



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Biologia - IB

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

**Caracterização biológica de isolados clínicos de *Bordetella pertussis* do Distrito Federal**

**Candidata: Nayara Pessoa de Oliveira**

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

Brasília, DF

Abril de 2018



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Biologia - IB

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

## **Caracterização biológica de isolados clínicos de *Bordetella pertussis* isolados no Distrito Federal**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília para obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana

**Candidata: Nayara Pessoa de Oliveira**

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

Brasília,DF

Abril de 2018

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

**Nayara Pessoa de Oliveira**

### **Caracterização biológica de isolados clínicos de *Bordetella pertussis* isolados no Distrito Federal**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana para a obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana.

Dissertação aprovada em:

Comissão examinadora:

1º Membro (Presidente):

Prof. Dra. Tatiana Amabile de Campos (UnB)

2º Membro:

Prof. Dra. Fabiola Cristina Ribeiro Zucchi (UnB)

3º Membro:

Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins (UnB)

4º Membro (Suplente):

Prof. Dra. Kelly Grace Magalhães (UnB)

À minha mãe Maria do Socorro, que deu tudo de si para me dar a educação e apoio que ela não pode ter e por nunca me deixar desistir.

À memória do meu pai Fernando, que me fez acreditar que eu poderia fazer qualquer coisa.

À minha irmã Nathalia, por sempre me incentivar e me apoiar

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a minha mãe, Socorro, por ser minha fundação e sempre me apoiar em minhas decisões. Eu não teria conseguido sem você. Obrigada por ter se dedicado tanto para que eu tivesse uma boa educação e por me amar incondicionalmente. À minha irmã, Nathalia, por sempre me apoiar e se preocupar comigo, mesmo não fazendo ideia do que é o meu trabalho. Agradeço a toda minha família por terem acreditado em mim e me apoiado nos momentos difíceis.

À minha orientadora, Tatiana, por ter me acolhido em seu laboratório desde o primeiro semestre da graduação, quando eu não sabia nem usar uma pipeta. Serei sempre grata pelo que me ensinou sobre ciência e a vida. Me considero uma pessoa de sorte por ter tido uma orientadora tão paciente, competente, humana e compreensiva. Você é um exemplo de cientista e mulher para mim. Obrigada por tudo, Tatiana!

À todos do LAMP, foi uma sorte imensa trabalhar em um laboratório onde todos são tão divertidos e se respeitam. Obrigada pela ajuda e pelas risadas. Agradeço em especial a minhas amigas de grupo, por todo apoio e carinho. Primeiro a Ana por ser minha companheira de jornada, ouvi meus desabafos e dizer que tudo vai dar certo no fim. A Leticia, por ser essa pessoa maravilhosa e divertida e por ter me ajudado tanto nesse projeto, com as extrações e MLVA. A Laura, sempre tão alegre e paciente comigo, mesmo quando eu a enchia de perguntas por mensagem. A Isa, por reclamar comigo quando as coisas dão errado e por comemorar quando dão certo. A Rafa, pelo apoio, risadas e pela ajuda no projeto. Vocês encheram meus dias de apoio e carinho e sempre serei grata por isso.

Tenho muito a agradecer as colaborações que fizeram esse trabalho ser possível. Ao professor Sébastien, pela parceria e por todo o esforço que fez para que a proteômica fosse possível. Ao Samuel, obrigada por ter tido tanta paciência comigo e pela ajuda com as extrações

e espectrometria. Vocês dois são pessoas maravilhosas. Agradeço também a equipe da Seção Vacinas Aeróbicas do instituto Butantã, por terem preparado e enviado as amostras para proteômica. A Patrícia da Embrapa Cenargen pelo sequenciamento do MLST. Aos colegas do LIM1 , por sempre me ajudarem quando eu precisei, e por cederem seus equipamentos para cultura de células.

Não posso deixar de agradecer as minhas amigas desde a graduação: Juliana, Bianca, Débora e Flaviane. Obrigada pelo apoio, conselhos e carinho. Em especial a Ju, pelas longas conversas que poderiam durar dias. Agradeço também a minhas amigas desde os tempos de escola : Natalice e Luiza. Obrigada por terem me apoiado nos momentos difíceis da minha vida e me fazerem me sentir como se eu estivesse concorrendo ao Nobel.

Agradeço aos professores e técnicos da UnB por participarem da minha formação. Obrigada a todos que contribuíram , mesmo que em pequenas ações, ao meu trabalho.

## RESUMO

A coqueluche é uma doença do trato respiratória altamente infecciosa causada pela bactéria gram-negativa *Bordetella pertussis*. Antes da introdução da vacina em 1950, a coqueluche era uma das principais causas de mortalidade infantil. Apesar dos números de casos terem reduzido drasticamente com a vacinação, a coqueluche continua endêmica com ciclos epidêmicos a cada 2-5 anos. No Brasil, o número de casos havia reduzido consideravelmente após aumento da cobertura vacinal, entretanto em 2011 a incidência de coqueluche aumentou em um surto que durou até 2014. Nesse período foram registrados 72.901 casos em todo o país. No Distrito Federal e entorno também foi registrado aumento dos números de casos de 2011 a 2014. Entre as hipóteses levantadas para o aumento da incidência estão: otimização do diagnóstico e evolução das linhagens circulantes perante pressão vacinal. Para um controle eficiente da coqueluche é importante conhecer o perfil genético e comportamento dos isolados circulantes. Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar dez isolados clínicos do Distrito Federal isolados entre 2011 e 2014, quanto a seu perfil genético utilizando MLVA e MLST. Além de avaliar os isolados quanto a sua capacidade de produção de biofilme e citotoxicidade para células epiteliais de traqueia, e avaliar se houve adaptação a nível de expressão proteica comparando um dos isolados a cepa bp 137, utilizada no programa de vacinação nacional. Os isolados analisados demonstraram uma alta similaridade genética apresentando pouca variação nos lócus analisados no MLVA. Cinco dos dez isolados podem pertencer ao MT 70, 91, 92 ou 137, perfis com pequena distribuição. A análise de MLST para os genes *prn* e *ptxS* encontrou variação alélica em comparação a cepa vacinal e isolados de outros países. Todos os isolados apresentam o alelo ptxP3, predominante em diversos países e relacionado ao ressurgimento da coqueluche. Quanto as análises microbiológicas, foi observado formação de biofilme em superfície abiótica e redução da viabilidade celular de células epiteliais após a infecção. Os resultados demonstraram pouca variação os isolados nos lócus

analisados e variação alélica em relação a cepa vacinal. Os isolados também apresentaram uma boa capacidade para formação de biofilme e citotoxicidade celular, que podem constituir uma vantagem adaptativa para essas cepas. Em conjunto, os dados demonstraram que os isolados analisados apresentam perfil genético diferente da linhagem vacinal. Além disto, todos os isolados apresentaram capacidade de formação de biofilme e potencial citotóxico, sugerindo que apresentam elevada capacidade de colonização da célula hospedeira. Análises posteriores com um maior número de isolados permitirá identificar qual o perfil alélico mais prevalente na região, permitindo, assim, avaliar se há necessidade de inserção de uma linhagem brasileira na produção da vacina.

## **Abstract**

Pertussis is a highly infectious respiratory tract disease caused by the gram-negative bacteria *Bordetella pertussis*. Previous to the introduction of the vaccine in 1950, whooping cough was a major cause of infant mortality. Although the numbers of cases have reduced with vaccination, pertussis remains endemic with epidemic cycles every 2-5 years. In Brazil, the number of cases had reduced considerably after increase of vaccine coverage, however in 2011 the incidence of pertussis increased in an outbreak that lasted until 2014. During that period, 72,901 cases were registered nationwide. In Distrito Federal and surroundings there was also an increase in the number of cases from 2011 to 2014. Among the hypotheses raised for the increase in incidence are: optimization of diagnosis and evolution of circulating strains under vaccine pressure. For efficient pertussis control it is important to know the genetic profile and behavior of the circulating isolates. Therefore, this study aimed to characterize ten clinical isolates from Distrito Federal isolated between 2011 and 2014, regarding their genetic profile using MLVA and MLST. In addition, the isolates were evaluated on their ability to produce biofilm and cytotoxicity to tracheal epithelial cells, and to evaluate whether there was adaptation at protein expression levels, we compare one of the isolates to the bp 137 strain, used in the national vaccination program. The analyzed isolates showed a high genetic similarity, presenting little variation in the locus analyzed in MLVA. Five of the ten isolates may belong to MT 70, 91, 92 or 137, profiles with small distribution. The MLST analysis for the *prn* and *ptxS* genes found allelic variation in comparison to the vaccine strain and isolates from other countries. All the isolates present the *ptxP3* allele, predominant in several countries and related to the resurgence of pertussis. As for the microbiological analyzes, it was observed biofilm formation on abiotic surface and reduction of cell viability of epithelial cells after infection. The results showed little variation between the isolates in the analyzed loci and allelic variation in relation to the vaccine strain. The isolates also showed a good capacity for biofilm

formation and cellular cytotoxicity, which may be an adaptive advantage for these strains. Together, the data demonstrated that the isolates analyzed presented a genetic profile different from the vaccine strain. In addition, all isolates presented biofilm formation and cytotoxic potential, suggesting that they have a high capacity for colonization of the host cell. Further analyzes with a greater number of isolates will allow to identify the most prevalent allelic profile in the region, thus allowing the evaluation of whether there is a need to insert a Brazilian lineage in the production of the vaccine.

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| <b>AGRADECIMENTOS</b> .....   | 5  |
| <b>RESUMO</b> .....   | 7  |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | 9  |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 13 |
| 1.1. COQUELUCHE E <i>BORDETELLA PERTUSSIS</i> .....                   | 17 |
| 1.2. FATORES DE VIRULÊNCIA E PATOGÊNESES DE <i>B.PERTUSSIS</i> .....  | 20 |
| 1.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....                                     | 27 |
| 1.4. EPIDEMIOLOGIA E ESTRATÉGIAS VACINAIS .....                       | 28 |
| 1.5. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE <i>B.PERTUSSIS</i> .....              | 30 |
| 1.6. ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS ENCONTRADAS EM ISOLADOS CIRCULANTES. .... | 33 |
| <b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....   | 39 |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....   | 40 |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                                    | 41 |
| 4.1. ISOLADOS DE <i>BORDETELLA PERTUSSIS</i> .....                    | 41 |
| 4.2. CULTIVO DOS ISOLADOS .....                                       | 41 |
| 4.3. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO .....                                   | 42 |
| 4.4. MLVA .....   | 42 |
| 4.5. MLST .....   | 43 |
| 4.6. QUANTIFICAÇÃO DE BIOMASSA DE BIOFILME .....                      | 44 |
| 4.7. MANUTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR HEP-2 .....                       | 45 |
| 4.8. TESTE DE VIABILIDADE DE CÉLULAS EPITELIAIS APÓS INFECÇÃO .....   | 46 |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.9. EXTRAÇÃO PROTEÍNAS TOTAIS E DIGESTÃO PARA ESPECTROMETRIA DE MASSA | 47        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                       | <b>48</b> |
| 5.1. ISOLADOS  | 48        |
| 5.2. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR   | 48        |
| 5.2.1. <i>MLVA</i>   | 49        |
| 5.2.2. <i>MLST</i>   | 51        |
| 5.3. FORMAÇÃO DE BIOFILME E CITOTOXICIDADE DE <i>B. PERTUSSIS</i>      | 55        |
| 5.3.1. <i>Produção de Biofilme</i>                                     | 56        |
| 5.3.2. VIABILIDADE DE CÉLULAS EPITELIAIS APÓS INFECÇÃO                 | 57        |
| <b>6. CONCLUSÕES</b>   | <b>61</b> |
| <b>7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                    | <b>62</b> |

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** INTERAÇÃO DA *BORDETELLA PERTUSSIS* COM EPITÉLIO DA MUCOSA. PRIMEIRO PASSO NA COLONIZAÇÃO É ADESÃO MEDIADA PELA HEMAGLUTININA FILAMENTOSA E FIMBRIA. A CITOTOXINA TRAQUEAL (TCT) E LIPO-OLIGOSSACARÍDEO (LOS) DESENCADAM DANOS AO EPITÉLIO INDUZINDO LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS), PRINCIPALMENTE INDUZINDO PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) PELAS CÉLULAS PRODUTORAS DE MUCO (EM ROXO).A *BORDETELLA PERTUSSIS* PODE TAMBÉM INVADIR AS CÉLULAS E FORMAR BIOFILME. A ADENILATO CICLASE (ACT) E O SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III, POR MEIO DO SEU EFETOR BTEA, AFETAM VIAS DE SINALIZAÇÃO LEVANDO A CITOTOXICIDADE. FIGURA ADAPTADA DE DE GOUW ET AL., 2011..... 27
- FIGURA 2.** COEFICIENTE DE INCIDÊNCIA DE COQUELUCHE E COBERTURA VACINAL COM DTP E DTPW-HB/HIB. ENTRE 2013 A 2017 COBERTURA DTPW-HB/HIB. FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018..... 37
- FIGURA 3.** DISTRIBUIÇÃO DE CASOS CONFIRMADOS DE COQUELUCHE POR GRUPO ETÁRIO DE 2007 A 2014. RETIRADO DE GUIMARÃES; CARNEIRO; CARVALHO-COSTA, 2015..... 37
- FIGURA 4.** DISTRIBUIÇÃO DOS PULSOTIPOS IDENTIFICADOS NO DISTRITO FEDERAL DURANTE 2012 A 2014. O NÚMERO DE ISOLADOS IDENTIFICADOS COMO *BP.XBAI.0039* ESTÁ EM DESTAQUE. (ROCHA ET AL., 2017) ..... 38
- FIGURA 5.** FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS DE *B.PERTUSSIS* EM SUPERFÍCIE ABIÓTICA. FORMAÇÃO DE BIOFILME APÓS 24 E 48 HRS DE CRESCIMENTO. CADA VALOR REPRESENTA A MÉDIA DE DOIS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES REALIZADOS EM TRIPLICATA PARA CADA ISOLADO. A BARRA DE ERRO REPRESENTA O DESVIO PADRÃO..... 56
- FIGURA 6.** VIABILIDADE DA CÉLULA HEP-2 APÓS 24 PÓS-INFECÇÃO. CADA VALOR REPRESENTA A MÉDIA DA TRIPLICATA PARA CADA ISOLADO. LINHA AZUL INDICA PORCENTAGEM EM VIABILIDADE CELULAR EM RELAÇÃO AO CONTROLE NI (NÃO INFECTADO). BARRAS DE ERROS

