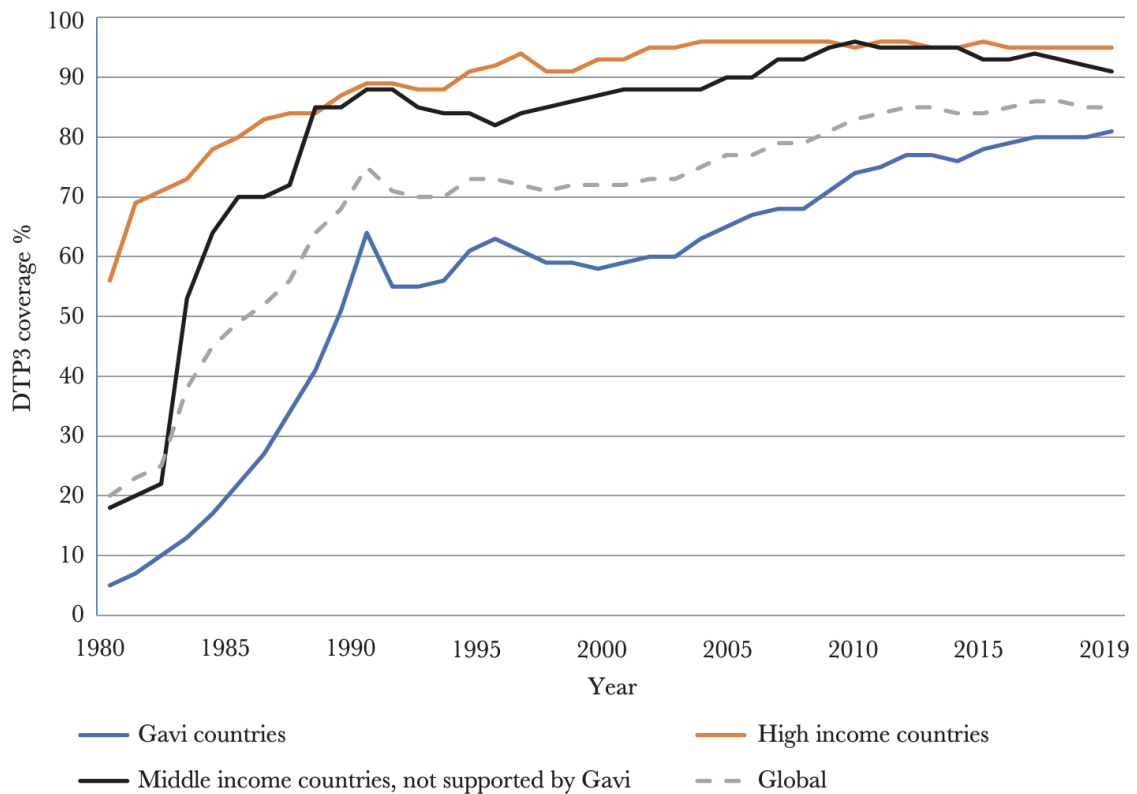


Figura 20 - Cobertura vacinal completa da vacina DTP3 a nível global, de países desenvolvidos e em desenvolvimento - 1980 a 2019.

Fonte: (LINDSTRAND et al., 2021)

Importantes surtos epidêmicos foram notificados em diversos países e descritos na literatura entre os anos de 2008 e 2016 como, Estados Unidos da América (EUA), Canadá, Austrália, Japão, Reino Unido, Suécia, Polônia, Malásia, Argentina, Brasil, Colômbia e México (AMIRTHALINGAM; GUPTA; CAMPBELL, 2013; CENTRO EUROPEU DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE DOENÇAS, 2019; HOZBOR et al., 2019; KAMIYA et al., 2012; SMITH et al., 2014; THISYAKORN et al., 2019).

O ressurgimento global da coqueluche pode ser explicado por diversos fatores, dentre eles, maior número de indivíduos transmissores da doença, uma vez que a alta cobertura vacinal restringia-se à crianças pequenas, sendo necessário aumentar a incidência de vacinação de crianças maiores, jovens e adultos (DOMENECH DE CELLÈS et al., 2016; KILGORE et al., 2016); investimentos e otimização dos métodos diagnósticos; evolução das cepas de *B. pertussis* circulantes diante a pressão seletiva conferida pela vacinação e menor duração da proteção vacinal (CHERRY, 2019; OLIVEIRA, 2018; PINTO; MERKEL, 2017).

Diante desse contexto, o desempenho geral do programa de imunização é regido pela cobertura vacinal completa de DTP3, uma vez que ela é recomendada universalmente, permitindo assim o monitoramento da cobertura vacinal entre os países (LIN et al., 2022; LINDSTRAND et al., 2021).

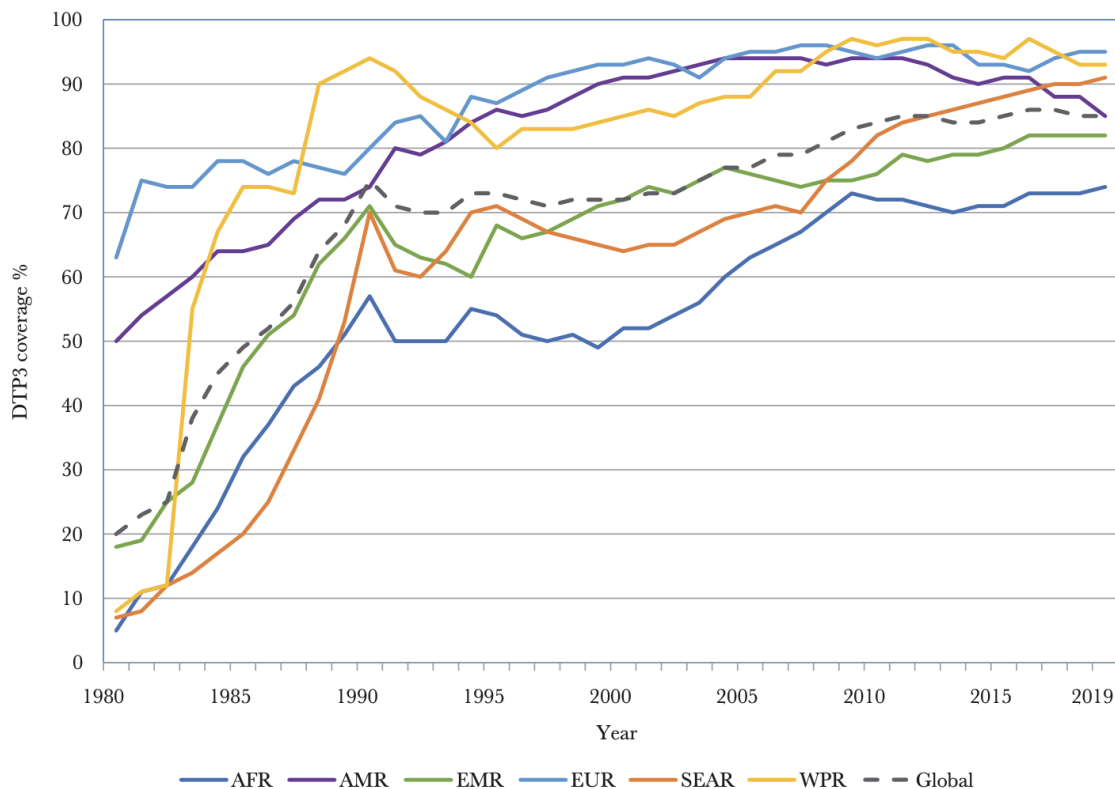


Figura 21 - Cobertura vacinal global da vacina DTP3 e por região da OMS, 1980 a 2019.  
Fonte: (LINDSTRAND et al., 2021)

Legenda das regiões da OMS: AFR (África); AMR (Américas); EMR (Mediterrâneo Oriental); EUR (Europa); SEAR (Sudeste Asiático); WPR (Pacífico Ocidental).

A disparidade da cobertura vacinal existente entre os países ricos e pobres na década de 1980 foi radicalmente reduzida, entretanto, conforme demonstrado na figura 21, a cobertura vacinal global de DTP3 estagnou-se entre 84% e 86%. Em 2019, 116 milhões (85%) de crianças receberam o ciclo completo da DTP. Já em 2021, cerca de 105 milhões de crianças receberam as 3 doses da DTP, o que correspondeu a aproximadamente 81% da cobertura vacinal global. Sob a ótica da cobertura vacinal regional, a partir de 2015 houve um crescimento constante da vacinação de DTP3 na África e no Sudeste Asiático, ao passo que na região das Américas houve um declínio considerável da cobertura vacinal conforme representado na figura 22 (LIN et al., 2022; LINDSTRAND et al., 2021; WHO, 2022).

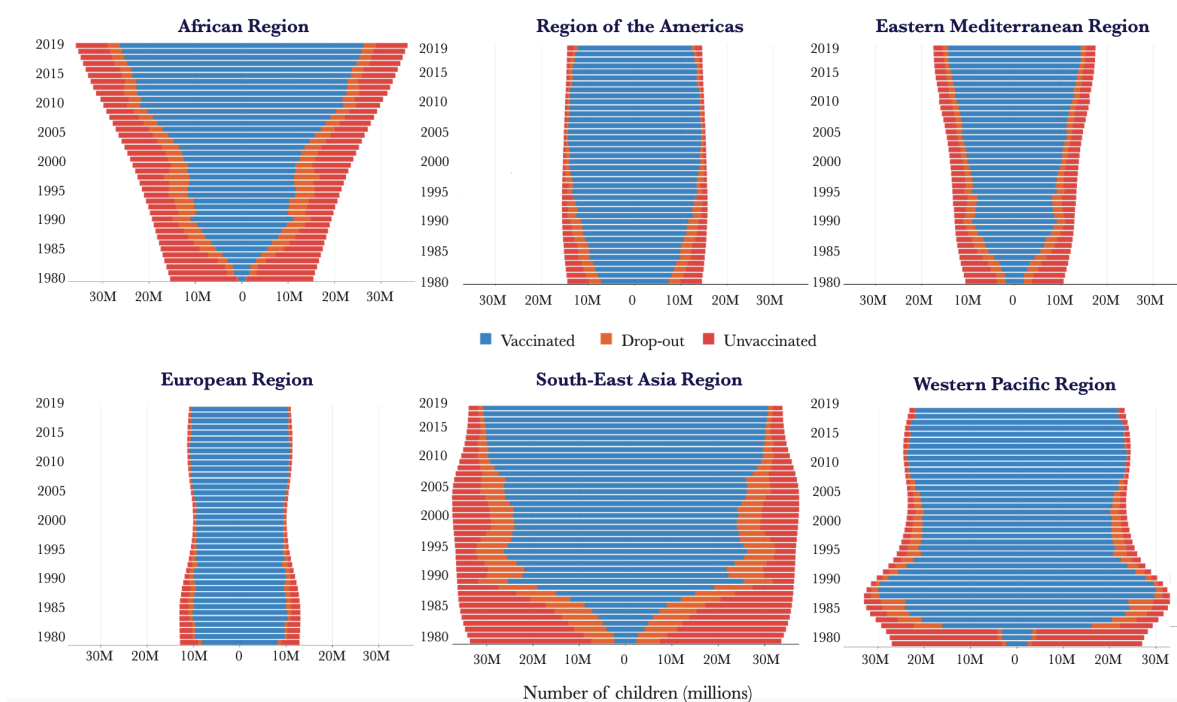


Figura 22 - Crianças menores de 2 anos com vacinação completa, incompleta e não vacinadas com DTP, por região 1980 – 2019.

Fonte: (LINDSTRAND et al., 2021)

Legenda das regiões da OMS: AFR (África); AMR (Américas); EMR (Mediterrâneo Oriental); EUR (Europa); SEAR (Sudeste Asiático); WPR (Pacífico Ocidental).

O número de crianças em milhões com menos de 2 anos com 3 doses completas da vacina DTP, por região da OMS durante o período de 1980 a 2019, está representado na cor azul, doses incompletas laranja e não vacinadas em vermelho, (figura 20) (LINDSTRAND et al., 2021).

É possível perceber que a cobertura vacinal com a vacinação completa, ou seja, três doses da DTP, oscilou bastante ao longo das décadas. A região da Europa na década de 80, estava à frente das demais regiões com quase 10 milhões de crianças vacinadas, seguida da região das Américas com quase 8 milhões. A região da África ocupava a última posição da cobertura vacinal, atingindo menos de 1 milhão de crianças menores de dois anos vacinadas. O aumento da cobertura na região africana ao longo dos anos é especialmente notável devido à crescente coorte de nascimentos (LINDSTRAND et al., 2021; WHO, 2023c).

A região das Américas entre 2018 e 2019 registrou uma queda em sua cobertura vacinal. Em 2018, cerca de 88% das crianças foram vacinadas com as três doses da DTP, caindo este percentual para cerca de 85%, o que corresponde a pouco mais de 12,5 milhões de crianças vacinadas. Ainda assim, permaneceu acima da cobertura vacinal global, permanecendo atrás apenas das regiões do Sudeste Asiático, Pacífico Ocidental e Europa respectivamente (LIN et al., 2022; LINDSTRAND et al., 2021; WHO, 2022).

### 1.7 Epidemiologia Brasil e Distrito Federal

No Brasil, o número de casos de coqueluche em 1982 ultrapassou 54 mil notificações, sendo a taxa de incidência de 426,7/1.000.000 milhão de habitantes. A partir da década de 1990, houve uma considerável redução da incidência dos casos, passando para 101,7/1.000.000 milhão de habitantes em um total de cerca de mais de 15.300 notificações conforme demonstrado na figura 23. Tal redução somente foi possível mediante a ampliação das coberturas vacinais das vacinas Tetravalente (Difteria, Tétano, *Pertussis* e *Haemophilus influenzae* b-DTP+Hib) e DTP (BRASIL, 2015; WHO, 2023b).

Naquela década, a cobertura vacinal alcançada era de cerca de 66%. À medida que as coberturas elevaram-se a valores entre 93% e 98%, no período de 1998 a 2000, a incidência reduziu-se para 10/1.000.000 milhão e 4,3/1.000.000 milhão de habitantes respectivamente (figuras 23 e 24) (WHO, 2023b).

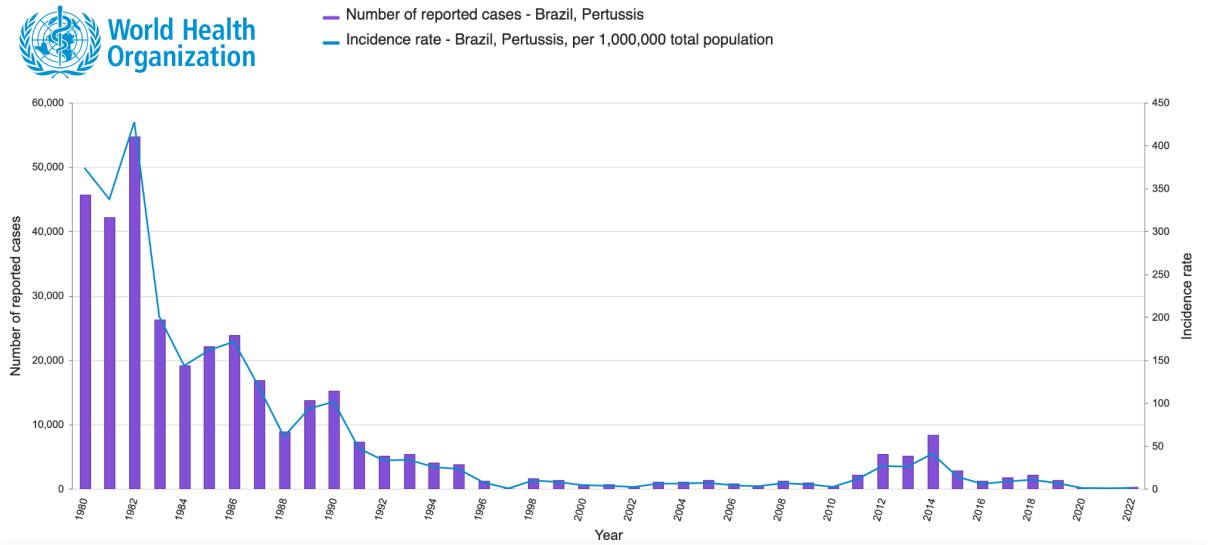


Figura 23 - Casos notificados e incidência da coqueluche no Brasil - 1980 a 2022. Fonte: (WHO, 2023b)

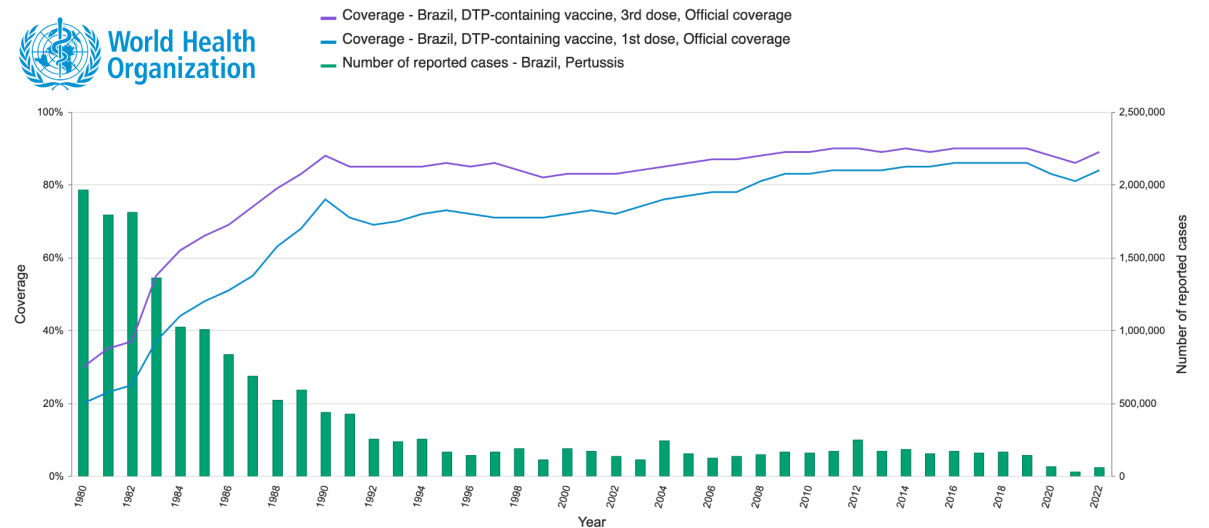


Figura 24 - Cobertura vacinal completa contra coqueluche no Brasil X notificações entre 1980 a 2022. Fonte: (WHO, 2023b)

Com a manutenção das altas coberturas vacinais, na década de 2000, a incidência variou de 6,2/1.000.000 milhão em 2004, a 2,4/1.000.000 milhão de habitantes, em 2010. A partir de 2011 a taxa de incidência começou a subir (11,4/1.000.000 milhão), atingindo o pico em 2014 com 41/1.000.000 milhão de habitantes (figura 23) (BRASIL, 2015; WHO, 2023b).

A reemergência da coqueluche ocorreu com o aumento do número de casos (2.257) em 2011 e se estendeu até 2014, atingindo o pico de casos (8.338), apesar das elevadas coberturas vacinais ao longo desse período, 99,56% em 2011 e 93,3%



em 2014, conforme figura 24. Entretanto, entre os anos de 2014 e 2017 houve um decréscimo de 78,5% na incidência da coqueluche (14,2/1.000.000 milhão em 2015, para 8,7/1.000.000 milhão em 2017). Em 2018 o número de casos voltou a subir (2.232), caindo para 1.423 em 2019, reduzindo drasticamente em 2020 com 229 casos confirmados, sendo registrados 143 casos em 2021. Tal redução representou uma queda da taxa de incidência de 10,6/1.000.000 milhão para 0,7/1.000.000 milhão de habitantes (BRASIL, 2016, 2018, 2020a; WHO, 2023b).

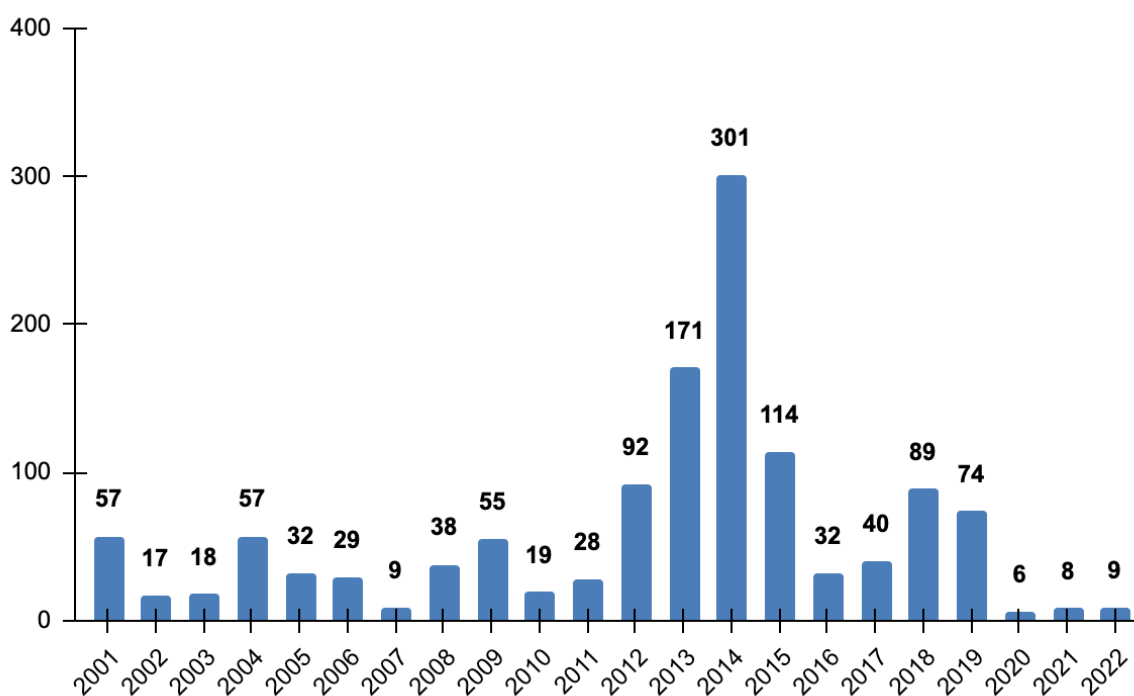


Figura 25 - Casos confirmados no Distrito Federal notificados no SINAN entre 2001 e 2022  
Fonte: (SINAN, 2023)

De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), o número total de casos de coqueluche no Distrito Federal (DF) entre os anos de 2001 e 2022, considerado todos os critérios de confirmação (laboratorial, clínico-epidemiológico, clínico e os casos ignorados), oscilou bastante, registrando um pico de 301 casos no anos de 2014, com queda nos anos seguintes, sendo confirmado nove casos em 2022, conforme anexo 1.

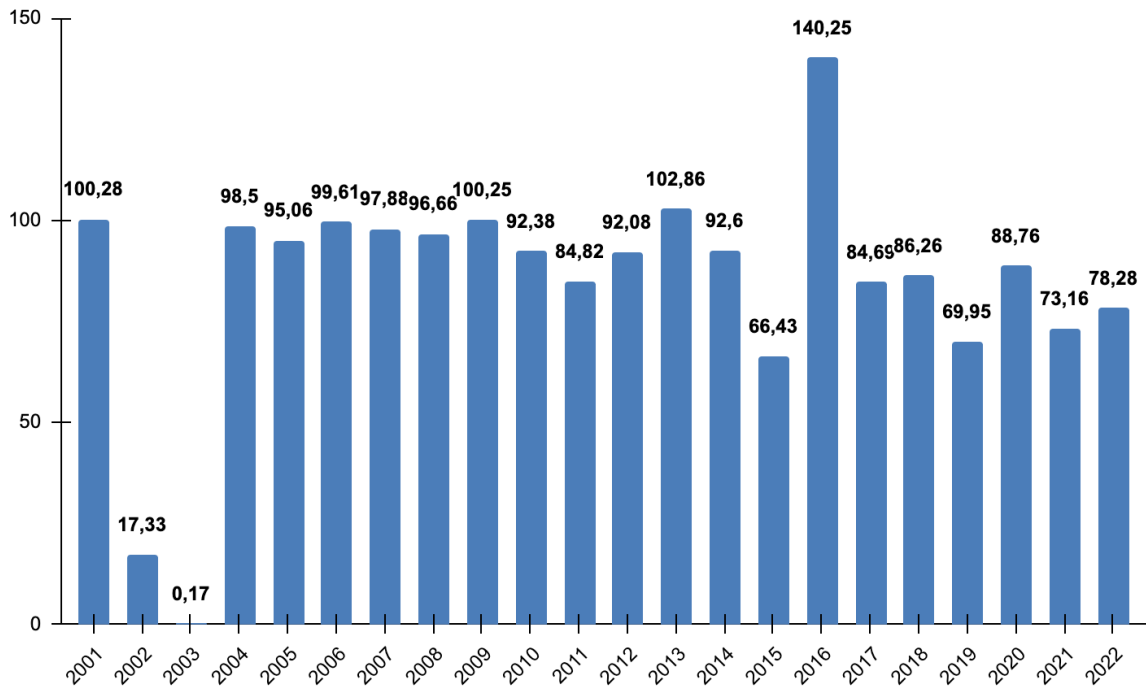


Figura 26 - Cobertura vacinal contra coqueluche no Distrito Federal entre 2001 e 2022  
 Fonte: (SINAN, 2023)

A cobertura vacinal contra a coqueluche no DFI entre os anos de 2001 e 2022 de acordo com os dados do SINAN (2023), revela uma média de mais de 84%, sendo superior aos 92% entre os anos de 2004 a 2010. Entretanto, os anos de 2015 e 2019 registraram uma cobertura vacinal abaixo dos 70%, aumentando em 2020, porém, com queda nos anos seguintes.

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar da alta cobertura vacinal, a cada ano, milhares de casos de coqueluche ainda são notificados no Brasil e no mundo. Crianças lactentes, portanto, em processo de imunização contra *Bordetella pertussis*, têm sido a população mais afetada pela patologia. Além disso, o número de casos confirmados de coqueluche em adolescentes e adultos com o ciclo vacinal completo das vacinas pentavalente (difteria, tétano, pertussis, hepatite B e *Haemophilus* tipo b) e da tríplice bacteriana (difteria, tétano e pertussis - DTP) tem crescido nos últimos anos, o que evidencia a presença e a capacidade de circulação da *B. pertussis* na população imunizada.

A seleção de linhagens de *B. pertussis* com epítomos diferentes das cepas vacinais celular ou acelular é uma das hipóteses propostas para explicar o surgimento de casos novos de coqueluche. Diante desse quadro é importante identificar o perfil genético e fenotípico dos isolados circulantes. No entanto, ainda são escassos estudos para caracterizar os isolados de *B. pertussis* reemergentes pós-vacinação no Brasil.

Devido ao aumento da prevalência e incidência de casos de coqueluche no Brasil e no mundo no período de 2012 a 2018, faz-se necessário conhecer e investigar o cenário da doença em Brasília e na região integrada de desenvolvimento do DF, a fim de propor ações que visem a promoção da saúde da população do Distrito Federal. Logo, estudos que visam à identificação do perfil genético e epidemiológico da coqueluche são essenciais para o delineamento de estratégias para seu controle e erradicação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Identificar o perfil genotípico das linhagens de *Bordetella pertussis* circulantes no Distrito Federal e entorno, entre 2012 e 2018 em relação aos genes *fim3* e *ptx*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Obter as amostras de *Bordetella pertussis* isoladas no Distrito Federal e região entre 2012 e 2018;
- Sequenciar os genes *fim3* e *ptx* das linhagens de *Bordetella pertussis*;
- Realizar a análise epidemiológica da incidência e prevalência de *Bordetella pertussis* circulantes no Distrito Federal pela plataforma do SINAN entre 2012 e 2022;
- Identificar o perfil alélico de *fim3* e *ptx* nos isolados bacterianos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta do material e obtenção das amostras

As amostras de pacientes com suspeita de coqueluche ou contato de pacientes com suspeita foram enviadas ao Laboratório Central de Saúde Pública do DF (LACEN-DF), pelas Unidades de Saúde e Hospitais do DF, em tubos contendo o meio de transporte Regan-Lowe com cefalexina e com o *swab* de alginato de cálcio com haste flexível, contendo a secreção coletada, inserido no meio (LEITE, 2019; UFMG, 2020).

No presente estudo, foram utilizadas cepas de *B. pertussis* isoladas no DF e entorno no período de setembro de 2012 a agosto de 2018. O isolamento das cepas foi realizado no LACEN-DF, por ser instituto responsável pela vigilância e pesquisa de *B. pertussis* no DF.

Todas as cepas isoladas foram incluídas no estudo. Um total de 136 cepas isoladas de amostras de *swab* de nasofaringe foi investigado. Os dados de isolamento estão descritos no apêndice 1.

### 4.2 Identificação dos isolados de *B. pertussis*

As amostras oriundas das unidades de saúde foram encaminhadas para o LACEN que realizou o cultivo em Agar Bordet-Gengou (BG) suplementado com sangue de carneiro a 15%. Após o cultivo dos isolados, as cepas de *B. pertussis* foram identificadas pela técnica MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry).

MALDI-TOF MS é um método avançado para a identificação de microrganismos baseado em espectrometria de massa. Essa tecnologia utiliza um laser para ionizar e vaporizar uma amostra preparada com uma matriz específica, resultando na liberação de íons que são então acelerados em um tubo de voo (time-of-flight). A massa dos íons é determinada pela medição do tempo que levam para atingir o detector ao final do tubo (LIU et al., 2022).

A técnica foi considerada revolucionária para a identificação rápida e de rotina de microrganismos, destacando-se pela sua excelente relação custo-benefício, além de ser altamente reprodutível e confiável. Essa tecnologia opera pela extração de

perfis espectrais únicos e característicos dos microrganismos, permitindo sua identificação ao correlacionar esses perfis com os de cepas de referência presentes em um banco de dados. Assim, o MALDI-TOF MS é reconhecido por sua rapidez e precisão no processo de identificação e classificação de microrganismos (KIM et al., 2017; RICCHI et al., 2017).

