

Serotypes and genetic profiles of *Bordetella pertussis* strains isolated in the city of São Paulo, 2006-2008

Sorotipos e perfis genéticos de cepas de Bordetella pertussis isoladas na cidade de São Paulo, 2006-2008

Daniela Leite¹, Pamela K. Cassidy², Kathleen M. Tatti³,
Tânia Mara Ibelli Vaz⁴, Maria Lúcia Tondella⁵

Resumo

Objetivo: O conhecimento de *Bordetella pertussis* circulante na América Latina é limitado. Portanto, o objetivo deste estudo foi usar a técnica da eletroforese em campo pulsado e a sorotipagem para caracterizar cepas de *B. pertussis* isoladas na cidade de São Paulo (SP).

Métodos: Este estudo, conduzido entre 2006 e 2008, analisou 652 swabs de nasofaringe coletados de casos suspeitos e comunicantes de coqueluche, provenientes de 37 hospitais sentinela de São Paulo. Foram realizadas as técnicas da eletroforese em campo pulsado e sorotipagem em 91 (70%) cepas de *B. pertussis*, escolhidas aleatoriamente.

Resultados: Noventa e sete por cento das cepas de São Paulo foram sorotipadas como Fim3. Foram identificados 14 perfis genéticos pela eletroforese em campo pulsado; o mais prevalente (57%) também é o mais prevalente nos EUA.

Conclusões: Esses dados, em conjunto com ações da vigilância, podem ter um impacto nas estratégias de prevenção e controle de coqueluche na região, oferecendo informações úteis para a introdução de estratégias novas de vacinação e redução do risco de transmissão para bebês menores de 6 meses de idade.

J Pediatr (Rio J). 2012;88(4):357-60: Bordetella pertussis, coqueluche, América Latina, crise de tosse, eletroforese em campo pulsado, sorotipagem.

Introdução

Coqueluche, ou pertussis, é uma doença respiratória infecciosa, causada pela bactéria *Bordetella pertussis*. *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* e *B. holmesii* também podem ser encontradas no trato respiratório humano, causando uma doença semelhante à coqueluche, porém com sintomas mais amenos. Apesar dos programas de vacinação em massa e da boa cobertura vacinal em muitos países, a

Abstract

Objective: Knowledge of *Bordetella pertussis* circulating in Latin America is limited. Therefore, the goal of this study was to use pulsed-field gel electrophoresis and serotyping to characterize *B. pertussis* strains isolated in the city of São Paulo, Brazil.

Methods: This study, conducted between 2006 and 2008, analyzed 652 nasopharyngeal swabs from suspected pertussis cases and contacts, collected from 37 sentinel hospitals in São Paulo. Randomized samples of 91 (70%) strains of *B. pertussis* were subtyped by pulsed-field gel electrophoresis and serotyping.

Results: Ninety-seven percent of strains from São Paulo were serotyped as Fim3. Fourteen pulsed-field gel electrophoresis profiles were identified; the most prevalent (57%) is also the most prevalent in the USA.

Conclusions: These data, in conjunction with surveillance activities, may impact strategies regarding prevention and control of pertussis in the region, providing useful information for introduction of new vaccination strategies and reduction of risk of transmission to infants less than 6 months of age.

J Pediatr (Rio J). 2012;88(4):357-60: Bordetella pertussis, pertussis, Latin America, whooping cough, pulsed-field gel electrophoresis, serotyping.

B. pertussis continua a circular em nível mundial, com 48,5 milhões de casos anualmente, 295.000 óbitos e epidemias a cada 3-5 anos¹.

Altos níveis de eficácia têm sido obtidos tanto com vacinas de célula inteira (wP) ou acelular (aP). A duração da proteção após o esquema básico de vacinação, com uma dose de reforço da vacina wP, é estimada em torno de 6 a 12 anos,

1. Pesquisador científico, Pertussis Laboratory, Instituto Adolfo Lutz (IAL), São Paulo, SP.
2. Mestre. National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, EUA.
3. Doutora. National Center for Immunization and Respiratory Diseases, CDC, Atlanta, Georgia, EUA.
4. Doutora. Pertussis Laboratory, IAL, São Paulo, SP.
5. Doutora. National Center for Immunization and Respiratory Diseases, CDC, Atlanta, Georgia, EUA.