INDICAM DESVIO PADRÃO. A DIFERENÇA SIGNIFICATIVA FORAM ACESSADAS POR ANOVA .\*, P < 0.05; \*\*\*, P<0.001;\*\*\*\*, P<0.0001..... 58

**FIGURA 7.**ANÁLISE DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.GEL DE POLIACRILAMIDA 12% DOS EXTRATOS RESULTANTES DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA. M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR. . 60

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>TABELA 1.</b> ESPÉCIES DE <i>BORDETELLA</i> .CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E HOSPEDEIROS.....   | 19 |
| <b>TABELA 2.</b> SEQUÊNCIAS DE PRIMERS MLVA - <i>B.PERTUSSIS</i> ..  | 43 |
| <b>TABELA 3.</b> PRIMERS UTILIZADOS PARA MLST DE <i>B.PERTUSSIS</i> . ..   | 44 |
| <b>TABELA 4.</b> CLASSIFICAÇÃO QUANTO A PRODUÇÃO DE BIOFILME. BR: BRANCO E VA: VALOR DE ABSORBÂNCIA. ....                                | 45 |
| <b>TABELA 5.</b> ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>B.PERTUSSIS</i> ISOLADOS ENTRE 2012 E 2014 SELECIONADOS .....                                   | 48 |
| <b>TABELA 6.</b> NÚMERO DE REPETIÇÃO DE VNTRS E PERFIL MLVA (MT) DE CEPAS DE <i>B.PERTUSSIS</i> .....                                    | 50 |
| <b>TABELA 7.</b> MLST DOS ISOLADOS DE <i>B.PERTUSSIS</i> E DA CEPA VACINAL BP137. ALELOS DOS GENES ASSOCIADOS A VIRULÊNCIA.....          | 52 |
| <b>TABELA 9.</b> TIPAGEM MOLECULAR DOS ISOLADOS DE <i>BORDETELLA PERTUSSIS</i> ISOLADOS NO DISTRITO FEDERAL E DA CEPA VACINAL BP137..... | 55 |
| <b>TABELA 8.</b> PERFIL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DE ISOLADOS DE <i>B.PERTUSSIS</i> EM 48 HORAS. ....                                      | 57 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

IS: Elementos de Inserção de sequência

BvgSA : do inglês, bordetella virulence genes

PT: Toxina Pertussis

cAMP :AMP cíclico

ACT :Adenilato ciclase

TCT : Citotoxina Traqueal

DNT : Toxina Dermonecrótica

FHA :Hemaglutinina Filamentosa

AGGs : aglutinógenos

PRN: Pertactina

T3SS: Sistema de Secreção do Tipo III

LPS : Lipopolissacarídeo

LOS : lipo-oligossacarídeo

ROS : Espécies Reativas de Oxigênio

NO: Óxido Nitrico

wP: vacina celular, do inglês “whole-cell”

aP: vacina acelular

PFGE :Eletroforese em Gel de Campo Pulsado , do inglês pulsed field gel electrophoresis

VNTRs : do inglês, “*Variable Number Tandem Repeats*”

MLVA: do inglês, “*Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis*”

MLST: do inglês, “*Multilocus sequence typing*”

*ptxSI*: o primeiro gene do operon da toxina PT

*ptxP* :promotor do gene da toxina PT

*fim3*:proteína codificadora de fimbria

WGS: sequenciamento do genoma completo, do inglês “*whole-genome sequencing*”

SUS: Sistema Único de Saúde

SINAN : Sistema de Informação de Agravos de Notificação

DTPw-HB/Hib :vacina Pentavalente

DTP: Tríplice bacteriana (Difteria,Tétano e *Pertussis*).

DTPa: vacina Difteria,Tétano e *Pertussis* acelular.

LACEN-DF: Laboratório Central de Saúde Pública do DF

BG: Agar Bordet - Gengou

SS: Stainer-Scholte

MT: tipo de MLVA

MTT :3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

uop/mL: (Unidade Opacimétrica por mL).

SNP: polimorfismo de um único nucleotideo, do inglês “single nucleotide polymorfism”

# 1. Introdução

## 1.1. Coqueluche e *Bordetella pertussis*

A coqueluche ou tosse comprida é uma doença do trato respiratório, altamente contagiosa, caracterizada por acessos de tosse violenta que produz um som agudo típico e é endêmica em todo o mundo. Foi descrita clinicamente pela primeira vez pelo médico e pesquisador Guillaume de Baillou após uma epidemia na França em 1578, apesar de pesquisas recentes terem encontrado registros de epidemias anteriores na Pérsia (ASLANABADI et al., 2015). A coqueluche já era conhecida por 300 anos, quando Jules Bordet identificou um bacilo gram-negativo na expectoração de sua filha de 5 meses de idade que sofria de coqueluche. Entretanto, o bacilo era incapaz de crescer nos meios de cultura conhecidos na época, o que dificultou sua caracterização (KILGORE et al., 2016). Foi apenas em 1906 que Bordet conseguiu isolar a bactéria, quando com a ajuda de Octave Gengou criou um meio contendo extrato de batata e sangue – meio conhecido hoje como Bordet-Gengou (GUISO, 2014;BORDET E GENGOU, 1906). A bactéria ficou então conhecido como *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) em sua homenagem.

*B. pertussis* é um cocobacilo gram-negativo, aeróbico e é um patógeno estritamente humano, sem reservatórios animais conhecidos (LOCHT, 2016). O gênero *Bordetella* contém nove espécies descritas, sendo que três delas são tão similares filogeneticamente entre si que são consideradas subespécies: *B. pertussis*, *B. parapertussis<sub>hu</sub>* e *B. bronchiseptica* (PARK et al., 2012). Apesar da semelhança genética, apresentam grandes diferenças quanto a patogenicidade, hospedeiros e severidade da infecção (PARKHILL et al., 2003). Infectam o trato respiratório humano, mas só *B. pertussis* causa a coqueluche, *B. parapertussis<sub>hu</sub>* pode causar tosse semelhante a coqueluche com sintomas mais moderados e *B. bronchiseptica* tem apresentações clínicas que podem variar de assintomática a pneumonia (PARKHILL et al.,

2003). *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* podem infectar uma série de hospedeiros animais, sendo que a linhagem de *B. parapertussis* que infecta ovinos e suínos é denominada *B. parapertussis<sub>ov</sub>* e representa uma linhagem geneticamente distinta da que infecta humanos (CUMMINGS et al., 2004).

A pergunta de como subespécies tão semelhantes podem ter se adaptado a diferentes hospedeiros, e a *B. pertussis* ter permanecido restrita a humanos é alvo de diversos estudos de adaptação de patógenos. O sequenciamento do genoma total das três “*Bordetellas* clássicas” sugere que *B. pertussis* e *B. parapertussis<sub>hu</sub>* tenham evoluído independentemente de um ancestral similar a *B. bronchiseptica* e que adaptação destas ao hospedeiro humano foi resultado de perda de genes, acúmulo de pseudogenes e expansão de Elementos de Inserção de sequência (IS)(DIAVATOPOULOS et al., 2005; PARKHILL et al., 2003).

A *B. holmesii* também infecta humanos, fazendo parte de uma linhagem genética distinta e pode causar uma síndrome semelhante à coqueluche ou infecções invasivas (septicemia, pneumonia, artrite e meningite) (PITTET; POSFAY-BARBE, 2016). A semelhança das síndromes causadas por *B. holmesii* e *B. parapertussis<sub>hu</sub>* à coqueluche representa um desafio para o diagnóstico e vigilância dessa doença (MARTINI et al., 2017). A *B. pertussis* pode ser diferenciada de outras espécies de *Bordetella* por suas características bioquímicas e seu crescimento (KILGORE et al., 2016). *B. pertussis* é fastidiosa, não apresenta mobilidade e é positiva para catalase e oxidase. *B. parapertussis*, por outro lado, é menos fastidiosa, negativa para oxidase, e urease positiva e apresenta um pigmento marrom quando cultivada em meio Regan-Lowe ou Mueller-Hinton (LEBER, 2014). *B. holmesii* pode ser diferenciada por não produzir hemólise no meio com sangue como as outras duas, não ser fastidiosa e crescer em meios de laboratório rotineiros, além de também produzir pigmento marrom como a *B. parapertussis* (PITTET; POSFAY-BARBE, 2016).

A *B. petrii*, *B. trematum* e *B. ansorpii* já foram isoladas de humanos, mas tem ocorrências raras e são patógenos oportunistas (LE COUSTUMIER et al., 2011). *B. avium* e *B. hinzii* infectam aves e em raras ocasiões já foram isoladas de humanos (GROSS; KEIDEL; SCHMITT, 2010). As características bioquímicas das espécies de *Bordetella* conhecidas até agora e seus hospedeiros estão reunidas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Espécies de *Bordetella*. Características Bioquímicas e Hospedeiros. Adaptação de KILGORE et al., 2016 e PITTET; POSFAY-BARBE, 2016

|                          | Oxidase | Urease | Motilidade | Hemolise | Produção pigmento marrom | Hospedeiros                           |
|--------------------------|---------|--------|------------|----------|--------------------------|---------------------------------------|
| <i>B. pertussis</i>      | +       | -      | -          | +        | -                        | Humano                                |
| <i>B. parapertussis</i>  | -       | +      | -          | +        | +                        | Humano, ovelha, cabra, porco          |
| <i>B. bronchiseptica</i> | +       | +      | +          | -        | -                        | Humano, porco, gato, cachorro, coelho |
| <i>B. holmesii</i>       | -       | -      | -          | -        | +                        | Humano                                |
| <i>B. avium</i>          | +       | -      | +          | -        | -                        | Humano, aves                          |
| <i>B. hinzii</i>         | +       | +      | +          | -        | -                        | Humano, aves                          |
| <i>B. petrii</i>         | +       | -      | -          | -        | -                        | Humano                                |
| <i>B. trematum</i>       | -       | -      | +          | -        | -                        | Humano                                |
| <i>B. ansorpii</i>       | -       | -      | +          | -        | -                        | Humano                                |

## 1.2. Fatores de Virulência e patogêneses de *B.pertussis*

O sucesso da *B. pertussis* na colonização do trato respiratório é o resultado de grande aparato de toxinas, estruturas de superfície e proteínas metabólicas sob controle de um sistema de regulação que dita a expressão desses fatores de virulência em resposta ao ambiente (PINTO; MERKEL, 2017).

A transcrição da maioria dos fatores de virulência da *B. pertussis* está sob o controle do locus **BvgSA** (do inglês, bordetella virulence genes), um sistema regulatório global de dois componentes - BvgA e o BvgS – que controla mais de 100 genes (BOULANGER et al., 2013). Sistemas de regulação de dois componentes geralmente consistem de um sensor de cinase (um domínio sensor situado no periplasma conectado a um domínio cinase dentro da célula) e um regulador de resposta que funciona como um ativador transcricional ligante de DNA (DECKER et al., 2012). No sistema BvgAS, o BvgS representa o sensor de cinase, ele muda de conformação em resposta ao estímulo ambiental e transmite o sinal resultante por autofosforilação do sensor cinase. O BvgS fosforilado então ativa BvgA, transferindo seu fosfato. O BvgA fosforilado se liga a promotores para ativar a transcrição dos genes sobre seu controle e de uma proteína repressora, a BvgR, que regula negativamente a transcrição dos genes que tem de ser reprimidos (MOON et al., 2017).

Controlando a concentração intracelular de BvgA fosforilado, o sistema controla a transição entre três fases fenotípicas, Bvg<sup>-</sup> (avirulenta), Bvg<sup>i</sup> (intermediária) e Bvg<sup>+</sup> (virulenta) (HERROU et al., 2009). A fase Bvg<sup>+</sup> ocorre a 37°C e é necessária para o desenvolvimento da infecção, nela são expressas as toxinas e adesinas (DECKER et al., 2012). A fase Bvg<sup>i</sup>, em que algumas adesinas são produzidas, pode desempenhar papel na transmissão e estágios iniciais da doença (BOULANGER et al., 2013). Em algumas condições laboratoriais, sinais como baixa

temperatura, presença de sulfato de magnésio ou ácido nicotínico desencadeiam a modulação da fase avirulenta, Bvg<sup>-</sup>. Nessa fase a ausência de BvgA fosforilado, e conseqüentemente do repressor BvgR, levando a expressão de genes anteriormente reprimidos que são relacionados a sobrevivência em ambientes de privação nutricional (KINNEAR; MARQUES; CARBONETTI, 2001).

A **Toxina Pertussis** (PT) é o fator de virulência mais extensivamente caracterizado e essencial para manifestação clínica da coqueluche. A PT é exclusiva da *B. pertussis*, apesar de *B. parapertussis*<sub>hu</sub> e *B. bronchiseptica* terem genes para codificar a toxina, elas não a expressam (LINZ et al., 2016). PT se apresenta como uma holotoxina com conformação AB<sub>5</sub> - uma subunidade catalítica A (S1) e cinco subunidades de ligação B (S2-S4) - (CARBONETTI, 2010). A subunidade A é um domínio catalítico de ADP-ribosilação, e é responsável pela atividade enzimática da PT e as subunidades B estão envolvidas na ligação da toxina aos receptores nas células alvo, permitindo a translocação da unidade catalítica A através da membrana plasmática (CARBONETTI, 2010). No citoplasma a subunidade A catalisa a transferência de ADP-ribose para proteínas G, inativando-as (MELVIN et al., 2014).