#### 4.3 Cultivo dos isolados de *B. pertussis*

Uma vez isoladas e identificadas, as cepas de *B. pertussis* foram estocadas no banco de coleção de culturas do LACEN/DF. Posteriormente foram disponibilizadas para o Laboratório de Análise Molecular de Patógenos da Universidade de Brasília – LAMP/UnB. Os isolados foram novamente cultivados em Agar Bordet-Gengou (BG) suplementado com sangue de carneiro a 15% e incubados em condições úmidas a 35° C durante três dias, no intuito de serem criados clones para a realização da extração do DNA.

#### 4.4 Extração do DNA

Após a etapa de cultivo dos isolados de *B. pertussis*, as colônias cultivadas foram suspensas em Tampão TE, que contém tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM com um pH ajustado para 8,0. A extração do DNA desses isolados foi realizada utilizando o kit *Wizard Genomic DNA Purification* da Promega, seguindo as instruções específicas do fabricante para bactérias Gram-negativas. O DNA obtido através desse processo foi então quantificado para determinar sua concentração e avaliado quanto à sua pureza usando um espectrofotômetro Nanodrop™ 2000 da *ThermoFisher*. Para assegurar a adequação do material extraído para futuras análises, foi necessário que a concentração de DNA atingisse pelo menos 100 ng/μl, conforme as diretrizes da Promega (2023a).

#### 4.5 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR de *fim3* e *ptx*

Para a amplificação do gene *fim3*, procedeu-se com reações de PCR totalizando um volume de 25 μl, que incluíram 2μl de DNA genômico na concentração de 20 ng/μl, 1μl de cada um dos *primers* iniciais a 10 pmol/μl, 0,125 μl

da enzima GoTaq® polimerase da Promega, 1µl de dNTPs a 0,2 nM, 5µl do 5x colorless GoTaq® *Reaction Buffer* da Promega e 14,875µl de água deionizada MilliQ. O protocolo de amplificação seguiu com uma etapa inicial de desnaturação por 5 minutos a 95°C, depois 25 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 94°C, 45 segundos de anelamento a 57°C, e 1 minuto de extensão a 72°C, finalizando com uma extensão de 3 minutos a 72°C. Os *primers* utilizados foram *fim3F*, com a sequência 5' – CCCCCGGACCTGATATTCTGATG, e *fim3R*, com a sequência 5' – GCTGAGCGTGCTGAAGGACAAGAT, resultando em um produto de 700 bp. Os produtos da PCR foram posteriormente purificados usando o kit *ReliaPrep™ DNA Clean-Up System* da Promega (2023b).

Para a amplificação do gene *ptx*, procedimentos de PCR foram realizados em um volume total de 25µl, que incluiu 2 µl de DNA genômico com densidade de 20 ng/µl, 1µl de cada primer medindo 10 pmol/µl, 0,125 µl da enzima GoTaq® polimerase da Promega, 1 µl de dNTPs a 0,2 nM, 5 µl do tampão 5x colorless GoTaq® *Reaction Buffer* da Promega e 14,875 µl de água Milli-Q deionizada. O protocolo de amplificação seguiu com uma etapa inicial de desnaturação por 5 minutos a 95° C, depois 25 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 94° C, 45 segundos de anelamento a 55° C, e 1 minuto de extensão a 72° C, finalizando com uma etapa de extensão de 5 minutos a 72° C. Os primers aplicados foram o *PTX-PF*, com sequência 5' – AATCGTCCTGCTCAACCGCC, e *PTX-PR*, com sequência 5' – GGTATACGGTGGCGGGAGGA, gerando um produto de 574 bp. Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados usando o kit *ReliaPrep™ DNA Clean-Up System* da Promega (2023b).

#### 4.6 Sequenciamento dos genes *fim3* e *ptx*

O protocolo utilizado consiste em quatro genes alvos: gene da proteína Pertactina (*prn*), o primeiro gene do operon da toxina PT (*ptxS1*) e seu promotor (*ptxP*), e a proteína codificadora de fimbria (*fim3*) (BOWDEN et al., 2014). Para amplificação do gene *prn* foi utilizado o kit HotStar Taq mastermix (QIAGEN).

As PCR foram feitas num volume final de 20µl, 2µl de DNA genômico 20 ng/µl, 1 µl de cada *primer* a 10 pmol/µl, 10µl de HotStar Taq mastermix, 2µl de Solução Q (betaína), 2µl de DMSO e 2µl de H<sub>2</sub>O livre de nuclease. O programa utilizado começa com uma incubação de 15 min a 95°C, seguidos de 33 ciclos, cada

um consistindo de 30s a 94°C, 90s a 50°C, e 90s a 72°C, com uma extensão final a 72°C por 10 min. Para amplificação de *fim3*, *ptxP*, e *ptxS1* foi usada a polimerase GoTaq® (Promega), 20 ng/μl de DNA, *primers* a 10 pmol/μl cada, dntp 0,2mM.

Após 5 min a 95°C, *ptxP*, *ptxS1*, e *fim3* foram amplificados em 25 ciclos consistindo de 45s a 94°C, 45s de anelamento a 57°C para *fim3*, a 55°C para *ptxP* e 58°C a *ptxS1* e 1 min de 44 extensão a 72°C, com 5 min de extensão final a 5 min. Os *primers* utilizados estão descritos na tabela 3. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit ReliaPrep™ DNA Clean-Up System (Promega). O sequenciamento foi feito utilizando o kit de sequenciamento BigDye (Applied Biosystems). Os produtos foram separados pela plataforma de análise ABI3130 (Applied biosystems) e a sequência consenso criada utilizando o software BioEdit v7.0.5. As sequências foram comparadas com alelos conhecidos para cada gene utilizando a ferramenta disponível em <https://bigsd.b.pasteur.fr/bordetella/>

**Tabela 3 - Primers utilizados**

Nome do <i>Primer</i>	Sequência	Tamanho do produto
Fim3F	5'-CCCCCGGACCTGATATTCTGATG-3'	700 bp
Fim3R	5'-GCTGAGCGTGCTGAAGGACAAGAT-3'	
PTX-PF	5'-AATCGTCCTGCTCAACCGCC-3'	574 bp
PTX-PR	5'-GGTATACGGTGGCGGGAGGA-3'	

Fonte: Adaptado de (OLIVEIRA, 2018)

#### 4.7 Identificação dos genótipos por MAST

Os alelos de *fim3* e *ptxP* foram identificados por meio de tipagem de sequência de antígeno (MAST). A referida tipagem foi originalmente desenvolvida para estudar mudanças nas populações de *B. pertussis* e para identificar isolados que produzem variantes de proteínas que eram distintas das variantes incorporadas nas vacinas contra coqueluche (PETERSEN et al., 2012). A MAST está focada nos genes que codificam as cinco proteínas (PT, FHA, PRN, Fim2 e Fim3) utilizadas nas vacinas acelulares atuais. O promotor da PT (*ptxP*) também está incluído para tipagem isolada, pois a variante *ptxP3* aumenta a produção de toxina. Todas as vacinas acelulares atualmente contêm PT, enquanto os outros componentes são usados em combinações variadas (BERBERS; DE GREEFF; MOOI, 2009;



EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL., 2022; MOOI et al., 2009).

O protocolo de MAST utilizado consiste em analisar o polimorfismo de seis genes alvo utilizados nas vacinas acelulares: *prn*, *ptxA*, *ptxP*, *tcfA*, *fim2* e *fim3*. (DU et al., 2016; MOOI et al., 2012; VAN GENT et al., 2015).

#### 4.8 Sorotipagem dos isolados de *B. pertussis*

A sorotipagem foi realizada pelo Centro de Bacteriologia (CB) do Instituto Adolfo Lutz Central (IAL) pela técnica de macroaglutinação em lâmina. Os antissoros foram desenvolvidos no Laboratório de Referência Nacional para Coqueluche do IAL, empregando cepas de referência de *B. pertussis* (GL353, 360E, H36), as quais foram fornecidas pelo Laboratório de Referência da Organização Mundial da Saúde para Pertussis localizado na Universidade de Manchester, na Inglaterra (LEITE, 2019). A produção dos antígenos usados para a imunização de coelhos, bem como o processo de absorção para a geração dos antissoros, foram conduzidos conforme o método estabelecido por Preston e Te Punga (1959).

A realização da técnica de macroaglutinação em lâmina envolveu o uso de uma placa de vidro marcada com quadrículas, que foi posicionada sobre uma caixa equipada com uma lâmpada (conhecida como Caixa de Huddleson). O procedimento começou com a combinação de 20 µl de uma densa suspensão bacteriana de cor branca leitosa, criada em uma solução salina de 0,85% (equivalente a 0,85 g de NaCl em 100 mL de água destilada e esterilizada), com uma quantidade igual de antissoro O1, antissoro Fim2, antissoro Fim3, e também com solução salina a 2% (2 g de NaCl em 100 mL de água destilada e esterilizada). Esta última solução foi usada para verificar a autoaglutinação e controlar a rugosidade das cepas (LEITE, 2019).

#### 4.9 Análise da incidência e prevalência de *B. pertussis* no DF (SINAN)

Para a análise da incidência e prevalência de casos de infecção por *Bordetella pertussis* utilizou-se a ferramenta Epi Info<sup>®</sup>, versão 7.2.5 (“Epi Info<sup>™</sup> | CDC”, 2022), um software de domínio público indicado para pesquisas científicas da área médica e saúde pública, principalmente na investigação de surtos e vigilância

de doenças. A ferramenta possibilitou elaborar a base de dados epidemiológicos da presente pesquisa de doutoramento, bem como a análise estatística dos dados.

A plataforma DATASUS TabNet também foi utilizada como ferramenta descritiva das informações estatísticas provenientes do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), capaz de contribuir com a identificação e tendências de padrões epidemiológicos da coqueluche no Brasil e Distrito Federal no período de 2007 a 2022. Portanto, o TabNet funcionou como uma interface que facilitou o acesso e a exploração de informações do SINAN.

Para análise estatística dos dados, foram usados testes de significância, teste t de Student e análise de variância (ANOVA) para as variáveis contínuas e discretas, e o teste do Qui-quadrado para as variáveis categóricas, sendo consideradas significantes as probabilidades  $<0,05$ .

#### 4.10 Aprovação por Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

As amostras aqui apresentadas referem-se a espécimes biológicos de pacientes os quais participaram da pesquisa: Caracterização clonal de cepas de *Bordetella pertussis* isoladas no DF, Brasil, a qual foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa – FEPECS/SES-DF – CAAE 43098415.6.1001.5553, tendo sido aprovada de acordo com o parecer consubstanciado número 1.056.702, conforme anexo 2 (ROCHA et al., 2017).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Dados epidemiológicos

#### 5.1.1 Descrição do aumento de incidência de coqueluche em 2014 no Distrito Federal, no Brasil e em outros países

De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), o número total de casos confirmados de coqueluche no DF entre os anos de 2012 a 2022 foi de 936, considerando todos os critérios de confirmação (laboratorial, clínico-epidemiológico, clínico e os casos ignorados). O número de casos oscilou bastante durante o período, havendo um pico de 301 casos no ano de 2014, com queda nos anos seguintes, sendo confirmado apenas nove casos em 2022, conforme apresentado na figura 27.

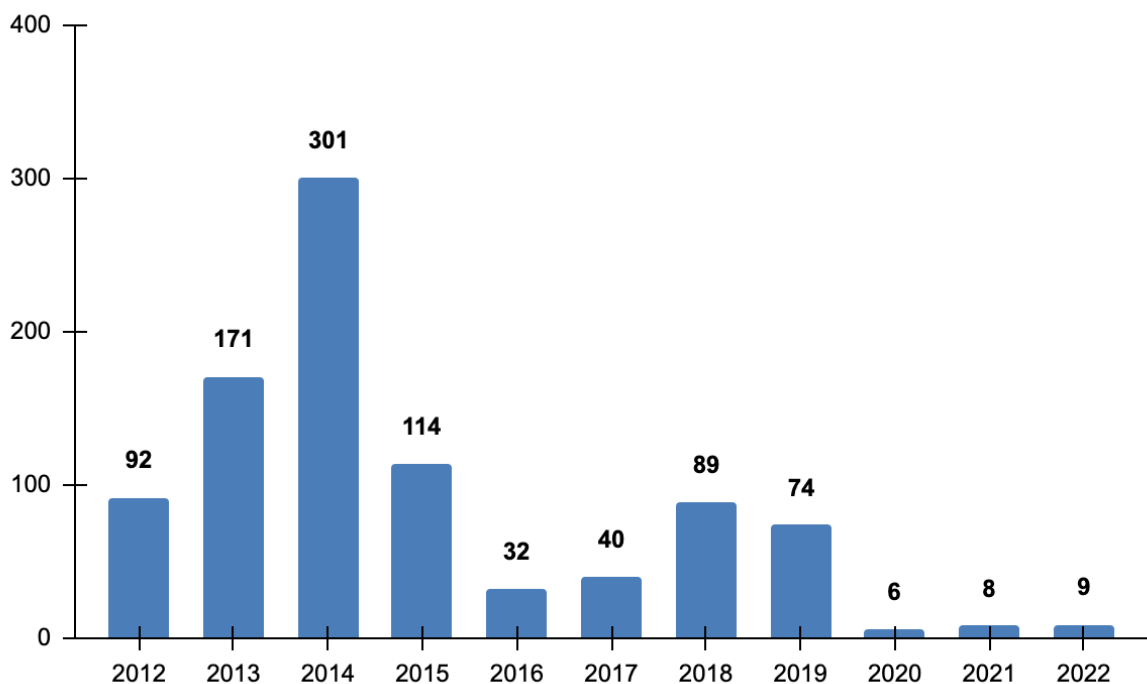


Figura 27 - Casos confirmados no DF notificados no SINAN entre 2012 e 2022  
Fonte: (SINAN, 2023)

O número total de casos notificados e confirmados no DF, quando listado em um ranking, apresenta-se em 9ª colocação quando comparado com os demais Estados do Brasil, ficando atrás de São Paulo (6.831), Pernambuco (3.597), Espírito

Santo (2.976), Paraná (2.792), Rio Grande do Sul (2.394), Minas Gerais (2.138), Bahia (1.578) e Santa Catarina (1.167), durante o mesmo período (SINAN, 2023).

Entre o período de 2012 a 2022 evidenciou-se um pico de número de casos no Distrito Federal (301) no ano de 2014, configurando um surto epidemiológico, fato este que se repetiu em praticamente todos os Estados brasileiros, de acordo com os dados do SINAN (2023) e conforme demonstrado na figura 28, com exceção de apenas seis Estados: Minas Gerais, Espírito Santo, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte e Amazonas, que tiveram o pico de número de casos no ano de 2013. Portanto, tais achados evidenciam um cenário epidêmico de coqueluche no Brasil no ano de 2014.

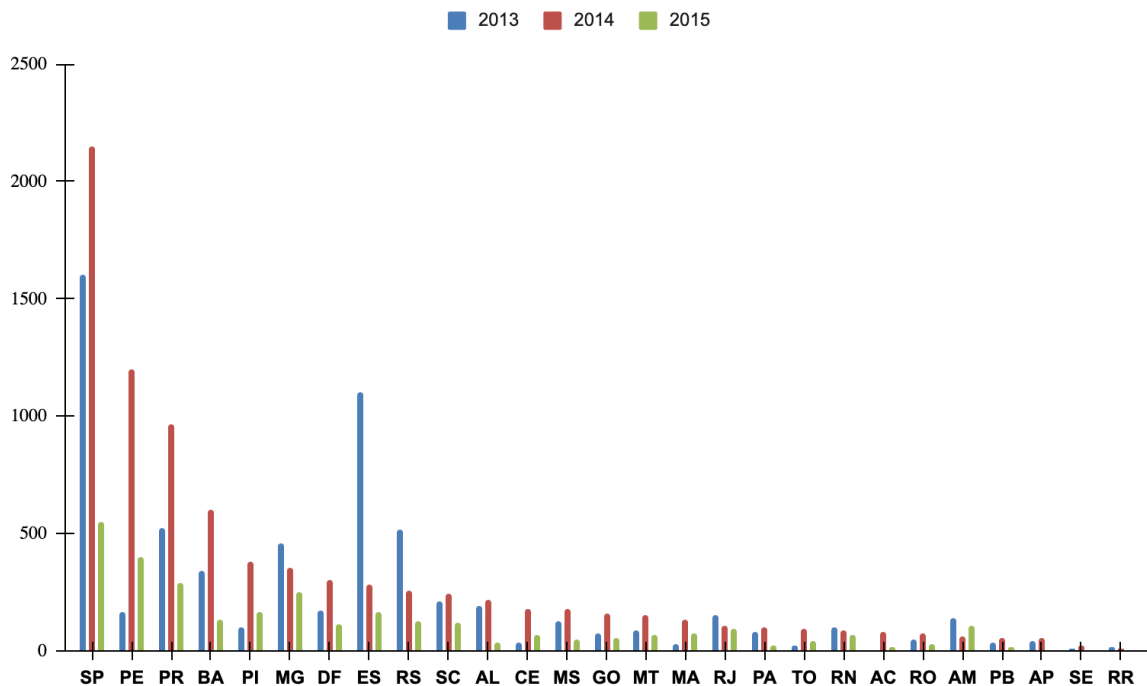


Figura 28 - Casos confirmados no Brasil, notificados ao SINAN entre 2013 e 2015  
Fonte: (SINAN, 2023)

Entretanto, a configuração de um cenário de epidemia de coqueluche em 2014 não se restringiu ao Brasil. Foram reportados 32.971 casos de coqueluche aos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) no ano de 2014, o que indica um crescimento de 15% em relação aos 28.639 casos registrados em 2013 (HOZBOR, 2018). Nos Estados Unidos, no Estado da Califórnia, por exemplo, houve um crescimento significativo na incidência de coqueluche. Comparado a anos

anteriores, o aumento foi de cinco vezes, totalizando 9.935 casos. Isso indica um padrão de epidemia cíclica, ocorrendo a cada três a cinco anos, no que se refere ao crescimento dos casos confirmados (WINTER et al., 2014). Já na China, de acordo com os dados fornecidos pelo Centro Chinês de Controle e Prevenção de Doenças (China CDC), apesar de ter havido uma redução no número anual de casos notificados de coqueluche para menos de 3.000 entre 2006 e 2013, observou-se um aumento significativo de casos a partir de 2014 (LIN et al., 2022).

### 5.1.2 Análise dos isolados bacterianos do LACEN e IAL

O diagnóstico laboratorial da coqueluche pode ser realizado pela cultura da bactéria *B. pertussis* a partir de amostras nasofaríngeas, sendo este método considerado padrão-ouro para o diagnóstico. Outra técnica utilizada é a PCR em tempo real (qPCR), um método molecular mais rápido e sensível do que a cultura, capaz de detectar o DNA bacteriano da *B. pertussis* (BRASIL, 2022). O método de cultura é conduzido no Centro de Bacteriologia (CB) do Instituto Adolfo Lutz Central (IAL), que é o laboratório de referência nacional para esta doença. Além disso, essa atividade diagnóstica também é realizada nos doze Centros de Laboratórios Regionais (CLRs) do Instituto Adolfo Lutz, assim como nos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs) distribuídos pelos diversos estados do Brasil (LEITE, 2019; PEREIRA; LEITE, 2022).

Dos 301 casos de coqueluche do DF notificados ao SINAN no período de 2012 a 2022, 159 foram confirmados por critério laboratorial pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN/DF) representados pela figura 29. Os números de casos do DF ficaram atrás de São Paulo (5.288), Rio Grande do Sul (838), Paraná (791), Santa Catarina (582), Pernambuco (551), Minas Gerais (542), Bahia (486) e Mato Grosso do Sul (266) (SINAN, 2023).

O isolamento das cepas de *B. pertussis* pelo LACEN/DF foi realizado pela técnica de cultura bacteriana e a identificação por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS). Do total de cepas, 136 foram disponibilizadas ao Laboratório de Análise Molecular de Patógenos (LAMP) da Universidade de Brasília (UnB), sendo estas a base de dados para as análises do presente estudo. Nesse contexto, a figura 30 apresenta a distribuição de isolados de *B. pertussis* do LACEN/DF por ano

de isolamento. Os resultados evidenciaram forte ascensão em 2012, 2013 e pico na distribuição dos isolados no ano de 2014.

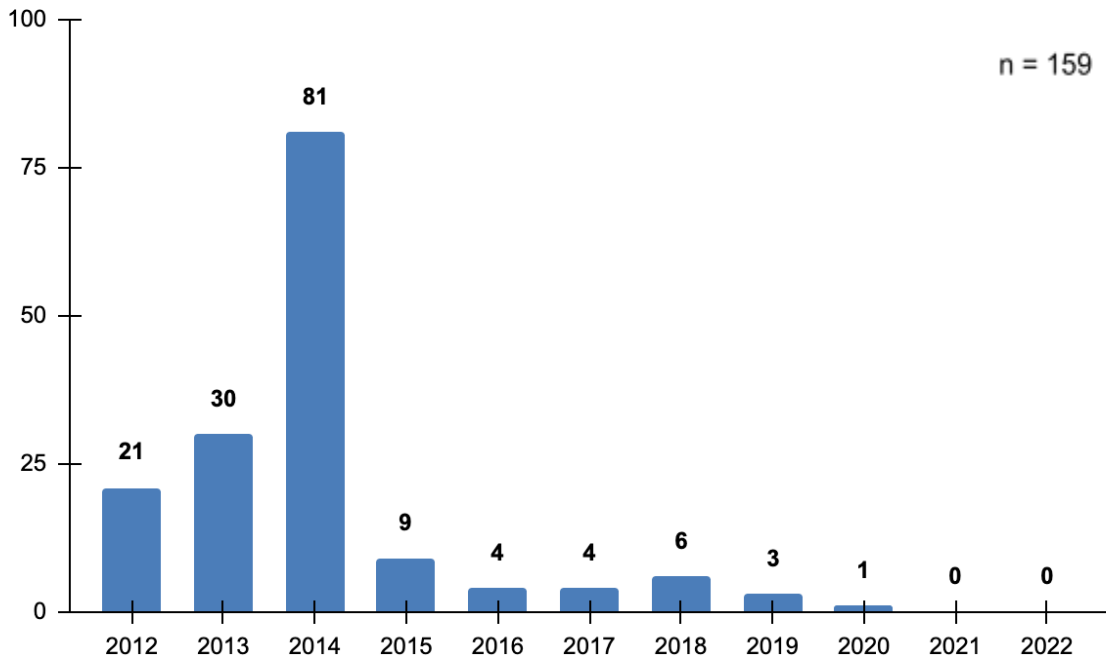


Figura 29 - Distribuição no DF de casos notificados de infecção por *B. pertussis* por critério laboratorial por ano no SINAN  
Fonte: (SINAN, 2023)

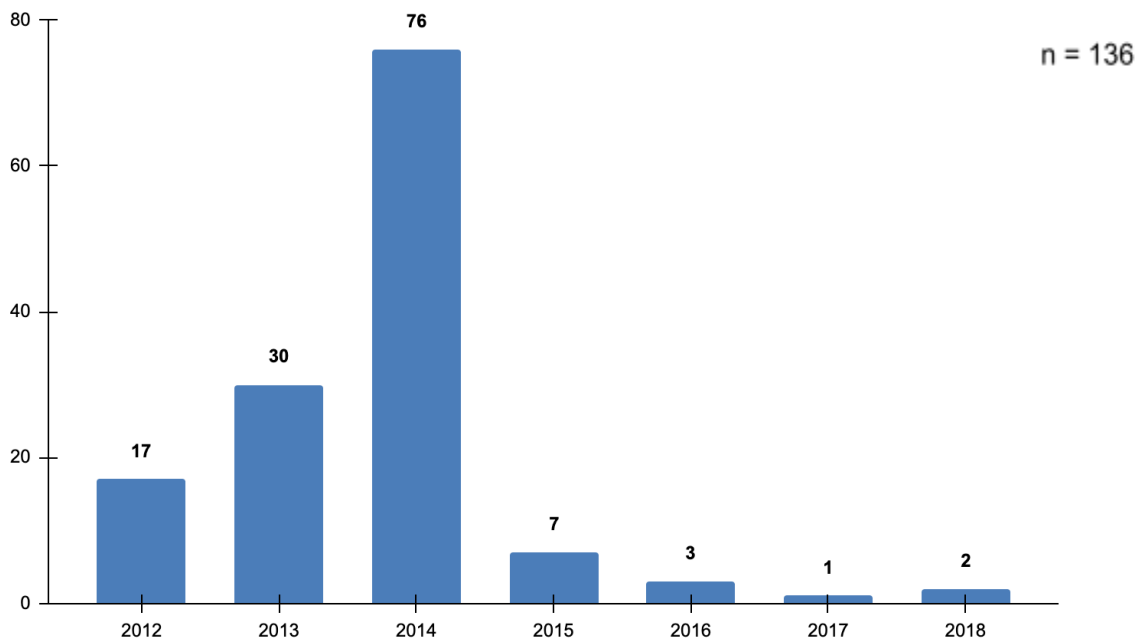


Figura 30 - Distribuição no DF de isolados de *B. pertussis* por ano – LACEN/DF

Um estudo realizado por Leite (2019) visou verificar a ocorrência de isolados de *B. pertussis* deficientes em pertactina no Brasil no período de 2010 a 2016. Para tanto, foi necessário analisar 555 cepas de um universo total de 3.557 isolados de *B. pertussis* provenientes das cinco regiões geográficas do Brasil. A seleção dos isolados deu-se aleatoriamente respeitando as distribuições proporcionais segundo área geográfica brasileira e ano calendário do recorte temporal determinado pela pesquisadora.

O total de cepas de *B. pertussis* isoladas do DF e enviados pelo LACEN/DF para o IAL, foi de 135 no período de 2010 a 2016, porém, apenas 71 cepas (52,6%) foram analisadas por Leite (2019). A amostra total do presente estudo disponibilizado pelo LACEN/DF ao LAMP/UnB, conforme discutido anteriormente e representado pela figura 30, foi de 136 isolados de *B. pertussis*, porém, oriundos do período de 2012 a 2018. Levando em consideração o recorte temporal de isolamento de cepas de *B. pertussis* em comum aos dois estudos, ou seja, entre os anos de 2012 a 2016, 132 cepas do DF foram enviadas pelo LACEN/DF para o IAL. Este fato torna-se relevante, pois reforça a fidedignidade dos dados analisados na presente pesquisa, além do IAL ter tido papel fundamental de contribuição para este trabalho, uma vez que foi o responsável por realizar a sorotipagem das cepas de *B. pertussis* circulantes no DF.

Considerando a distribuição de isolados de *B. pertussis* por ano no DF oriundos do LACEN/DF, ficou evidente o pico de incidência de isolados (76) no ano de 2014. A tabela 4 demonstrou que não houve diferenças estatísticas significativas entre os dados obtidos pelo LACEN/DF (76) e as notificações registradas no SINAN (81), ou seja, pelo teste t de Student ( $p=0,61$ ) os resultados são equivalentes e concordantes. Tais achados corroboram do ponto de vista estatístico que o universo amostral pesquisado foi fidedigno aos casos notificados e confirmados no SINAN.

**Tabela 4** - Distribuições de isolados de *B. pertussis* – LACEN/DF versus SINAN

Ano	Isolados LACEN-DF	Notificações SINAN Critério Laboratorial
2012	17	21
2013	30	30
2014	76	81
2015	7	9
2016	3	4
2017	1	4
2018	2	6
2019	0	3
2020	0	1
2021	0	0
2022	0	0
Total	136	159
Média	12,36	14,45
Desvio Padrão	23,12	24,00

p=0,61 (teste t de Student)

### 5.1.3 Perfil epidemiológico da coqueluche no Distrito Federal

Através da Lei Federal nº 4.545, promulgada em 1964, o Distrito Federal foi organizado em Regiões Administrativas (RAs). Naquele momento, o território contava com oito RAs, estabelecidas com base no progresso e expansão da área urbana do Distrito Federal (BRASIL, 1964). Com o passar do tempo e o desenvolvimento da região, esse número cresceu, e hoje o Distrito Federal é composto por 33 Regiões Administrativas, conforme estabelecido pela Lei Complementar nº 958, datada de 19 de dezembro de 2019 (BRASIL, 2019) e representado pela figura 31 (CASTRO, 2020).