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

Apoio financeiro: Fogarty International Center, National Institutes of Health, to the University of Pittsburgh (grant D43TW006592).

Como citar este artigo: Leite D, Cassidy PK, Tatti KM, Vaz TM, Tondella ML. Serotypes and genetic profiles of *Bordetella pertussis* strains isolated in the city of São Paulo, 2006-2008. *J Pediatr (Rio J)*. 2012;88(4):357-60.

Artigo submetido em 29.07.11, aceito em 18.01.12.

<http://dx.doi.org/10.2223/JPED.2186>

o mesmo período que ocorre após a infecção natural. Alguns estudos demonstram que a duração da proteção com o uso da vacina aP está situada dentro do mesmo intervalo de tempo². No Brasil, o programa de vacinação foi estabelecido em 1968 com difteria, wP e tétano (DPT) e, atualmente, o Ministério da Saúde recomenda três doses de DTP + Hib (vacina tetravalente) aos 2, 4 e 6 meses de idade e dois reforços de DTP: o primeiro aos 15 meses, e o segundo, entre 4 e 6 anos³.

De 1980 a 1983, mais de 40.000 casos de coqueluche (taxa de incidência > 30/100.000) foram notificados no Brasil, mas os casos diminuíram substancialmente após 1983. Em 1990, 15.329 casos (taxa de incidência de 10,64/100.000) foram relatados, sendo a maior taxa observada na década. Em 1995, 3.798 casos (taxa de incidência 2,44/100.000) foram relatados e, depois disso, o número anual de casos não excedeu 2.000 (taxa de incidência 1/100.000). Em 2008, houve 1.344 casos (taxa de incidência 0,71/100.000)⁴.

A coqueluche continua sendo endêmica no mundo, e sua reemergência foi relatada em muitos países. Foram sugeridas diversas explicações para esse ressurgimento, inclusive baixa eficácia da vacina, perda da imunidade sem reforços naturais e vacinais, maior reconhecimento clínico e laboratorial da coqueluche e mudanças na população circulante de *B. pertussis*^{1,5}.

Diferentes metodologias têm sido descritas para estudar a epidemiologia molecular da *B. pertussis*, incluindo a sorotipagem, eletroforese em campo pulsado (PFGE), *multilocus sequence typing* (MLST) e *multilocus variable number tandem repeat analysis* (MLVA)⁶. Entre as metodologias disponíveis que são capazes de monitorar diferenças genéticas entre isolados, a PFGE foi escolhida como método de referência para estudos epidemiológicos da coqueluche, por apresentar um maior poder discriminatório^{7,8}.

A sorotipagem é um dos métodos mais antigos para caracterizar a *B. pertussis* e baseado nas reações com antissoros específicos, a *B. pertussis* pode ser dividida em três tipos fimbriais: Fim2, Fim3 e Fim2, 3⁹. Embora a identificação do sorotipo seja importante para a caracterização primária das cepas, métodos moleculares com maior reprodutibilidade e poder discriminatório, como a PFGE, podem ser mais úteis em investigações epidemiológicas, pois a PFGE oferece um perfil de restrição reproduzível de grandes fragmentos de DNA bacteriano⁷.

Informações sobre isolados circulantes de *B. pertussis* na América Latina são limitadas. Portanto, o objetivo deste estudo foi usar PFGE e sorotipagem para caracterizar cepas de *B. pertussis* isoladas na cidade de São Paulo (SP).

Materiais e métodos

Entre 2006 e 2008, foram coletados 652 swabs de nasofaringe de casos suspeitos e comunicantes de coqueluche, provenientes de 37 hospitais sentinelas na cidade de São Paulo, onde foram cultivados no Centro de Referência Nacional para Coqueluche, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. As amostras foram coletadas com swabs estéreis alginatados e transportados em meio de ágar carvão semissólido, Regan-

Lowe (RL, Oxoid), suplementado com 10% de sangue de carneiro e 40 µg/mL cefalexina. As amostras foram cultivadas no mesmo dia da coleta em ágar RL com 10% de sangue de carneiro e 40 µg/mL cefalexina e incubados a 35-37 °C em atmosfera úmida por até 10 dias. Colônias sugestivas de pertencerem ao gênero *Bordetella* foram confirmadas pela coloração de Gram, e as espécies foram identificadas por testes bioquímicos. A detecção do antígeno O1 específico para *B. pertussis* foi realizada pelo teste de aglutinação em lâmina e antissoro O1. Durante o período do estudo, 132 cepas de *B. pertussis* foram isoladas e armazenadas liofilizadas. Para o presente estudo, foi selecionada uma amostragem aleatória de 91 (70%) cepas de *B. pertussis*, de acordo com idade (Figura 1) e distribuição nos hospitais sentinela.