As proteínas G são essenciais para transdução de sinais em diversos tipos celulares, muitas proteínas G tem efeito inibitório regulando enzimas e vias, incluindo as responsáveis pela formação de AMP cíclico (cAMP) (MELVIN et al., 2014). A ausência dessa regulação resulta em acúmulo de cAMP que atua em diversas cascatas de sinalização, desregulando a resposta imune (MANGMOOL; KUROSE, 2011). A toxina inibe a migração de várias células como neutrófilos, monócitos e linfócitos, e, em modelo murino, reduz citocinas pró-inflamatórias (ANDREASEN; CARBONETTI, 2008; SPANGRUDE et al., 1985). Diversos sintomas sistêmicos da infecção são atribuídos a produção de PT como leucocitose, secreção de insulina, hipoglicemia e sensibilidade a histamina (CARBONETTI, 2010).

A **Adenilato ciclase** (ACT) é uma toxina presente em *B.pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* (CARBONETTI, 2010). ACT apresenta dois módulos funcionais, o domínio C-terminal é responsável pela ligação a célula alvo e forma poros seletivos para cátions na membrana plasmática, e o domínio N-terminal é uma adenilato ciclase que converte ATP em cAMP (MELVIN et al., 2014). Os efeitos da ACT nas células alvos são aumento da permeabilidade íons e elevados níveis de cAMP, como resultado ACT inibe formação de superóxidos, quimiotaxia de células T, fagocitose e eliminação das bactérias (EBY et al., 2013).

Durante a remodelação da parede celular é produzido um monômero de peptidoglicano. Esse pequeno fragmento é produzido por diversas bactérias, mas é liberado em tão grande quantidade pela *B.pertussis* que chega a ser um fator de virulência conhecido como **Citotoxina Traqueal** (TCT) (COOKSON; TYLER; GOLDMAN, 1989). A TCT age sinergicamente com lipopolissacarídeos para estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias e a síntese de Óxido Nítrico, o que resulta na danificação das células ciliadas (FLAK et al., 2000). Seu efeito citotóxico nas células ciliadas é apontado por muitos autores como a causa para a tosse característica da coqueluche, TCT retardaria o movimento ciliar deixando a tosse como único mecanismo para eliminar o acúmulo de moléculas inflamatórias (FLAK et al., 2000). Entretanto essa associação ainda não foi comprovada por ausência de modelos animais apropriados para testar essa hipótese (MELVIN et al., 2014).

A **Toxina Dermonecrótica** (DNT) é uma toxina termolábil com conformação A-B e recebeu esse nome porque ao ser injetada de forma subcutânea em camundongos forma lesões necróticas (MATSUZAWA et al., 2004). DNT ativa GTPases da família Rho, que são essenciais para diversas funções celulares como mobilidade celular, transcrição e reorganização do cito-esqueleto, indicando que ela age diretamente na célula hospedeira (MASUDA et al., 2000). O papel da DNT na patogênese da *B.pertussis* ainda não é bem estabelecido e sabe-se

que linhagens mutantes que não expressam DNT são tão virulentas quanto a linhagem selvagem (DORJI et al., 2018).

Um das estruturas de superfície essenciais é a adesina **Hemaglutinina Filamentosa** (FHA). Essa proteína de 220 KDa associada a superfície celular e também secretada é necessária e suficiente para garantir a adesão bacteriana em diversos tipos celulares (ISHIBASHI; NISHIKAWA, 2002). FHA funciona como intermediária na adesão da *B.pertussis* ao trato respiratório superior e é essencial para progressão da infecção do trato superior para o trato inferior. Ela também desempenha papel importante na evasão da resposta imunológica. FHA se liga a receptores CR3 em macrófagos, esse receptor é conhecido por estar envolvido na fagocitose mediada pelo sistema complemento mediado por opsonização (DE GOUW et al., 2011).

A interação de FHA em conjunto com a ACT, que também atua em receptores CR3 garante a fagocitose da bactéria sem que essa morra por espécies reativas de oxigênio, promovendo a sobrevivência intracelular da *B. pertussis* (DE GOUW et al., 2011) . Estudos *in vivo* demonstraram que ela também permite modular a inflamação ao interagir com receptores dos macrófagos, por meio de supressão da citocina pró-inflamatória IL-12 e induz IL-10 (KILGORE et al., 2016). Estudos também associaram FHA a formação de biofilme em superfícies abióticas e nariz e traqueia de camundongos, mais uma importante contribuição desse fator para colonização pela *B.pertussis* (SERRA et al., 2011).

*B.pertussis* também produz filamentos proteicos associados à superfície celular que são denominados **Fímbrias** (FIM). Ela contém dois tipos sorologicamente distintos de fimbria (sorotipo 2 e 3) compostos pela subunidades Fim2 e Fim3, essas subunidades também são conhecidas como **aglutinógenos** (AGGs) 2 e 3 (CHEN et al., 2010). As fimbrias tem função semelhante à FHA, e estão envolvidas na adesão e supressão da resposta inflamatória inicial.

Foi observado que tanto FHA quanto as fimbrias são necessárias para adesão em células de linhagem epitelial de laringe, HEP-2, enquanto somente FHA é requerida para adesão a células brônquicas de linhagem, NCI-H292 (VAN DEN BERG et al., 1999). Isso pode indicar que a fimbria é importante para colonização da mucosa da laringe ,enquanto FHA é essencial para colonizar o epitélio inteiro (VAN DEN BERG et al., 1999).

A **Pertactina** (PRN) é uma proteína autotransportadora de 69 kDa presente em *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* e *B. parapertussis*<sub>hu</sub>. Ela contém motivos Arginina- Glicina – Aspartato necessários para ligação de espécies de *Bordetella* a receptores de células eucarióticas (INATSUKA et al., 2010). O papel exato da PRN na patogênese de *Bordetella* ainda é desconhecido, entretanto estudos utilizando *B. bronchiseptica* indicam associação da PRN a resistência a eliminação de bactérias por neutrófilos e persistência no trato respiratório inferior (INATSUKA et al., 2010) .

Muitas bactérias contam com uma estrutura de origem protéica semelhante a uma agulha na parede celular, essas estruturas são conhecidas como sistema de secreção e são utilizados por elas para translocar fatores de virulência para células hospedeiras, auxiliando na infecção. A *B.pertussis* possui um desses sistemas, o **Sistema de Secreção do Tipo III** (T3SS), sua estrutura é composta de um corpo basal que ancora o sistema através das membranas interna e externa e uma cilindro semelhante a uma agulha na porção extracelular (NOTTI; STEBBINS, 2016). Mutações que eliminam o T3SS resultam em diminuição da persistência bacteriana no trato respiratório inferior e também no aumento de anticorpos na resposta imune (MELVIN et al., 2014). Apesar da clara importância do T3SS na colonização por *B.pertussis* a maioria dos efetores secretados por ela não são conhecidos ou permanecem não caracterizados. Os efetores mais conhecidos são BteA e BopN, ao primeiro é atribuído efeito citotóxico *in vitro* e sua eliminação causa efeitos semelhantes a eliminação total do T3SS, e o BopN que atua nas células

dendríticas (DCs), mediando a supressão de IL-12 e a indução de IL-10 (DE GOUW et al., 2011; PANINA et al., 2005).

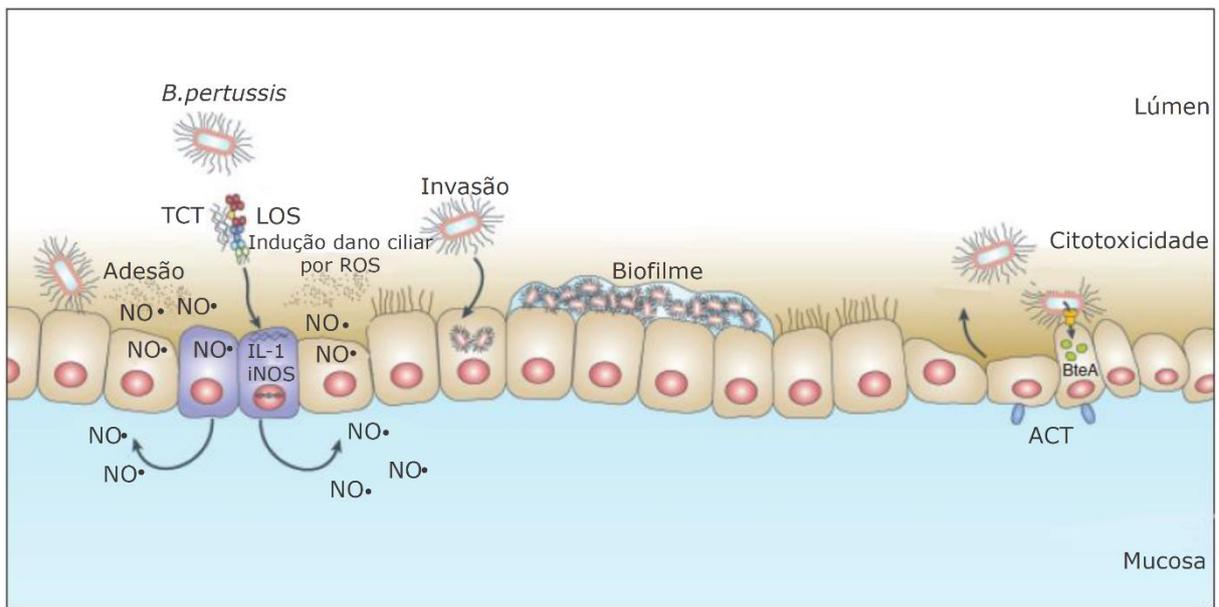
O **Lipopolissacarídeo (LPS)** é um componente essencial da membrana externa das bactéria gram-negativas, além de contribuir para estrutura da membrana ele funciona como uma endotoxina, tem pode estimulador da resposta imune inata e serve como um sinal de aviso inicial da infecção bacteriana (SPERANDEO; MARTORANA; POLISSI, 2017). O LPS é composto de três partículas: Lipídeo A, a porção hidrofóbica que ancora o LPS na membrana externa; um oligossacarídeo base; e o Antígeno-O formado por unidades repetidas de oligossacarídeos (SPERANDEO; MARTORANA; POLISSI, 2017). *B. pertussis*, *B. parapertussis*<sub>Hu</sub> e *B. bronchiseptica* produzem formas diferentes de LPS.

*B. pertussis* produz um lipídeo A penta-acetilado e sua base oligossacarídica é composta de um complexo trissacarídeo, *B. bronchiseptica* produz um lipídeo A hexa-acetilado ligada ao mesmo trissacarídeo e as repetições de Antígeno-O, e *B. parapertussis*<sub>Hu</sub> produz um lipídeo A hexa-acetilado que é ligado a uma estrutura de oligossacarídeo base alterada e as repetições de Antígeno-O (HARVILL et al., 2000) Por não apresentar as repetições de Antígeno-O, LPS de *B. pertussis* é também conhecido como lipo-oligossacarídeo (LOS) (MELVIN et al., 2014). A presença de Antígeno-O impede a ligação de antígenos anti *B.pertussis* a *B. parapertussis*<sub>Hu</sub> é um dos motivos para a vacinas contra coqueluche, não protegerem também contra *B. parapertussis*<sub>Hu</sub> (HARVILL et al., 2000).

A formação de **biofilme** por *B.pertussis* é apontada por diversos autores como um elemento de patogenicidade que contribui para a persistência de *B.pertussis* no trato respiratório. Biofilme de *B. pertussis* são caracterizados pela formação agregados celulares, seguido pela formação de uma estrutura tridimensional encapsulada em uma matriz composta de DNA e polissacarídeos (CONOVER; MISHRA; DEORA, 2011). A formação de biofilme

por *B. Pertussis* é bem caracterizada em superfície abiótica e também foi detectada no nariz e traqueia de camundongos infectados (CONOVER et al., 2010; SERRA et al., 2011). FHA e as fimbrias são essenciais para formação de biofilme, assim como o polissacarídeo Bps e a proteína de superfície bipA, esta última apesar de não ter papel totalmente conhecido na patogênese está presente em altas concentrações no biofilme e seu uso para imunizar camundongos se mostrou eficiente para reduzir a colonização de *B.pertussis* em camundongos (DE GOUW et al., 2014; DORJI et al., 2018) . A correlação entre formação de biofilme e patogênese de *B. pertussis* é suportada por ensaios com linhagens mutantes incapazes de formar biofilme, essa linhagens falham em resistir a eliminação mediada por sistema complemento, tem colonização deficiente no trato respiratório de camundongo, além de deficiência na formação de biofilme no trato respiratório (CONOVER et al., 2010; GANGULY et al., 2014; SERRA et al., 2011).

A coordenação dos fatores de virulência durante a infecção com *B.pertussis* ainda não é completamente elucidada. Acredita-se que após o hospedeiro ser exposto a *B.pertussis* por meio de perdigotos liberados por uma pessoa infectada, a infecção se inicia com a adesão da bactéria ao epitélio da traquéia e pulmões pela ação da FHA e fimbria (DE GOUW et al., 2011). Após a adesão, *B.pertussis* se multiplicaria localmente, resistindo a remoção pela limpeza mucociliar e células inflamatórias, e então causaria dano local no trato respiratório inferior e superior com manifestações sistêmicas (KILGORE et al., 2016). A interação da *B.pertussis* com epitélio mediada pelos fatores de virulência está representada na **Figura 1**.



**Figura 1.** Interação da *Bordetella pertussis* com epitélio da mucosa. Primeiro passo na colonização é adesão mediada pela Hemaglutinina Filamentosa e Fimbria. A Citotoxina Traqueal (TCT) e lipooligossacarídeo (LOS) desencadeiam danos ao epitélio induzindo liberação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), principalmente induzindo produção de Óxido Nítrico (NO) pelas células produtoras de muco (em roxo). A *Bordetella pertussis* pode também invadir as células e formar biofilme. A Adenilato Ciclase (ACT) e o Sistema de Secreção do Tipo III, por meio do seu efetor BteA, afetam vias de sinalização levando a citotoxicidade. Figura adaptada de DE GOUW et al., 2011.