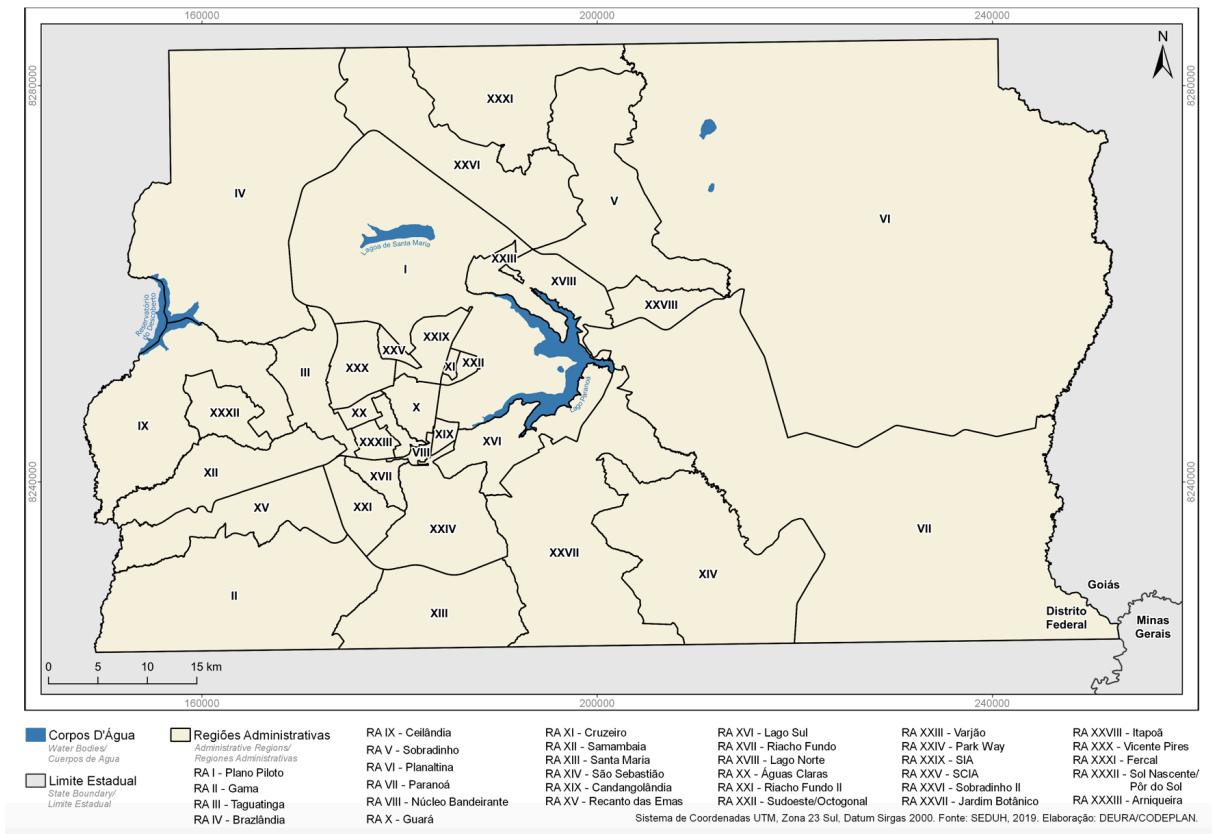


Figura 31 - Regiões Administrativas do Distrito Federal  
Fonte: (CASTRO, 2020)

A figura 32 representa a distribuição de isolados de *Bordetella pertussis* por unidade de saúde do Distrito Federal. Considerando a localização geográfica de cada unidade a partir de sua respectiva RA, os isolados de *B. pertussis* mais frequentes foram oriundos do Plano Piloto (RA I), que compreendem os bairros de Brasília, Asa Sul e Asa Norte. Ao todo foram 65 isolados (47,8%) provenientes do Hospital Alvorada (3), Hospital de Base de Brasília (1), Hospital Materno Infantil (39); Hospital Santa Lúcia (4); Hospital Regional da Asa Norte (12); LACEN (5); e Hospital Santa Helena (1). Dos 65 isolados da RA I, a maioria (60%) foram do HMIB.

De acordo com Ribeiro e Mendes (2019) que realizaram um estudo descritivo, baseado na revisão das notificações compulsórias de coqueluche no SINAN entre 2007 e 2016, dos pacientes confirmados e diagnosticados com coqueluche, o Hospital Materno Infantil de Brasília liderou o número de internações por coqueluche, com 143 casos, representando 21,7% do total, enquanto o Hospital Regional de Taguatinga veio em segundo, com 124 pacientes tratados para a mesma doença, o que corresponde a 18,82% dos casos nos anos estudados.

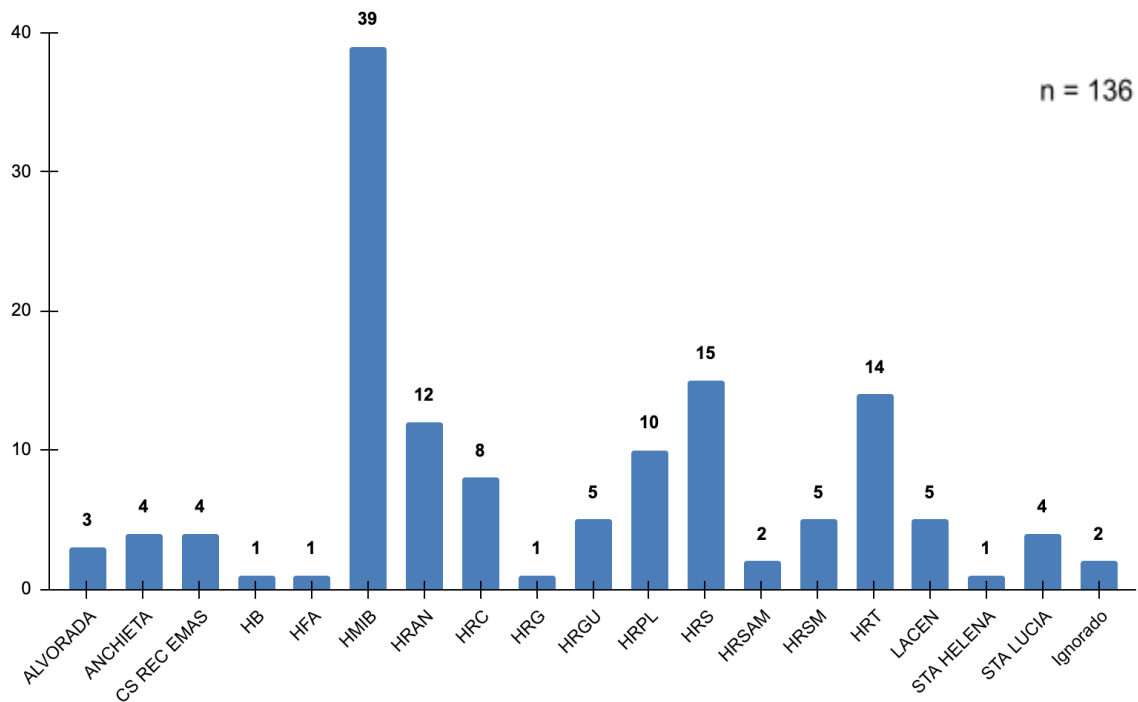


Figura 32 - Distribuição no DF de isolados de *B. pertussis* por Unidade de Saúde

Legenda: CS REC Emas: Centro de Saúde do Recanto das Emas; HB: Hospital de Base de Brasília; HFA: Hospital das Forças Armadas; HMIB: Hospital Materno Infantil de Brasília; HRAN: Hospital Regional da Asa Norte; HRC: Hospital Regional de Ceilândia; HRG: Hospital Regional do Gama; HRGU: Hospital Regional do Guará; HRPL: Hospital Regional de Planaltina; HRS: Hospital Regional de Sobradinho; HRSAM: Hospital Regional de Samambaia; HRSM: Hospital Regional de Santa Maria; HRT: Hospital Regional de Taguatinga; LACEN: Laboratório Central de Saúde Pública; STA Helena: Hospital Santa Helena; STA Lúcia: Hospital Santa Lúcia

Confrontando os achados de Ribeiro e Mendes (2019) com os dados da presente pesquisa, foram isolados do Hospital Regional de Taguatinga e do Hospital Anchieta, que pertencem à RA III, 14 isolados (10,3%) e 4 isolados (2,94%) de *B. pertussis* respectivamente, totalizando 18 isolados (13,24%).

#### 5.1.4 Dados demográficos da coqueluche no Distrito Federal

A classificação das faixas etárias do ser humano é determinada levando em consideração o ciclo completo de crescimento e desenvolvimento do indivíduo, dividido em duas fases essenciais, os períodos pré e pós-natal. No período pré-natal, ou seja, durante a gestação, a divisão etária é classificada em: embrionário (primeiro trimestre); fetal precoce (segundo trimestre) e fetal tardio (terceiro trimestre). Já o período pós-natal compreende as fases neonatal, infância e adolescência. O período neonatal, também conhecido como recém-nascido,

compreende de 0 a 28 dias de vida. Durante a infância, há a divisão das fases lactente (29 dias a 2 anos de idade); pré-escolar (2 a 6 anos) e escolar (6 a 10 anos). Já a adolescência compreende a fase pré-puberal (10 a 14 anos); puberal (14 a 16 anos) e pós-puberal (16 a 20 anos) (GILL, 2018; MARTORELL, 2013; PEDIATRIA, 2022).

O conceito de classificação das faixas etárias facilita a compreensão da representação das figuras 33 e 34, que apresentam a distribuição de isolados de *B. pertussis* no Distrito Federal no período de 2012 a 2018, por faixa etária e fases da vida respectivamente. Dos 136 isolados, 116 (85,3%) foram provenientes de crianças com até 2 anos de idade, sendo 102 (75%) destes lactentes.

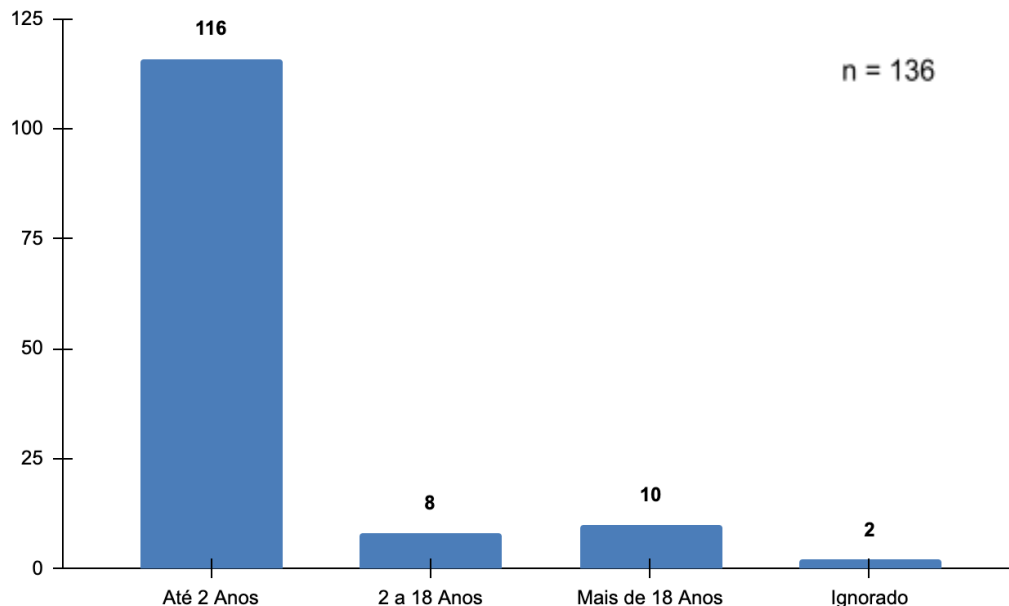


Figura 33 - Distribuição no DF de isolados de *B. pertussis* por faixa etária

Segundo de Ribeiro e Mendes (2019) no Distrito Federal entre 2007 e 2016, a grande maioria dos casos de coqueluche (82,5%) ocorreu em pacientes com menos de 1 ano de idade, com registro de 21 óbitos de crianças com menos de 4 meses de idade. De acordo com Rocha et. al (2017) em um estudo realizado entre 2012 e 2014 em Brasília, observou-se uma maior ocorrência de culturas positivas de *B. pertussis* entre crianças de 2 a 4 meses (42,4%), seguida pela faixa etária de 5 a 6 meses (6,5%) e 7 meses a 2 anos (7,6%) totalizando 56,5% de isolados oriundos de lactentes.

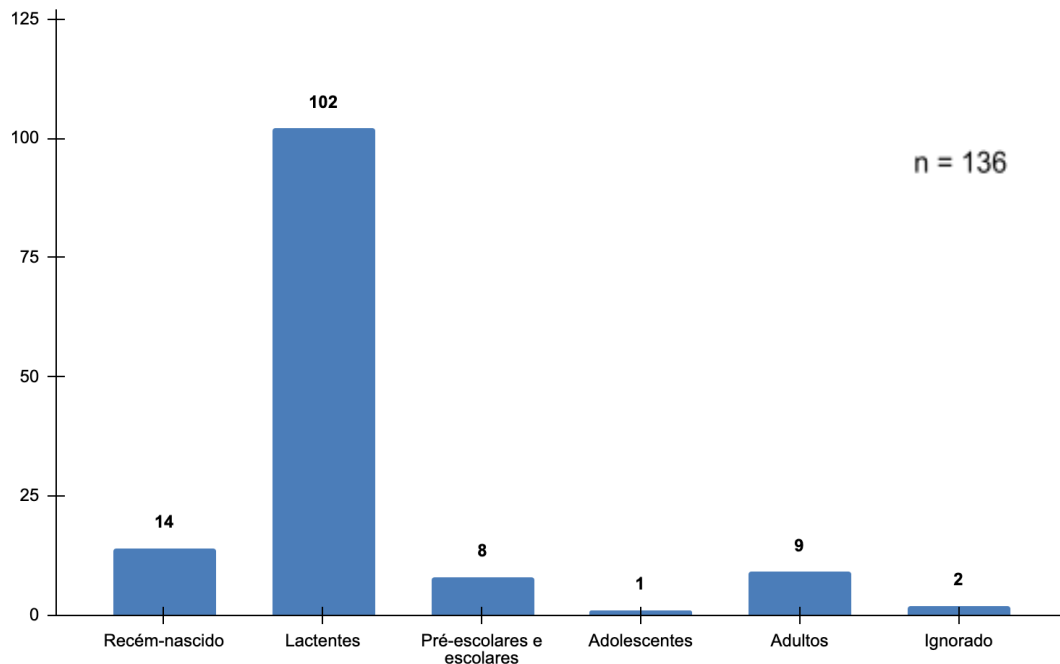


Figura 34 - Distribuição no DF de isolados de *B. pertussis* por fases da vida

Machado e Marcon (2022) realizaram um estudo da incidência de coqueluche em crianças menores de 1 ano no Brasil e verificaram que entre janeiro de 2008 e dezembro de 2018, o Brasil registrou um total de 20.650 casos de coqueluche confirmados em bebês com menos de um ano de idade, sendo que 10.760 desses casos (52%) foram em crianças menores de três meses. No ano de 2008, 967 casos foram reportados em bebês menores de um ano. O ano de 2014 destacou-se pelo maior número de casos, com um total de 5.033, dos quais 2.845 envolveram bebês de até três meses de idade, representando 56% do total de casos daquele ano. Os pesquisadores identificaram que a incidência de coqueluche em crianças menores de um ano aumentou de 30,46 casos por 100 mil habitantes em 2008 para 170,52 casos por 100 mil habitantes em 2014.

É sabido que a coqueluche apresenta taxas de incidência e severidade especialmente elevadas em neonatos e lactentes. Mesmo com a existência de campanhas de imunização, a coqueluche ainda representa um significativo desafio para a saúde pública (VAZ-DE-LIMA et al., 2019; WHO, 2023b). No Brasil, o esquema vacinal infantil vigente abrange a administração de três doses da vacina pentavalente, que protege contra difteria, tétano, pertússis, hepatite B (recombinante) e *Haemophilus influenzae* tipo b (conjugada), aplicada aos 2, 4 e 6 meses de idade. Além disso, são previstos reforços da vacina DTP, específica para

difteria, tétano e pertússis, quando a criança atinge 15 meses e novamente aos 4 anos de idade (BRASIL, 2020b). Desde 2001, observou-se uma elevação mundial na incidência de coqueluche, sobretudo em crianças com menos de 1 ano de idade, particularmente entre aquelas com menos de 3 meses. Esse aumento pode ser relacionado a esquemas de vacinação incompletos (GUIMARÃES; CARNEIRO; CARVALHO-COSTA, 2015).

No Brasil, desde novembro de 2014, com o propósito de diminuir os índices de incidência e mortalidade causados pela coqueluche em bebês, o Ministério da Saúde passou a recomendar a inclusão da vacina dTpa (difteria, tétano e pertússis acelular) no Programa Nacional de Imunizações para gestantes (SKOFF et al., 2015). Conforme este programa, aconselha-se que as gestantes recebam uma dose da vacina dTpa a partir da 20<sup>a</sup> semana de gravidez. Caso não tenham sido imunizadas durante o período gestacional, a vacinação é recomendada no período pós-parto, conhecido como puerpério (BRASIL, 2020b).

O propósito da imunização com a vacina dTpa durante a gestação é duplo: proteger a mãe contra a infecção pela *B. pertussis* e prevenir a transmissão deste patógeno ao bebê por via vertical. Além disso, essa estratégia visa aumentar a transferência de anticorpos da mãe para o feto através da placenta, proporcionando, assim, uma proteção antecipada ao recém-nascido contra a coqueluche antes mesmo dele receber sua primeira dose da vacina pentavalente aos dois meses de idade (GKENTZI et al., 2017).

Diversas teorias foram propostas para esclarecer o crescimento no registro de casos de coqueluche no Brasil, incluindo mutações genéticas na bactéria *B. pertussis*. Outra possibilidade seria a diminuição na eficácia imunogênica da vacina acelular (dTpa), contribuindo assim para uma maior disseminação da doença entre adolescentes, adultos, e conseqüentemente os lactentes (GUIMARÃES; CARNEIRO; CARVALHO-COSTA, 2015; MACHADO; MARCON, 2022).

A figura 35 apresenta a distribuição de isolados de *B. pertussis* no Distrito Federal por gênero, com predomínio para o gênero feminino (55,88%), versus 41,91% de isolados provenientes do gênero masculino. Do ponto de vista estatístico, a população acometida não demonstrou diferença significativa em relação ao sexo. Dado semelhante foi encontrado por Ribeiro e Mendes (2019) que verificou maior frequência de coqueluche no gênero feminino (54,43%), contra 45,57% no gênero masculino.

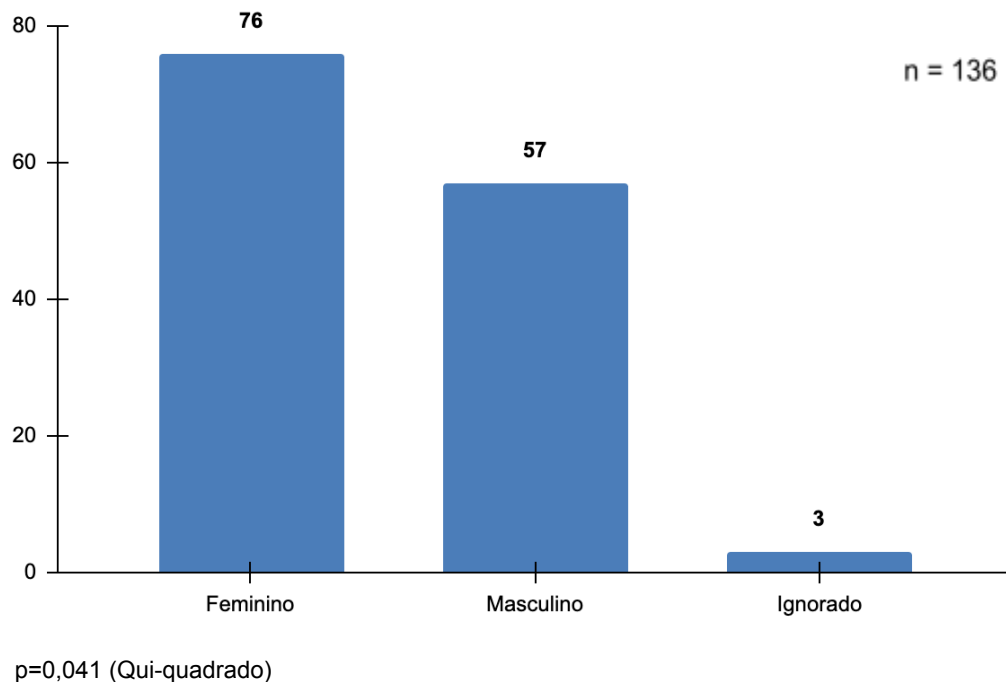


Figura 35 - Distribuição no DF de isolados de *B. pertussis* por gênero

### 5.1.5 Sorotipos de *B. pertussis* circulantes no Distrito Federal

A sorotipagem, ou identificação antigênica, representa uma das técnicas mais tradicionais para a classificação de *Bordetella pertussis*, a partir da macroaglutinação em lâmina para identificar o antígeno somático O1, que é específico da espécie *pertussis* do gênero *Bordetella*, que quando reagente, confirma sua presença. A sorotipagem foi desenvolvida em um período em que havia poucas opções metodológicas para distinguir entre cepas bacterianas (ELDERING; HORNBECK; BAKER, 1957; ROBINSON; ASHWORTH; IRONS, 1989).

Originalmente, uma ampla variedade de sorotipos era empregada para diferenciar as cepas de *B. pertussis*. Atualmente, a diferenciação se limita essencialmente aos sorotipos 1, 2 e 3. O antígeno do sorotipo 1, que faz parte do lipo-oligossacarídeo da *B. pertussis*, não serve como critério de distinção entre as cepas dessa bactéria, pois não apresenta variação (LEITE, 2019; MOOI et al., 2000). Entretanto, foi identificado que os epítomos relacionados aos sorotipos 2 e 3 estão vinculados às fímbrias, especificamente denominadas fímbrias do sorotipo 2 e do sorotipo 3 (ou Fim2 e Fim3) que são cruciais para diferenciar as cepas e para

monitorar as variações ao longo do tempo na população de *B. pertussis* (ASHWORTH; IRONS; DOWSETT, 1982; LEITE, 2019).

A identificação dos sorotipos de *B. pertussis* do presente estudo seguiu o método proposto por Robinson et. al (1989), que consiste na observação da aglutinação em presença dos antígenos O1, Fim2 e Fim3. Caso não seja detectada nenhuma reação com os antígenos fimbriais, ou seja, não haja aglutinação na lâmina, o sorotipo é classificado como indeterminado.

A classificação dos sorotipos de *B. pertussis* foi feita com base na expressão desses antígenos da seguinte forma: Sorotipo 1,2: definido pela associação do antígeno somático O1 com a presença do antígeno fimbrial Fim2; Sorotipo 1,3: determinado pela associação do antígeno somático O1 com a presença do antígeno fimbrial Fim3; Sorotipo 1,2,3: identificado quando o antígeno somático O1 está presente juntamente com ambos os antígenos fimbriais Fim2 e Fim3 (Fim2,3); e Sorotipo 1,4: quando há aglutinação do antígeno somático O1, mas não há aglutinação dos antígenos fimbriais Fim2 e Fim3 (LEITE, 2019; ROBINSON; ASHWORTH; IRONS, 1989; ROCHA et al., 2017).

Diante desse contexto, a figura 36 apresenta os sorotipos de *B. pertussis* circulantes no Distrito Federal. Dos 136 isolados, 64 (47,05%) expressaram o sorotipo 1,3 (Fim3). A barra indicada como "ignorado" representa 33 isolados (24,25%) de *B. pertussis* sorotipadas pelo IAL, porém, não foram disponibilizadas para o LAMP/UnB. O segundo fenótipo mais expressivo foi o sorotipo 1,2 (Fim2), representando 19,12% (26) dos isolados.

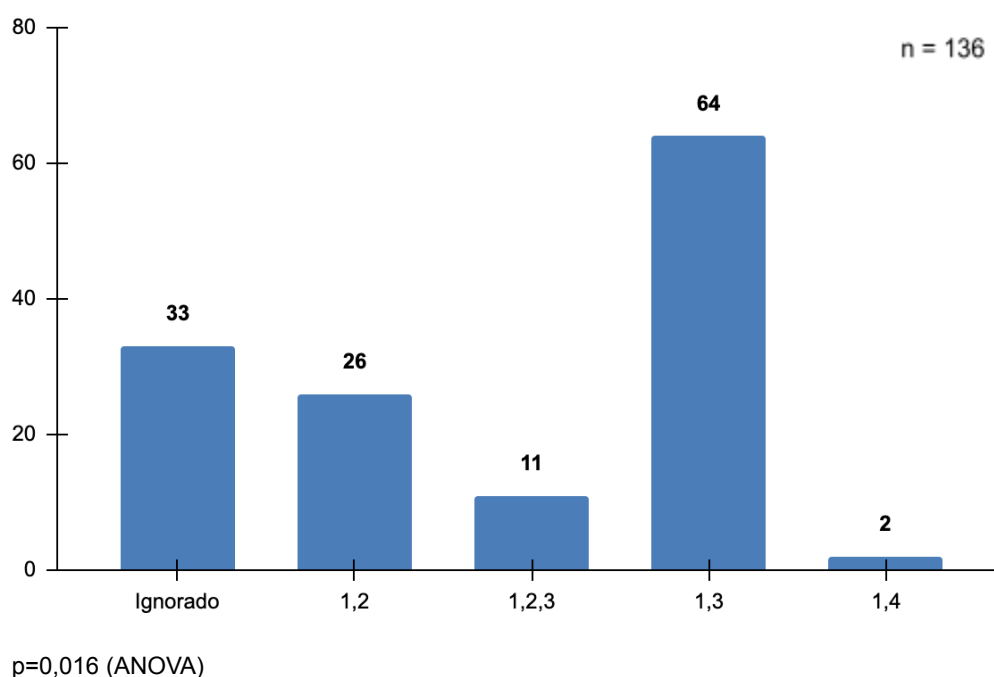


Figura 36 - Distribuição no DF de sorotipos de isolados de *B. pertussis*

Rocha et al., (2017) também realizaram análises da sorotipagem de isolados de *B. pertussis* circulantes no Distrito Federal no período de 2012 a 2014. Ao longo do intervalo de tempo estudado, os pesquisadores supracitados identificaram os três sorotipos de *B. pertussis*: Fim2, Fim3 e Fim2,3. O sorotipo Fim2 foi o mais comum, representando 53,26% dos isolados, seguido por Fim3 com 32,61% e Fim2,3 com 13,04%, resultados estes diferentes do apresentado na figura 36. Houve também uma cepa que reagiu exclusivamente com o antissoro específico para a espécie de *B. pertussis* (O1), sem apresentar reação aos antígenos fimbriais Fim2 e Fim3.

Entretanto, Leite et al., (2012) por sua vez, encontraram resultados semelhantes à presente pesquisa, ao identificarem a predominância de isolados de *B. pertussis* do sorotipo Fim3 (97%), circulantes na cidade São Paulo em um estudo realizado entre 2006 a 2008, assim como Zhang et al., (2010) também encontraram o perfil Fim3 predominante (73%) em um estudo realizado na China no período de 1997 a 2005. Resultados semelhantes são relatados por Kallonen e He (2009) em estudos realizados na Europa.

Há de se destacar que, estudos ao redor do mundo evidenciam que o perfil de sorotipo Fim3 está presente na população vacinada contra a coqueluche. Enquanto que a variação fimbrial Fim2, e Fim2,3 prevalecem em populações não imunizadas (HALLANDER et al., 2005; KALLONEN; HE, 2009; PRESTON, 1985).



Estes achados corroboram os resultados da presente pesquisa, uma vez que a população do Distrito Federal possui cobertura vacinal acima dos 80%, variando entre 92% a 86% entre os anos de 2012 a 2018, conforme apresentado pela figura 26 (SINAN, 2023).

A figura 37 retrata a distribuição de sorotipos de isolados de *B. pertussis* no Distrito Federal por unidade de saúde. Houve predomínio de isolados nos hospitais: HMIB (39 - 28,68%), HRT (15 - 11,01%) e HRS (14 - 10,30%) com destaque para o sorotipo 1,3 em todas as unidades hospitalares citadas. O sorotipo fimbrial Fim3 no HRS (9) correspondeu a 64,28% dos sorotipos da unidade de saúde. No HMIB (20) 51,28% dos sorotipos eram do tipo Fim3, e no HRT (7) 46,67%.

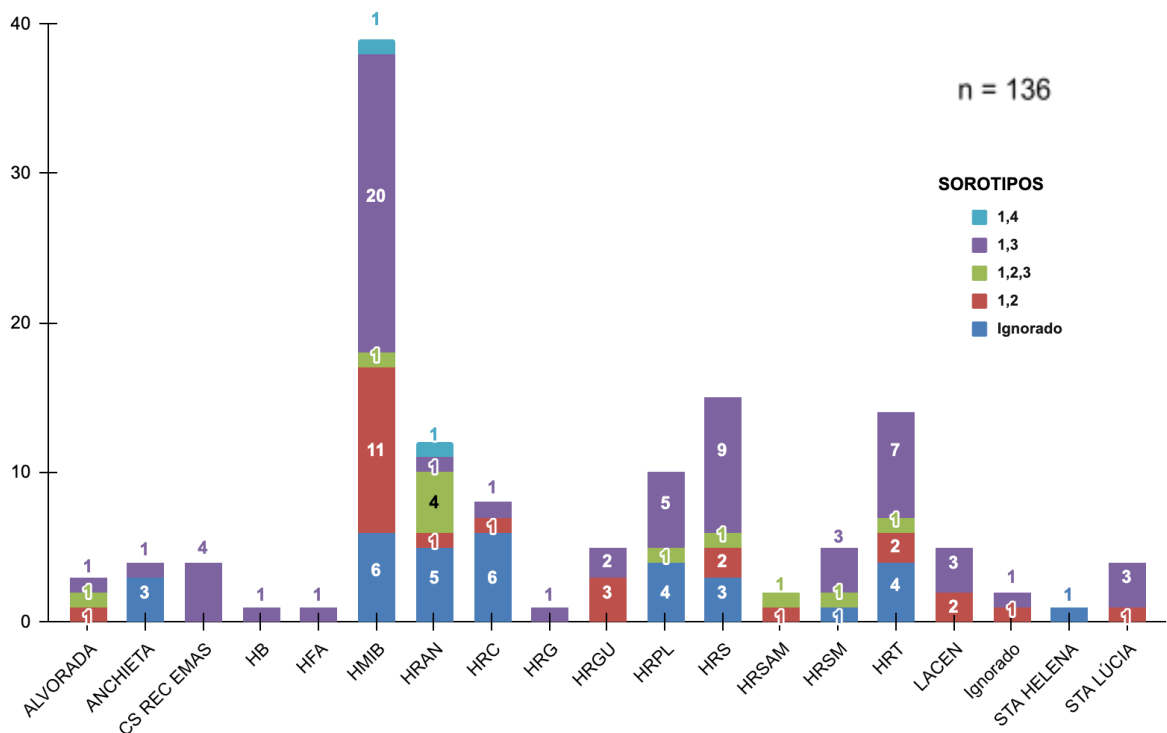


Figura 37 - Distribuição no DF de sorotipos de isolados de *B. pertussis* por Unidade de Saúde

Em relação à distribuição de sorotipos pelas RAs do Distrito Federal, de todas as 33 RAs, 10 apresentaram algum isolado de *B. pertussis* do tipo Fim3 (RAs I, II, III, V, VI, IX, X, XI, XIII e XV). Apenas a unidade de saúde HRSAM, localizada em Samambaia (RA XII) não apresentou. Ou seja, cepas de *B. pertussis* do tipo Fim3 circularam em aproximadamente 30% do território geográfico do Distrito Federal, enquanto que os sorotipos Fim2 e Fim2,3 circularam em 18% do território, ou seja, em apenas 6 RAs. Rocha et al., (2017) encontraram resultados diferentes, uma vez

que em 15 RAs (45,45%) foram encontrados o sorotipo Fim2, em 9 regiões (27,27%) encontrou-se o sorotipo Fim3 e em 7 RAs (21,21%) circulou o sorotipo Fim2,3.