Os sorotipos foram determinados pelo teste de microaglutinação¹⁰ com pequenas modificações. O teste foi realizado por meio de suspensões bacterianas inativadas pelo calor (1 hora a 56 °C) e tratadas com formalina. Foi realizado ensaio imunoenzimático (ELISA) conforme descrito anteriormente¹⁰, usando suspensões inativadas pelo calor. Em ambos os testes, foram utilizadas cepas de *B. pertussis* B222, B201 e B222 para controle positivo, expressando, respectivamente, Fim2, Fim3 e Fim2, 3. Anticorpos monoclonais anti-*B. pertussis* fimbrial 2 (04/154) e fimbrial 3 (04/156) foram obtidos do National Institute for Biological Standards and Control, Reino Unido.

Seguimos o método de PFGE descrito por Hardwick et al.¹¹ usando a enzima de restrição *Xba*I. Os padrões de PFGE foram analisados utilizando o software BioNumerics (versão 4.0; Applied Maths, Inc., Austin, TX, EUA).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz (número de protocolo 065/2009).

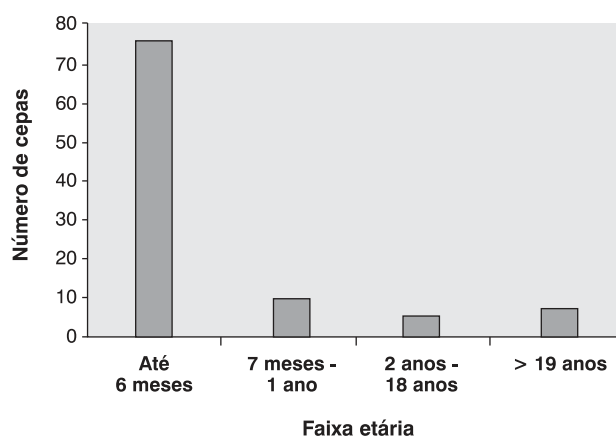


Figura 1 - Distribuição de cepas de *Bordetella pertussis* isoladas na cidade de São Paulo, Brasil, por faixa etária durante 2006-2008

Resultados e discussão

No presente estudo, a maioria das cepas de *B. pertussis* (97%, 88/91) foi sorotipo Fim3 pelo teste de microaglutinação e por ELISA. Duas cepas apresentaram resultados discordan-

tes: uma cepa resultou Fim2, 3 por microaglutinação, mas Fim3 por ELISA, e a outra resultou Fim3 por microaglutinação, mas Fim2,3 por ELISA. Não foi possível sorotipar um isolado de *B. pertussis* por nenhuma das técnicas.

PFGE foi altamente discriminatória, identificando 14 perfis genéticos, de acordo com a nomenclatura do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (Figura 2). Os perfis PFGE013 (57%, 52/91) e PFGE082 (15%, 14/91) foram os tipos mais comuns. Outros 12 perfis foram identificados (1-6 cepas cada) e representaram 28% (25/91) dos isolados.

Quanto à distribuição de casos por faixa etária, o mais prevalente foi o grupo de crianças com 1 ano de idade ou menos, correspondendo a 91,2% (83/91) das cepas estudadas. Apenas 8,8 % das cepas foram isoladas de adolescentes e adultos (Figura 1).