### 1.3. Manifestações clínicas

A manifestação clássica da coqueluche é caracterizada por três fases: fase catarral, fase paroxística e fase de convalescença. Na fase catarral, o paciente apresenta mal-estar, febre baixa ou temperatura normal, coriza e tosse, sintomas semelhante a resfriados comuns (NIEVES et al., 2011). Após 1-2 semanas progride para segundo estágio da doença, a fase paroxística, que é marcada pelos acessos de tosse intensa e espasmódicas seguido por um som agudo característico da coqueluche, essa fase pode durar de 1-10 semanas (POSTELS-MULTANI et al., 1995). Os sintomas vão então diminuindo gradualmente e persistem por semanas a meses, essa fase é denominada fase de convalescença (GUIISO, 2014).

A severidade dos sintomas depende da idade e resposta imune do paciente. Em crianças menores de 1 ano os sintomas podem ser mais intensos, a bactéria pode se disseminar pelo

pulmão levando a pneumonia, bronquiolite e hemorragia alveolar (MELVIN et al., 2014). Em casos mais severos, ocorre linfocitose extrema, que correlaciona com hipertensão pulmonar, falha respiratória e morte (DIAVATOPOULOS et al., 2005). Os sintomas em adolescentes e adultos variam bastante do histórico vacinal e se o paciente já teve um episódio clínico de coqueluche. A manifestação pode ser clássica ou assintomática, sendo que re-infecções assintomáticas são muito comuns em adultos (DE SERRES et al., 2000).

#### **1.4. Epidemiologia e estratégias vacinais**

*B.pertussis* é um organismo extremamente infeccioso com uma estimativa de 12 a 17 casos secundários produzidos por um caso primário em uma população totalmente suscetível (NIEVES; HEININGER, 2016). Antes da vacina se tornar amplamente disponível em 1950, estima-se que a maioria das pessoas tenha tido contato com *B.pertussis*, sendo que dessas 50% teriam desenvolvido a doença (“Pertussis vaccines”, 2016). Com a introdução da vacina, houve um declínio significativo no número de casos mundialmente com redução de até 90% em países desenvolvidos como Estados Unidos e Canadá (DOMENECH DE CELLÈS et al., 2016).

Atualmente a cobertura vacinal global para coqueluche é de 86% segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (“WHO”, 2019). Aproximadamente 64% dos países ao redor do mundo utilizam vacina contra coqueluche feita a partir da célula de *B.pertussis* inteira inativada, conhecida como vacina celular (wP, do inglês “whole-cell”) (“Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on immunization, October 2017 – conclusions and recommendations”, 2017). Entretanto em alguns países desenvolvidos, a vacina celular foi substituída na década de 90 pela vacina acelular (aP) devido a preocupações quanto a reações adversas da wP, como sensibilidade à dor no local da injeção, febre e irritabilidade após a vacinação (PINTO; MERKEL, 2017). As vacinas acelulares contêm toxinas e antígenos de superfície inativados, elas podem ser produzidas a partir da toxina PT inativada sozinha ou com

FHA, PRN e fimbrias (ZHANG et al., 2011) . Apesar de serem menos reatogênicas, as aP tem duração de proteção mais curta que a vacina wP (GAMBHIR et al., 2015).

Embora a vacinação em massa tenha reduzido drasticamente a ocorrência da coqueluche, diversos países reportaram a ressurgência da doença. A coqueluche continua endêmica e apresenta ciclos epidêmicos a cada 2-5 anos (VAN GENT et al., 2015). Doença geralmente associada a crianças não imunizadas com menos de 6 meses de idade, nos últimos ano houve um aumento da incidência em crianças, jovens e adultos vacinados, que podem estar funcionando como reservatórios para transmissão de *B.pertussis* (ARNAL et al., 2015). Estimar o número de casos globais de coqueluche é um desafio considerando a ausência de dados de vigilância em diversos países. Os últimos dados oficiais reportados pela OMS estimam 143.963 casos reportados de coqueluche em 2017 (“WHO”, 2019). A epidemiologia de coqueluche nos países de alta renda é bem caracterizada e divulgada, contudo acredita-se que a maioria dos casos ainda ocorra em países de baixa e média renda. A última estimativa de óbitos relacionados à coqueluche é de 2008 com o registro de 89.000 mortes, nas quais 90% ocorreram em países de baixa e média renda (MAURICE; DAVEY, 2009).

Houve um aumento de casos reportados de coqueluche em países desenvolvidos na última década, com epidemias recentes na Europa, Austrália e Estados Unidos (KMIETOWICZ, 2012; PILLSBURY; QUINN; MCINTYRE, 2014; WOLF; ROWHANI-RAHBAR; OPEL, 2015). Nos Estados Unidos, a coqueluche se tornou endêmica e é considerada a doença imunoprevenível de maior prevalência, mesmo tendo uma cobertura vacinal entre 94% e 95% (GAMBHIR et al., 2015). No surto de 2012, foram reportados 48.000 casos de coqueluche, o maior número desde a introdução da vacina no país na década de 50 (CASSIDAY et al., 2016). As razões sugeridas para a ressurgência da coqueluche são: i) aumento da consciência sobre a doença principalmente em adultos, resultando em aumento da

realização de teste para coqueluche e fazendo com que autoridades de saúde pública reportem mais casos; ii) otimização dos métodos de diagnóstico; iii) evolução das linhagens circulantes diante da pressão vacinal, iv) menor duração de proteção para a vacina aP utilizada em países de alta renda (PINTO; MERKEL, 2017).

### **1.5. Epidemiologia Molecular de *B. pertussis***

Ferramentas de tipificação molecular têm sido utilizadas como uma estratégia importante para identificar e rastrear as alterações genéticas e a variação de antígeno exibida por cepas circulantes de *B. pertussis* (HEGERLE; GUIISO, 2013). Os isolados clínicos podem ser tipificados com base em observações fenotípicas e caracterização genotípica (HEGERLE; GUIISO, 2013).

Um exemplo de tipificação fenotípica é a **sorotipagem** que se baseia na detecção dos antígenos de superfície por anticorpos específicos (SEALEY; BELCHER; PRESTON, 2016). Os antígeno alvo na sorotipificação de *B. pertussis* são as fímbrias. Há duas estruturas de fimbria sorologicamente distintas sorotipos, fim2 e fim3, com base nesses dois sorotipos a cepa pode ser classificada em: Fim2 ,para cepas que expressam apenas fímbrias do tipo 2; Fim3, para as que expressam apenas fímbrias do tipo 3; Fim2,3, para células que expressam os dois tipos (CHEN et al., 2010).

Fim2 e Fim3 são importantes antígenos de *B. pertussis* com um papel na resposta imune fornecida por ambas vacinas contra coqueluche (GORRINGE; VAUGHAN, 2014). Os anticorpos anti-fímbrias demonstraram ser importantes para a proteção tanto por vacinas de wP quanto aP , por isso monitorar a expressão fimbrial em isolados clínicos é importante para analisar o efeito da pressão vacinal sob os isolados (VAN GENT et al., 2015). No entanto, a expressão de fímbrias está sujeita à variação e há variação insuficiente para permitir a subtipagem, limitando o poder de resolução desse método (HEGERLE; GUIISO, 2013).

A técnica de genotipagem mais utilizada para tipificação de *B.pertussis* é **Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)**, do inglês pulsed field gel electrophoresis) que classifica bactéria por sítios de restrição dentro do genoma da bactéria. O processo envolve embeber o organismo em agarose, lisando o organismo, e digerindo o DNA genômico com endonuclease que reconhece sequência específicas no genoma. A separação dos fragmentos é feita num gel de agarose com mudança repetida da orientação do campo elétrico, permitindo a migração de fragmentos grandes. O padrão gerado no gel permite agrupar os isolados por similaridade, gerando perfis genéticos que são chamados pulsotipos (RIBOT et al., 2006).

A técnica de PFGE é considerada padrão ouro para tipificação de *B.pertussis*, por ser altamente discriminatória e é usada amplamente para acompanhar isolados circulantes (ADVANI; DONNELLY; HALLANDER, 2004). Apesar de ser padrão ouro de tipificação, PFGE apresenta desvantagens por ser uma técnica de difícil comparação direta e precisa de perfis de diferentes laboratórios devido à variação na técnica e na terminologia (ADVANI; DONNELLY; HALLANDER, 2004).

Há no genoma bacteriano muitas sequências repetitivas. Quando essas repetições são adjacentes umas às outras e seu número de repetições em um mesmo *locus* variam, tais *locus* são conhecidos como VNTRs (do inglês, “*Variable Number Tandem Repeats*”) (CHANG et al., 2007). Como os números de repetições adjacentes variam de indivíduo para indivíduo, os VNTRs são usados como marcadores moleculares para tipificação de várias espécies bacterianas em uma técnica conhecida como MLVA (do inglês, “*Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis*”) (SCHOULS et al., 2004).

A base do MLVA é uma amplificação por PCR das regiões VNTR. O produto da amplificação é analisado em um sequenciador automático de DNA e o tamanho do produto é utilizado para calcular o número de repetições presente no *locus* VNTR (CHANG et al., 2007).

MLVA é uma técnica vantajosa para tipificação de *B.pertussis*, pois é uma metodologia simples, com boa resolução e permite a comparação de isolados inter-laboratoriais (SCHOULS et al., 2004).

O MLVA geralmente é utilizado em conjunto com a técnica **MLST** (do inglês, “*Multilocus sequence typing*”). O MLST se baseia no sequenciamento de alguns genes selecionados, em seguida as sequências são adicionadas a um banco de dados onde são comparadas a alelos conhecidos para cada gene (VAN LOO et al., 2002). Geralmente, os genes selecionados são os genes essenciais ao metabolismo, conhecidos como *housekeeping*. No entanto análise dos genes *housekeeping* de *B.pertussis* mostraram pouco polimorfismo, levando a busca de novos alvos para análise de MLST (VAN LOO et al., 2002).

*B.pertussis* é uma espécie homogênea, o que dificulta a seleção de *locus* que apresentem polimorfismo para a tipificação por MLST. Como bactérias patogênicas interagem com seu hospedeiro através da produção de fatores de virulência, a resposta imune natural ou induzida pela vacina que atinge diretamente essas proteínas pode selecionar mutações genéticas na população bacteriana. Assim, análises por genotipagem dos genes que codificam essas proteínas extracelulares fornecem uma compreensão sobre a evolução da população bacteriana sob pressão da vacina (HEGERLE; GUIZO, 2013). Os genes de *B.pertussis* que codificam proteínas de superfícies e as toxinas são geralmente utilizados para o MLST por apresentarem mais polimorfismo que genes *housekeeping* e por permitirem acessar efeito da pressão vacinal sob o genoma. Os genes mais utilizados são: 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). Análises temporais dos genes *ptxS1*, *prn* e *fim3* em isolados holandeses demonstraram que os alelos presente na cepa vacinal foram gradualmente

substituídos por alelos distintos após a introdução de vacina (MOOI; VAN DER MAAS; DE MELKER, 2014).

Embora a PFGE seja um bom indicador da diversidade de cepas circulantes de coqueluche, essa técnica não é capaz de distinguir os pontos exatos das alterações genômicas (BOWDEN et al., 2016). Análises como o MLST e MLVA, também têm a limitação de apenas poderem acessar poucos pontos de variabilidade, considerando que os genes analisados só realizam cerca de 0,1% do genoma da bactéria (TANG et al., 2017). Devido à variabilidade genética limitada de *B. pertussis*, o sequenciamento do genoma completo (WGS, do inglês “*whole-genome sequencing*”) seria a técnica ideal para identificar a variação entre isolados clínicos (WEIGAND et al., 2017).

Apesar da excelente capacidade do WGS para a análise de *B. pertussis*, ela não é uma técnica amplamente utilizada como ferramenta primária de tipificação e vigilância. O genoma de *B. pertussis* é repleto de seqüências repetidas e contém centenas de seqüências de inserção (ISs), o que torna o processo de montagem do genoma desafiador (BOWDEN et al., 2016). Além disso, o custo da técnica e a estrutura necessária ainda não são tão acessíveis, mesmo com a redução de custos. Em geral, o WGS para a epidemiologia de *B. pertussis* tem sido utilizado para comparar genomas entre isolados para acessar a variação de cepas ressurgentes e para avaliar o impacto de diferentes estratégias de vacinação na evolução de *B. pertussis* (XU et al., 2015).

#### **1.6. Alterações estruturais encontradas em isolados circulantes.**

Uma das hipóteses para persistência da *B.pertussis* mesmo com alta cobertura vacinal é a adaptação da bactéria. A adaptação poderia afetar a estrutura ou regulação de produtos da *B.pertussis* e seu reconhecimento pelo sistema imune (MOOI; MAAS; MELKER, 2014).

Apesar de serem organismos extremamente monomórficos, mudanças nas linhagens ressurgentes em comparação as linhagens vacinais foram encontradas. Essas diferenças são na sequência de aminoácidos e na regulação dos genes de virulência, incluindo os que fazem parte da vacina aP (DORJI et al., 2018). Linhagens circulantes expressam em níveis mais altos diversos fatores de virulência como PT, T3SS, e uma proteína envolvida na resistência ao sistema complemento (BrkA) (KING et al., 2013a). Há 17 alelos possíveis para o gene PT, o alelo *ptxP3* foi observada em diversos isolados clínicos e linhagens que possuem esse alelo produzem mais PT que as outras (KING et al., 2013a). Foi observado que linhagens que possuíam *ptxP3* colonizavam melhor o trato respiratório de camundongos tanto vacinados quanto não imunizados (SAFARCHI et al., 2016). Isolados clínicos com ausência da proteína de superfície PRN ou foram encontrados na Austrália, Japão, Europa e Estados Unidos, como essa proteína é bastante imunogênica e faz parte da formulações da vacina aP, sua deleção poderia representar uma vantagem a essas linhagens (SAFARCHI et al., 2015).