A figura 38 representa a distribuição de sorotipos de *B. pertussis* no DF no período de 2012 a 2018. Foi possível identificar os três sorotipos nos anos de 2012 a 2014 (Fim2, Fim3 e Fim2,3), sendo possível observar a prevalência do sorotipo Fim3 e ausência deste nos anos seguintes. Entretanto, não significa dizer que o sorotipo fimbrial Fim3 tenha parado de circular no DF entre os anos de 2015 a 2018, uma vez que os 13 isolados de *B. pertussis* deste período foram classificados como ignorados, ou seja, os autores desta pesquisa não tiveram acesso aos sorotipos dessas cepas sorotipadas pelo IAL.

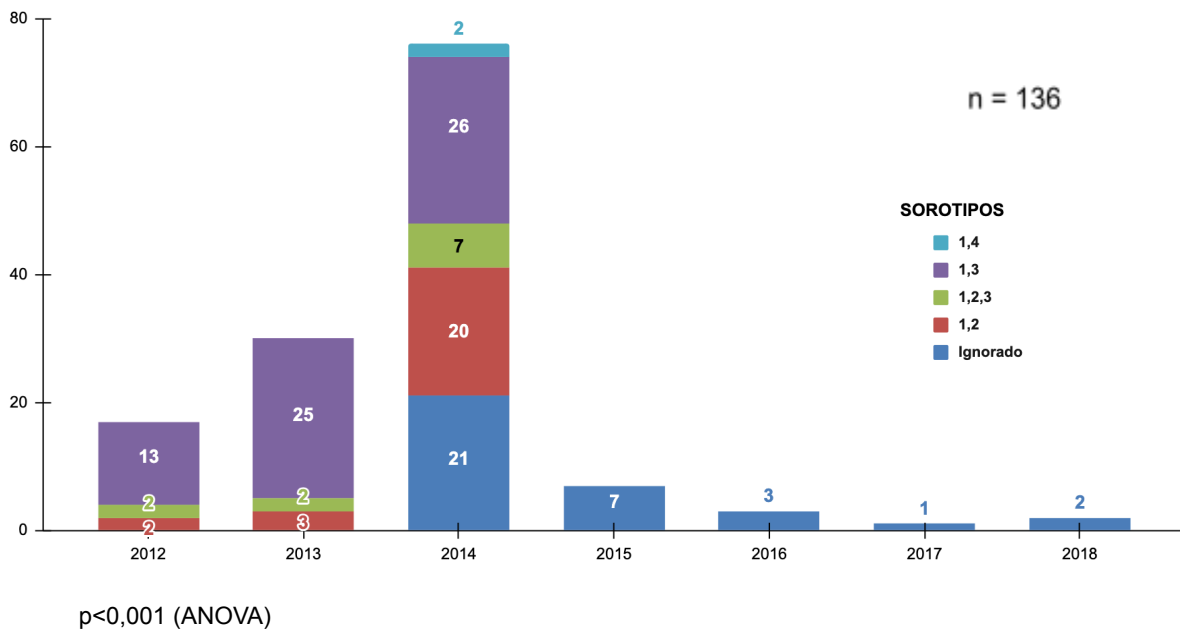


Figura 38 - Distribuição no DF de sorotipos de isolados de *B. pertussis* por ano

O perfil fimbrial Fim3 em 2012, representou 76,47%. Em 2013, Fim3 correspondeu a 83,33% dos sorotipos identificados. Já em 2014, 34,21% foi a representatividade do sorotipo Fim3. No mesmo ano percebeu-se que o sorotipo Fim2 representou 26,31% dos sorotipos identificados. Rocha et al., (2017) também encontraram entre 2012 a 2014 os três sorotipos fimbriais com prevalência de Fim3. Tais achados sugerem que a partir de 2014 houve uma substituição da circulação do sorotipo Fim3, pelo Fim2 no Distrito Federal, sendo tal hipótese confirmada por Leite (2019) a nível nacional, e internacional por um estudo realizado por Bouchez et al., (2021) na França.

Comparando os resultados do presente estudo com a pesquisa de Leite (2019), que realizou a sorotipagem de 555 isolados de *B. pertussis* em todo o Brasil, no período de 2010 a 2016 (figura 39), foi possível notar uma variação na predominância dos sorotipos ao longo dos anos. Entre 2010 e 2012, o sorotipo Fim3 foi o mais frequente, mas começou a ser progressivamente substituído pelo sorotipo Fim2, que se tornou o mais prevalente em 2014.

Posteriormente, nos anos de 2015 e 2016, houve uma nova mudança na dominância dos sorotipos, com o sorotipo Fim2,3 emergindo como o principal, representando cerca de 75% dos isolados em comparação com os outros sorotipos. Isto sugere que possivelmente dentre os sorotipos da presente pesquisa, classificados como ignorado, haja a presença do perfil fimbrial Fim2,3, haja vista que os isolados de *B. pertussis* do Distrito Federal fizeram parte da amostra de Leite (2019).

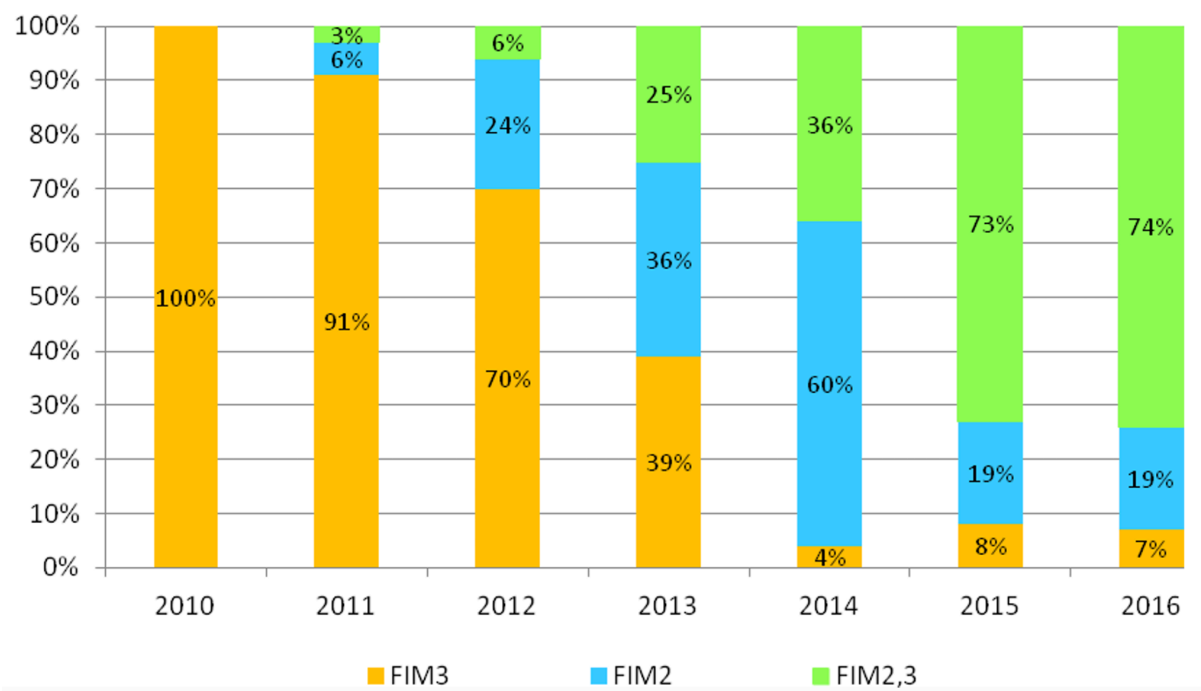


Figura 39 - Sorotipos circulantes entre os 555 isolados de *B. pertussis* estudados no Brasil, 2010 a 2016.

Fonte: (LEITE, 2019)

Estudos ao redor do mundo reforçaram os achados de Leite (2019). Uma pesquisa realizada na França entre 2006 e 2018 que teve como um dos objetivos determinar os sorotipos fimbriais a partir de 1.058 isolados clínicos de *B. pertussis* e analisar suas variações e tendências ao longo do período, determinou que a maioria

dos isolados (90,1%) expressou o sorotipo Fim3. Entretanto, a partir do ano de 2011, notou-se um crescimento constante de sorotipos Fim2, porém, ainda com a predominância de isolados Fim3 (80%). A partir de 2014 houve uma queda dos sorotipos Fim3 e um crescimento de Fim2, semelhante ao identificado na presente pesquisa (BOUCHEZ et al., 2021).

Em outros países da Europa o cenário se repetiu, a partir de um estudo realizado em nove países (Bélgica, Dinamarca, Finlândia, França, Itália, Noruega, Suécia, Países Baixos e Reino Unido) no período de 2012 a 2015, que analisou 265 isolados de *B. pertussis* e suas variações fimbriais. Dos isolados analisados, 53,2% continham Fim3 e 45,3% possuíam Fim2. Observou-se que, na Dinamarca (81,5%) e na Finlândia (78,6%), o sorotipo Fim2 era mais prevalente. Por outro lado, na França (93,1%), na Suécia (82,8%) e no Reino Unido (63,3%), o sorotipo Fim3 era o mais comum. Em outros países incluídos no estudo, a proporção entre os dois sorotipos mostrou-se mais equilibrada (BARKOFF et al., 2018).

## 5.2 Variabilidade alélica de *fim3* e *ptx*

Antes da vacinação infantil ser introduzida na década de 1950, a coqueluche era uma causa significativa de mortalidade infantil global (KALLONEN; HE, 2009). Apesar do sucesso da vacinação em reduzir morbidade e mortalidade, a doença ressurgiu nos anos 1990 em países com altas taxas de vacinação. A coqueluche tornou-se a doença prevenível por vacina mais comum nos países desenvolvidos. O aumento de casos foi notado principalmente entre adolescentes e adultos, onde a doença apresenta sintomas mais leves (BOUCHEZ et al., 2015; MOOI, 2010).

A vacinação contra a coqueluche introduziu uma nova seleção sobre as populações de *B. pertussis*, que inicialmente se adaptaram às vacinas de célula inteira (wP) em todo o mundo e, mais recentemente, às vacinas acelulares (aP) em países desenvolvidos. Essa pressão seletiva levou a mudanças nos isolados de *B. pertussis*, as quais foram identificadas utilizando diversas metodologias de tipagem e sequenciamento genômico completo (BOUCHEZ et al., 2015; HEGERLE et al., 2012; HEGERLE; GUIISO, 2013).

Embora a *B. pertussis* seja caracterizada por uma estrutura genética bastante uniforme (monomórfica), ela demonstra uma notável habilidade de variar geneticamente dentro de seus próprios genes por meio de rearranjos e

polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) (MOOI, 2010). Foram notadas variações alélicas em áreas do genoma importantes para a resposta antigênica, incluindo o gene *prn*, que possui 17 alelos e codifica a adesina pertactina (PRN); o gene *ptxP*, com 20 alelos, responsável pelo promotor do operon da toxina pertussis que produz a toxina pertussis (PT); o gene *ptxA*, com 11 alelos, que codifica a subunidade 1 (S1) da PT; e os genes *fim2* e *fim3*, que possuem dois e sete alelos, respectivamente, e codificam as proteínas fimbriais Fim2 e Fim3. Contudo, apesar dessas variações genéticas, elas não comprometeram a efetividade das vacinas de célula inteira (DIAVATOPOULOS et al., 2005; EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL., 2022; LEITE, 2019; MOOI; VAN DER MAAS; DE MELKER, 2014; VAN LOO et al., 2002).

Diante deste contexto, foram analisadas 136 cepas de *B. pertussis* circulantes no Distrito Federal, isoladas de pacientes clínicos, no intuito de serem identificados o perfil genotípico dessas linhagens em relação aos genes *fim3* e *ptx*, porém, apenas 94 isolados (69,12%) foram genotipados. Com o advento da pandemia da COVID-19 e a escassez de recursos financeiros, as demais cepas não puderam ser genotipadas.

### 5.2.1 Distribuição alélica de *fim3*

As 94 amostras analisadas passaram por amplificação e sequenciamento do gene *fim3* e os resultados revelaram uma considerável diversidade entre os isolados, identificando-se três diferentes tipos de alelos. A figura 40 apresenta a distribuição alélica do gene *fim3* dos isolados de *B. pertussis* circulantes no Distrito Federal. Evidenciou-se que a maior frequência de alelos (64) foi o do tipo 24 (*fim3-24*), representando 68,08% das amostras. Em segundo lugar emergiu o perfil alélico do tipo 3 (*fim3-3*) com 16 amostras (17,02%), seguido do alelo do tipo 1 (*fim3-1*), representando 14,9% dos isolados.

Segundo Bowden (2014) o locus *fim3*, responsável pela codificação das proteínas fimbriais, exibe uma diversidade polimórfica superior em comparação com outros *loci* que regulam a expressão de diferentes fatores de virulência da *B. pertussis*. Essa característica pode explicar a ampla variedade de alelos *fim3* identificados nas cepas analisadas neste estudo.

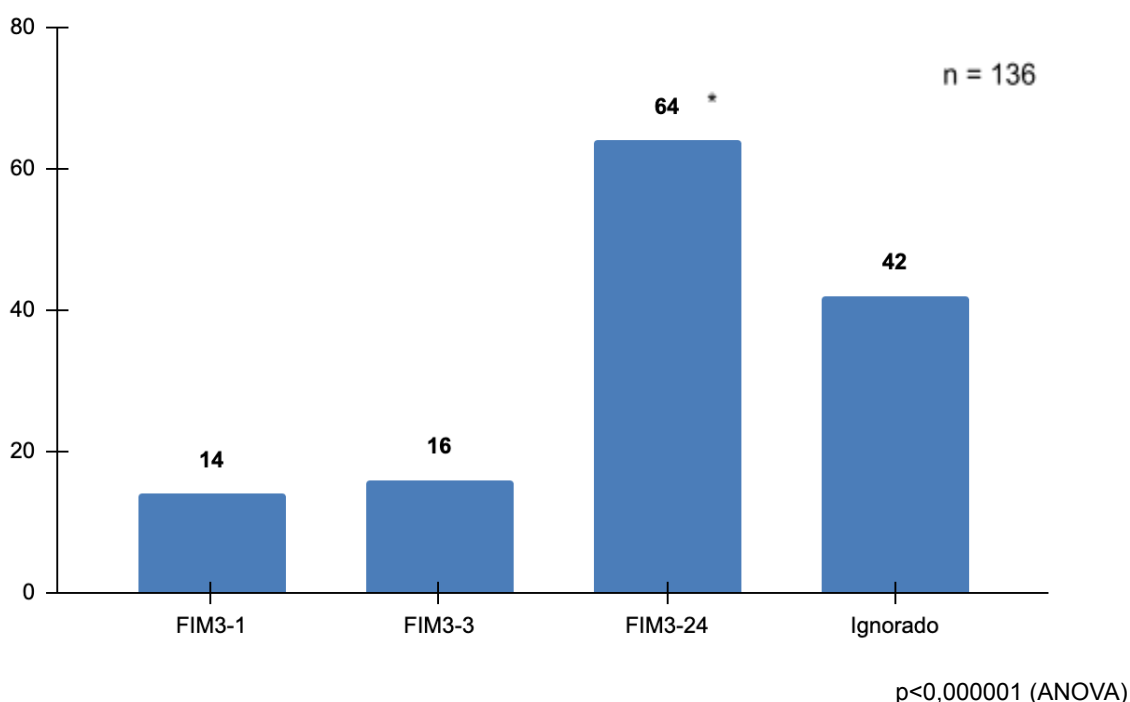


Figura 40 - Distribuição no DF de alelos 1, 3 e 24 do gene *fim3* de isolados de *B. pertussis*

O Programa Nacional de Imunização do Brasil (PNI) adota as vacinas wP, que são fabricadas pelo Instituto Butantan. Um estudo realizado por Akamatsu et al., (2015) apresentou a sequência genômica completa da cepa 137 de *B. pertussis* (também conhecida como cepa Butantan ou Bp137), que é empregada na elaboração da vacina wP. A pesquisa demonstrou que a cepa Bp137 carrega o alelo *fim3-1*.

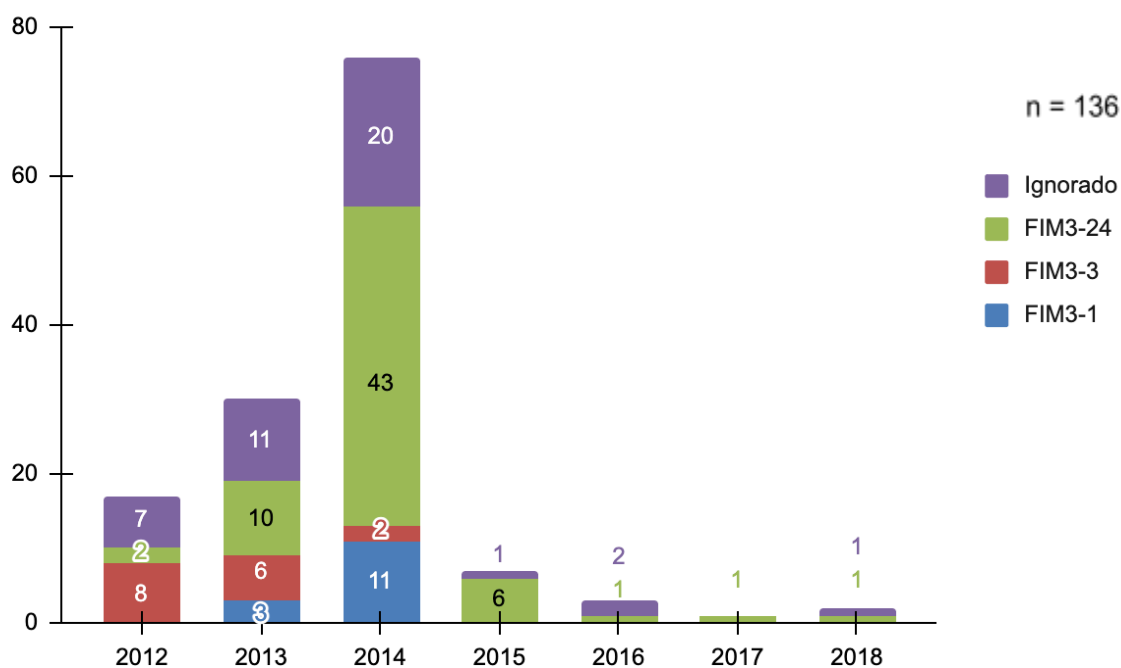
Diversos estudos relacionam o retorno da incidência da coqueluche às variações genóticas em certos fatores de virulência ou seus elementos reguladores. Os alelos *prn-1*, *ptxA-2*, *ptxP-1* e *fim2-1* foram identificados em várias cepas utilizadas em vacinas, que são diferentes da cepa do Butantan adotada com êxito em campanhas de vacinação em larga escala no Brasil desde os anos 1980 (AKAMATSU et al., 2015; BART et al., 2010, 2014; MOOI, 2010; VAN AMERSFOORTH et al., 2005).

Nesse contexto, aproximadamente 83% dos isolados de *B. pertussis* analisadas no presente estudo, apresentam alelos diferentes (*fim3-3* e *fim3-24*) do encontrado na cepa Bp127 (*fim3-1*) usada na vacina, sugerindo que a variação alélica pode ser um mecanismo adaptativo da bactéria à pressão seletiva imposta pela vacinação. A existência de diferenças antigênicas entre as cepas usadas em

vacinas e os isolados circulantes, especialmente em relação às fímbrias e outros fatores de virulência, foi observada em alguns estudos e pode desempenhar um papel significativo na adaptação da *B. pertussis* (BART et al., 2010, 2014).

Além disso, a prevalência elevada do alelo *fim3-24* chama a atenção, uma vez que, conforme apontado por Bart et al., (2014), tais genes são menos comuns na população, indicando uma distribuição global limitada. Esse fenômeno pode ser resultado das distintas pressões seletivas exercidas pela vacina de células inteiras em comparação com a vacina acelular, que atualmente é mais utilizada na maioria dos países, sobretudo nos países desenvolvidos.

A figura 41 apresenta a distribuição alélica do gene *fim3* que circulou no Distrito Federal entre os anos de 2012 a 2018, com prevalência do alelo *fim3-24* (56,58%) no ano de 2014, seguido do alelo *fim3-1* (14,47%) e por último o alelo *fim3-3* (2,63%). A partir do teste do Qui-quadrado ( $p=0,028$ ), foi possível determinar que a ocorrência do alelo *fim3-24* está associada ao pico da epidemia de coqueluche no Distrito Federal em 2014.



A ocorrência do alelo *fim3-24* está associada ao pico da epidemia em 2014 ( $p=0,028$  – Qui-quadrado)

Figura 41 - Distribuição no DF de alelos 1, 3 e 24 do gene *fim3* de isolados de *B. pertussis* por ano

Em 2012 o alelo prevalente foi o *fim3-3* (47,05%), enquanto que os alelos 1 e 24 eram menos frequentes. A partir de 2013 notou-se uma alteração significativa na distribuição dos alelos, com um aumento na presença de cepas contendo o alelo

*fim3-24*. De 2015 a 2018 as amostras analisadas evidenciaram predominantemente o alelo *fim3-24*. Essa rápida mudança no perfil dos alelos é típica da *B. pertussis*, devido à sua tendência a sofrer rearranjos genéticos (MOOI, 2010) e à alta capacidade do gene *fim3* de desenvolver polimorfismos, em comparação com outros genes relacionados a fatores de virulência (BOWDEN et al., 2014).

A figura 25 apresentada na pág. 49, ilustra um aumento progressivo no número de casos de coqueluche no Distrito Federal de 2012 a 2014, conforme os registros do SINAN (2023). Em 2001 houve um surto menor de 57 casos confirmados, se repetindo em 2004 com redução do número de casos até 2007. Em 2009, houve um surto novamente com 55 casos. No ano de 2010, observou-se uma redução nos casos, que foi seguida por um crescimento contínuo a partir de 2011 até o surto mais expressivo registrado no DF em 2014, com 301 casos confirmados. Após esse pico, a quantidade de casos começou a declinar. Esse padrão cíclico de surtos de coqueluche, com intervalos de 2 a 5 anos, é uma característica conhecida da doença (VAN GENT et al., 2015).

A mudança do perfil alélico das fímbrias (figura 41) entre 2012, quando o alelo *fim3-3* era predominante, e o ano de 2014 em diante, quando o alelo *fim3-24* passou a ser mais frequente, pode ter contribuído para um aumento na incidência das cepas de *B. pertussis* que estavam circulando no DF capazes de causar os sintomas de coqueluche, levando ao surto observado em 2014, mesmo com a cobertura vacinal no período de 92,6% (figura 26 - pág. 50). Isso ocorreu porque as mudanças na estrutura celular da *B. pertussis* podem ter influenciado na modulação da resposta imune, dificultando assim a interação celular parasita-hospedeiro, logo, o combate à infecção (MOOI; VAN DER MAAS; DE MELKER, 2014).

### 5.2.2 Distribuição alélica de *ptx*

A toxina pertussis desempenha um papel crucial na ativação da resposta imunológica induzida pela vacinação, uma vez que os anticorpos direcionados contra ela são essenciais para prevenir a invasão da *B. pertussis* nas células-alvo através de endocitose, processo este mediado pela própria toxina (CARBONETTI, 2010, 2016; FADUGBA et al., 2014). Além disso, foi comprovado que os anticorpos gerados em resposta à vacina, tanto de célula inteira quanto acelular, são importantes para a proteção do hospedeiro (VAN DER LEE et al., 2018). Portanto,



monitorar as variações alélicas no gene que codifica a PT (*ptx*) revela-se uma estratégia eficaz para avaliar o impacto da pressão exercida pela vacinação sobre as cepas de *B. pertussis* em circulação, contribuindo para um entendimento mais aprofundado do ressurgimento da coqueluche (DEWAN et al., 2020).

Diante deste contexto, as 94 amostras submetidas à amplificação do gene promotor da toxina pertussis *ptxP* foram igualmente sequenciadas e classificadas para determinar a diversidade genética presente nos isolados de *B. pertussis* circulantes no Distrito Federal. Observou-se uma uniformidade entre os isolados no que diz respeito à variação alélica, sendo verificado que todos compartilham o alelo *ptxP* tipo 3 (*ptxP*-3), conforme demonstrado na figura 42.

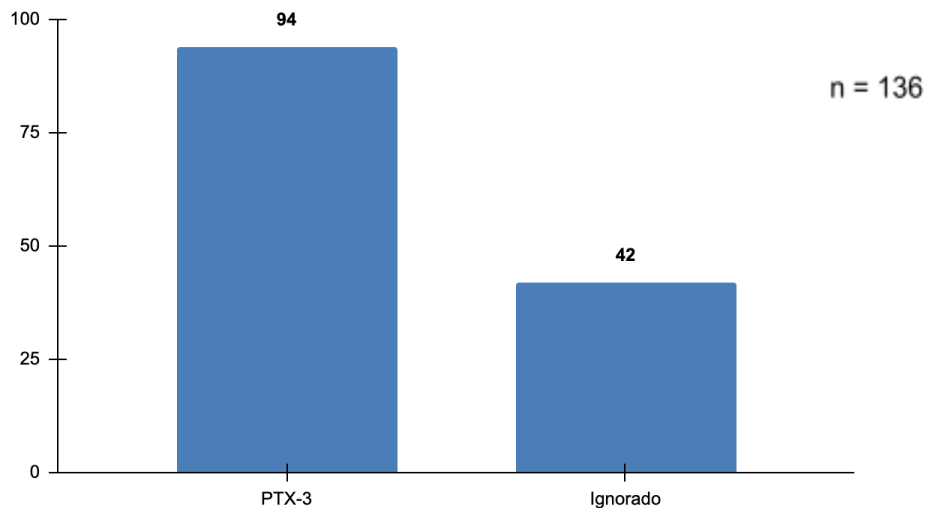


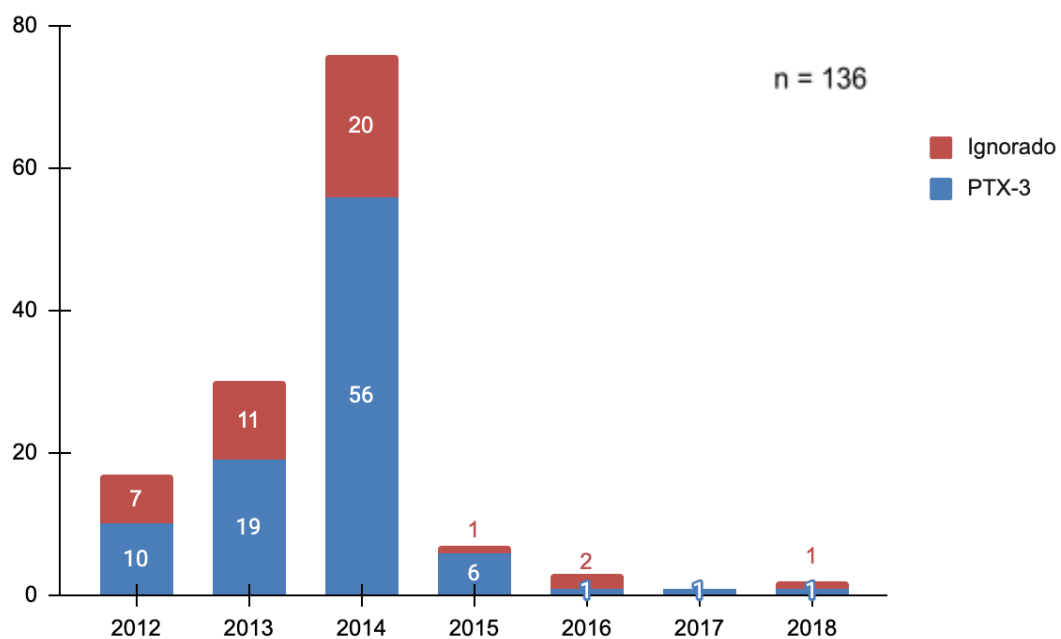
Figura 42 - Distribuição no DF do alelo 3 do gene *ptx* de isolados de *B. pertussis*

O alelo *ptxP*-3, inicialmente identificado na Holanda, tornou-se mais comum que os demais alelos, substituindo efetivamente o *ptxP*-1, conforme relatado por Bart et al., (BART et al., 2010). Com o tempo, linhagens que carregam o *ptxP*-3 foram observadas em outras regiões como Ásia, América do Sul, Europa e América do Norte, sugerindo que as cepas com esse alelo se disseminaram globalmente nas décadas de 1980 e 1990. Essa expansão fez do *ptxP*-3 um alelo de ampla distribuição internacional, o que pode justificar sua predominância entre os isolados examinados neste estudo (MOOI et al., 2009).

Conforme apontado por Mooi et al., (2009), pesquisas indicam que o alelo *ptxP*-3 está vinculado a uma maior capacidade adaptativa da *B. pertussis*, visto que cepas com esse alelo produzem a toxina pertussis em quantidades superiores. A

toxina pertussis ajuda na persistência do patógeno dentro do organismo hospedeiro ao interferir em componentes do sistema imune, tais como o sistema do complemento, fagocitose e a resposta a anticorpos (GOUW et al., 2014). Essa toxina é especialmente eficaz em bloquear a migração de células imunológicas, incluindo monócitos, neutrófilos e linfócitos. Foi observado também que cepas contendo o alelo *ptxP-3* conseguem colonizar mais efetivamente o tecido respiratório de camundongos, tanto vacinados quanto não vacinados (CARBONETTI, 2010; SAFARCHI et al., 2015). Portanto, a elevada produção desta toxina pode aumentar a virulência da *B. pertussis*, permitindo uma desregulação mais eficaz da imunidade do hospedeiro. Isso sugere que o alelo *ptxP-3* pode ter um papel importante na habilidade dos isolados clínicos deste estudo de colonizar o trato respiratório dos pacientes (MOOI et al., 2009).