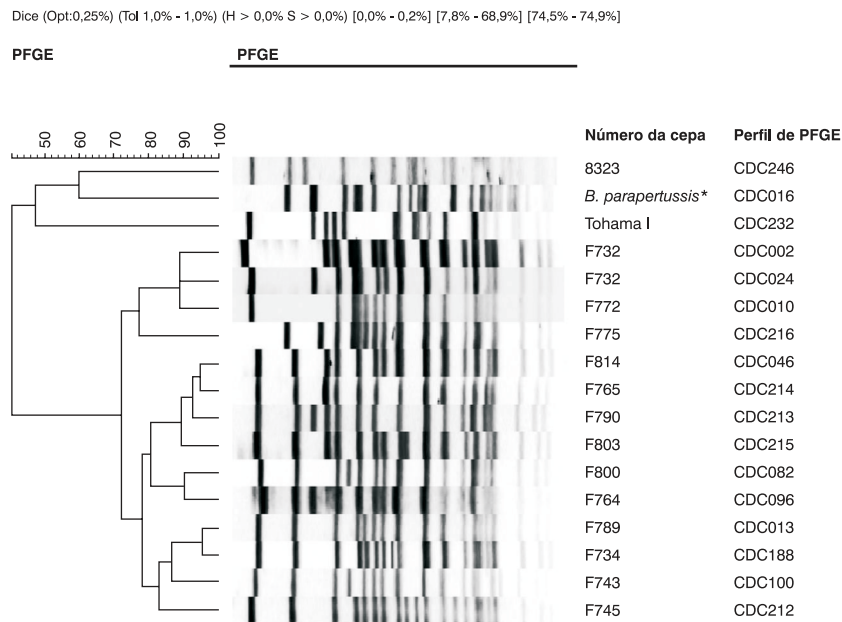
O monitoramento da expressão de fímbrias Fim2 e Fim3 por sorotipagem é importante para a diferenciação de cepas e detecção de mudanças na população de *B. pertussis*. Neste estudo, foi observada uma predominância de cepas do sorotipo Fim3. Anteriormente, no Brasil¹², 86% das 72 cepas coletadas entre 1988-2002 foram sorotipo Fim3, sugerindo que este sorotipo tem sido predominante no país por algumas décadas. Resultados semelhantes também foram relatados em outros países¹³⁻¹⁵.

PFGE tem sido utilizada como uma ferramenta epidemiológica para estudos de vigilância da variação genética de cepas de *B. pertussis* ao longo do tempo bem como para

identificação de cepas associadas a surtos^{9,11}. PFGE permite a identificação de cepas que são epidemiologicamente associadas e indistinguíveis por outros métodos de sorotipagem. PFGE tem sido utilizada no mundo inteiro, mas a comparação dos perfis pelos diferentes laboratórios é difícil devido à variação de técnicas e de nomenclatura. Assim como Gonçalves et al.¹², observamos 14 perfis genéticos por PFGE, com pouca diferença genética entre eles, demonstrando a estrutura relativamente homogênea ou clonal da *B. pertussis*. Entre os dois perfis mais frequentes, PFGE 013 foi o mais prevalente e frequente no Brasil entre 1988 e 2002¹². Além disso, é o perfil mais prevalente atualmente em circulação nos EUA (dados não mostrados). O fato de que o mesmo perfil genético predominante está circulando no Brasil e nos EUA é interessante, considerando que esses países usaram diferentes estratégias de vacinação contra coqueluche nos últimos 19 anos.

Não foi observada nenhuma relação entre idade, perfil genético e sorotipo, embora nossos dados tenham sido limitados pelo pequeno número de isolados de faixas etárias acima dos 6 meses de idade (Figura 1).

Um ampla variedade de vacinas contra coqueluche (wP ou aP) tem sido produzida, incluindo aP contendo um ou mais antígenos purificados como toxina pertussis (PT), hemaglutinina filamentososa (FHA), pertactina (PRN) e fímbrias (FIM) tipo 2 e tipo 3 usados separadamente ou em diferentes combinações. As eficácias de aP e wP variam dependendo da



PFGE = Eletroforese em gel em campo pulsado.
 * *B. parapertussis* isoladas no Brasil durante o período de estudo.

Figura 2 - Relação de perfis de eletroforese em gel em campo pulsado de cepas de *Bordetella pertussis* isoladas na cidade de São Paulo, Brazil, 2006-2008

definição de caso usada para coqueluche. O monitoramento dos sorotipos e perfis genéticos das cepas coletadas ao longo do tempo de diferentes regiões é importante para obter um melhor entendimento da população de *B. pertussis* atualmente em circulação em nível mundial. Esses dados fornecem uma visão geral da coqueluche no leste da América do Sul e, em conjunto com atividades de vigilância, podem ter um impacto nas estratégias de prevenção e controle da doença na região, oferecendo informações úteis para introduzir novas estratégias de vacinação visando à redução do risco de transmissão para bebês menores de 6 meses de idade.