Análise extensiva de isolados de *B. pertussis* coletados na Holanda no período de 1949 a 2009 demonstraram que há mudanças em genes com caráter antigênico ,como PT, PRN e Fimbrias ao longo do tempo (MOOI; MAAS; MELKER, 2014). Divergência antigênica entre isolados e linhagens vacinais poderia afetar a proteção conferida pela vacina. Proteômica comparativa entre isolados clínicos e linhagens vacinais foi empregada por alguns autores. Williamson *et al.* encontrou diferenças na expressão de antígenos da vacina aP entre isolados clínicos da Califórnia e a linhagem referência Tahoma I (WILLIAMSON et al., 2015). Arnal *et al* e Dorji *et al* usaram proteômica para comparar a expressão durante o biofilme de isolados clínicos versus Tahoma I ,os isolados clínicos produziram mais biofilme e as expressaram mais proteínas de metabolismo energético que Tahoma I, sem alterações na expressão de proteínas de superfície (ARNAL et al., 2015; DORJI et al., 2016). Esses estudos compararam os isolados a linhagem referência Tahoma I, o que não seria ideal já que foi demonstrado que essa linhagem

adaptada a laboratório não é uma representação de isolados circulantes agora ou no passado (LUU et al., 2018). LUU *et al* usou análise proteômica para comparar uma linhagem predominante isoladas na Austrália (contendo alelo *ptxP3*) a uma linhagem menos prevalente, o estudo não identificou diferença na expressão dos antígenos alvo da vacina aP, mas verificou redução na expressão de uma lipoproteína que é importante ativadora de células dendríticas e da bipA que tem capacidade imunogênica (LUU et al., 2018). Bottero *et al* comparou um isolado clínico argentino a linhagens utilizadas em vacinas celulares na América Latina, incluindo a linhagem bp137 utilizada no programa de imunização brasileiro, por proteômica, seqüenciamento e PFGE. Os resultados do trabalho indicaram que o isolado clínico argentino compartilhava mais proteínas em comum com a linhagem usada na vacina brasileira que a atualmente usada na vacina argentina, contrastando a diferença que se pode alcançar uma linhagem circulante a linhagem utilizada na imunização (BOTTERO et al., 2012).

### **1.7. Epidemiologia de coqueluche no Brasil e Distrito Federal.**

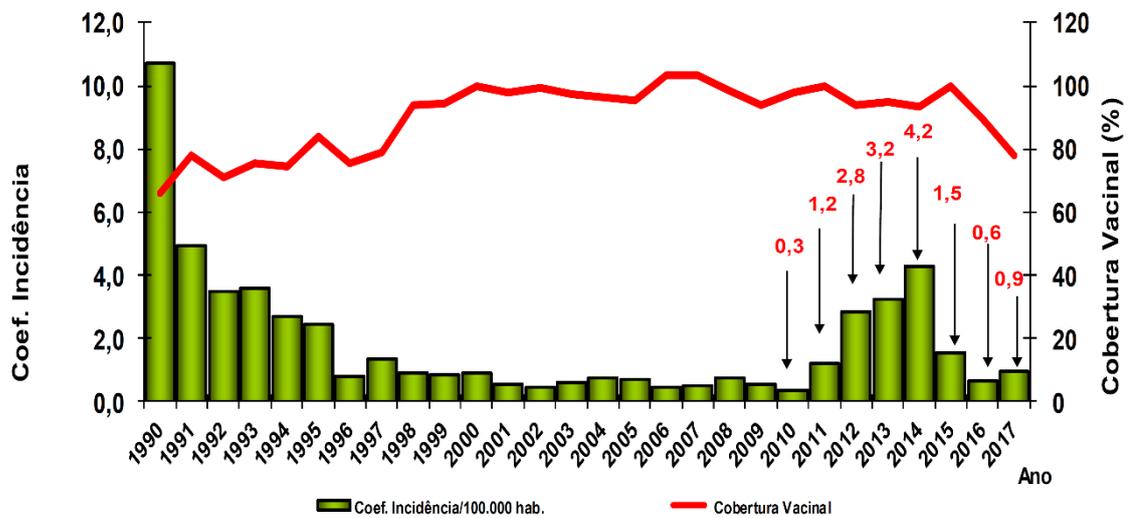
No Brasil, a coqueluche é uma doença de notificação compulsória, com o registro todas as notificações de casos tratados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). No começo da década de 80, em média 40,000 casos de coqueluche eram registrados por ano no país. Com aumento da cobertura vacinal em 1983, a incidência decaiu consideravelmente, chegando a reportar apenas 0,3 caso/100 mil habitantes em 2010 (VAZ-DE-LIMA et al., 2014).

A vacina contra coqueluche é disponibilizada em todo território nacional pelo SUS. A vacina utilizada no Brasil é celular fazendo parte da vacina Pentavalente (DTPw-HB/Hib ) que também imuniza para Difteria, Tétano, *Haemophilus influenzae* e Hepatite B, e da Tríplice

bacteriana (Difteria, Tétano e *Pertussis* – DTP). O programa atual de vacinação contempla três doses de DTPw-HB/Hib administradas aos 2, 4 e 6 meses de vida, seguida de reforços com a DTP aos 15 meses de vida e aos 4 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). É disponibilizada também pelo SUS a vacina acelular DTpa (Difteria, Tétano e *Pertussis* acelular), administrada em crianças que apresentaram reação adversa à vacina de células inteiras. A DTpa está também disponível para gestantes e profissionais de saúde em unidades neonatais desde 2014 como uma estratégia para reduzir o número de casos em recém nascidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018)

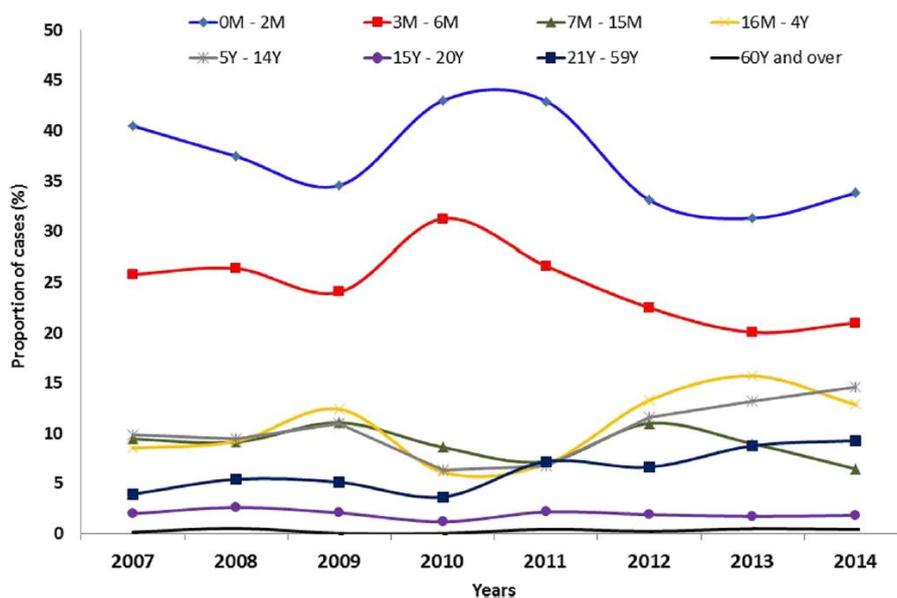
Apesar da alta cobertura vacinal com valores próximos a 95% e 100% desde 1998, o país teve uma reemergência de coqueluche a partir de 2011, o número de casos triplicou de 2010 a 2011. Ao todo, foram registrados 72.901 casos suspeitos de coqueluche e 374 óbitos devido à doença entre 2010 e 2014, sendo 2014 o ano com maior número de casos (8.614) com incidência de 4,2/100.000 hab (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Fatores como o comportamento cíclico da coqueluche, baixa homogeneidade das coberturas vacinais em certos estados e variação de linhagens entre as regiões podem ter influenciado a ocorrência do surto de 2011-2014 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Houve um decréscimo de 78,5% na incidência de coqueluche de 2014 até 2017. Esse decréscimo pode ser um resultado da inclusão da Vacina DTpa para gestantes e profissionais de saúde a partir de 2014 e pelo próprio ciclo da coqueluche (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). A cobertura vacinal no país e incidência registrados de 1990 a 2017 é representada na Figura 2.



**Figura 2.** Coeficiente de incidência de coqueluche e cobertura vacinal com DTP e DTPw-HB/Hib. Entre 2013 a 2017 cobertura DTPw-HB/Hib. FONTE: Ministério da Saúde, 2018.

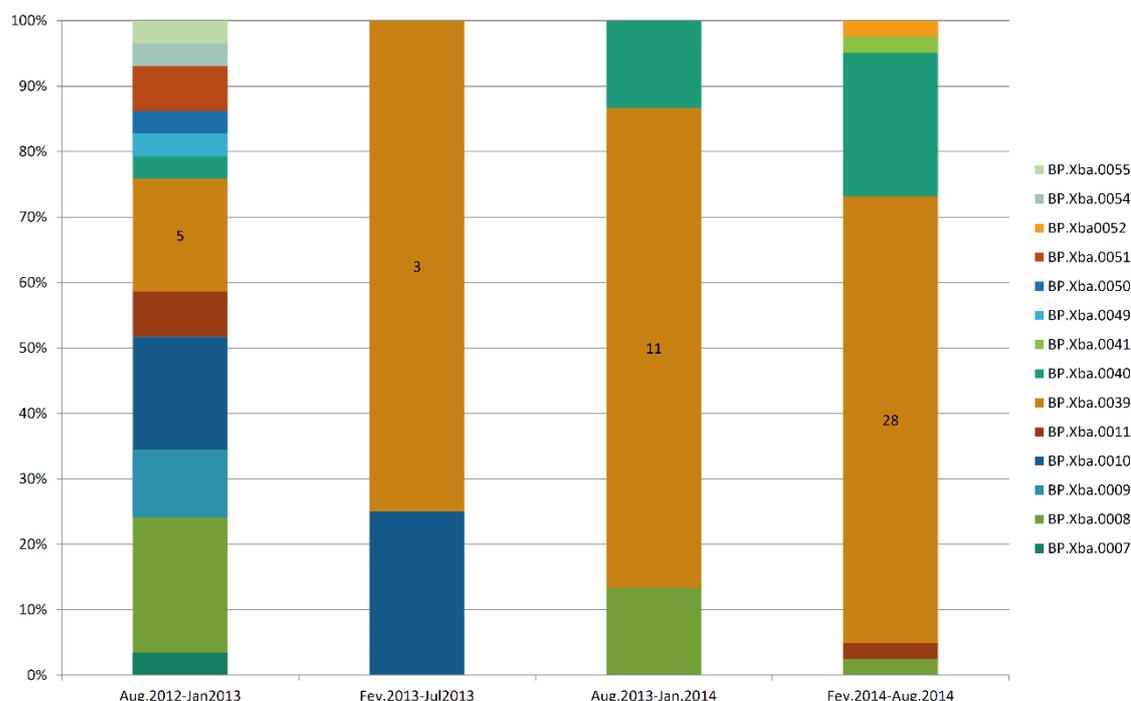
A maioria dos casos reportados de coqueluche entre 2007 e 2014 ocorreram entre indivíduos com idade maior que 6 meses de idade, com 13% dos casos registrados em crianças completamente imunizadas com idades entre 7 meses e 4 anos o que poderia indicar um leve escape da vacina (Figura 3) (GUIMARÃES; CARNEIRO; CARVALHO-COSTA, 2015).



**Figura 3.** Distribuição de casos confirmados de coqueluche por grupo etário de 2007 a 2014. Retirado de GUIMARÃES; CARNEIRO; CARVALHO-COSTA, 2015.

No Distrito Federal e entorno também foi registrado aumento dos números de casos de 2011 a 2014, registrando ao todo 604 segundo dados do SINAN . Rocha et al (2017) analisou 92 isolados clínicos de *B.pertussis* isolados no DF durante a epidemia, por meio das técnicas de sorotipagem e por PFGE, junto com análise dos dados epidemiológicos . A caracterização epidemiológica das linhagens isoladas no Distrito Federal identificou 14 pulsotipos e demonstrou que, durante o período de agosto de 2012 a agosto de 2014, houve seleção de um perfil genético específico (ROCHA et al., 2017). O pulsotipo denominado *Bp.XbaI.0039* teve aumento entre 2012 e 2014: de 17.6% dos isolados associados a esse pulsotipo em 2012 a 70% dos isolados em 2014, ao todo 51% de todos os isolados pertenciam a esse pulsotipo (Figura 4) (Rocha et al 2017).

A prevalência do perfil genético *Bp.XbaI.0039*, pode indicar a seleção desse perfil pela vacina atualmente usada no país. Mais caracterização dessa linhagem é necessária para entender a evolução dos isolados circulantes



**Figura 4.** Distribuição dos pulsotipos identificados no Distrito Federal durante 2012 a 2014. O número de isolados identificados como *Bp.XbaI.0039* está em destaque.(Rocha et al., 2017)

## **2.Justificativa**

Apesar alta cobertura vacinal, ainda são registrados milhões de casos coqueluche por ano. A população mais atingida pela coqueluche são crianças em processo de imunização, mas nos últimos anos vem aumentado o número de casos em adolescentes e adultos vacinados, mostrando a capacidade de circulação da *B. pertussis* na população imunizada. Um dos fatores que pode estar contribuindo para persistência da bactéria na população imunizada é a adaptação de isolados circulantes a vacina. Diante desse quadro é importante conhecer 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.

### **3.Objetivos**

A pesquisa tem como objetivo geral a caracterização de isolados clínicos de *Bordetella pertussis* isolados no Distrito Federal entre 2011 e 2014.