A figura 43 apresenta a distribuição do alelo *ptx-3* de isolados de *Bordetella pertussis* circulantes no DF no período de 2012 a 2018, com prevalência no ano de 2014.



$p < 0,000001$  (ANOVA)

Figura 43 - Distribuição no DF do alelo 3 do gene *ptx* de isolados de *B. pertussis* por ano

A cepa Bp137, empregada nas vacinas distribuídas no Brasil, é caracterizada pelo alelo *ptxP-2* na região promotora do gene responsável pela codificação da toxina pertussis (AKAMATSU et al., 2015). Observou-se que todas as cepas de *B.*

*pertussis* circulantes no DF apresentaram alelos diferentes daqueles da cepa Bp137, sugerindo um mecanismo de variação alélica por parte das cepas em circulação para evitar a resposta imune gerada pela vacinação. Bart et al., (2010) relatam que divergências antigênicas foram identificadas entre as cepas utilizadas nas vacinas e as cepas em circulação, especialmente em genes que codificam fatores de virulência chave, como a toxina *pertussis*, *pertactina* e *fímbrias*. Essas diferenças podem ter contribuído para a adaptação das bactérias diante da pressão exercida pela vacinação.

A tabela 5 demonstra a correlação existente entre a variação alélica do genótipo *fim3* com os sorotipos Fim2; Fim3 e Fim2,3. A associação esteve presente e foi positiva, ou seja, a presença dos alelos tipo 3 (*fim3-3*) e 24 (*fim3-24*) aumentam a chance de ocorrência dos sorotipos Fim3 e Fim2 respectivamente. Também houve associação, porém, negativa entre os alelos *fim3-3* e *fim3-24* com os sorotipos Fim2 e Fim3 respectivamente, ou seja, a presença desses alelos de *fim3* diminui a chance de ocorrência do sorotipo associado.

A tabela 6 por sua vez, demonstra a correlação existente entre a variação alélica do genótipo *fim3* com diferentes variáveis epidemiológicas como: sexo, fases da vida, faixa etária e incidência de casos de infecção por *B. pertussis* em 2014. A associação esteve presente e foi positiva, ou seja, a presença do alelo *fim3-24* aumenta a chance de ocorrência da epidemia de 2014 em cerca de 4 vezes. Também houve associação, porém, negativa entre o alelo *fim3-3* com a epidemia de 2014, ou seja, a ausência desse alelo durante o pico da epidemia sugere sua substituição por outro alelo no mesmo locus gênico durante a epidemia.

### 5.2.3 Correlação entre genótipo *ptx3-fim3* com sorotipos de cepas isoladas de *B. pertussis* - LACEN/DF e as variáveis epidemiológicas.

**Tabela 5** - Relação entre o genótipo *ptx3* e *fim3* e os sorotipos de cepas isoladas de *B. pertussis*

Genótipo <i>ptx3</i> e <i>fim3</i>	Variável verificada	OR	IC95%	p (Qui-quadrado)	Associação <sup>†</sup>
<i>Fim3</i> -1	Sorotipo 1,2	0,59	0,11-3,06	0,53354	Não
<i>Fim3</i> -1	Sorotipo 1,3	1,82	0,43-7,60	0,40172	Não
<i>Fim3</i> -1	Sorotipo 1,4	-	-	0,53555	Não
<i>Fim3</i> -1	Sorotipo 1,2,3	0,88	0,09-8,15	0,91282	Não
<i>Fim3</i> -3	Sorotipo 1,2	0,15	0,01-0,93	0,04253	Sim (-)
<i>Fim3</i> -3	Sorotipo 1,3	6,03	1,24-29,15	0,01471	Sim (+)
<i>Fim3</i> -3	Sorotipo 1,4	-	-	0,43477	Não
<i>Fim3</i> -3	Sorotipo 1,2,3	0,53	0,06-4,79	0,56916	Não
<i>Fim3</i> -24	Sorotipo 1,2	4,28	1,11-16,60	0,02675	Sim (+)
<i>Fim3</i> -24	Sorotipo 1,3	0,21	0,07-0,68	0,00631	Sim (-)
<i>Fim3</i> -24	Sorotipo 1,4	-	-	0,25554	Não
<i>Fim3</i> -24	Sorotipo 1,2,3	1,64	0,29-9,14	0,56668	Não

OR = *Odds ratio*; IC = Intervalo de confiança; p = probabilidade de as diferenças ocorrerem devidas ao acaso.

<sup>†</sup>Associação presente ou ausente (Sim ou Não). No caso de a associação estar presente, ela pode ser positiva (+), isto é, a presença do gene *fim3* aumenta a chance de ocorrência do sorotipo associado; ou a associação pode ser negativa (-), ou seja, a presença do gene *fim3* diminui a chance de ocorrência do sorotipo associado.

Os pontos sem preenchimento, referem-se a situações em que não foi possível calcular o OR devido a valores nulos em pelo menos uma das células nas tabelas de contingência 2x2 usadas para verificar as associações (vide os apêndices).

**Tabela 6** - Relação entre o genótipo *ptx3* e *fim3* e variáveis epidemiológicas

Genótipo <i>ptx3</i> e <i>fim3</i>	Variável verificada	OR	IC95%	p (Qui-quadrado)	Associação <sup>†</sup>
<i>Fim3</i> -1	Sexo masculino	0,15	0,01-1,04	0,05516	Limítrofe
<i>Fim3</i> -1	Pico da epidemia (ano 2014)	2,10	0,50-8,71	0,29919	Não
<i>Fim3</i> -1	Faixa etária lactente	0,31	0,08-1,15	0,07202	Não
<i>Fim3</i> -1	Faixa etária recém-nascido	3,31	0,68-15,96	0,11974	Não
<i>Fim3</i> -1	Faixa etária > 2 anos	2,39	0,52-10,95	0,25123	Não
<i>Fim3</i> -3	Sexo masculino	1,69	0,54-5,30	0,36384	Não
<i>Fim3</i> -3	Pico da epidemia (ano 2014)	0,05	0,01-0,27	0,00002	Sim (-)
<i>Fim3</i> -3	Faixa etária lactente	4,04	0,92-28,01	0,06332	Limítrofe
<i>Fim3</i> -3	Faixa etária recém-nascido	0,38	0,04-3,32	0,36867	Não
<i>Fim3</i> -3	Faixa etária > 2 anos	0,29	0,03-2,48	0,23627	Não
<i>Fim3</i> -24	Sexo masculino	1,40	0,50-3,94	0,51548	Não
<i>Fim3</i> -24	Pico da epidemia (ano 2014)	4,39	1,57-12,26	0,00375	Sim (+)
<i>Fim3</i> -24	Faixa etária lactente	0,87	0,30-2,47	0,79724	Não
<i>Fim3</i> -24	Faixa etária recém-nascido	0,75	0,18-3,10	0,69820	Não
<i>Fim3</i> -24	Faixa etária > 2 anos	1,11	0,29-4,24	0,86984	Não

OR = *Odds ratio*; IC = Intervalo de confiança; p = probabilidade de as diferenças ocorrerem devidas ao acaso.

<sup>†</sup>Associação presente ou ausente (Sim ou Não). No caso de a associação estar presente, ela pode ser positiva (+), isto é, a presença do gene *fim3* aumenta a chance de ocorrência da variável associada; ou a associação pode ser negativa (-), ou seja, a presença do gene *fim3* diminui a chance de ocorrência da variável associada.

## 6 CONCLUSÃO

Esta tese teve como objetivo identificar o perfil genotípico das linhagens de *B. pertussis* circulantes no Distrito federal, entre 2012 e 2018 em relação aos genes *fim3* e *ptx*. Foi possível concluir que, entre os isolados examinados, o alelo *fim3-24* foi o mais comum, observando-se uma predominância dos tipos *fim3-3* e *fim3-1* em 2012 e 2013 e uma prevalência do tipo *fim3-24* em 2014, coincidindo com a epidemia de coqueluche no Distrito Federal em 2014. Os resultados indicam que a maioria das cepas possui um perfil genético fimbrial distinto da cepa utilizada na vacina do programa nacional de imunização, e a seleção do alelo *fim3-24* em 2014 pode ter contribuído para o aumento de cepas causadoras de infecções sintomáticas. Isso se deve ao fato de que tais variações genéticas podem afetar a interação com o sistema imunológico.

No que tange à variação alélica do gene *ptx* o alelo *ptxP-3* foi o único presente, indicando ausência de diversidade alélica na região promotora do gene responsável pela codificação da toxina pertussis. Foi observado que todas as cepas possuem variações alélicas em comparação com a cepa usada na vacina no que diz respeito ao gene *ptxP*. A predominância do alelo *ptxP-3* pode ter contribuído para a eficácia das cepas em colonizar o trato respiratório dos pacientes, considerando que cepas com o *ptxP-3* tendem a ser mais virulentas. Além disso, a seleção do gene *fim3-24* durante o surto de coqueluche de 2014 no Distrito Federal, juntamente com a presença do alelo *ptxP-3*, sugere que a combinação desses fatores genéticos pode ter reforçado a resistência das bactérias, já que ambos diferem da cepa vacinal e influenciam na resposta imune do hospedeiro.

Realizar análises genômicas com um número maior de amostras, tanto do Distrito Federal quanto de outras regiões do Brasil, e até mesmo com outros genes do locus BvgAS, é fundamental para entender a variação alélica e definir o perfil genético da *Bordetella pertussis*. Esses resultados mostraram que as cepas circulantes de *B. pertussis* no surto analisado eram diferentes da cepa usada para imunização contra coqueluche no Brasil. Essas observações fornecem informações que poderiam ser usadas para direcionar programas de vacinação para prevenir futuros surtos de tosse convulsa no Brasil.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABE, A.; NISHIMURA, R.; KUWAE, A. Bordetella effector BopN is translocated into host cells via its N-terminal residues. **Microbiology and Immunology**, v. 61, n. 6, p. 206–214, jun. 2017.
- ADKINS, I. et al. Bordetella adenylate cyclase toxin differentially modulates toll-like receptor-stimulated activation, migration and T cell stimulatory capacity of dendritic cells. **PloS One**, v. 9, n. 8, p. e104064, 2014.
- AHMAD, J. N. et al. cAMP signalling of Bordetella adenylate cyclase toxin through the SHP-1 phosphatase activates the BimEL-Bax pro-apoptotic cascade in phagocytes. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 384–398, mar. 2016.
- AKAMATSU, M. A. et al. Whole-Genome Sequence of a Bordetella pertussis Brazilian Vaccine Strain. **Genome Announcements**, v. 3, n. 1, p. e01570-14, 26 fev. 2015.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 24 fev. 2006.
- AMIRTHALINGAM, G.; GUPTA, S.; CAMPBELL, H. Pertussis immunisation and control in England and Wales, 1957 to 2012: a historical review. **Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin**, v. 18, n. 38, p. 20587, 19 set. 2013.
- ANDREASEN, C.; CARBONETTI, N. H. Pertussis toxin inhibits early chemokine production to delay neutrophil recruitment in response to Bordetella pertussis respiratory tract infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 11, p. 5139–5148, nov. 2008.
- ASHWORTH, L. A. E.; IRONS, L. I.; DOWSETT, A. B. Antigenic Relationship Between Serotype-Specific Agglutinin and Fimbriae of *Bordetella pertussis*. **Infection and Immunity**, v. 37, n. 3, p. 1278–1281, set. 1982.
- BARKOFF, A.-M. et al. Surveillance of Circulating Bordetella pertussis Strains in Europe during 1998 to 2015. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 5, p. e01998-17, maio 2018.
- BART, M. J. et al. Comparative genomics of prevaccination and modern Bordetella pertussis strains. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 627, dez. 2010.
- BART, M. J. et al. Global Population Structure and Evolution of Bordetella pertussis and Their Relationship with Vaccination. **mBio**, v. 5, n. 2, p. e01074-14, maio 2014.
- BAUCHE, C. et al. Structural and functional characterization of an essential RTX subdomain of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 25, p. 16914–16926, 23 jun. 2006.
- BAYRAM, J. et al. Cytotoxicity of the effector protein BteA was attenuated in Bordetella pertussis by insertion of an alanine residue. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 8, p. e1008512, ago. 2020.

BEITELSHEES, M. et al. Phenotypic Variation during Biofilm Formation: Implications for Anti-Biofilm Therapeutic Design. **Materials**, v. 11, n. 7, p. 1086, jul. 2018.

BELCHER, T. et al. Pathogenicity and virulence of *Bordetella pertussis* and its adaptation to its strictly human host. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 2608–2632, 31 dez. 2021.

BERBERS, G. A. M.; DE GREEFF, S. C.; MOOI, F. R. Improving pertussis vaccination. **Human Vaccines**, v. 5, n. 7, p. 497–503, jul. 2009.

BOUCHEZ, V. et al. New Data on Vaccine Antigen Deficient *Bordetella pertussis* Isolates. **Vaccines**, v. 3, n. 3, p. 751–770, 14 set. 2015.

BOUCHEZ, V. et al. Evolution of *Bordetella pertussis* over a 23-year period in France, 1996 to 2018. **Eurosurveillance**, v. 26, n. 37, 16 set. 2021.

BOULANGER, A. et al. *In vivo* phosphorylation dynamics of the *Bordetella pertussis* virulence-controlling response regulator BvgA: *In vivo* phosphorylation of BvgA. **Molecular Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 156–172, abr. 2013.

BOWDEN, K. E. et al. Molecular Epidemiology of the Pertussis Epidemic in Washington State in 2012. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 10, p. 3549–3557, out. 2014.

BRASIL. **Lei nº 4545, de 10 de dezembro de 1964. Dispõe sobre a reestruturação administrativa do Distrito Federal, e dá outras providências.** Disponível em: <[https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l4545.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l4545.htm)>. Acesso em: 11 fev. 2024.

BRASIL. **Coqueluche no Brasil: análise da situação epidemiológica de 2010 a 2014.** Ministério da Saúde, , 2015.

BRASIL. **Situação epidemiológica da coqueluche, Brasil, 2015.** Ministério da Saúde, , 2016.

BRASIL. **Coqueluche.** Ministério da Saúde, , 2018.

BRASIL. **Lei Complementar nº 958, de 20 de dezembro de 2019. Define os limites físicos das regiões administrativas do Distrito Federal e dá outras providências.** Disponível em: <[https://www.sinj.df.gov.br/sinj/Norma/0503ee8e9efd40eca1ffd183d4b50fd0/Lei\\_Complementar\\_958\\_20\\_12\\_2019.html](https://www.sinj.df.gov.br/sinj/Norma/0503ee8e9efd40eca1ffd183d4b50fd0/Lei_Complementar_958_20_12_2019.html)>. Acesso em: 11 fev. 2024.

BRASIL. **Coqueluche.** Ministério da Saúde, , 2020a.

BRASIL. **Calendário nacional de vacinação da criança.** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/vacinacao/calendario/calendario>>. Acesso em: 11 fev. 2024b.

BRASIL. **Guia de Vigilância em Saúde.** 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2022.

CARBONETTI, N. H. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. **Future microbiology**, v. 5, p. 455–469, mar. 2010.



CARBONETTI, N. H. Bordetella pertussis: new concepts in pathogenesis and treatment. **Current opinion in infectious diseases**, v. 29, n. 3, p. 287–294, jun. 2016.

CAROFF, M.; KARIBIAN, D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. **Carbohydrate Research**, Bacterial Antigens and Vaccines. v. 338, n. 23, p. 2431–2447, 14 nov. 2003.

CASTRO, K. B. DE. **Atlas do Distrito Federal**. [s.l.] Kássia Castro, 2020.

CATTELAN, N. et al. Hyperbiofilm Formation by Bordetella pertussis Strains Correlates with Enhanced Virulence Traits. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 12, p. e00373-17, 17 nov. 2017.

CENTRO EUROPEU DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE DOENÇAS. **Pertussis - Annual Epidemiological Report for 2017**. Disponível em: <<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/pertussis-annual-epidemiological-report-2017>>. Acesso em: 3 abr. 2023.

CHEN, Q.; STIBITZ, S. The BvgASR virulence regulon of Bordetella pertussis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 47, p. 74–81, fev. 2019.

CHERRY, J. D. The History of Pertussis (Whooping Cough); 1906–2015: Facts, Myths, and Misconceptions. **Current Epidemiology Reports**, v. 2, n. 2, p. 120–130, jun. 2015.

CHERRY, J. D. The 112-Year Odyssey of Pertussis and Pertussis Vaccines-Mistakes Made and Implications for the Future. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 8, n. 4, p. 334–341, 25 set. 2019.

CHEUNG, G. Y. C. et al. Functional and structural studies on different forms of the adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis. **Microbial Pathogenesis**, v. 46, n. 1, p. 36–42, jan. 2009.

CLANTIN, B. et al. The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 16, p. 6194–6199, 20 abr. 2004.

CLARK, T. A. Changing pertussis epidemiology: everything old is new again. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 7, p. 978–981, 1 abr. 2014.

COOKSON, B. T.; TYLER, A. N.; GOLDMAN, W. E. Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of Bordetella pertussis. **Biochemistry**, v. 28, n. 4, p. 1744–1749, 21 fev. 1989.

COWELL, J. L.; HEWLETT, E. L.; MANCLARK, C. R. Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of Bordetella pertussis. **Infection and Immunity**, v. 25, n. 3, p. 896–901, set. 1979.

DE GOUW, D. et al. Pertussis: a matter of immune modulation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 3, p. 441–474, 1 maio 2011.

DECKER, K. B. et al. The Bordetella pertussis model of exquisite gene control by the global transcription factor BvgA. **Microbiology**, v. 158, n. 7, p. 1665–1676, 1 jul.

2012.

DEWAN, K. K. et al. Acellular Pertussis Vaccine Components: Today and Tomorrow. **Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 217, 13 maio 2020.

DIAVATOPOULOS, D. A. et al. Bordetella pertussis, the Causative Agent of Whooping Cough, Evolved from a Distinct, Human-Associated Lineage of B. bronchiseptica. **PLoS Pathogens**, v. 1, n. 4, p. e45, 30 dez. 2005.

DIETERICH, C.; RELMAN, D. A. Modulation of the host interferon response and ISGylation pathway by B. pertussis filamentous hemagglutinin. **PloS One**, v. 6, n. 11, p. e27535, 2011.

DOMENECH DE CELLÈS, M. et al. The pertussis enigma: reconciling epidemiology, immunology and evolution. **Proceedings. Biological Sciences**, v. 283, n. 1822, p. 20152309, 13 jan. 2016.

DORJI, D. et al. Bordetella Pertussis virulence factors in the continuing evolution of whooping cough vaccines for improved performance. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 207, n. 1, p. 3–26, fev. 2018.

DU, Q. et al. Direct molecular typing of Bordetella pertussis from nasopharyngeal specimens in China in 2012–2013. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 35, n. 7, p. 1211–1214, 1 jul. 2016.

DUPRÉ, E. et al. Virulence Regulation with Venus Flytrap Domains: Structure and Function of the Periplasmic Moiety of the Sensor-Kinase BvgS. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 3, p. e1004700, 4 mar. 2015.

EDWARDS, J. A.; GROATHOUSE, N. A.; BOITANO, S. Bordetella bronchiseptica adherence to cilia is mediated by multiple adhesin factors and blocked by surfactant protein A. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 6, p. 3618–3626, jun. 2005.

EL BAYÂ, A.; BRÜCKENER, K.; SCHMIDT, M. A. Nonrestricted Differential Intoxication of Cells by Pertussis Toxin. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 433–435, jan. 1999.

ELDERING, G.; HORNBECK, C.; BAKER, J. SEROLOGICAL STUDY OF *BORDETELLA PERTUSSIS* AND RELATED SPECIES. **Journal of Bacteriology**, v. 74, n. 2, p. 133–136, ago. 1957.

**Epi Info™ | CDC**. Disponível em: <[https://www.cdc.gov/epiinfo/por/pt\\_index.html](https://www.cdc.gov/epiinfo/por/pt_index.html)>. Acesso em: 30 ago. 2023.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Laboratory diagnosis and molecular surveillance of Bordetella pertussis: recommendations from ECDC**. LU: Publications Office, 2022.

FADUGBA, O. O. et al. Immune Responses to Pertussis Antigens in Infants and Toddlers after Immunization with Multicomponent Acellular Pertussis Vaccine. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 12, p. 1613–1619, dez. 2014.

FLAK, T. A.; GOLDMAN, W. E. Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. **Cellular Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 51–60, jul. 1999.

FLEMMING, H.-C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 11 ago. 2016.

FRY, N. K.; CAMPBELL, H.; AMIRTHALINGAM, G. JMM Profile: Bordetella pertussis and whooping cough (pertussis): still a significant cause of infant morbidity and mortality, but vaccine-preventable: This article is part of the JMM Profiles collection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 70, n. 10, 21 out. 2021.

FUKUI-MIYAZAKI, A. et al. Bordetella dermonecrotic toxin binds to target cells via the N-terminal 30 amino acids. **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 3, p. 154–159, mar. 2011.

GALÁN, J. E. et al. Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. **Annual review of microbiology**, v. 68, p. 415–438, 2014.

GILL, D. **Simplificando a semiologia pediátrica: dicas práticas**. [s.l.] Thieme Revinter, 2018.

GKENTZI, D. et al. Maternal vaccination against pertussis: a systematic review of the recent literature. **Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition**, v. 102, n. 5, p. F456–F463, set. 2017.

GOUW, D. D. et al. Differentially Expressed Genes in Bordetella pertussis Strains Belonging to a Lineage Which Recently Spread Globally. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e84523, 8 jan. 2014.

GUÉDIN, S. et al. Evidence that a globular conformation is not compatible with FhaC-mediated secretion of the Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 763–774, 1998.

GUERMONPREZ, P. et al. The adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 9, p. 1035–1044, 7 maio 2001.

GUEVARA, C. et al. Highly differentiated human airway epithelial cells: a model to study host cell-parasite interactions in pertussis. **Infectious Diseases (London, England)**, v. 48, n. 3, p. 177–188, 2016.

GUIMARÃES, L. M.; CARNEIRO, E. L. N. DA C.; CARVALHO-COSTA, F. A. Increasing incidence of pertussis in Brazil: a retrospective study using surveillance data. **BMC infectious diseases**, v. 15, p. 442, 23 out. 2015.

GUIISO, N. Bordetella pertussis. Em: **Molecular Medical Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 1507–1527.

GUIISO, N. Bordetella Adenylate Cyclase-Hemolysin Toxins. **Toxins**, v. 9, n. 9, p. 277, 11 set. 2017.

GUO, Q. et al. Structural basis for the interaction of Bordetella pertussis adenyl cyclase toxin with calmodulin. **The EMBO journal**, v. 24, n. 18, p. 3190–3201, 21 set. 2005.

HALLANDER, H. O. et al. Shifts of *Bordetella pertussis* Variants in Sweden from

1970 to 2003, during Three Periods Marked by Different Vaccination Programs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2856–2865, jun. 2005.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95–108, fev. 2004.

HASAN, S. et al. Bordetella pertussis Adenylate Cyclase Toxin Disrupts Functional Integrity of Bronchial Epithelial Layers. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 3, p. e00445-17, mar. 2018.

HEGERLE, N. et al. Evolution of French Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis isolates: increase of Bordetellae not expressing pertactin. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 9, p. E340–E346, set. 2012.

HEGERLE, N.; GUIISO, N. Epidemiology of whooping cough & typing of *Bordetella pertussis*. **Future Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1391–1403, nov. 2013.

HEISS, L. N. et al. Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 8, p. 3123–3128, ago. 1993.

HENDERSON, I. R. et al. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 68, n. 4, p. 692–744, dez. 2004.

HOTEZ, P. J. Immunizations and vaccines: a decade of successes and reversals, and a call for ‘vaccine diplomacy’. **International Health**, v. 11, n. 5, p. 331–333, 2 set. 2019.

HOVINGH, E. S. et al. Emerging Bordetella pertussis Strains Induce Enhanced Signaling of Human Pattern Recognition Receptors TLR2, NOD2 and Secretion of IL-10 by Dendritic Cells. **PloS One**, v. 12, n. 1, p. e0170027, 2017.

HOZBOR, D. Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Pertussis. Em: DIAS, W.; RAW, I. (Eds.). **Pertussis - Disease, Control and Challenges**. [s.l.] InTech, 2018.

HOZBOR, D. et al. Pertussis in Latin America: Recent epidemiological data presented at the 2017 Global Pertussis Initiative meeting. **Vaccine**, v. 37, n. 36, p. 5414–5421, 23 ago. 2019.

HUECK, C. J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 62, n. 2, p. 379–433, jun. 1998.

INATSUKA, C. S. et al. Pertactin is required for Bordetella species to resist neutrophil-mediated clearance. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 7, p. 2901–2909, jul. 2010.

JACOB-DUBUISSON, F.; LOCHT, C.; ANTOINE, R. Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 306–313, abr. 2001.

JUNKER, M.; BESINGI, R. N.; CLARK, P. L. Vectorial transport and folding of an

autotransporter virulence protein during outer membrane secretion. **Molecular Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 1323–1332, mar. 2009.

KALLONEN, T.; HE, Q. *Bordetella pertussis* strain variation and evolution postvaccination. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, n. 7, p. 863–875, jul. 2009.

KAMANOVA, J. et al. Adenylate cyclase toxin subverts phagocyte function by RhoA inhibition and unproductive ruffling. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 181, n. 8, p. 5587–5597, 15 out. 2008.

KAMANOVA, J. *Bordetella* Type III Secretion Injectosome and Effector Proteins. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 466, 4 set. 2020.

KAMIYA, H. et al. Transmission of *Bordetella holmesii* during pertussis outbreak, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 7, p. 1166–1169, jul. 2012.

KARYGIANNI, L. et al. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 668–681, 1 ago. 2020.

KASHIMOTO, T. et al. Identification of functional domains of *Bordetella* dermonecrotizing toxin. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 8, p. 3727–3732, ago. 1999.

KESSIE, D. K. et al. Activity of Tracheal Cytotoxin of *Bordetella pertussis* in a Human Tracheobronchial 3D Tissue Model. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 614994, 2020.

KILGORE, P. E. et al. Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 449–486, jul. 2016.

KIM, S. W. et al. Rapid MALDI biotyper-based identification and cluster analysis of *Streptococcus iniae*. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 260–266, abr. 2017.

KUWAE, A. et al. BopB is a type III secreted protein in *Bordetella bronchiseptica* and is required for cytotoxicity against cultured mammalian cells. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 973–983, dez. 2003.

KUWAE, A. et al. BopC is a novel type III effector secreted by *Bordetella bronchiseptica* and has a critical role in type III-dependent necrotic cell death. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 10, p. 6589–6600, 10 mar. 2006.

KUWAE, A. et al. BteA Secreted from the *Bordetella bronchiseptica* Type III Secretion System Induces Necrosis through an Actin Cytoskeleton Signaling Pathway and Inhibits Phagocytosis by Macrophages. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0148387, 2016.

LEBER, A. L. Pertussis. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 34, n. 2, p. 237–255, jun. 2014.

LEITE, D. et al. Serotypes and genetic profiles of *Bordetella pertussis* strains isolated in the city of São Paulo, 2006–2008. **Jornal de Pediatria**, 23 maio 2012.

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

**coqueluche.** São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2019.

LEO, J. C.; GRIN, I.; LINKE, D. Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 367, n. 1592, p. 1088–1101, 19 abr. 2012.

LIN, L.-N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of pertussis in children and their close contacts in households: A cross-sectional survey in Zhejiang Province, China. **Frontiers in Pediatrics**, v. 10, 2022.

LINDSTRAND, A. et al. The World of Immunization: Achievements, Challenges, and Strategic Vision for the Next Decade. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 224, n. Suppl 4, p. S452–S467, 30 set. 2021.

LIU, Y. et al. Automatic Identification of MALDI-TOF MS Database Using Classical Bordetella Species Isolates. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 2022, p. 1–8, 15 jun. 2022.

LOCHT, C.; ANTOINE, R.; JACOB-DUBUISSON, F. Bordetella pertussis, molecular pathogenesis under multiple aspects. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 82–89, fev. 2001.

LOCHT, C.; COUTTE, L.; MIELCAREK, N. The ins and outs of pertussis toxin: Pertussis toxin. **FEBS Journal**, v. 278, n. 23, p. 4668–4682, dez. 2011.

LOFTUS, K. Evolution of bordetella pertussis genome may play a role in the increased rate of whooping cough cases in the United States. James Madison University. p. 36, 2018.

MACHADO, L. Z.; MARCON, C. E. M. Incidência de coqueluche em crianças menores de 1 ano e relação com a vacinação materna no Brasil, 2008 a 2018. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 31, n. 1, p. e2021625, 2022.

MACINA, D.; EVANS, K. E. Bordetella pertussis in School-Age Children, Adolescents, and Adults: A Systematic Review of Epidemiology, Burden, and Mortality in the Middle East. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 10, n. 2, p. 719–738, jun. 2021.

MADIGAN, M. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MARTORELL, G. **Child: from birth to adolescence**. 1st ed ed. New York, NY: McGraw-Hill, 2013.

MASUDA, M. et al. Activation of Rho through a cross-link with polyamines catalyzed by Bordetella dermonecrotizing toxin. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 4, p. 521–530, 15 fev. 2000.

MATSUZAWA, T. et al. Identification of a receptor-binding domain of Bordetella dermonecrotic toxin. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3427–3432, jul. 2002.

MAZAR, J.; COTTER, P. A. Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. **Molecular Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 641–654, nov. 2006.

MAZAR, J.; COTTER, P. A. New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 508–515, nov. 2007.

MELVIN, J. A. et al. Bordetella pertussis pathogenesis: current and future challenges. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 274–288, abr. 2014.