Agradecimentos

Agradecemos a Kinue Irino e Eliete Caló Romero, por revisarem este manuscrito, e a Leyva C. Melo, pelo auxílio técnico laboratorial. Este estudo foi financiado, em parte, pelo Fogarty International Center, National Institutes of Health, University of Pittsburgh (D43TW006592).

Referências

1. Mattoo S, Cherry JD. [Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to Bordetella pertussis and other Bordetella subspecies.](#) *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:326-82.
2. de Carvalho AP, Pereira EM. [Acellular pertussis vaccine for adolescents.](#) *J Pediatr (Rio J).* 2006;82:S15-24.
3. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD). Programa Estadual de Imunização. Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA). 2006;27.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 7ª edição. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. p. 1-20.
5. Bottero D, Gaillard ME, Fingerhann M, Weltman G, Fernández J, Sisti F, et al. [Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms, and surfaceome analysis of vaccine and clinical Bordetella pertussis strains.](#) *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14:1490-8.
6. Litt DJ, Neal SE, Fry NK. [Changes in genetic diversity of the Bordetella pertussis population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type.](#) *J Clin Microbiol.* 2009;47:680-8.
7. Mosiej E, Augustynowicz E, Zawadka M, Dabrowski W, Lutyńska A. [Strain variation among Bordetella pertussis isolates circulating in Poland after 50 years of whole-cell pertussis vaccine use.](#) *J Clin Microbiol.* 2011;49:1452-7.
8. Advani A, Van der Heide HG, Hallander HO, Mooi FR. [Analysis of Swedish Bordetella pertussis isolates with three typing methods: characterization of an epidemic lineage.](#) *J Microbiol Methods.* 2009;78:297-301.
9. Mooi FR, Hallander H, Wirsing von König CH, Hoet B, Guiso N. [Epidemiological typing of Bordetella pertussis isolates: recommendations for a standard methodology.](#) *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19:174-81.
10. Tsang RS, Sill ML, Advani A, Xing D, Newland P, Hallander H. [Use of monoclonal antibodies to serotype Bordetella pertussis isolates: comparison of results obtained by indirect whole-cell enzyme-linked immunosorbent assay and bacterial microagglutination methods.](#) *J Clin Microbiol.* 2005;43:2449-51.
11. Hardwick TH, Cassiday P, Weyant RS, Bisgard KM, Sanden GN. [Changes in predominance and diversity of genomic subtypes of Bordetella pertussis isolated in the United States, 1935 to 1999.](#) *Emerg Infect Dis.* 2002;8:44-9.
12. Gonçalves CR, Vaz TM, Medeiros MI, Castro MT, Rocha MM, Melles CE, et al. [Phenotypical and genotypical characterization of Bordetella pertussis strains isolated in São Paulo, Brazil, 1988-2002.](#) *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007;49:123-5.
13. Weber C, Boursaux-Eude C, Coralie G, Caro V, Guiso N. [Polymorphism of Bordetella pertussis isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years.](#) *J Clin Microbiol.* 2001;39:4396-403.
14. Kourova N, Caro V, Weber C, Thiberge S, Chuprinina R, Tseneva G, et al. [Comparison of the Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis isolates circulating in Saint Petersburg between 1998 and 2000 with Russian vaccine strains.](#) *J Clin Microbiol.* 2003;41:3706-11.
15. Tsang RS, Lau AK, Sill ML, Halperin SA, Van Caesele P, Jamieson F, et al. [Polymorphisms of the fimbria fim3 gene of Bordetella pertussis strains isolated in Canada.](#) *J Clin Microbiol.* 2004;42:5364-7.

Correspondência:

Daniela Leite
 Centro de Bacteriologia, Laboratório de Referência Nacional para Coqueluche, Instituto Adolfo Lutz
 Av. Dr. Arnaldo, 351, 9º andar
 CEP 01246-902 - São Paulo, SP
 Tel.: (11) 3068.2896
 E-mail: dedeleite@gmail.com