Os objetivos específicos são:

1. Epidemiologia molecular dos isolados selecionados utilizando as técnicas de MLVA e MLST;
2. Caracterizar a produção de biofilme dos isolados;
3. Investigar a influência dos isolados sobre viabilidade celular de células epiteliais;
4. Analisar perfil de expressão proteica da linhagem *Bp.XbaI.0039* e comparar a linhagem vacinal usada no programa de vacinação nacional.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Isolados de *Bordetella pertussis***

As cepas utilizadas no estudo foram isoladas de pacientes apresentando sintomas de infecção por *B. pertussis*. O isolamento a partir de amostras de swab de nasofaringe coletadas pelas Unidades de Saúde do Distrito Federal foi realizado pelo Laboratório Central de Saúde Pública do DF (LACEN-DF). Ao todo, 92 cepas foram isoladas no Distrito Federal e Entorno no período de agosto de 2012 a agosto de 2014.

Nesse estudo, foram selecionados dez isolados tendo como base o perfil vacinal dos pacientes e o dado de PFGE previamente disponível. Os dados vacinais - número de doses da vacina DTP - foram obtidos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN - NET), repositório do Ministério da Saúde para notificação e investigação de doenças de notificação compulsória.

### **4.2. Cultivo dos isolados**

Isolados foram cultivados em Agar Bordet - Gengou (BG) suplementado com sangue ovino a 15% e incubados em condições úmidas a 35 ° C durante três dias. Para o ensaio de biofilme as bactérias foram cultivadas em BG e o crescimento foi transferido para meio de cultura líquido Stainer-Scholte (SS) contendo por litro : l-ácido glutâmico 240 mg; l-prolina 0,24 g ; NaCl 2,5 g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g; KCl 0,2 g; MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0,1 g; Tris 1.5 g ; l-cisteína 40 mg; niacina 4 mg; ácido ascórbico 20 mg; glutatina 0,10 g e FeSO<sub>4</sub> 10 mg (CATTELAN et al., 2017).

Para extração de proteínas, os extratos celulares do isolado BP71 e da linhagem vacinal bp 137 foram gentilmente preparados pela Seção de Vacinas Aeróbicas do Instituto Butantan.

### 4.3. Extração de DNA genômico

As cepas foram crescidas em meio Agar Bordet Gengou em atmosfera úmida a 35 ° C durante três dias para extração de DNA. O crescimento resultante foi ressuspensionado em Tampão TE (tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e extração de DNA foi feita com kit de extração Wizard Genomic DNA purification kit (Promega) conforme protocolo descrito pelo fabricante para bactérias gran-negativas.

### 4.4. MLVA

A tipagem MLVA foi realizada como descrita por SCHOULS et al., 2004. Cada um dos cinco loci VNTR (VNTR1, VNTR3, VNTR4, VNTR5 e VNTR6) foram amplificados em PCRs separadas. Cada VNTR foi amplificada usando um primer *forward* com extremidade 5' marcada com fluorescência e um primer reverso não marcado. As PCR foram feitas num volume final de 20 µl, 1 µl de DNA genômico 20 ng/µl, primers a 10 pmol, 10 µl de HotStar *Taq* master mix (QIAGEN) e 2 µl de Solução Q (betaína). O programa de PCR consiste de 15 min a 95°C, seguido por 25 ciclos de amplificação de 30 s a 94°C, 90 s a 57°C e 60 s a 72°C, com um passo final de extensão de 30 min a 60°C. Os primers utilizados estão indicados na Tabela 2. Os produtos de PCR foram separados com o seqüenciador automático de DNA ABI3130 (Applied biosystems – Thermofisher). A determinação do tamanho dos amplicons em pares de base foi determinada pelo software DNA analyser 3730. Os tipos de MLVA (MT) foram designados de acordo com os protocolos e ferramentas do National Institute of Health and Environment (NIEHS) para a tipagem MLVA de *B. pertussis* disponível em (<https://www.mlva.net/bpertussis/default.asp>). O MLVA da cepa vacinal foi feito com base no genoma da cepa bp137 disponível no NCBI sob o número de acesso NZ\_CP010323.1.

**Tabela 2.** Sequências de primers MLVA - *B.pertussis*. Os primers marcados na extremidade 5' com corante fluorescente estão indicados com a adição da letra F no nome.

| Nome primer        | Sequência primer               |
|--------------------|--------------------------------|
| <b>BP-VNTR1-Ff</b> | CCTGGCGGCGGGAGACGTGGTGGTG      |
| <b>BP-VNTR1-r</b>  | AAAATTGCGGCATGTGGGCTGACTCTGA   |
| <b>BP-VNTR3-Ff</b> | GCCTCGGCGAAATTGCTGAAC          |
| <b>BP-VNTR3-r</b>  | GCGGGCGAGGAAACGCCCGAGACC       |
| <b>BP-VNTR4-Ff</b> | CGTGCCCTGCGCCTGGACCTG          |
| <b>BP-VNTR4-r</b>  | GCCGCTGCTCGACGCCAGGGACAA       |
| <b>BP-VNTR5-Ff</b> | GAAGCCGGCCACCCGAGCTCCAGGCTCTT  |
| <b>BP-VNTR5-r</b>  | TGCCGGGTTTCGGCATCTCGATGGGATACG |
| <b>BP-VNTR6-Ff</b> | CCAACGGCGGTCTGCTGGGTGGTC       |
| <b>BP-VNTR6-r</b>  | AGGGCGCTGGTCACGCCACCGAGGAT     |

#### 4.5.MLST

O protocolo de MLST utilizado foi o descrito por BOWDEN et al., 2014 que 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*). 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, 10 µl de HotStar *Taq* mastermix, 2µl de Solução Q (betaína) , 2 µl de DMSO e 2 µl 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 30 s a 94°C, 90 s a 50°C, e 90 s 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 45 s a 94°C, 45 s de anelamento a 57°C para *fim3*, a 55°C para *ptxP* e 58°C a *ptxS1* e 1 min de

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) e os primers descritos na Tabela 3. 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://pubmlst.org/bordetella/>.

**Tabela 3.** Primers utilizados para MLST de *B.pertussis*.

| Nome do Primer | Sequência                      | Tamanho do produto |
|----------------|--------------------------------|--------------------|
| <b>Fim3F</b>   | 5'-<br>CCCCCGGACCTGATATTCTGATG | 700 bp             |
| <b>Fim3R</b>   | 5'-GCTGAGCGTGCTGAAGGACAAGAT    |                    |
| <b>PTX-PF</b>  | 5'-AATCGTCCTGCTCAACCGCC        | 574 bp             |
| <b>PTX-PR</b>  | 5'-<br>GGTATACGGTGGCGGGAGGA    |                    |
| <b>ptxS1F</b>  | 5'-TCCTCCCGCCACCGTATACC        | 647 bp             |
| <b>ptxS1R</b>  | 5'-GTTCCGACCAGGCTGCCATG        |                    |
| <b>PRN-AF</b>  | 5'-GCCAATGTACCGGTCCAA          | 1.4 bp             |
| <b>PRN-BR</b>  | 5'-CGGATTCAGGCGCAACTC          |                    |

#### 4.6. Quantificação de biomassa de biofilme

Os isolados foram cultivados em meio líquido Stainer-Scholte (SS) e inoculados em placas de 96 poços a uma OD600 de 0,1. Nos poços de branco foram acrescentado apenas o meio SS estéril . Após 24 horas de ensaio o meio era renovado. Após 48 horas, os poços foram lavados com PBS três vezes para remover células não aderentes. Em seguida, as células aderentes foram fixadas com metanol por 15 minutos.O fixador foi descartado e a placa deixada

a temperatura ambiente até secar. Depois de seca, foi adicionado o corante cristal violeta por 30 minutos. Após esse tempo, o excesso de corante foi lavado com água corrente e a placa deixada a temperatura ambiente para secar. O biofilme corado foi então solubilizado com ácido acético glacial (33%). Em seguida, a biomassa de biofilme foi quantificada medindo a OD570 utilizando o espectrofotômetro de microplacas SpectraMax. O ensaio foi realizado duas vezes e em triplicata amostral. Para quantificar a produção de biofilme foi realizada uma média aritmética dos valores de absorbância obtidos por cada amostra. As cepas foram classificadas nas categorias: não produtora, fraca, média e forte produtora de biofilme. Se o valor obtido era menor ou igual ao valor obtido do branco a linhagem foi considerada não produtora de biofilme. Se o valor obtido fosse maior que o valor do branco, mas menor ou igual a duas vezes o valor do branco a linhagem foi considerada produtora fraca de biofilme. Se o valor fosse maior que duas vezes o valor do branco, mas menor ou igual a 4 vezes o valor do branco ela foi considerada uma produtora moderada de biofilme. Se o valor fosse 4 vezes maior que o valor do branco a linhagem era classificada como produtora forte de biofilme (CATTELAN et al., 2017; STEPANOVIC et al., 2004). A classificação do biofilme está resumida na Tabela 4.

**Tabela 4.** Classificação quanto a produção de biofilme. BR: Branco e VA: Valor de Absorbância.

| <b>NÃO PRODUTORA</b> | <b>FRACA</b>         | <b>MÉDIA</b>            | <b>FORTE</b> |
|----------------------|----------------------|-------------------------|--------------|
| $VA \leq BR$         | $2x BR \geq VA > BR$ | $4x BR \geq VA > 2x BR$ | $VA > 4x BR$ |

#### **4.7. Manutenção da linhagem celular Hep-2**

A linhagem celular Hep-2, derivada de carcinoma epidermóide de laringe humano foi obtida do Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz. As células foram armazenadas

em freezer -80°C em Soro Fetal Bovino (GIBCO) e 10% de DMSO. Para a realização dos ensaios, a linhagem celular foi cultivada em garrafas em meio DMEN (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e mantidas a 37°C com uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.8. Teste de viabilidade de células epiteliais após infecção**

A viabilidade das células epiteliais Hep-2 após infecção por *B. pertussis* foi avaliada pela redução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) em cristais de Formazan por meio da ação de desidrogenases mitocondriais. As células Hep-2 foram cultivadas em placas de 96 poços a concentração final de  $1.0 \times 10^4$  células por poço. No dia seguinte, as células foram infectadas com  $1.0 \times 10^6$  bactérias por poço. A placa foi incubada a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 45 minutos para permitir adesão da bactéria às células, em seguida os poços foram lavados 3x com tampão PBS para remover as bactérias que não aderiram e o meio foi renovado e a placa foi novamente incubada. DMSO 20% serviu como controle de morte celular e células não infectadas como controle negativo. Foi feito também o controle da redução de MTT pelas bactérias,  $1.0 \times 10^6$  bactérias foram adicionadas a poços contendo apenas o meio de cultura DMEN, o valor de absorvância desse controle foi descontado do valor de absorvância dos poços experimentais. Após 24 horas de infecção, o MTT foi adicionado. A placa foi incubada por duas horas para permitir conversão de MTT em cristais de Formazan. Em seguida, os cristais foram ressolubilizados com a adição de DMSO 100%. A redução de MTT foi quantificada por medição da densidade óptica no comprimento de onda de 570 nm. Uma maior densidade óptica indica uma maior redução de MTT, conseqüentemente maior número de células viáveis. (VAN DEN BERG et al., 1999).

#### **4.9. Extração proteínas totais e digestão para espectrometria de massa**

Para extração de proteínas, os extratos celulares do isolado BP71 e da linhagem vacinal bp137 foram cultivadas como a linhagem bp 137 geralmente é cultivada na escala piloto para a preparação da vacina pela Seção de Vacinas Aeróbicas do Instituto Butantan. Foram preparadas três replicatas biológicas para cada cepa a concentração final de 210 uop/mL (Unidade Opacimétrica por mL).

Os extratos celulares foram centrifugados a 3.000 xg por 20 min e o pellet foi dissolvido em tampão de lise, composto de Tris HCl 50 mM, EDTA 2 mM, SDS a 1% e inibidor de protease PMSF 0.4 mM (Thermo Fisher). Em seguida, as células foram rompidas por sonicação e o lisado resultante foi centrifugado a 16000xg a 4°C por 30 min para remover os restos celulares (LUU et al., 2018). A integridade das proteínas foi acessada por eletroforese SDS-PAGE (do inglês, “Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide *Gel* Electrophoresis”) a 12%.

As amostras foram reduzidas com DTT 100 mM por 50 min a 46 °C e, então, foi adicionado iodoacetamida 55 mM por 40 min a temperatura ambiente protegidas da luz. Em seguida as proteínas foram digeridas com tripsina, na proporção 1:50 de tripsina para µg de proteína, e as amostras foram incubadas a 37 °C overnight. A reação de digestão foi interrompida com a adição de TFA a 0,1% (v:v). Em seguida, as amostras foram dessalinizadas em microcolunas de resina caseiras StageTips C<sub>18</sub> (RAPPSILBER; MANN; ISHIHAMA, 2007).

#### **4.10. Análise estatística**

A análise estatística dos dados obtidos foi feita pelo *software* GraphPadPrism versão 7.0.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Características dos isolados

Dos 10 isolados selecionados, três foram isolados de indivíduos não imunizados, cinco de indivíduos em processo de imunização (uma ou duas doses da DTP) e dois imunizados (três doses mais reforço). A genotipagem por PFGE foi utilizada como segundo parâmetro de seleção (ROCHA et al., 2017). Quatro isolados são do pulsotipo dominante *BP.Xba.0039*, um isolado do segundo pulsotipo de maior frequência *BP.Xba.0040* e cinco isolados de pulsotipos com baixa frequência. Os dados dos isolados escolhidos estão resumidos na Tabela 5.