MOOI, F. R. et al. Epidemiological Typing of Bordetella pertussis Isolates: Recommendations for a Standard Methodology. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 19, n. 3, p. 174–181, 1 abr. 2000.

MOOI, F. R. et al. Bordetella pertussis Strains with Increased Toxin Production Associated with Pertussis Resurgence. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. 1206–1213, ago. 2009.

MOOI, F. R. Bordetella pertussis and vaccination: The persistence of a genetically monomorphic pathogen. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 1, p. 36–49, jan. 2010.

MOOI, F. R. et al. Characterization of Bordetella holmesii isolates from patients with pertussis-like illness in the Netherlands. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 289–291, mar. 2012.

MOOI, F. R.; VAN DER MAAS, N. A. T.; DE MELKER, H. E. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation – two sides of the same coin. **Epidemiology and Infection**, v. 142, n. 4, p. 685–694, abr. 2014.

MOON, K. et al. The BvgAS Regulon of *Bordetella pertussis*. **mBio**, v. 8, n. 5, p. e01526-17, 8 nov. 2017.

MORSE, S. I.; MORSE, J. H. Isolation and properties of the leukocytosis- and lymphocytosis-promoting factor of Bordetella pertussis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 143, n. 6, p. 1483–1502, 1 jun. 1976.

NGUYEN, V. T. N.; SIMON, L. Pertussis. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 45, n. 3, p. 423–431, set. 2018.

NICHOLSON, T. L.; BROCKMEIER, S. L.; LOVING, C. L. Contribution of Bordetella bronchiseptica filamentous hemagglutinin and pertactin to respiratory disease in swine. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 5, p. 2136–2146, maio 2009.

NIEUW AMERONGEN, A. V. et al. Sulfomucins in the human body. **Biological Chemistry**, v. 379, n. 1, p. 1–18, jan. 1998.

NIEVES, D. J. et al. Clinical and Laboratory Features of Pertussis in Infants at the Onset of a California Epidemic. **The Journal of Pediatrics**, v. 159, n. 6, p. 1044–1046, dez. 2011.

NIEVES, D. J.; HEININGER, U. *Bordetella pertussis*. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 3, p. 4.3.25, 6 maio 2016.

NOTTI, R. Q.; STEBBINS, C. E. The Structure and Function of Type III Secretion Systems. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 1, p. 10.1128/microbiolspec.VMBF-0004–2015, fev. 2016.

NOVAK, J. et al. Structure-Function Relationships Underlying the Capacity of Bordetella Adenylate Cyclase Toxin to Disarm Host Phagocytes. **Toxins**, v. 9, n. 10, p. 300, 24 set. 2017.

NOVÁK, J. et al. A Mutation Upstream of the *rpIN-rpsD* Ribosomal Operon Downregulates Bordetella pertussis Virulence Factor Production without Compromising Bacterial Survival within Human Macrophages. **mSystems**, v. 5, n. 6, p. e00612-20, 22 dez. 2020.

NOVIKOV, A.; MARR, N.; CAROFF, M. A comparative study of the complete lipopolysaccharide structures and biosynthesis loci of Bordetella avium, B. hinzii, and B. trematum. **Biochimie**, Fatty acids and lipopolysaccharides from health to disease. v. 159, p. 81–92, 1 abr. 2019.

OLIVEIRA, N. P. DE. **Caracterização biológica de isolados clínicos de Bordetella pertussis do Distrito Federal**. Dissertação—Brasília: Universidade de Brasília, 2018.

PARK, J. T. Identification of a dedicated recycling pathway for anhydro-N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine derived from Escherichia coli cell wall murein. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 13, p. 3842–3847, jul. 2001.

PEDIATRIA, S. B. DE (ED.). **Tratado de pediatria - 5a ed. Volume 1**. 5. ed. Santana de Parnaíba, SP: Editora Manole, 2022.

PEREIRA, J. L. S.; LEITE, D. **ANÁLISE DE DADOS SECUNDÁRIOS DOS CASOS SUSPEITOS DE COQUELUCHE NO ESTADO DE SÃO PAULO**. Anais Da III Mostra Dos Trabalhos De Conclusão De Curso Da Especialização Em Vigilância Laboratorial Em Saúde Pública. **Anais...** Em: III MOSTRA DOS TRABALHOS DE CONCLUSÃO DE CURSO DA ESPECIALIZAÇÃO EM VIGILÂNCIA LABORATORIAL EM SAÚDE PÚBLICA. Agron Science, 1 jul. 2022. Disponível em: <<https://agronscience.com/10107-2/>>. Acesso em: 30 jan. 2024

PETERSEN, R. F. et al. Temporal Trends in Bordetella pertussis Populations, Denmark, 1949–2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 767–774, maio 2012.

PINTO, M. V.; MERKEL, T. J. Pertussis disease and transmission and host responses: insights from the baboon model of pertussis. **Journal of Infection**, v. 74, p. S114–S119, jun. 2017.

PITTET, L. F.; POSFAY-BARBE, K. M. *Bordetella holmesii*: Still Emerging and Elusive 20 Years On. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, p. 4.2.11, 25 mar. 2016.

PITTMAN, M. The concept of pertussis as a toxin-mediated disease: **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 3, n. 5, p. 467–486, set. 1984.

PRESTON, A. et al. Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in bordetellae. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 8, p. 3763–3767, ago. 1999.

PRESTON, A. et al. Complete structures of Bordetella bronchiseptica and Bordetella parapertussis lipopolysaccharides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 26, p. 18135–18144, 30 jun. 2006.



PRESTON, N. W. Essential immunogens in human pertussis: the role of fimbriae. **Developments in Biological Standardization**, v. 61, p. 137–141, 1985.

PRESTON, N. W.; TE PUNGA, W. A. The relation between agglutinin production by pertussis vaccines and their immunising potency in mice. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 78, n. 1, p. 209–216, jul. 1959.

PROCOP, G. W. et al. **Koneman Diagnóstico Microbiológico texto e atlas**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

PROMEGA. **Wizard® Genomic DNA Purification Kit Protocol**. Disponível em: <<https://www.promega.com.br/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/>>. Acesso em: 3 dez. 2023a.

PROMEGA. **ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System Technical Manual**. Disponível em: <<https://www.promega.com.br/resources/protocols/technical-manuals/500/reliaprep-dna-clean-up-and-concentration-system-protocol/>>. Acesso em: 3 dez. 2023b.

RADICS, J.; KÖNIGSMAIER, L.; MARLOVITS, T. C. Structure of a pathogenic type 3 secretion system in action. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 21, n. 1, p. 82–87, jan. 2014.

RIBEIRO, R. M. M.; MENDES, V. A. Situação epidemiológica da coqueluche no Distrito Federal entre 2007 e 2016. **Revista Bioética**, v. 27, n. 4, p. 764–771, dez. 2019.

RICCHI, M. et al. Exploring MALDI-TOF MS approach for a rapid identification of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* field isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 3, p. 568–577, mar. 2017.

RIVERA-CHÁVEZ, F.; MEKALANOS, J. J. Cholera toxin promotes pathogen acquisition of host-derived nutrients. **Nature**, v. 572, n. 7768, p. 244–248, ago. 2019.

ROBERTSON, A. M.; WRIGHT, D. P. Bacterial glycosulphatases and sulphomucin degradation. **Canadian Journal of Gastroenterology = Journal Canadien De Gastroenterologie**, v. 11, n. 4, p. 361–366, 1997.

ROBINSON, A.; ASHWORTH, L. A. E.; IRONS, L. I. Sorotipagem de cepas de *Bordetella pertussis*. **Vaccine**, v. 7, n. 6, p. 491–494, 1 dez. 1989.

ROCHA, E. L. et al. The characterization of *Bordetella pertussis* strains isolated in the Central-Western region of Brazil suggests the selection of a specific genetic profile during 2012–2014 outbreaks. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 7, p. 1392–1397, maio 2017.

SAFARCHI, A. et al. Pertactin negative *Bordetella pertussis* demonstrates higher fitness under vaccine selection pressure in a mixed infection model. **Vaccine**, v. 33, n. 46, p. 6277–6281, nov. 2015.

SHELLER, E. V. et al. Cooperative roles for fimbria and filamentous hemagglutinin in *Bordetella* adherence and immune modulation. **mBio**, v. 6, n. 3, p. e00500-00515, 26 maio 2015.

SINAN. **TabNet Win32 3.0: COQUELUCHE - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Distrito Federal**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/coquedf.def>>. Acesso em: 17 abr. 2023.

SKOFF, T. H. et al. Sources of Infant Pertussis Infection in the United States. **Pediatrics**, v. 136, n. 4, p. 635–641, 1 out. 2015.

SMITH, T. et al. Pertussis Surveillance in Canada: Trends to 2012. **Canada Communicable Disease Report = Relevé Des Maladies Transmissibles Au Canada**, v. 40, n. 3, p. 21–30, 7 fev. 2014.

SPERANDEO, P.; MARTORANA, A. M.; POLISSI, A. The lipopolysaccharide transport (Lpt) machinery: A nonconventional transporter for lipopolysaccharide assembly at the outer membrane of Gram-negative bacteria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 44, p. 17981–17990, 3 nov. 2017.

STEIN, P. E. et al. The crystal structure of pertussis toxin. **Structure**, v. 2, n. 1, p. 45–57, jan. 1994.

TERUYA, S. et al. Bordetella Dermonecrotic Toxin Is a Neurotropic Virulence Factor That Uses CaV3.1 as the Cell Surface Receptor. **mBio**, v. 11, n. 2, p. e03146-19, 24 mar. 2020.

THISYAKORN, U. et al. Pertussis in the Association of Southeast Asian Nations: epidemiology and challenges. **International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 87, p. 75–83, out. 2019.

UCIEKLAK, K.; KOJ, S.; NIEDZIELA, T. Bordetella holmesii Lipopolysaccharide Hide and Seek Game with Pertussis: Structural Analysis of the O-Specific Polysaccharide and the Core Oligosaccharide of the Type Strain ATCC 51541. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6433, 3 set. 2020.

UEHARA, T.; PARK, J. T. The N-acetyl-D-glucosamine kinase of Escherichia coli and its role in murein recycling. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 21, p. 7273–7279, nov. 2004.

UFMG. **Detecção molecular do vírus SARS-CoV-2 – NUPAD**. , 2020. Disponível em: <<https://www.nupad.medicina.ufmg.br/doencas-infecciosas/instrucoes-coleta-covid-19/>>. Acesso em: 29 nov. 2023

VAN AMERSFOORTH, S. C. M. et al. Analysis of *Bordetella pertussis* Populations in European Countries with Different Vaccination Policies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2837–2843, jun. 2005.

VAN DER LEE, S. et al. Whole-Cell or Acellular Pertussis Primary Immunizations in Infancy Determines Adolescent Cellular Immune Profiles. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 51, 24 jan. 2018.

VAN GENT, M. et al. Analysis of Bordetella pertussis clinical isolates circulating in European countries during the period 1998–2012. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n. 4, p. 821–830, 1 abr. 2015.

VAN LOO, I. H. M. et al. Multilocus Sequence Typing of *Bordetella pertussis* Based on Surface Protein Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 1994–2001, jun. 2002.

VAZ-DE-LIMA, L. R. A. et al. Association between the timing of maternal vaccination and newborns' anti-pertussis toxin antibody levels. **Vaccine**, v. 37, n. 36, p. 5474–5480, 23 ago. 2019.

VOJTOVA, J.; KAMANOVA, J.; SEBO, P. Bordetella adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 69–75, fev. 2006.

WHO. Pertussis vaccines: WHO position paper. **Releve Epidemiologique Hebdomadaire**, v. 85, n. 40, p. 385–400, 1 out. 2010.

WHO. **Pertussis: Vaccine Preventable Diseases Surveillance Standards.**

Disponível em:

<<https://www.who.int/publications/m/item/vaccine-preventable-diseases-surveillance-standards-pertussis>>. Acesso em: 2 abr. 2023.

WHO. **Immunization coverage.** Disponível em:

<<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage>>. Acesso em: 3 abr. 2023.

WHO. **Pertussis.** Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/pertussis>>.

Acesso em: 2 abr. 2023a.

WHO. **Pertussis reported cases and incidence.** Disponível em:

<<https://immunizationdata.who.int/pages/incidence/PERTUSSIS.html?CODE=Global&YEAR=>>>. Acesso em: 9 abr. 2023b.

WHO. **WHO Immunization Data portal.** Disponível em:

<[https://immunizationdata.who.int/compare.html?COMPARISON=type1\\_\\_WIISE/MT\\_AD\\_INC\\_LONG+type2\\_\\_WIISE/MT\\_AD\\_COV\\_LONG+option1\\_\\_PERTUSSIS\\_cases+option2\\_\\_DTP\\_coverage&CODE=Global&YEAR=>](https://immunizationdata.who.int/compare.html?COMPARISON=type1__WIISE/MT_AD_INC_LONG+type2__WIISE/MT_AD_COV_LONG+option1__PERTUSSIS_cases+option2__DTP_coverage&CODE=Global&YEAR=>)>. Acesso em: 9 abr. 2023c.

WILLEMS, R. J.; VAN DER HEIDE, H. G.; MOOI, F. R. Characterization of a *Bordetella pertussis* fimbrial gene cluster which is located directly downstream of the filamentous haemagglutinin gene. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 18, p. 2661–2671, set. 1992.

WINTER, K. et al. **Pertussis Epidemic.** Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6348a2.htm>>. Acesso em: 29 jan. 2024.

WU, V. et al. Plasmacytoid dendritic cell-derived IFN $\alpha$  modulates Th17 differentiation during early *Bordetella pertussis* infection in mice. **Mucosal Immunology**, v. 9, n. 3, p. 777–786, maio 2016.

YUK, M. H. et al. Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation by the *Bordetella* type III secretion system.

**Molecular Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 991–1004, mar. 2000.

ZHANG, L. et al. Effect of Vaccination on *Bordetella pertussis* Strains, China.

**Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 11, p. 1695–1701, nov. 2010.

## 8 ANEXOS

### 8.1 Anexo 1 – Casos de coqueluche confirmados notificados no SINAN

24/09/2023, 18:08

TabNet Win32 3.2: COQUELUCHE - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Brasil

#### COQUELUCHE - CASOS CONFIRMADOS NOTIFICADOS NO SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO BRASIL

Casos confirmados por Critério conf. segundo Ano 1º Sintoma(s)

UF de notificação: Distrito Federal

Período: 2012-2022

Ano 1º Sintoma(s)	Ign/Branco	Laboratório	Clínico-epidemiológico	Clínico	Total
<b>TOTAL</b>	<b>5</b>	<b>159</b>	<b>99</b>	<b>673</b>	<b>936</b>
2012	1	21	11	59	92
2013	-	30	35	106	171
2014	2	81	22	196	301
2015	-	9	13	92	114
2016	1	4	5	22	32
2017	-	4	7	29	40
2018	1	6	2	80	89
2019	-	3	3	68	74
2020	-	1	-	5	6
2021	-	-	1	7	8
2022	-	-	-	9	9

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net

#### Notas:

1. Períodos Disponíveis ou período - Correspondem aos anos de notificação dos casos.
2. Para tabular dados epidemiológicos de um determinado ano selecione na linha a variável de interesse, na Coluna Ano dos 1ºs sintomas; em Períodos Disponíveis assinale o ano inicial da série e todos os posteriores até o ano atual (p/ incluir casos notificados com atraso) e em Seleções Disponíveis assinale os anos dos 1ºs sintomas (ex: nº de casos com início de sintomas 2007: selecione na linha UF de residência, na Coluna Ano de 1ºs sintomas, em Períodos disponíveis 2007 até o ano atual e em Seleções assinale Ano de 1ºs sintomas 2007).
3. Para cálculo da incidência utilize locais de residência.
4. Dados de 2007 a 2017 atualizados em 01/07/2019.
5. Dados de 2018 atualizados em 08/02/2023, realizada uma validação dos dados.
6. Dados de 2019 atualizados em 08/03/2023, realizada uma validação dos dados.
7. Dados de 2020 atualizados em 08/02/2023, realizada uma validação dos dados.
8. Dados de 2021 atualizados em 08/02/2023, dados sujeitos à revisão.
9. Dados de 2022 atualizados em 08/02/2023, dados sujeitos à revisão.
10. Foram confirmados casos de Coqueluche no Estado do Espírito Santo (e-SUS VS) nos anos de 2020 (6) e 2022 (2).

\*Dados disponibilizados no TABNET em fevereiro de 2023.

#### Legenda:


- - Dado numérico igual a 0 não resultante de arredondamento.

## 8.2 Anexo 2 – Confirmação da aprovação por CEP/CONEP - Plataforma Brasil

25/09/2023, 19:22

Plataforma Brasil

Portal do Governo Brasileiro



[Esqueceu a senha?](#) [Cadastre-se](#) v3.8.2

Você está em: Público > Confirmar Aprovação pelo CAAE ou Parecer

**CONFIRMAR APROVAÇÃO PELO CAAE OU PARECER**

Informe o número do CAAE ou do Parecer:

Número do CAAE:  Número do Parecer:

*Esta consulta retorna somente pareceres aprovados. Caso não apresente nenhum resultado, o número do parecer informado não é válido ou não corresponde a um parecer aprovado.*

**DETALHAMENTO**




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

Número do CAAE:  Número do Parecer:

Quem Assinou o Parecer:  Pesquisador Responsável:

Data Início do Cronograma:  Data Fim do Cronograma:  Contato Público:

Suporte a sistemas: 136 - opção 8  
 e-mail: [suporte.sistemas@datasus.gov.br](mailto:suporte.sistemas@datasus.gov.br)  
 Fale conosco: <http://datasus.saude.gov.br/fale-conosco>



## 9 APÊNDICES

9.1 Apêndice 1 –Tabela com o extrato dos dados epidemiológicos e genotípicos dos isolados de *B. pertussis*

	CAIXAS	CODIGO UNB	ALELO FIM-3	ALELO PTX	NSEDFLAB TRAK	SEXO	IDADE DIAS	IDADE MES	IDADE ANO	CATEG IDADE1	CATEG IDADE2	IDADE	NASCIMENTO	US	ISOLAMENTO	SOROTIPO	REPIQUE	ESTOQUE	ANO
1	1	BP 1	3	3	2766088	F	88	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	2m28d	5/3/2012	HRPL	9/13/2012	1,2,3	3/24/2017	3/27/2017	2012
2	1	BP 2	3	3	2767849	F	90	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	3m	4/15/2012	HRG	9/13/2012	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2012
3	1	BP 3			2839133	M	373	12	1	LACT	1) At_ 2 Anos	1a8d	7/13/2018	HMB	9/6/2012	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2012
4	1	BP 4	24	3	2839352	F	70	2	0	LACT	1) At_ 2 Anos	70d	6/13/2012	ALVORADA	9/13/2012	1,2	3/24/2017	3/27/2017	2012
5	1	BP 5			2871945	F	6205	204	17	ADOLESC	2) 3 A 18 Anos	17a	2/15/1995	HMB	9/13/2012	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2012
6	1	BP 6	3	3	2901325	M	90	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	3m	5/31/2012	HMB	9/17/2012	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2012
7	1	BP 7	3	3	2871950	F	54	2	0	LACT	1) At_ 2 Anos	54d	7/8/2012	HMB	9/17/2012	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2012
8	1	BP 8			2935471	M	30	1	0	LACT	1) At_ 2 Anos	1m	8/17/2012	HRSM	10/1/2012	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2012
9	1	BP 9			2944031	M	90	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	3m	6/10/2012	HRS	10/1/2012	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2012
10	1	BP 10	24	3	3024505	F	10585	348	29	ADULTO	3) Mais de 18 Anos	29a	8/23/1983	HMB	10/26/2012	1,2	3/24/2017	3/27/2017	2012
11	1	BP 11			2953226	M	99	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	3m9d	6/15/2012	HMB	10/31/2012	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2012
12	1	BP 12	3	3	3050152	M	82	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	2m22d	8/1/2012	HMB	10/31/2012	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2012
13	1	BP 13			3098289	M	60	2	0	LACT	1) At_ 2 Anos	2m	8/23/2012	HRSM	11/20/2012	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2012
14	1	BP 14			3124894	F	90	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	3m	8/4/2012	ALVORADA	11/22/2012	1,2,3	3/24/2017	3/27/2017	2012
15	1	BP 15	3	3	3161318	F	150	5	0	LACT	1) At_ 2 Anos	5m	6/22/2012	HRPL	12/10/2012	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2012
16	1	BP 16	3	3	3193116	M	60	2	0	LACT	1) At_ 2 Anos	2m	9/18/2012	ALVORADA	12/12/2012	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2012
17	1	BP 17	3	3	3271161	M	60	2	0	LACT	1) At_ 2 Anos	2m	10/18/2012	HRS	1/7/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2012
18	1	BP 18	3	3	3307446	F	28	1	0	RN	1) At_ 2 Anos	28d	12/10/2012	HB	1/18/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
19	1	BP 19			3322130	M	90	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	3m	9/18/2012	HRPL	1/25/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
20	1	BP 20	3	3	3337707	M	30	1	0	LACT	1) At_ 2 Anos	1m	11/22/2012	HMB	1/28/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
21	1	BP 21	3	3	3339138	M	9855	324	27	ADULTO	3) Mais de 18 Anos	27a	8/4/1985	CS REC EMAS	1/28/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
22	1	BP 22	24	3	3342361	F	210	7	0	LACT	1) At_ 2 Anos	7m	5/10/2012	HMB	1/28/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
23	1	BP 23			3371405	F	30	1	0	LACT	1) At_ 2 Anos	1m	12/29/2012	HMB	2/6/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
24	1	BP 24	1	3	3386633	F	730	24	2	PREESC-ESC	2) 3 A 18 Anos	2a	5/28/2010	HRS	2/4/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
25	1	BP 25			3379937	M	120	4	0	LACT	1) At_ 2 Anos	4m	9/17/2012	HMB	2/6/2013	1,2	3/24/2017	3/27/2017	2013
26	2	BP 26	1	3	3383706	F	60	2	0	LACT	1) At_ 2 Anos	2m	11/6/2012	HRT	2/8/2013	1,2,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
27	2	BP 27			3386090	F	12045	396	33	ADULTO	3) Mais de 18 Anos	33a	7/3/1979	HMB	2/8/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
28	2	BP 28			3386116	F	60	2	0	LACT	1) At_ 2 Anos	2m	11/19/2012	HMB	2/8/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
29	2	BP 29	3	3	3396142	F	90	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	3m	11/19/2012	HMB	2/18/2013	1,2	3/24/2017	3/27/2017	2013
30	2	BP 30	3	3	4279444	F	45	1	0	LACT	1) At_ 2 Anos	1m15d	6/25/2013	HMB	8/5/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
31	2	BP 31	24	3	4270489	F	68	2	0	LACT	1) At_ 2 Anos	2m8d	3/18/2013	HRPL	8/5/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
32	2	BP 32			4300497	M	30	1	0	LACT	1) At_ 2 Anos	1m	5/31/2013	HRAN	8/7/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
33	2	BP 33			4304154	F	9855	324	27	ADULTO	3) Mais de 18 Anos	27a	1/29/1986	HRGU	8/7/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
34	2	BP 34	24	3	4375095	M	113	4	0	LACT	1) At_ 2 Anos	3m23d	5/2/2013	HRPL	8/26/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
35	2	BP 35	1	3	4377852	F	157	5	0	LACT	1) At_ 2 Anos	5m7d	3/9/2013	HMB	8/26/2013	1,2	3/24/2017	3/27/2017	2013
36	2	BP 36			4417553	F	7665	252	21	ADULTO	3) Mais de 18 Anos	21a	2/2/1992	HRSM	9/2/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
37	2	BP 37	24	3	4522511	M	80	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	2m20d	6/21/2013	HRT	9/20/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
38	2	BP 38			4551700	M	43	1	0	LACT	1) At_ 2 Anos	1m13d	8/1/2013	STA LUCIA	9/25/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
39	2	BP 39			4693492	M	55	2	0	LACT	1) At_ 2 Anos	1m25d	8/15/2013	HRAN	10/24/2013	1,2,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
40	2	BP 40	24	3	4718910	M	14235	468	39	ADULTO	3) Mais de 18 Anos	39a	9/26/1974	HFA	10/31/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
41	2	BP 41	24	3	4844098	M	24	1	0	RN	1) At_ 2 Anos	24d	10/15/2013	HRT	11/20/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
42	2	BP 42	3	3	4988466	M	86	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	2m26d	9/1/2013	HMB	12/17/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
43	2	BP 43			4988461	M	54	2	0	LACT	1) At_ 2 Anos	1m24d	10/13/2013	HMB	12/20/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
44	2	BP 44	24	3	4987504	M	66	2	0	LACT	1) At_ 2 Anos	2m6d	10/4/2013	HRT	12/23/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
45	2	BP 45	24	3												1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
46	2	BP 46	24	3	5023483	F	2190	72	6	PREESC-ESC	2) 3 A 18 Anos	6a	8/31/2007	LACEN	12/23/2013	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013
47	2	BP 47	24	3	5057515	M	58	2	0	LACT	1) At_ 2 Anos	1m28d	10/23/2013	LACEN	1/6/2014	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2013

CAIXAS	CODIGO UNB	ALELO FIM-3	ALELO PTX	NSESDFLAB TRAK	SEXO	IDADE DIAS	IDADE MES	IDADE ANO	CATEG IDADE1	CATEG IDADE2	IDADE	NASCIMENTO	US	ISOLAMENTO	SOROTIPO	REPIQUE	ESTOQUE	ANO	
48	2	BP 48	24	3	5128974	F	746	25	2	PREESC-ESC	2) 3 A 18 Anos	2a16d	10/24/2013	CS REC EMAS	1/20/2014	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2014
49	2	BP 49	24	3	5162085	F	365	12	1	LACT	1) At_ 2 Anos	1a	11/14/2012	HRS	1/24/2014	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2014
50	2	BP 50	24	3	5275707	M	77	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	2m17d	11/19/2013	HRT	2/12/2014	1,2	3/24/2017	3/27/2017	2014
51	2	BP 51	3	3	5291368	F	143	5	0	LACT	1) At_ 2 Anos	4m23d	9/15/2013	HRS	2/19/2014	1,3	3/24/2017	3/27/2017	2014
52	2	BP 52	24	3	5314161	F	13870	456	38	ADULTO	3) Mais de 18 Anos	38a	11/17/1975	HRAN	2/19/2014	1,4	3/24/2017	3/27/2017	2014
53	3	BP 53	24	3	5321813	F	365	12	1	LACT	1) At_ 2 Anos	1A	4/25/2012	HRS		1,2	4/30/2017	5/2/2017	2014
54	3	BP 54			5382276	M	100	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	3M10D	11/12/2013	HMB		1,2	4/30/2017	5/2/2017	2014
55	3	BP 55	24	3	5420198		86	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	2M26D	12/2/2013	HRAN		1,2,3	4/30/2017	5/2/2017	2014
56	3	BP 56			5403591	F	124	4	0	LACT	1) At_ 2 Anos	4M4D	10/23/2013	HRS		1,3	4/30/2017	5/2/2017	2014
57	3	BP 57	24	3	5408679	M	730	24	2	PREESC-ESC	2) 3 A 18 Anos	2A	7/12/2011	HRGU		1,2	7/28/2017	8/1/2017	2014
58	3	BP 58			5419858	M	88	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	2M28D	11/30/2013	HRSAM		1,2,3	7/28/2017	8/1/2017	2014
59	3	BP 59			5500631	M	730	24	2	PREESC-ESC	2) 3 A 18 Anos	2A	2/17/2012	LACEN		1,2	7/28/2017	8/1/2017	2014
60	3	BP 60			5519303	M	90	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	3M	12/18/2013	HRT		1,3	7/28/2017	8/1/2017	2014
61	3	BP 61			5567292	F	111	4	0	LACT	1) At_ 2 Anos	3M21D	2/12/2014	LACEN		1,2	7/28/2017	8/1/2017	2014
62	3	BP 62			6038462	F	26	1	0	RN	1) At_ 2 Anos	26D	3/28/2014	HRGU		1,2	7/28/2017	8/1/2017	2014
63	3	BP 63			6105345	F	135	4	0	LACT	1) At_ 2 Anos	4M15D	12/21/2013	HMB		1,2	7/28/2017	8/1/2017	2014
64	3	BP 64	24	3	6137494	F	31	1	0	LACT	1) At_ 2 Anos	1M1D	4/9/2014	HMB		1,2	7/28/2017	8/1/2017	2014
65	3	BP 65	24	3	6240123	M	24	1	0	RN	1) At_ 2 Anos	24D	5/2/2014	HRT		1,2	7/28/2017	8/1/2017	2014
66	3	BP 66	24	3	6263580	F	88	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	2M28D	4/1/2014	HMB		1,2	7/28/2017	8/1/2017	2014
67	3	BP 67	24	3	6283914	F	149	5	0	LACT	1) At_ 2 Anos	4M29D	1/4/2014	HMB		1,2	7/28/2017	8/1/2017	2014
68	3	BP 68			6289611	F	59	2	0	LACT	1) At_ 2 Anos	1M29D	4/5/2014	HRAN		1,2,3	7/28/2017	8/1/2017	2014
69	3	BP 69	24	3	6285405	M	93	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	3M3D	3/1/2014	HRGU		1,2	7/28/2017	8/1/2017	2014
70	3	BP 70			6318482	M	118	4	0	LACT	1) At_ 2 Anos	3M28D	2/12/2014	HRS		1,2	7/28/2017	8/1/2017	2014
71	3	BP 71	24	3	6330214	F	20	1	0	RN	1) At_ 2 Anos	20D	5/20/2014	HRSM		1,2,3	7/28/2017	8/1/2017	2014
72	3	BP 72	24	3	6349147	F	192	6	0	LACT	1) At_ 2 Anos	6M12D	12/2/2013	HRC		1,2	7/28/2017	8/1/2017	2014
73	3	BP 73			6378800	F	36	1	0	LACT	1) At_ 2 Anos	1M6D	5/13/2014	STA LUCIA		1,2	7/28/2017	8/1/2017	2014
74	3	BP 74	24	3	6370988	F	21	0	0	RN	1) At_ 2 Anos	21D	5/28/2014	HRAN		1,2	8/4/2017	8/7/2017	2014
75	3	BP 75	24	3	6408176	F	71	2	0	LACT	1) At_ 2 Anos	2M11D	4/15/2014	HRGU		1,3	7/28/2017	8/1/2017	2014
76	3	BP 76	24	3	6449362	F	25	0	0	RN	1) At_ 2 Anos	25D	6/7/2014	HMB		1,2	7/28/2017	8/1/2017	2014
77	3	BP 77	24	3	6464958	F	36	1	0	LACT	1) At_ 2 Anos	1M6D	6/1/2014	HRAN		1,2,3	7/28/2017	8/1/2017	2014
78	4	BP 78	24	3	6476285	F	24	6	0	LACT	1) At_ 2 Anos	6M24D	1/15/2014	HRS	7/16/2014	1,2,3	7/28/2017	8/1/2017	2014
79	4	BP 79	24	3	6476537	F	20	1	0	LACT	1) At_ 2 Anos	1M20D	5/19/2014	STA LUCIA	7/15/2014	1,3	7/28/2017	8/1/2017	2014
80	4	BP 80	1	3	6485605	F	17	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	3M17D	3/24/2014	HRS	7/15/2014	1,3	7/28/2017	8/1/2017	2014
81	4	BP 81	1	3	6492223	F	3	4	0	LACT	1) At_ 2 Anos	4M3D	3/9/2014	HRSAM	7/16/2014	1,2	9/1/2017	9/4/2017	2014
82	4	BP 82			6460652	F	17	1	0	LACT	1) At_ 2 Anos	1M17D	5/18/2014	UPA-REC EMAS	7/23/2014	1,3	9/1/2017	9/4/2017	2014
83	4	BP 83	3	3	6515249	F	8	2	0	LACT	1) At_ 2 Anos	2M8D	5/8/2014	HRPL	7/25/2014	1,3	9/1/2017	9/4/2017	2014
84	4	BP 84			6574776	M	27	1	0	LACT	1) At_ 2 Anos	1M27D	5/28/2014	HRAS	8/4/2014	1,3	9/1/2017	9/4/2017	2014
85	4	BP 85	1	3	6543115	F	1095	36	3	PREESC-ESC	2) 3 A 18 Anos	3A	11/24/2010	HRS	8/8/2014	1,3	9/1/2017	9/4/2017	2014
86	4	BP 86	24	3	6543115											1,2			2014
87	4	BP 87	24	3	6601020	M	88	3	0	LACT	1) At_ 2 Anos	2M28D	5/1/2014	HRC	8/8/2014	1,3	9/1/2017	9/4/2017	2014
88	4	BP 88			6607226	M	17	1	0	RN	1) At_ 2 Anos	17D	7/13/2014	LACEN	8/13/2014	1,3	9/1/2017	9/4/2017	2014
89	4	BP 89	1	3	6614159	M	25	1	0	RN	1) At_ 2 Anos	25D	7/6/2014	HMB	8/13/2014	1,3	9/1/2017	9/4/2017	2014
90	4	BP 90	24	3	6614198	M	48	2	0	LACT	1) At_ 2 Anos	1M18D	5/14/2014	HMB	8/13/2014	1,2,3	9/1/2017	9/4/2017	2014
91	4	BP 91	1	3	6650181	F	27	1	0	RN	1) At_ 2 Anos	27D	7/10/2014	ANCHIETA	8/20/2014	1,3	9/4/2017	9/8/2017	2014
92	4	BP 92	24	3	6722821	M	43	1	0	LACT	1) At_ 2 Anos	1M13D	7/7/2014	STA LUCIA	8/27/2014	1,3	9/4/2017	9/8/2017	2014
93	4	BP 93	1	3	6736931	F	69	2	0	LACT	1) At_ 2 Anos	2M9D	6/13/2014	HMB	9/1/2014	1,3	9/4/2017	9/8/2017	2014
94	4	BP 94	24	3	6737006	F	45	1	0	LACT	1) At_ 2 Anos	1M15D	7/7/2014	HMB	9/1/2014	1,3	9/4/2017	9/8/2017	2014



CAIXAS	CODIGO UNB	AELO FIM-3	AELO PTX	NSSESFLAB TRAK	SEXO	IDADE DIAS	IDADE MES	IDADE ANO	CATEG IDADE1	CATEG IDADE2	IDADE	NASCIMENTO	US	ISOLAMENTO	SOROTIPO	REPIQUE	ESTOQUE	ANO	
95	4	BP 95	1	3	6772244	F	9125	300	25	ADULTO	3) Mais de 18 Anos	25A	10/2/1988	HMB	9/8/2014	1,3	9/4/2017	9/8/2017	2014
96	4	BP 96	1	3	6798982	F	21	1	0	RN	1) At. 2 Anos	21D	8/11/1984	HMB	9/12/2014	1,3	9/4/2017	9/8/2017	2014
97	4	BP 97	24	3	6807293	F	52	2	0	LACT	1) At. 2 Anos	52D	7/14/2014	HRT	9/12/2014	1,3	9/4/2017	9/8/2017	2014
98	4	BP 98			6839865	M	16425	540	45	ADULTO	3) Mais de 18 Anos	45A	12/25/1969	HRS	9/16/2014	1,3	9/4/2017	9/8/2017	2014
99	4	BP 99	24	3	6858198	F	90	3	0	LACT	1) At. 2 Anos	3M	6/3/2014	HRT	9/16/2014	1,3	9/4/2017	9/8/2017	2014
100	4	BP 100	24	3	6867923	F	90	3	0	LACT	1) At. 2 Anos	3M	6/3/2014	HRT	9/18/2014	1,3	9/4/2017	9/8/2017	2014
101	4	BP 101	24	3	6897302	M	60	2	0	LACT	1) At. 2 Anos	2M	7/12/2014	HMB	9/25/2014	1,2	9/4/2017	9/8/2017	2014
102	4	BP 102	24	3	6897286	M	1095	36	3	PREESC-ESC	2) 3 A 18 Anos	3A	12/19/2010	CS REC EMAS	9/30/2014	1,3	9/4/2017	9/8/2017	2014
103	4	BP 103	24	3	6939368	M	60	2	0	LACT	1) At. 2 Anos	2M	7/20/2014	HMB	9/30/2014	1,4	9/4/2017	9/8/2017	2014
104	5	BP 104	1	3	7002133	F	210	7	0	LACT	1) At. 2 Anos	7M	2/23/2014	HRAN	10/14/2014		9/4/2017	9/8/2017	2014
105	5	BP 105	1	3	7014886	M	180	6	0	LACT	1) At. 2 Anos	6M	3/25/2014	HRC	10/16/2014		9/4/2017	9/8/2017	2014
106	5	BP 106	24	3	7065175	M	120	4	0	LACT	1) At. 2 Anos	4M	8/13/2014	HRS	10/28/2014		9/4/2017	9/8/2017	2014
107	5	BP 107	24	3	7087355	F	60	2	0	LACT	1) At. 2 Anos	2M	8/21/2014	HRS	11/3/2014		9/4/2017	9/8/2017	2014
108	5	BP 108			7065635	F	60	2	0	LACT	1) At. 2 Anos	2M	8/21/2014	HRSM	11/5/2014		9/4/2017	9/8/2017	2014
109	5	BP 109	1	3	7162094	M	3285	108	9	PREESC-ESC	2) 3 A 18 Anos	9A	5/10/2005	HRPL	11/1/2014		9/4/2017	9/8/2017	2014
110	5	BP 110	24	3	7143965	F	90	3	0	LACT	1) At. 2 Anos	3M	7/13/2014	HRPL	11/14/2014		9/25/2017	9/28/2017	2014
111	5	BP 111			7199874	F	30	1	0	LACT	1) At. 2 Anos	1M	9/15/2014	ANCHIETA	11/18/2014		9/25/2017	9/28/2017	2014
112	5	BP 112			7206476	M	30	1	0	LACT	1) At. 2 Anos	1M	9/19/2014	ANCHIETA	11/18/2014		9/25/2017	9/28/2017	2014
113	5	BP 113			7142009	M	90	3	0	LACT	1) At. 2 Anos	3M	7/23/2014	HRC	11/20/2014		9/25/2017	9/28/2017	2014
114	5	BP 114	24	3	7190921	F	29	1	0	LACT	1) At. 2 Anos	29D	10/11/2014	HRT	11/20/2014		9/25/2017	9/28/2017	2014
115	5	BP 115	24	3	7237821	M	90	3	0	LACT	1) At. 2 Anos	3M	8/10/2014	HRC	11/29/2014		9/25/2017	9/28/2017	2014
116	5	BP 116	24	3	7287421	M	24	1	0	RN	1) At. 2 Anos	24D	11/4/2014	HRAN	12/4/2014		9/25/2017	9/28/2017	2014
117	5	BP 117	24	3	7289454	M	90	3	0	LACT	1) At. 2 Anos	3M	8/12/2014	HRT	12/9/2014		9/25/2017	9/28/2017	2014
118	5	BP 118	24	3	7301243	F	60	2	0	LACT	1) At. 2 Anos	2M	9/22/2014	HRAN	12/9/2014		9/25/2017	9/28/2017	2014
119	5	BP 119	24	3	7304807	F	180	6	0	LACT	1) At. 2 Anos	6M	5/15/2014	ANCHIETA	12/9/2014		10/13/2017	10/18/2017	2014
120	5	BP 120			7294450	F	30	1	0	LACT	1) At. 2 Anos	1M	10/18/2014	HRT	12/9/2014		10/13/2017	10/18/2017	2014
121	5	BP 121	24	3	7314519	F	60	2	0	LACT	1) At. 2 Anos	2M	9/22/2014	HMB	12/12/2014		10/13/2017	10/18/2017	2014
122	5	BP 122	24	3	7344220	F	60	2	0	LACT	1) At. 2 Anos	2M	9/25/2014	HMB	12/23/2014		10/13/2017	10/18/2017	2014
123	5	BP 123	24	3	7384498	F	60	2	0	LACT	1) At. 2 Anos	2M	10/6/2014	HMB	1/6/2015		10/13/2017	10/18/2017	2014
124	5	BP 124	24	3	7389159	F	60	2	0	LACT	1) At. 2 Anos	2M	10/23/2014	HMB	1/14/2015		10/13/2017	10/18/2017	2015
125	5	BP 125	24	3	7420355	M	30	1	0	LACT	1) At. 2 Anos	1M	12/13/2014	HRS	1/20/2015		10/13/2017	10/18/2017	2015
126	5	BP 126	24	3	7459797	F	90	3	0	LACT	1) At. 2 Anos	3M	10/24/2014	HMB	2/4/2015		10/13/2017	10/18/2017	2015
127	5	BP 127	24	3	7458679	F	90	3	0	LACT	1) At. 2 Anos	3M	10/13/2014	HRC	2/4/2015		10/13/2017	10/18/2017	2015
128	5	BP 128	24	3	7459697	F	120	4	0	LACT	1) At. 2 Anos	4M	9/24/2014	HMB	2/5/2015		10/13/2017	10/18/2017	2015
129	6	BP 129			7475795	M	27	1	0	RN	1) At. 2 Anos	27D	1/2/2015	STA HELENA	2/12/2015		10/16/2018	10/18/2017	2015
130	6	BP 130	24	3	7544994	M	30	1	0	LACT	1) At. 2 Anos	1M	1/6/2015	HRT	2/25/2015		10/16/2018	10/18/2017	2015
131	6	BP 131	24	3	9196454	F	150	5	0	LACT	1) At. 2 Anos	5M	8/25/2015	HRAN	3/1/2016		2/20/2018	2/23/2018	2016
132	6	BP 132			9511318	F	60	2	0	LACT	1) At. 2 Anos	2M	2/16/2016	HRAN	4/26/2016		2/26/2018	2/28/2018	2016
133	6	BP 133			10682550	M	60	2	0	LACT	1) At. 2 Anos	2M	10/2/2016	HRC	12/16/2016		3/16/2018	3/20/2018	2016
134	6	BP 134	24	3	11412108	M	365	12	1	LACT	1) At. 2 Anos	1A	4/15/2016	HRC	5/29/2017		2/20/2018	2/23/2018	2017
135	6	BP 135	24	3	12667978	M	26	1	0	RN	1) At. 2 Anos	26D	2/1/2018	HRPL	3/12/2018		3/12/2018	3/15/2018	2018
136	6	BP 136			13414434	F	120	4	0	LACT	1) At. 2 Anos	4M	3/4/2018	HRPL	8/14/2018		8/14/2018	8/16/2018	2018

### 9.2 Apêndice 2 –Tabelas de contingência 2x2 usadas para verificar as associações e resultados brutos de Odds Ratio e Qui-quadrado.

25/09/2023, 19:08

Editor de HTML para Google Drive



**TABLES FIM3\_3SN Sorotipo12SN**

		Sorotipo12SN		
FIM3_3SN	False	True	Total	
<b>False</b>	37	17	54	
Row%	68,52%	31,48%	100,00%	
Col%	71,15%	94,44%	77,14%	
<b>True</b>	15	1	16	
Row%	93,75%	6,25%	100,00%	
Col%	28,85%	5,56%	22,86%	
<b>TOTAL</b>	52	18	70	
Row%	74,29%	25,71%	100,00%	
Col%	100,00%	100,00%	100,00%	

#### Single Table Analysis

	Point	95% Confidence Interval	
	Estimate	Lower	Upper
PARAMETERS: Odds-based			
Odds Ratio (cross product)	0,1451	0,0177	1,1898 (T)
Odds Ratio (MLE)	0,1480	0,0065	0,9399 (M)
		0,0033	1,1210 (F)
PARAMETERS: Risk-based			
Risk Ratio (RR)	0,7309	0,5861	0,9113 (T)
Risk Difference (RD%)	-25,2315	-42,3820	-8,0810 (T)
(T=Taylor series; C=Cornfield; M=Mid-P; F=Fisher Exact)			
<b>Sparse data. Use exact confidence limits.</b>			
STATISTICAL TESTS	Chi-square	1-tailed p	2-tailed p
Chi-square - uncorrected	4,1136		0,0425398689
Chi-square - Mantel-Haenszel	4,0548		0,0440451937
Chi-square - corrected (Yates)	2,8987		0,0886483207
Mid-p exact		0,0204410443	
Fisher exact		0,0367035326	0,0529984849
<b>At least one cell has expected size &lt;5. Chi-square may not be a valid test.</b>			



**TABLES FIM3\_3SN Sorotipo13SN**

		Sorotipo13SN	
--	--	--------------	--





	Point	95% Confidence Interval	
	Estimate	Lower	Upper
<b>PARAMETERS: Odds-based</b>			
Odds Ratio (cross product)	0,5333	0,0594	4,7893 (T)
Odds Ratio (MLE)	0,5375	0,0217	4,0371 (M)
		0,0109	5,0088 (F)
<b>PARAMETERS: Risk-based</b>			
Risk Ratio (RR)	0,9481	0,8097	1,1102 (T)
Risk Difference (RD%)	-4,8611	-19,3851	9,6629 (T)
(T=Taylor series; C=Cornfield; M=Mid-P; F=Fisher Exact)			
<b>Sparse data. Use exact confidence limits.</b>			
<b>STATISTICAL TESTS</b>			
	Chi-square	1-tailed p	2-tailed p
Chi-square - uncorrected	0,3241		0,5691695011
Chi-square - Mantel-Haenszel	0,3194		0,5719417050
Chi-square - corrected (Yates)	0,0090		0,9244107988
Mid-p exact		0,3200917350	
Fisher exact		0,4924488231	1,0000000000
<b>At least one cell has expected size &lt;5. Chi-square may not be a valid test.</b>			



**TABLES FIM3\_1SN Sorotipo12SN**

	Sorotipo12SN		
FIM3_1SN	False	True	Total
<b>False</b>	43	16	59
Row%	72,88%	27,12%	100,00%
Col%	82,69%	88,89%	84,29%
<b>True</b>	9	2	11
Row%	81,82%	18,18%	100,00%
Col%	17,31%	11,11%	15,71%
<b>TOTAL</b>	52	18	70
Row%	74,29%	25,71%	100,00%
Col%	100,00%	100,00%	100,00%

**Single Table Analysis**

	Point	95% Confidence Interval	
	Estimate	Lower	Upper
<b>PARAMETERS: Odds-based</b>			
Odds Ratio (cross product)	0,5972	0,1163	3,0670 (T)
Odds Ratio (MLE)	0,6012	0,0809	2,8693 (M)



(T=Taylor series; C=Cornfield; M=Mid-P; F=Fisher Exact)

**Sparse data. Use exact confidence limits.**

STATISTICAL TESTS	Chi-square	1-tailed p	2-tailed p
Chi-square - uncorrected	0,7032		0,4017209561
Chi-square - Mantel-Haenszel	0,6931		0,4051039601
Chi-square - corrected (Yates)	0,2512		0,6162280654
Mid-p exact		0,2160654190	
Fisher exact		0,3140738993	0,5111937415

**At least one cell has expected size <5. Chi-square may not be a valid test.**



**TABLES FIM3\_1SN Sorotipo14SN**

FIM3_1SN	Sorotipo14SN		Total
	False	True	
<b>False</b>	57	2	59
Row%	96,61%	3,39%	100,00%
Col%	83,82%	100,00%	84,29%
<b>True</b>	11	0	11
Row%	100,00%	0,00%	100,00%
Col%	16,18%	0,00%	15,71%
<b>TOTAL</b>	68	2	70
Row%	97,14%	2,86%	100,00%
Col%	100,00%	100,00%	100,00%

**Single Table Analysis**

	Point	95% Confidence Interval	
	Estimate	Lower	Upper
PARAMETERS: Odds-based			
Odds Ratio (cross product)	0,0000	Undefined	Undefined (T)
Odds Ratio (MLE)	0,0000	0,0000	19,1176 (M)
		0,0000	29,4280 (F)
PARAMETERS: Risk-based			
Risk Ratio (RR)	0,9661	0,9210	1,0134 (T)
Risk Difference (RD%)	-3,3898	-8,0076	1,2279 (T)

(T=Taylor series; C=Cornfield; M=Mid-P; F=Fisher Exact)

**Sparse data. Use exact confidence limits.**





Fisher exact	0,6980307860 1,0000000000
At least one cell has expected size <5. Chi-square may not be a valid test.	



**DISPLAY DBVARIABLES**

PageNumber	Prompt	Field Type	Variable	Value	Format/Value	Special Value	Table
		Text	FaixaEtariaLactenteSN			Standard	Defined
		Text	FaixaEtariaRN_SN			Standard	Defined
		Text	FIM3_1SN			Standard	Defined
		Text	FIM3_24SN			Standard	Defined
		Text	FIM3_3SN			Standard	Defined
		Text	LactenteSN			Standard	Defined
		Text	PicoEpidemiaAno2014SN			Standard	Defined
		Text	RNsn			Standard	Defined
		Text	SexoMascuinoSN			Standard	Defined
		Text	Sorotipo123SN			Standard	Defined
		Text	Sorotipo12SN			Standard	Defined
		Text	Sorotipo13SN			Standard	Defined
		Text	Sorotipo14SN			Standard	Defined
	ALELO FIM-3	Number	ALELO FIM-3			DataSource	Plan1\$
	ALELO PTX	Number	ALELO PTX			DataSource	Plan1\$
	ANO	Number	ANO			DataSource	Plan1\$
	CAIXAS	Number	CAIXAS			DataSource	Plan1\$
	CATEG IDADE1	Text	CATEG IDADE1			DataSource	Plan1\$
	CATEG IDADE2	Text	CATEG IDADE2			DataSource	Plan1\$
	CODIGO UNB	Text	CODIGO UNB			DataSource	Plan1\$
	ESTOQUE	DateTime	ESTOQUE			DataSource	Plan1\$
	IDADE	Text	IDADE			DataSource	Plan1\$
	IDADE ANO	Number	IDADE ANO			DataSource	Plan1\$
	IDADE DIAS	Number	IDADE DIAS			DataSource	Plan1\$
	IDADE MES	Number	IDADE MES			DataSource	Plan1\$
	ISOLAMENTO	DateTime	ISOLAMENTO			DataSource	Plan1\$
	N	Number	N			DataSource	Plan1\$
	NASCIMENTO	DateTime	NASCIMENTO			DataSource	Plan1\$
	NSESDFLABTRAK	Number	NSESDFLABTRAK			DataSource	Plan1\$
	REPIQUE	DateTime	REPIQUE			DataSource	Plan1\$
	SEXO	Text	SEXO			DataSource	Plan1\$
	SOROTIPO	Text	SOROTIPO			DataSource	Plan1\$
	US	Text	US			DataSource	Plan1\$



**TABLES FIM3\_1SN SexoMascuinoSN**

SexoMasculinoSN			
FIM3_1SN	False	True	Total
<b>False</b>	36	23	59
Row%	61,02%	38,98%	100,00%
Col%	78,26%	95,83%	84,29%
<b>True</b>	10	1	11
Row%	90,91%	9,09%	100,00%
Col%	21,74%	4,17%	15,71%
<b>TOTAL</b>	46	24	70
Row%	65,71%	34,29%	100,00%
Col%	100,00%	100,00%	100,00%

Single Table Analysis

	Point Estimate	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
PARAMETERS: Odds-based			
Odds Ratio (cross product)	0,1565	0,0188	1,3056 (T)
Odds Ratio (MLE)	0,1597	0,0069	1,0474 (M)
		0,0035	1,2590 (F)
PARAMETERS: Risk-based			
Risk Ratio (RR)	0,6712	0,5090	0,8851 (T)
Risk Difference (RD%)	-29,8921	-50,9516	-8,8327 (T)
(T=Taylor series; C=Cornfield; M=Mid-P; F=Fisher Exact)			
<b>Sparse data. Use exact confidence limits.</b>			
STATISTICAL TESTS			
	Chi-square	1-tailed p	2-tailed p
Chi-square - uncorrected	3,6770		0,0551696823
Chi-square - Mantel-Haenszel	3,6244		0,0569373402
Chi-square - corrected (Yates)	2,4699		0,1160456653
Mid-p exact		0,0287714923	
Fisher exact		0,0513776649	0,0833066986
<b>At least one cell has expected size &lt;5. Chi-square may not be a valid test.</b>			



TABLES FIM3\_1SN PicoEpidemiaAno2014SN

PicoEpidemiaAno2014SN			
FIM3_1SN	False	True	Total
<b>False</b>	26	33	59
Row%	44,07%	55,93%	100,00%
Col%	89,66%	80,49%	84,29%

<b>True</b>	3	8	11
Row%	27,27%	72,73%	100,00%
Col%	10,34%	19,51%	15,71%
<b>TOTAL</b>	29	41	70
Row%	41,43%	58,57%	100,00%
Col%	100,00%	100,00%	100,00%

**Single Table Analysis**

	Point	95% Confidence Interval	
	Estimate	Lower	Upper
<b>PARAMETERS: Odds-based</b>			
Odds Ratio (cross product)	2,1010	0,5063	8,7182 (T)
Odds Ratio (MLE)	2,0800	0,5129	10,5394 (M)
		0,4417	13,3812 (F)
<b>PARAMETERS: Risk-based</b>			
Risk Ratio (RR)	1,6158	0,5903	4,4229 (T)
Risk Difference (RD%)	16,7951	-12,4143	46,0045 (T)
(T=Taylor series; C=Cornfield; M=Mid-P; F=Fisher Exact)			
<b>Sparse data. Use exact confidence limits.</b>			
<b>STATISTICAL TESTS</b>			
	Chi-square	1-tailed p	2-tailed p
Chi-square - uncorrected	1,0778		0,2991978521
Chi-square - Mantel-Haenszel	1,0624		0,3026754112
Chi-square - corrected (Yates)	0,4967		0,4809331242
Mid-p exact		0,1628942112	
Fisher exact		0,2435685739	0,3419502966
<b>At least one cell has expected size &lt;5. Chi-square may not be a valid test.</b>			



**TABLES FIM3\_1SN FaixaEtariaLactenteSN**

<b>FaixaEtariaLactenteSN</b>			
<b>FIM3_1SN</b>	<b>False</b>	<b>True</b>	<b>Total</b>
<b>False</b>	16	43	59
Row%	27,12%	72,88%	100,00%
Col%	72,73%	89,58%	84,29%
<b>True</b>	6	5	11
Row%	54,55%	45,45%	100,00%
Col%	27,27%	10,42%	15,71%
<b>TOTAL</b>	22	48	70
Row%	31,43%	68,57%	100,00%



	Estimate	Lower	Upper
<b>PARAMETERS: Odds-based</b>			
Odds Ratio (cross product)	3,3125	0,6873	15,9656 (T)
Odds Ratio (MLE)	3,2383	0,5636	16,0252 (M)
		0,4379	19,3953 (F)
<b>PARAMETERS: Risk-based</b>			
Risk Ratio (RR)	1,2352	0,8515	1,7917 (T)
Risk Difference (RD%)	17,1032	-10,3227	44,5292 (T)
(T=Taylor series; C=Cornfield; M=Mid-P; F=Fisher Exact)			
<b>Sparse data. Use exact confidence limits.</b>			
<b>STATISTICAL TESTS</b>			
	Chi-square	1-tailed p	2-tailed p
Chi-square - uncorrected	2,4206		0,1197473835
Chi-square - Mantel-Haenszel	2,3860		0,1224232718
Chi-square - corrected (Yates)	1,1348		0,2867599844
Mid-p exact		0,0860357864	
Fisher exact		0,1431946349	0,1431946349
<b>At least one cell has expected size &lt;5. Chi-square may not be a valid test.</b>			



**TABLES FIM3\_1SN FaixaEtariaMaior2anosSN**

<b>FaixaEtariaMaior2anosSN</b>			
<b>FIM3_1SN</b>	<b>False</b>	<b>True</b>	<b>Total</b>
<b>False</b>	51	8	59
Row%	86,44%	13,56%	100,00%
Col%	86,44%	72,73%	84,29%
<b>True</b>	8	3	11
Row%	72,73%	27,27%	100,00%
Col%	13,56%	27,27%	15,71%
<b>TOTAL</b>	59	11	70
Row%	84,29%	15,71%	100,00%
Col%	100,00%	100,00%	100,00%

**Single Table Analysis**

	Point	95% Confidence Interval	
	Estimate	Lower	Upper
<b>PARAMETERS: Odds-based</b>			
Odds Ratio (cross product)	2,3906	0,5219	10,9515 (T)
Odds Ratio (MLE)	2,3548	0,4274	10,8479 (M)
		0,3335	12,9226 (F)











25/09/2023, 19:08

Editor de HTML para Google Drive

<b>True</b>	15	1	16
Row%	93,75%	6,25%	100,00%
Col%	25,42%	9,09%	22,86%
<b>TOTAL</b>	59	11	70
Row%	84,29%	15,71%	100,00%
Col%	100,00%	100,00%	100,00%

**Single Table Analysis**

	Point	95% Confidence Interval	
	Estimate	Lower	Upper
<b>PARAMETERS: Odds-based</b>			
Odds Ratio (cross product)	0,2933	0,0346	2,4871 (T)
Odds Ratio (MLE)	0,2973	0,0126	2,0045 (M)
		0,0063	2,4234 (F)
<b>PARAMETERS: Risk-based</b>			
Risk Ratio (RR)	0,8691	0,7264	1,0399 (T)
Risk Difference (RD%)	-12,2685	-28,0175	3,4804 (T)
(T=Taylor series; C=Cornfield; M=Mid-P; F=Fisher Exact)			
<b>Sparse data. Use exact confidence limits.</b>			
<b>STATISTICAL TESTS</b>	Chi-square	1-tailed p	2-tailed p
Chi-square - uncorrected	1,4027		0,2362792905
Chi-square - Mantel-Haenszel	1,3826		0,2396556148
Chi-square - corrected (Yates)	0,6293		0,4276129574
Mid-p exact		0,1327122978	
Fisher exact		0,2211871631	0,4358124536
<b>At least one cell has expected size &lt;5. Chi-square may not be a valid test.</b>			



**TABLES FIM3\_24SN SexoMasculinoSN**

SexoMasculinoSN			
FIM3_24SN	False	True	Total
<b>False</b>	19	8	27
Row%	70,37%	29,63%	100,00%
Col%	41,30%	33,33%	38,57%
<b>True</b>	27	16	43
Row%	62,79%	37,21%	100,00%
Col%	58,70%	66,67%	61,43%
<b>TOTAL</b>	46	24	70
Row%	65,71%	34,29%	100,00%

25/09/2023, 19:08

Editor de HTML para Google Drive

Col%	100,00%	100,00%	100,00%
------	---------	---------	---------

**Single Table Analysis**

	Point Estimate	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
<b>PARAMETERS: Odds-based</b>			
Odds Ratio (cross product)	1,4074	0,5015	3,9496 (T)
Odds Ratio (MLE)	1,4006	0,4980	4,1059 (M)
		0,4514	4,5972 (F)
<b>PARAMETERS: Risk-based</b>			
Risk Ratio (RR)	1,1207	0,8009	1,5682 (T)
Risk Difference (RD%)	7,5797	-14,9014	30,0607 (T)
(T=Taylor series; C=Cornfield; M=Mid-P; F=Fisher Exact)			
<b>STATISTICAL TESTS</b>			
	Chi-square	1-tailed p	2-tailed p
Chi-square - uncorrected	0,4229		0,5154817354
Chi-square - Mantel-Haenszel	0,4169		0,5184969811
Chi-square - corrected (Yates)	0,1534		0,6952994366
Mid-p exact		0,2660371337	
Fisher exact		0,3499352604	0,6091183061



**TABLES FIM3\_24SN PicoEpidemiaAno2014SN**

	PicoEpidemiaAno2014SN		
FIM3_24SN	False	True	Total
<b>False</b>	17	10	27
Row%	62,96%	37,04%	100,00%
Col%	58,62%	24,39%	38,57%
<b>True</b>	12	31	43
Row%	27,91%	72,09%	100,00%
Col%	41,38%	75,61%	61,43%
<b>TOTAL</b>	29	41	70
Row%	41,43%	58,57%	100,00%
Col%	100,00%	100,00%	100,00%

**Single Table Analysis**

	Point Estimate	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
<b>PARAMETERS: Odds-based</b>			
Odds Ratio (cross product)	4,3917	1,5730	12,2613 (T)
Odds Ratio (MLE)	4,2899	1,5458	12,4760 (M)
		1,4057	13,9461 (F)







## 9.3 Apêndice 3 – Artigo da tese publicado.

Infection, Genetics and Evolution 121 (2024) 105599



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/meegid](http://www.elsevier.com/locate/meegid)

Short communication

### *fim3*–24/*ptxP*-3 genotype is associated to whooping cough outbreak in Brazilian Midwest: The selection of *Bordetella pertussis* strains driven by vaccine immunization

Victor Gomes de Paula<sup>a</sup>, Rayane Sarafim de Sousa<sup>b</sup>,  
Rafaella Christina Moreira Rocha da Silva<sup>a,b</sup>, Everton Giovani Alves<sup>c</sup>,  
Alexandre Rodrigues Caetano<sup>d</sup>, Patrícia Ianella<sup>d</sup>, Tatiana Amabile de Campos<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>c</sup> Núcleo de Bacteriologia, Laboratório Central de Saúde do Distrito Federal, Brazil

<sup>d</sup> Empresa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Distrito Federal, Brazil

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
*Bordetella pertussis*  
Pertussis  
Whooping cough  
Outbreak  
Antigen selection  
*fim3*  
*ptxP*  
Vaccine

## ABSTRACT

Whooping cough (or Pertussis) is an acute infectious respiratory disease caused by *Bordetella pertussis* bacteria. The disease is highly transmissible and can be fatal in children under two years old. Since the introduction of vaccine immunization in 1940, Pertussis incidence decreased worldwide. In Brazil, the immunization was introduced in 1977 using the whole cell (wP) vaccine. Despite the high vaccination coverage, an unexpected increase in the number of observed Pertussis cases was observed in 2012. In this year, 2257 cases were reported exceeding the average incidence rate of <1000 cases per year until 2010. This outbreak reached a peak level in 2014 and ended in 2018 according to the Brazilian National Surveillance System (SINAN). To understand the relationship between the outbreak and the vaccination, bacterial isolates ( $n = 136$ ) from the Brazilian Midwest region obtained during the outbreak were submitted to genotyping of two vaccine loci: *ptxP* and *fim3*. Most of isolates (102) were obtained from nursing children (29 days to 2 years old). Genotyping of 94 isolates revealed that *fim3*–24/*ptxP*-3 was the most prevalent genotype (68%) associated with the outbreak peak. Two additional genotypes were also observed: *fim3*-1/*ptxP*-3 (15%) and *fim3*-3/*ptxP*-3 (17%). Conversely, the *fim3*-1/*ptxP*-2 genotype, which is harbored by the strain used in the wP vaccine (Bp137), was not observed. These results showed that *B. pertussis* circulating strains in the outbreak analyzed were different from the strain used for Pertussis immunization in Brazil. These observations provide insights that could be used to target vaccination programs to prevent future whooping cough outbreaks in Brazil.