**Tabela 5.** Isolados clínicos de *B.pertussis* isolados entre 2012 e 2014 selecionados

| CEPA | Pulsotipo   | SOROTIPO | IDADE | SEXO | MÊS DE ISOLAMENTO | RESIDÊNCIA       | NÚMERO DE DOSES DA DTP |
|------|-------------|----------|-------|------|-------------------|------------------|------------------------|
| BP1  | BP.Xba.0055 | 1,2,3    | 2M28D | F    | AGOSTO/12         | PLANALTINA-DF    | UMA                    |
| BP4  | BP.Xba.0010 | 1,2      | 2M09D | F    | AGOSTO/2012       | BRASILIA-DF      | NÃO IMUNIZADO          |
| BP7  | BP.Xba.0008 | 1,3      | 1M    | F    | SETEMBRO/12       | FORMOSA-GO       | NÃO IMUNIZADO          |
| BP15 | BP.Xba.0039 | 1,3      | 5M    | F    | NOVEMBRO/2012     | PLANALTINA-DF    | DUAS                   |
| BP24 | BP.Xba.0039 | 1,3      | 2A    | F    | JANEIRO/13        | PLANALTINA-DF    | TRÊS + UM REFORÇO      |
| BP26 | BP.Xba.0010 | 1,3      | 2M    | F    | JANEIRO/13        | SAMAMBAIA-DF     | UMA                    |
| BP35 | BP.Xba.0040 | 1,2      | 5M    | F    | AGOSTO/13         | RIACHO FUNDO-DF  | DUAS                   |
| BP46 | BP.Xba.0039 | 1,2      | 6A    | F    | DEZEMBRO/13       | SÃO SEBASTIAO-DF | TRÊS + UM REFORÇO      |
| BP51 | BP.Xba.0011 | 1,3      | 4M20D | F    | FEVEREIRO/14      | SOBRADINHO-DF    | DUAS                   |
| BP71 | BP.Xba.0039 | 1,2,3    | 16D   | F    | JUN/14            | SOBRADINHO-DF    | NÃO IMUNIZADO          |

### 5.2. Epidemiologia Molecular

O ressurgimento da coqueluche tem sido atribuído a vários fatores, incluindo imunidade induzida pela vacina em declínio e adaptação de *B. pertussis* (HE; MERTSOLA, 2008). A adaptação da *B.pertussis* é apoiada por várias observações. *B. pertussis* é um patógeno

extremamente monomórfico, o que é contraditório considerando que, variação genética é crítica para adaptação de patógenos extritamente humanos. No entanto, *B. pertussis* é capaz de criar diversidade dentro de seu repertório de genes através de rearranjos e polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP, do inglês “single nucleotide polymorphism”) (WEIGAND et al., 2017). Os métodos de tipagem molecular contribuem para entender as forças que impulsionam a bactéria a sobreviver e enfrentar evoluções ambientais, como a pressão exercida pelas vacinas (BOLOTIN; HARVILL; CROWCROFT, 2015).

Foram analisados 10 isolados de *B. pertussis* do Distrito Federal através das técnicas de MLVA e MLST, além do dado anterior de PFGE de ROCHA et al., 2017. O perfil molecular dos isolados está resumido na Tabela 6.

### **5.2.1.MLVA**

Produtos das PCRs VNTR tiveram seus tamanhos em pares de base definidos por um sequenciador de DNA. O tamanho do produto é usado para calcular o número de repetição de cada VNTR. A combinação das repetições dos loci VNTR (alelos) constituem o perfil MLVA. Problemas na análise do VNTR6 impossibilitaram o seu uso para o MLVA, sendo assim os resultados apresentados são parciais. Atualmente 332 perfis de MLVA de *B. pertussis* são conhecidos (NATIONAL INSTITUTE FOR PUBLIC HEALTH AND THE ENVIRONMENT, 2019). Dentre os dez isolados de *B. pertussis* analisados, cinco isolados (BP1, BP4, BP24, BP35 e BP71 ) podem pertencer aos perfis MLVA (MTs) 70, 91, 92 ou 137; um isolado (BP26) foi classificado como MT208 e um isolado (BP51) pertence ao MT181. Os isolados BP7, BP15 e BP46 apresentam um padrão de VNTR ainda não descrito.

As amostras tiveram um baixo grau de polimorfismo nos loci analisados. Os VNTR4b e VNTR5 tiveram o mesmo número de repetições em todos os isolados. O VNTR1 teve 7

repetições em 8/10 dos isolados, VNTR3a teve 6 repetições em 7/10 , VNTR3b não estava presente em 9 isolados e VNTR4a teve 7 repetições em 9/10 dos isolados.

**Tabela 6.** Número de repetição de VNTRs e perfil MLVA (MT) de cepas de *B.pertussis*. ND: não descrito.

| CEPA         | VNTR1 | VNTR3a | VNTR3b | VNTR4a | VNTR4b | VNTR5 | VNTR6 | MLVA (MT)         |
|--------------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------------------|
| <b>BP1</b>   | 7     | 6      | 0      | 7      | 0      | 6     | -     | 70 ,91, 92 ou 137 |
| <b>BP4</b>   | 7     | 6      | 0      | 7      | 0      | 6     | -     | 70 ,91, 92 ou 137 |
| <b>BP7</b>   | 0     | 6      | 0      | 8      | 0      | 6     | -     | ND                |
| <b>BP15</b>  | 8     | 6      | 0      | 7      | 0      | 6     | -     | ND                |
| <b>BP24</b>  | 7     | 6      | 0      | 7      | 0      | 6     | -     | 70 ,91, 92 ou 137 |
| <b>BP26</b>  | 7     | 5      | 0      | 7      | 0      | 6     | -     | 208               |
| <b>BP35</b>  | 7     | 6      | 0      | 7      | 0      | 6     | -     | 70 ,91, 92 ou 137 |
| <b>BP46</b>  | 7     | 0      | 0      | 7      | 0      | 6     | -     | ND                |
| <b>BP51</b>  | 7     | 5      | 6      | 7      | 0      | 6     | -     | 181               |
| <b>BP71</b>  | 7     | 6      | 0      | 7      | 0      | 6     | -     | 70 ,91, 92 ou 137 |
| <b>Bp137</b> | 9     | 6      | 0      | 7      | 0      | 13    | 7     | 330               |

Dos 10 isolados, 3 isolados não tiveram seu perfil descrito ainda. Os outros 7 isolados apresentaram perfis não tão comuns, os isolados BP26 e o BP51 tem perfis ainda não citados em artigos, MT208 e MT181, respectivamente. Cinco isolados podem pertencer ao MT70, MT91, MT92 ou MT137, sendo que os perfis MT91 e MT137 não foram ainda citados em artigos publicados. O MT92 foi descrito somente na China e Polônia, países que utilizam a vacina wP (MOSIEJ et al., 2017; WANG; HE, 2015). MT70 foi encontrado na Polônia, surgiu na população pela primeira vez na década de 70 e sua frequência cresceu no país, sendo que entre 2000 e 2013 chegou a corresponder a 37,5% dos isolados clínicos (MOSIEJ et al., 2017). Na Austrália, o MT70 ressurgiu após a troca da vacina wP para aP, sendo um dos perfis mais comuns no país até 2010 (KURNIAWAN et al., 2010). Infelizmente, a maioria dos estudos realizados são de países desenvolvidos que utilizam vacina aP e nenhum país da América Latina

utilizou essa técnica o que dificulta a comparação. Atualmente, o MT27 é o perfil com maior circulação nos Estados Unidos, toda Europa, Austrália e Japão ; países que utilizam vacina aP (BOWDEN et al., 2014; KURNIAWAN et al., 2010; MIYAJI et al., 2013; VAN GENT et al., 2015). A cepa vacinal bp137 pertence ao MT330 , um MT não descrito ainda e que difere em na maioria dos VNTR das cepas analisadas.

### 5.2.2. MLST

A variação alélica de isolados de *B. pertussis* é geralmente encontrada em genes associados à virulência, em particular nos genes para o promotor da toxina pertussis (*ptxP*), para a subunidade da toxina pertussis (*ptxS1*), para pertactina (*prn*) e para a subunidade fimbrial (*fim3*), sendo esses genes os mais utilizados em análises MLST (VAN GENT et al., 2012). O aparecimento de novos alelos desses genes foi observado em diversos países como Holanda, Reino Unido, Argentina, Rússia e Finlândia (MOOI, 2010).

Os 10 isolados analisados apresentaram pouca variação. O gene *fim3* foi o único gene que diferiu entre os isolados, sendo que cinco isolados têm alelo do tipo 3 (*fim3-3*) , quatro isolados com alelo do tipo 1 (*fim3-1*) e dois isolados com tipo 24 (*fim3-24*). Os outros três genes apresentaram o mesmo alelo para todos os isolados, sendo o *prn* do alelo do tipo 9 (*prn9*) , *ptxP* do tipo 3 (*ptxP3*) e *ptxS1* do tipo 13 (*ptxS113*). Os genes analisados tem alelos distintos da cepa vacinal (*prn7-ptxP2-ptxS14-fim3-1*) descritos por AKAMATSU et al., 2015. O perfil alélico para cada isolado está representado na Tabela 7.

**Tabela 7.** MLST dos isolados de *B.pertussis* e da cepa vacinal BP137. Alelos dos genes associados a virulência.

| Cepa         | Alelo      |             |              |             |
|--------------|------------|-------------|--------------|-------------|
|              | <i>prn</i> | <i>ptxP</i> | <i>ptxS1</i> | <i>fim3</i> |
| <b>BP1</b>   | 9          | 3           | 13           | 3           |
| <b>BP4</b>   | 9          | 3           | 13           | 3           |
| <b>BP7</b>   | 9          | 3           | 13           | 3           |
| <b>BP15</b>  | 9          | 3           | 13           | 3           |
| <b>BP24</b>  | 9          | 3           | 13           | 1           |
| <b>BP26</b>  | 9          | 3           | 13           | 1           |
| <b>BP35</b>  | 9          | 3           | 13           | 1           |
| <b>BP46</b>  | 9          | 3           | 13           | 24          |
| <b>BP51</b>  | 9          | 3           | 13           | 3           |
| <b>BP71</b>  | 9          | 3           | 13           | 24          |
| <b>BP137</b> | 1          | 2           | 2            | 1           |

Alguns autores tem mostrado que divergência antigênica ocorreu entre cepas vacinais e isolados clínicos em relação a proteínas de superfície que conferem imunidade protetora; toxina pertussis (PT) , pertactina e fímbrias. Além de evidências de que o polimorfismo no promotor de PT (*ptxP*) também pode ser importante na adaptação (BART et al., 2010).

O gene *prn* codifica a proteína de superfície pertactina, um importante antígeno tanto da wP quanto a aP. A PRN é a proteína mais variável encontrada em *B. pertussis*, com 13 alelos conhecidos e um crescente número de cepas com PRN deletada (MOOI, 2010). A variação no *prn* é principalmente gerado por duas regiões (1 e 2), embora SNPs sejam também observados. A região 1 contém repetições compostas de cinco aminoácidos (Gly-Gly-X-X-Pro) e está localizado próximo ao motivo relacionado a ligação a receptores do hospedeiro (MOOI, 2010). O alelo *prn* mais comum em cepas vacinais é o *prn1* e *prn7* (BYRNE; SLACK, 2006). O alelo da cepa vacinal bp137 é o *prn7* e o alelo encontrado no grupo de isolados testados é *prn9*, a diferença entre esses alelos consiste em duas repetições adicionais de cinco aminoácidos na região 1 no alelo *prn9*. O alelo *prn9* é recente e raro, já foi observado em baixa frequência no Peru, Canadá, Japão e Cambodia (BAILON et al., 2016; MIYAJI et al., 2013; MORIUCHI et

al., 2017; SHUEL et al., 2013). Nos últimos anos houve aumento na circulação de isolados clínicos que não produzem PRN, um fenótipo observado em diferentes países (BOUCHEZ et al., 2015). Não foi possível nesse trabalho acessar se os isolados do DF não expressam a proteína PRN. Seriam necessários primers adicionais para toda extensão do gene para alcançar resolução suficiente na sequência para identificar mutações relacionadas a deficiência de PRN.

As fímbrias (FIM) são proteínas filamentosas associadas à superfície celular, essenciais para a colonização do trato respiratório. *B. pertussis* produz dois tipos distintos de fímbrias (sorotipos 2 e 3) compostas por subunidades Fim2 e Fim3, respectivamente (NUCCIO; BAUMLER, 2007). O locus *fim2* e *fim3* podem apresentar polimorfismo, no entanto o gene *fim3* apresenta mais variação por isso é usado para MLST. O locus *fim3* contribui para a maior diversidade do MLST (BOWDEN et al., 2014). O *fim3* foi o único gene que apresentou variação de alelos nos isolados analisados. Quatro isolados apresentam o mesmo alelo da cepa vacinal - *fim3-1*, quatro isolados apresentaram o alelo *fim3-3* e dois isolados contém o alelo *fim3-24*. Os alelos *fim3-1* e o alelo *fim3-2* são os dominantes, sendo os alelos *fim3-3* e *fim3-24* mais raros (BART et al., 2014).

A toxina PT é composta por cinco subunidades (ptxS1, ptxS2, ptxS3, ptxS4 e ptxS5) , sendo o gene da subunidade *ptxS1* - também conhecido como *ptxA*, - é o que apresenta mais polimorfismo (VAN LOO et al., 2002). Análise extensiva de isolados de *B. pertussis* coletados ao longo de anos demonstraram que há alterações dos alelos da era pré-vacinação ao alelos que circulam atualmente. Os alelos correspondente a maioria das cepas vacinais são *ptxS1-2* e o *ptxS1-4* ,entretanto o alelo mais comum é o *ptxS1-1* (MOOI; MAAS; MELKER, 2014). O alelo na cepa vacinal bp137 é o alelo *ptxS1-4* e o alelo encontrado nos isolados analisados são *ptxS1-13*, um alelo raro, observado apenas na Polônia (MOSIEJ et al., 2017).