## 1. Introduction

Whooping cough or Pertussis is an acute respiratory infectious disease caused by the fastidious Gram-negative bacteria *Bordetella pertussis* (Nguyen and Simon, 2018). Pertussis is extremely contagious and can cause coughing, vomiting leading to exhaustion and death among 0–2-year-old children (Nguyen and Simon, 2018). The bacterial pathogenesis consists of strong attachment to ciliated respiratory cells promoted by FHA (filamentous haemagglutinin), fimbrial proteins (FIM), PRN (pertactin) and BrkA (outer membrane protein). Toxins (Pertussis toxin-

PT, adenylate cyclase toxin- ACT, endotoxin) can produce systemic effects by interfering with the immune system as complement inhibition, phagocytes, and T- and B-cells responses (Decker and Edwards, 2021).

Since the immunization introduction, in 1940, the incidence and the mortality due to Pertussis decreased annually worldwide (Esposito and Principi, 2018). In Brazil, the immunization was introduced in 1977 by whole cell vaccine (wP). Currently, three primary doses are administered at ages 2, 4 and 6 months and two booster doses are recommended at 15 months and 4 years. The acellular vaccine (aP) is only recommended to pregnant women and to children with severe risks of adverse

\* Corresponding author at: Laboratório de Análises Moleculares de Patógenos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP 70.910-900 Brasília, DF, Brazil.

E-mail address: [tatianadecampos@unb.br](mailto:tatianadecampos@unb.br) (T.A. de Campos).

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2024.105599>

Received 31 March 2024; Received in revised form 23 April 2024; Accepted 25 April 2024

Available online 26 April 2024

1567-1348/© 2024 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

reactions to wP vaccination (Rocha et al., 2017).

In Brazil, Pertussis incidence has been decreasing since 1977, when National vaccination programs were implemented. The lowest number of reports were observed in 2010 with 0.32 cases/100.000 people (Brazilian Surveillance System /SINAN – *Sistema Nacional de Notificação de Agravos* - <https://portalsinan.saude.gov.br/>). However, a sudden increase in Pertussis cases was observed in 2011, when 2070 cases were reported, rising to 8447 confirmed countrywide cases in 2014. At the *Distrito Federal* (located in Brazilian Midwest), the number of confirmed cases increased in 2012, reaching a peak level in 2014 with 301 confirmed cases. From 2018, the incidence started to decrease, and 89 cases were confirmed. In 2022, only two Pertussis cases were notified by the National Surveillance System. This outbreak was surprising, considering Brazil has high levels of vaccination coverage against Pertussis (Guimarães et al., 2015). The Brazilian Midwest, particularly, is included among the geographic regions presenting the highest immunization coverage, with over than 95% (Guimarães et al., 2015).

The previous characterization of the *B. pertussis* isolates obtained from Distrito Federal (DF- Federal District of Brazil) between 2012 and 2014 showed the prevalence of one genomic restriction profile suggesting the association of a specific strain to the outbreak (Rocha et al., 2017). To verify whether this genomic profile was associated to the genetic selection driven by the vaccine immunization, we compared the sequences of two Pertussis vaccine loci (*fim3* - which mediates the nasopharynx colonization; and *ptxP* - which is associated with PT expression) from the outbreak isolates with those sequences harbored by the vaccinal strain (Akamatsu et al., 2015; GeneBank access number CP\_010323). For this purpose, we analyzed the isolates obtained from 2012 to 2018 with the intention to identify the *fim3/ptxP* allelic profile presented by the strains isolated from the beginning, the peak and from the end of the outbreak.

## 2. Material and methods

### 2.1. Bacterial isolates

*Bordetella pertussis* isolates from the Central Public Health Laboratory of Federal District (LACEN/DF) surveillance collection from August 2012 to August 2018 were analyzed. All the isolates were obtained from nasopharyngeal swabs from patients presenting whooping cough signs. The isolates obtained from swabs were cultured in Regan-Lowe (Oxoid, UK) plates supplemented with 10% sheep blood and cephalixin (40 µg/mL - Sigma Aldrich-USA) at 35–37 °C up to 10 days. Suggestive *B. pertussis* colonies were submitted to identification on the VITEK-MS (bioMérieux, FR). Associated patient data (i.e. sex, age, etc.) were also used in this study (Supplementary material).

### 2.2. *fim3* and *ptxP* genotype

Among the 136 isolates analyzed (obtained from 136 nasopharynx swabs), 94 were submitted *fim3* and *ptxP* genotyping. The 42 remaining isolates were not genotyped due to difficulties of their recovery from the bacterial stock. Bacterial suspensions obtained from each isolate previously cultured in Regan-Lowe (Oxoid, UK) at 37 °C were used for DNA extraction with the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, USA). A total of 40 ng of DNA was used for PCR amplification of *fim3* and *ptxP* fragments as described by Bowden et al. (2016). Amplicons were purified with the ReliaPrep DNA clean-up system (Promega, USA) and submitted to Sanger sequencing in both directions with an ABI3130 (Applied Biosystems, USA) instrument. Obtained electropherograms were processed to generate FASTA sequences for each isolate and gene typing was performed by using the BIGSdb-Pasteur platform ([https://bigsdbsdb.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdbsdb/bigsdbsdb.pl?db=pubmlst\\_bordetella\\_seqdef](https://bigsdbsdb.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdbsdb/bigsdbsdb.pl?db=pubmlst_bordetella_seqdef)).

### 2.3. Epidemiological data and statistics analysis

Pertussis epidemiological data in Brazil from the Brazilian surveillance system (SINAN – *Sistema Nacional de Notificação de Agravos* - <http://portalsinan.saude.gov.br/>) and from the World Health Organization (WHO - [https://www.who.int/health-topics/pertussis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/pertussis#tab=tab_1)) were used. All data were analyzed with the EpiInfo 7.2.5 software (Epi-Info -CDC, 2022). Shapiro-Wilk test (alpha level 0.05) were used to determine if the sample is normally distributed. t-Student and ANOVA analysis were performed with continuous and discrete variables. Qui-square tests were used to categorize the variables. < 0.05 values were considered significant.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Epidemiological data and bacterial isolates

Pertussis cases in Brazil are confirmed on the bases of clinical, epidemiological criteria in association with laboratory diagnostic tests. Clinical criteria are based on symptoms, blood cell counts where leucocytes are  $\geq 20,000/\mu\text{L}$  and lymphocytes are  $\geq 10,000/\mu\text{L}$  (Guimarães et al., 2015). The epidemiological criteria are based on laboratory testing of nasopharynx swabs. Nasopharynx secretion samples are dispatched to the Central Laboratories of Public Health (LACENs) for diagnosis by bacterial culture or by PCR detection.

No significant differences were observed between the number of isolates analyzed and the number of cases notified by the National Surveillance System (SINAN) by laboratorial criteria (Fig. 1). Most of the isolates were obtained among 2013–2014, corresponding to the peak of the outbreak. Among the isolates, 14 were obtained from newborns (0–28 days old), 102 were originated from nursing children (29 days to 2 years old), 8 from 2 to 10 years old children, 1 from a teenager and 9 from adults (over 18 years old). Patient information was not available for two isolates. No differences were observed between the number of strains isolated from female or male patients.

Most of the isolates were obtained from nursing patients showing that this age group was the most affected. Since 2014, this epidemiological profile was considered to recommend the acellular vaccine (aP) to pregnant women in Brazil (Guimarães et al., 2015). Our findings indicate that this immunization approach is effective in preventing Pertussis infections, as a decrease on the confirmed number of cases can be observed from 2018 onwards (Fig. 1).

### 3.2. *fim3/ptxP* genotyping

Fim2 and Fim3 fimbriae are protective antigens important to establishing Pertussis immunity (Gorringe and Vaughan, 2014). Their antigenicity is useful to strains serotyping, making it one of the most used surveillance tools (Gorringe and Vaughan, 2014). These fimbriae are not exclusively linked to the bacterial serotype but also are associated to specific biological characteristic. Fim3 fimbriae are associated with more PT toxin production, autoagglutination and with IL-2 and IL-6 host cytokines production (Matczak et al., 2023; Otsuka et al., 2023). Fim3 is encoded by the *fim3* gene, which is classified as a vaccine locus with 45 described alleles (BIGSdb- Pasteur platform).

The current survey observed alleles *fim3*-1 (detected in 14 isolates), *fim3*-3 (identified in 16 isolates) and *fim3*-24 (observed in 64 isolates). Among the isolates, *fim3*-24 was the most observed presenting a positive association to the peak of the outbreak (Fig. 2; Table 1). These findings can suggest that *fim3*-24 provided advantages to the bacteria to colonize nursing babies' nasopharynx. Alternatively, the high prevalence of *fim3*-24 could be promoted by vaccine driven selection, as BP137 (strains used in wP) harbor *fim3*-1 allele (Akamatsu et al., 2015). The *fim3*-1 and *fim3*-3 alleles have been reported worldwide, starting in strains isolated from 1950s up to current days (Bart et al., 2014a; Fu et al., 2019; Lefrancq et al., 2022; Mosiej et al., 2015; Shina et al., 2002;



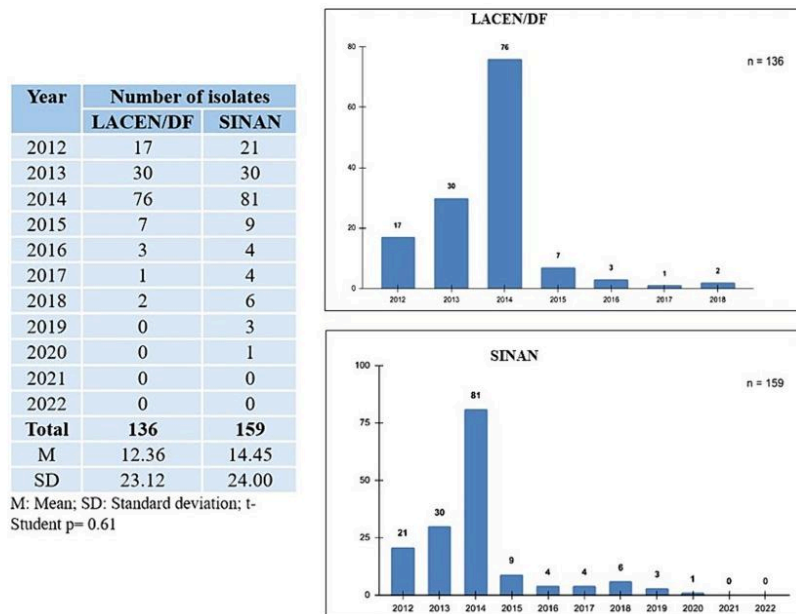


Fig. 1. *Bordetella pertussis* isolates analyzed. The isolates were obtained from Distrito Federal -Central Laboratory of Public Health (LACEN/DF) (Brazilian Midwest). No significant differences were observed between the number of isolates and those presented by the National Surveillance System (SINAN). Y axis: number of isolates; X axis year of bacterial isolation.

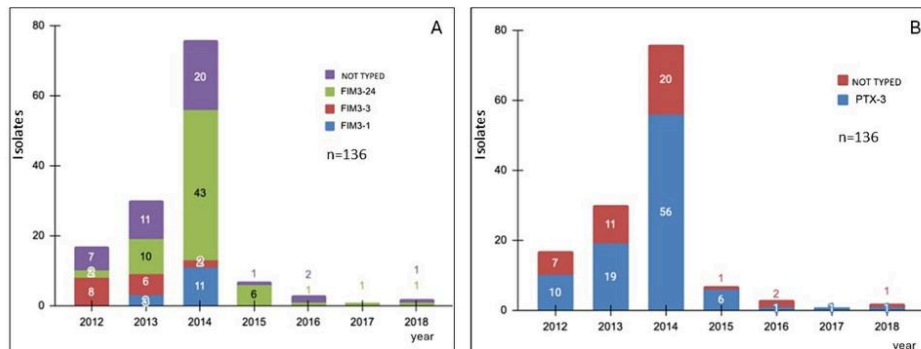


Fig. 2. *fim3* and *ptxP* genotyping of *Bordetella pertussis* isolates from 2012 to 2018 in the Brazilian Midwest (Distrito Federal – Federal District). Forty-two isolates were not typed due to bacterial recovery difficulties.

Zhang et al., 2022). Conversely, *fim3-24* is a very uncommon allele in *B. pertussis* in the American continent (Bowden et al., 2016), and not observed in other countries with wP vaccine (Alai et al., 2020; Zawadka et al., 2014). The high prevalence of *fim3-24* in the sample analyzed may be associated with the vaccine strain and/or to the circulating strains in Brazil. Further studies should be done to better characterize this hypothesis.

The *ptxP* locus corresponds to the promoter of *ptx*, the PT gene encoding (Locht and Keith, 1986). All isolates analyzed harbored *ptxP-3*. This allele is different to *ptxP-1*, those contained in the Brazilian vaccine strain (Akamatsu et al., 2015). High *ptxP-3* prevalence has been

described among *B. pertussis* worldwide and has been shown to be associated with the increased PT production (Lam et al., 2014). The allele was first associated to the *B. pertussis* global spreading potential and to immune evasion ability driven by vaccine selection (Lam et al., 2012).

In Norway, this allele was predominant among strains isolated from 1996 to 2019 (Brandal et al., 2022). In Tunisia (Ben Fraj et al., 2019), China (Wu et al., 2021) and Iran (Shahcheraghi et al., 2020) *ptxP-3* has been detected in high prevalence. In Sweden, *ptxP-3* was associated to new successful *B. pertussis* variant that appeared in 1997 (Advani et al., 2011). In South Italy, it was associated to the Pertussis resurgence

**Table 1**  
Association between *fim3/ptxP* genotypes and epidemiologic variables (patient sex and age, outbreak peak).

<i>fim3/ptxP</i> genotype	Epidemiological variable	OR	CI95%	Qui-square p-value	Association Type
<i>fim3-1/ptxP-3</i>	Patient sex (male)	0.15	0.01–1.04	0.05516	Borderline
<i>fim3-1/ptxP-3</i>	Outbreak peak*	2.10	0.50–8.71	0.29919	–
<i>fim3-1/ptxP-3</i>	Patient age: nursing	0.31	0.08–1.15	0.07202	–
<i>fim3-1/ptxP-3</i>	Patient age: newborn	3.31	0.68–15.96	0.11974	–
<i>fim3-1/ptxP-3</i>	Patient age ≥ 2 years	2.39	0.52–10.95	0.25123	–
<i>fim3-3/ptxP-3</i>	Patient sex (male)	1.69	0.54–5.30	0.36384	–
<i>fim3-3/ptxP-3</i>	Outbreak peak*	0.05	0.01–0.27	0.00002	Negative
<i>fim3-3/ptxP-3</i>	Patient age: nursing	4.04	0.92–28.01	0.06332	Borderline
<i>fim3-3/ptxP-3</i>	Patient age: newborn	0.38	0.04–3.32	0.36867	–
<i>fim3-3/ptxP-3</i>	Patient age ≥ 2 years	0.29	0.03–2.48	0.23627	–
<i>fim3-24/ptxP-3</i>	Patient sex (male)	1.40	0.50–3.94	0.51548	–
<i>fim3-24/ptxP-3</i>	Outbreak peak*	4.39	1.57–12.26	0.00375	Positive
<i>fim3-24/ptxP-3</i>	Patient age: nursing	0.87	0.30–2.47	0.79724	–
<i>fim3-24/ptxP-3</i>	Patient age: newborn	0.75	0.18–3.10	0.69820	–
<i>fim3-24/ptxP-3</i>	Patient age ≥ 2 years	1.11	0.29–4.24	0.86984	–

\* 2014 year. OR = Odds ratio; CI = Confidence Interval.

(Loconsole et al., 2018), and in Japan the allele was observed in severe Pertussis cases in pediatric patients (Imamura et al., 2020). Genomic analysis of 6540 isolates showed that *ptxP-3* strains constitute the most frequent MGT (multi-level genome type) observed worldwide comprising isolates from America, Europe and Asia (Payne et al., 2023).

All these studies suggest that *ptxP-3* is associated with high dissemination *B. pertussis* strains and may be related to Pertussis resurgence worldwide after the introduction of vaccination. Further characterization of *ptxP* allele in isolates obtained before 2014 can clarify whether *ptxP-3* was also associated to Pertussis resurgence in Brazil. Studies suggested that the use of aP (the acellular vaccine) has acted on *B. pertussis* evolution by providing selection pressures from vaccine induced immunity (Barkoff et al., 2019; Bart et al., 2014; Lam et al., 2014; Lefrancq et al., 2022). Our findings suggest that this selection may be also driven by the wP vaccine, as all isolates presented vaccine locus genotypes different from the bacteria used for producing the wP vaccine. The presence of *ptxP-3* in all isolates may be a concern for preventing future outbreaks, as this allele.

#### 4. Conclusion

Our study showed that Pertussis outbreak in Brazilian Midwest was caused mainly by *B. pertussis* strains presenting *fim3-24/ptxP-3*, a genotype different from the vaccine strain Bp137. These observations suggest that these strains were able to colonize and cause whooping cough symptoms despite the vaccine immunization. Vaccine updates including several *B. pertussis* genotypes can be an alternative to prevent future Pertussis outbreaks.

#### Data statement

All data used in this research are available in the Supplementary

material section. The data used in this research was obtained according to the ethical committee FEPECS/SES-DF under number registration 4309841.5.6.1001.5553 and approval number 1.056.702.

#### Financial support

This study was supported by the Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP/DF Foundation) (Grant number 0193.001.616/2016).

#### Ethical approval

This study was reviewed and approved by the ethical committee FEPECS/SES-DF under number registration 43,098,415.6.1001.5553 and approval number 1.056.702.

#### CRediT authorship contribution statement

**Victor Gomes de Paula:** Writing – original draft, Methodology, Data curation. **Rayane Sarafim de Sousa:** Methodology. **Rafaella Christina Moreira Rocha da Silva:** Methodology. **Everton Giovanni Alves:** Methodology, Data curation. **Alexandre Rodrigues Caetano:** Writing – review & editing, Methodology. **Patricia Ianella:** Validation, Methodology. **Tatiana Amabile de Campos:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Investigation, Funding acquisition.

#### Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

#### Data availability

Data will be made available on request.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2024.105599>.

#### References

- Advani, A., Gustafsson, L., Åhrén, C., Mooi, F.R., Hallander, H.O., 2011. Appearance of *Fim3* and *ptxP3*-*Bordetella pertussis* strains, in two regions of Sweden with different vaccination programs. *Vaccine* 29, 3438–3442. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.02.070>.
- Akamatsu, M.A., Nishiyama, M.Y., Morone, M., Oliveira, U.C., Bezerra, M.F.B., Sakauchi, M.A., Raw, I., Junqueira de Azevedo, I.L.M., Kitajima, J.P., Carvalho, E., Ho, P.L., 2015. Whole-genome sequence of a *Bordetella pertussis* Brazilian vaccine strain. *Genome Announc.* 3 <https://doi.org/10.1128/genomeA.01570-14>.
- Alai, S., Ghattargi, V.C., Gautam, M., Patel, K., Pawar, S.P., Dhotre, D.P., Shaligram, U., Gairola, S., 2020. Comparative genomics of whole-cell pertussis vaccine strains from India. *BMC Genomics* 21, 345. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6724-8>.
- Barkoff, A.-M., Mertsola, J., Pierard, D., Dalby, T., Hoegh, S.V., Guillot, S., Stefanelli, P., van Gent, M., Berbers, G., Vestreim, D., Greve-Isdahl, M., Wehlin, L., Ljungman, M., Fry, N.K., Markey, K., He, Q., 2019. Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates: evidence of increased circulation in Europe, 1998 to 2015. *Eurosurveillance* 24. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.7.1700832>.
- Bart, M.J., Harris, S.R., Advani, A., Arakawa, Y., Bottero, D., Bouchez, V., Cassidy, P.K., Chiang, C.-S., Dalby, T., Fry, N.K., Gaillard, M.E., van Gent, M., Guiso, N., Hallander, H.O., Harvill, E.T., He, Q., van der Heide, H.G.J., Heuvelman, K., Hozbor, D.F., Kamachi, K., Karataev, G.I., Lan, R., Lutyńska, A., Maharjan, R.P., Mertsola, J., Miyamura, T., Octavia, S., Preston, A., Quail, M.A., Sintchenko, V., Stefanelli, P., Tondella, M.L., Tsang, R.S.W., Xu, Y., Yao, S.-M., Zhang, S., Parkhill, J., Mooi, F.R., 2014. Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *mBio* 5. <https://doi.org/10.1128/mBio.01074-14>.
- Ben Fraj, I., Kechrid, A., Guillot, S., Bouchez, V., Brisse, S., Guiso, N., Smaoui, H., 2019. Pertussis epidemiology in Tunisian infants and children and characterization of *Bordetella pertussis* isolates: results of a 9-year surveillance study, 2007 to 2016. *J. Med. Microbiol.* 68, 241–247. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000892>.
- Brandal, L.T., Vestreim, D.F., Bruvik, T., Roness, R.B., Bjørnstad, M.L., Greve-Isdahl, M., Steens, A., Brynildsrud, O.B., 2022. Evolution of *Bordetella pertussis* in the acellular

- vaccine era in Norway, 1996 to 2019. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 41, 913–924. <https://doi.org/10.1007/s10096-022-04453-0>.
- Decker, M.D., Edwards, K.M., 2021. Pertussis (whooping cough). *J. Infect. Dis.* 224, S310–S320. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa469>.
- Esposito, S., Principi, N., 2018. Prevention of pertussis: an unresolved problem. *Hum. Vaccin. Immunother.* 14, 2452–2459. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1480298>.
- Fu, P., Wang, C., Tian, H., Kang, Z., Zeng, M., 2019. *Bordetella pertussis* infection in infants and young children in Shanghai, China, 2016–2017: clinical features, genotype variations of antigenic genes and macrolides resistance. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 38, 370–376. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002160>.
- Gorringe, A.R., Vaughan, T.E., 2014. *Bordetella pertussis* fimbriae (Fim): relevance for vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 13, 1205–1214. <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.930667>.
- Guimarães, L.M., Carneiro, E.L.N.C., Carvalho-Costa, F.A., 2015. Increasing incidence of pertussis in Brazil: a retrospective study using surveillance data. *BMC Infect. Dis.* 15, 442. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1222-3>.
- Imamura, T., Shoji, K., Kono, N., Kubota, M., Nishimura, N., Ishiguro, A., Miyairi, I., 2020. Allele frequencies of *Bordetella pertussis* virulence-associated genes identified from pediatric patients with severe respiratory infections. *J. Infect. Chemother.* 26, 765–768. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2020.02.016>.
- Lam, C., Octavia, S., Ricafort, L., Sintchenko, V., Gilbert, G.L., Wood, N., McIntyre, P., Marshall, H., Guiso, N., Keil, A.D., Lawrence, A., Robson, J., Hogg, G., Lan, R., 2014. Rapid increase in Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 20 <https://doi.org/10.3201/eid2004.131478>.
- Lefranq, N., Bouchez, V., Fernandes, N., Barkoff, A.-M., Bosch, T., Dalby, T., Åkerlund, T., Darenberg, J., Fabianova, K., Vestreim, D.F., Fry, N.K., González-López, J.J., Gullby, K., Habington, A., He, Q., Litt, D., Martini, H., Piérard, D., Stefanelli, P., Stegger, M., Zavadilova, J., Armatys, N., Landier, A., Guillot, S., Hong, S.L., Lemey, P., Parkhill, J., Toubiana, J., Cauchemez, S., Salje, H., Brisse, S., 2022. Global spatial dynamics and vaccine-induced fitness changes of *Bordetella pertussis*. *Sci. Transl. Med.* 14. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aba3253>.
- Locht, C., Keith, J.M., 1986. Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization. *Science* 232, 1258–1264. <https://doi.org/10.1126/science.3704651>.
- Loconsole, D., De Robertis, A.L., Morea, A., Metallo, A., Lopalco, P.L., Chironna, M., 2018. Resurgence of pertussis and emergence of the Prtx3 toxin promoter allele in South Italy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 37, e126–e131. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001804>.
- Matczak, S., Bouchez, V., Leroux, P., Douché, T., Collinet, N., Landier, A., Gianetto, Q.G., Guillot, S., Chamot-Rooke, J., Hasan, M., Matondo, M., Brisse, S., Toubiana, J., 2023. Biological differences between FIM2 and FIM3 fimbriae of *Bordetella pertussis*: not just the serotype. *Microbes Infect.* 25, 105152. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2023.105152>.
- Mosiej, E., Zawadka, M., Krysztopa-Grzybowska, K., Polak, M., Augustynowicz, E., Piekarska, K., Lutyńska, A., 2015. Sequence variation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from Poland in the period 1959–2013. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 147–152. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2216-6>.
- Nguyen, V.T.N., Simon, L., 2018. Pertussis. *Prim. Care* 45, 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.05.003>.
- Otsuka, N., Koide, K., Goto, M., Kamachi, K., Kenri, T., 2023. Fim3-dependent autoagglutination of *Bordetella pertussis*. *Sci. Rep.* 13, 7629. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34672-0>.
- Rocha, E.L., Leite, D., Camargo, C.H., Martins, L.M., Silva, R.S.N., Martins, V.P., Campos, T.A., 2017. The characterization of *Bordetella pertussis* strains isolated in the Central-Western region of Brazil suggests the selection of a specific genetic profile during 2012–2014 outbreaks. *Epidemiol. Infect.* 145, 1392–1397. <https://doi.org/10.1017/S0950268816003332>.
- Shahcheraghi, F., Saedi, S., Safarchi, A., Noofeli, M., Tadayon, K., Chin, A., Tay, Y., Lamichhane, B., Rahimi, H., 2020. Genome diversity and evolutionary characteristics of clinical isolates of *Bordetella pertussis* circulating in Iran.
- Shina, A., Hart, C.A., Stenton, M.D., Dawson, S., Mcracken, C.M., Binns, S.H., Gaskell, R. M., Winstanley, C., 2002. Distribution of fim3 and flaA TTGE sequence types amongst isolates of *Bordetella bronchiseptica* from different host animals. *J. Med. Microbiol.* 51, 557–587. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-7-557>.
- Wu, S., Hu, Q., Yang, C., Zhou, H., Chen, H., Zhang, Y., Jiang, M., He, Y., Shi, X., 2021. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* and analysis of vaccine antigen genes from clinical isolates from Shenzhen, China. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 20, 53. <https://doi.org/10.1186/s12941-021-00458-3>.
- Zawadka, M., Mosiej, E., Polak, M., Krysztopa-Grzybowska, K., Moskala, B., Rokosz-Chudziak, N., Rabcezenko, D., Augustynowicz, E., Lutyńska, A., 2014. Consistency of *Bordetella pertussis* vaccine seed strains and potency of whole-cell pertussis vaccine still in use in Poland. *Biologicals* 42, 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2013.11.006>.
- Zhang, J., Zhang, D., Wang, X., Wei, X., Li, H., 2022. Macrolide susceptibility and molecular characteristics of *Bordetella pertussis*. *J. Int. Med. Res.* 50, 030006052210787. <https://doi.org/10.1177/03000605221078782>.