Estudos recentes associaram o ressurgimento da coqueluche à expansão de cepas de *B. pertussis* com um novo alelo para o promotor da toxina PT, o *ptxP3*, no lugar de cepas de alelo *ptxP1*. A recente expansão das cepas de *ptxP3* sugere que essas cepas carregam mutações que aumentaram sua aptidão. As cepas de *ptxP3* exibem aumento produção de toxina pertussis e, portanto, pode ser mais virulenta em humanos e suprimir a imunidade do hospedeiro eficientemente (KING et al., 2013b). Os 10 isolados analisados tem o alelo *ptxP3* em contraste ao alelo *ptxP2* da cepa vacinal. Cepas com promotor *ptxP3*, foram relatados pela primeira vez na Holanda. Desde então sido relatado em muitos países e substituiu outros alelos (DORJI et al., 2016).

As cepas isoladas no DF apresentaram alelos dos genes de virulência com baixa distribuição mundial, com exceção do alelo *ptxP3*. O que pode ser um resultado da pressão exercida pela vacina wP ser diferente da exercida pela aP, utilizada atualmente por diversos países. Os isolados circulantes também diferem em relação a cepa utilizada na vacinação nacional, indicando uma possível variação alélica como mecanismo de adaptação a pressão exercida pela vacina.

Não foi possível agrupar os isolados em linhagens, pois mesmo algum isolados apresentando o mesmo perfil de MLVA e MLST, elas diferem no PFGE. O resultado de PFGE sozinho mostrou um maior poder discriminatório que MLVA e MLST juntos, como visto em trabalhos anteriores (BOWDEN et al., 2014). Entretanto PFGE não permite a comparação com isolados de outros países.

**Tabela 8.** Tipagem molecular dos isolados de *Bordetella pertussis* isolados no Distrito Federal e da cepa vacinal Bp137.

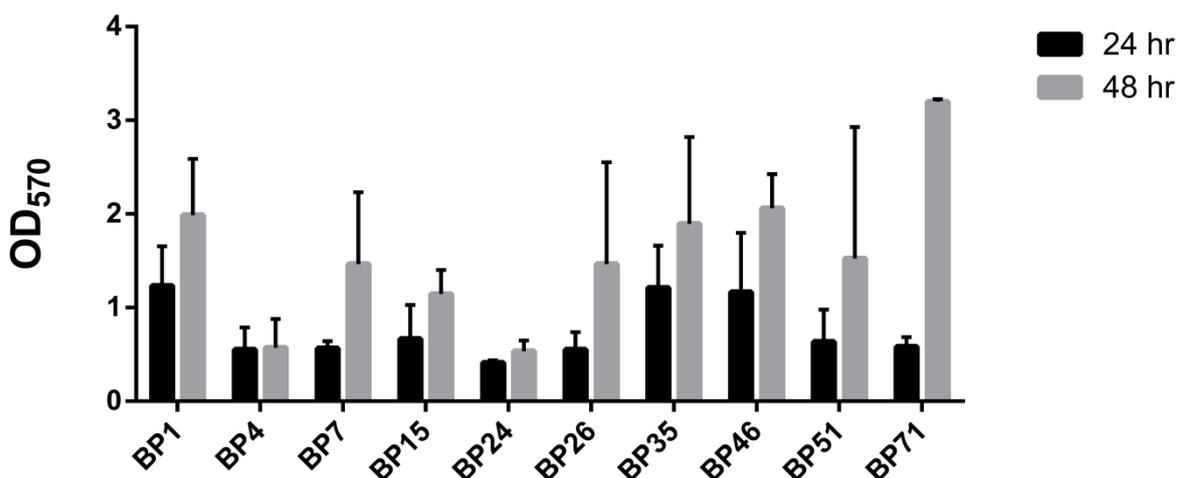
| CEPAS                      | PFGE               | MLVA                    | <i>prn</i> | alelo - MLST |              |             |
|----------------------------|--------------------|-------------------------|------------|--------------|--------------|-------------|
|                            |                    |                         |            | <i>ptxP</i>  | <i>ptxS1</i> | <i>fim3</i> |
| <b>BP1</b>                 | <i>BP.Xba.0055</i> | 70 ,91,<br>92 ou<br>137 | 9          | 3            | 13           | 3           |
| <b>BP4</b>                 | <i>BP.Xba.0010</i> | 70 ,91,<br>92 ou<br>137 | 9          | 3            | 13           | 3           |
| <b>BP7</b>                 | <i>BP.Xba.0008</i> | ND                      | 9          | 3            | 13           | 3           |
| <b>BP15</b>                | <i>BP.Xba.0039</i> | ND                      | 9          | 3            | 13           | 3           |
| <b>BP24</b>                | <i>BP.Xba.0039</i> | 70 ,91,<br>92 ou<br>137 | 9          | 3            | 13           | 1           |
| <b>BP26</b>                | <i>BP.Xba.0010</i> | 208                     | 9          | 3            | 13           | 1           |
| <b>BP35</b>                | <i>BP.Xba.0040</i> | 70 ,91,<br>92 ou<br>137 | 9          | 3            | 13           | 1           |
| <b>BP46</b>                | <i>BP.Xba.0039</i> | ND                      | 9          | 3            | 13           | 24          |
| <b>BP51</b>                | <i>BP.Xba.0011</i> | 181                     | 9          | 3            | 13           | 3           |
| <b>BP71</b>                | <i>BP.Xba.0039</i> | 70 ,91,<br>92 ou<br>137 | 9          | 3            | 13           | 24          |
| <b>Bp137<br/>(Vacinal)</b> | -                  | 330                     | 7          | 2            | 4            | 1           |

### 5.3. Formação de biofilme e citotoxicidade de *B. pertussis*

Alguns autores sugeriram que as alterações genéticas nas cepas de *B. pertussis* circulantes não apenas promoveram variação antigênica, mas também aumentaram a virulência dessas cepas para reduzir a eficácia das vacinas (CARBONETTI, 2010). Realizamos ensaio de biofilme e de viabilidade celular para acessar a capacidade dos isolados do DF de mobilizarem seus fatores de virulência para formação de biofilme e interação com as células hospedeiras.

### 5.3.1. Produção de Biofilme

A formação de biofilme é considerada uma estratégia de sobrevivência que permite maior colonização, persistência, transmissão e circulação de *B. pertussis* (ARNAL et al., 2015). Trabalhos anteriores associaram o fenótipo de formação de biofilme com vantagens de colonização em modelos animais e propuseram o biofilme como um mecanismo para circulação e ressurgência da *B. pertussis* (CATTELAN et al., 2017). Para acessar se biofilme consistiria uma vantagem para os isolados circulantes do Distrito Federal, a formação de biofilme em microplaca de polietileno foi quantificada. Todos os dez isolados tiveram capacidade de formação de biofilme em superfície abiótica e biomassa variou entre os isolados como representado na Figura 5. Houve uma maior produção de biofilme após 48 horas de crescimento, o que era esperado já que essas bactérias tem um crescimento lento.



**Figura 5.** Formação de biofilme por isolados de *B. pertussis* em superfície abiótica. Formação de biofilme após 24 e 48 hrs de crescimento. Cada valor representa a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata para cada isolado. A barra de erro representa o desvio padrão.

Após 48 horas, 8 dos 10 isolados apresentaram biofilme forte e dois isolados (BP4 e BP24) tiveram um perfil de biofilme moderado como representado na Tabela 9. O isolado com maior biomassa foi o BP71 com uma absorvância média de 3.19.

**Tabela 9.** Perfil de formação de biofilme de isolados de *B.pertussis* em 48 horas.

| <b>Biofilme em 48 hr</b> |          |
|--------------------------|----------|
| <b>BP1</b>               | Forte    |
| <b>BP4</b>               | Moderado |
| <b>BP7</b>               | Forte    |
| <b>BP15</b>              | Forte    |
| <b>BP24</b>              | Moderado |
| <b>BP26</b>              | Forte    |
| <b>BP35</b>              | Forte    |
| <b>BP46</b>              | Forte    |
| <b>BP51</b>              | Forte    |
| <b>BP71</b>              | Forte    |

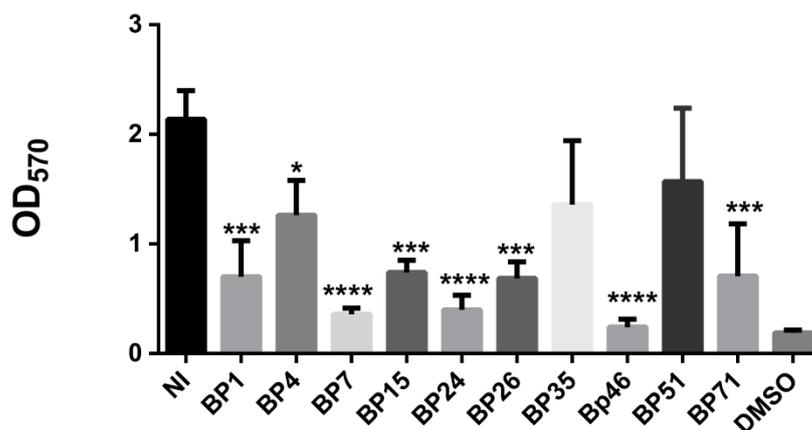
Isolados clínicos com maior capacidade de formação de biofilme em comparação a cepa referência Tahoma I foram observados na Argentina, Estados Unidos e Austrália , e aparenta ser independente da estratégia vacinal utilizada (DORJI et al., 2016). Cattelan et al acharam correlação entre biofilme forte e maior capacidade de adesão a células epiteliais e colonização do trato respiratório de camundongos (CATTELAN et al., 2017). Esses dados sugerem que os isolados de *B.pertussis* do DF tem um alto potencial para produção de biofilme que poderia constituir uma vantagem na colonização do hospedeiro.

### **5.3.2. Viabilidade de células epiteliais após infecção**

Células viáveis com metabolismo ativo convertem o MTT em formazan - um produto de cor púrpura com uma absorvância máxima próxima a 570 nm. Quando as células morrem, elas perdem a capacidade de converter MTT em formazan, assim, a formação da cor serve como

um marcador de viabilidade celular (STOCKERT et al., 2012). O ensaio MTT foi usado para acessar o efeito citotóxico dos isolados de *B.pertussis* sobre células epiteliais de traquéia Hep-2.

Dos isolados testados, oito reduziram o número de células viáveis e os isolados BP35 e BP51 não afetaram a viabilidade significativamente como representado na Figura. Os isolados com efeito mais citotóxico foram BP46 com redução de 88,7% das células viáveis, BP7 com 83,2 % e BP24 reduziu em 81,4 % o número de células viáveis.



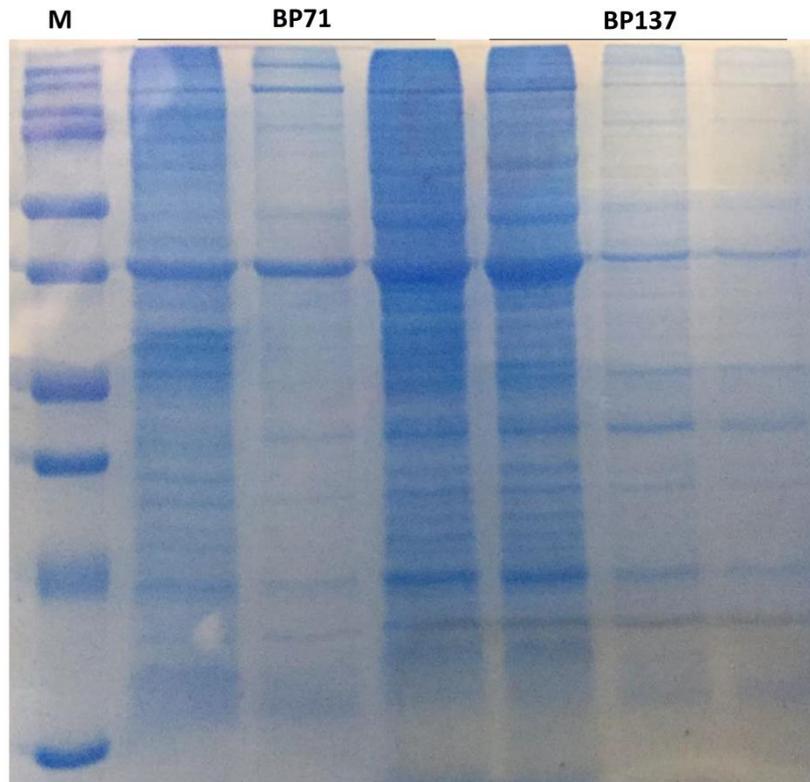
**Figura 6.** Viabilidade da célula Hep-2 após 24 horas pós-infecção. Cada valor representa a média da triplicata para cada isolado. Linha azul indica porcentagem em viabilidade celular em relação ao controle NI (não infectado). Barras de erros indicam desvio padrão. As diferenças significativas foram acessadas por Anova .\*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ .

A *B.pertussis* invade células, altera a morfologia das células das vias aéreas e induz uma grave resposta inflamatória com neutrófilos em grande quantidade, bronquiolite necrosante e hemorragia intra-alveolar (GUEVARA et al., 2016). Ela tem um apanhado de

toxinas que poderia influenciar a viabilidade de células infectadas, sendo elas: toxina Pertussis (PT), Adenilato ciclase (ACT), Citotoxina Traqueal (TCT) e a toxina dermonecrótica (DNT). Não foi possível identificar quais dessas toxinas está diretamente afetando as células epiteliais *in vitro*. Considerando que os isolados analisados possuem o alelo *ptxP3* que está associado ao aumento da produção da toxina PT e consequente aumento de virulência e severidade da manifestação clínica (GUTIÉRREZ-FERMAN et al., 2018), podemos sugerir que os isolados apresentam um quantidade maior de toxina PT que pode conferir um maior efeito citotóxico sobre as células epiteliais analisadas. Contudo, estudos de quantificação da toxina são necessários para embasar esta hipótese.

#### **5.4. Análise da extração de proteínas totais**

Para investigar as proteínas expressas diferencialmente entre a cepa vacinal e isolados. A cepa vacinal BP137 e o isolado BP71 foram cultivados na mesma condição de cultivo e suas proteínas foram extraídas para uma posterior análise proteômica. O isolado BP71 foi o escolhido por representar características comuns com a maior parte dos isolados do período : foi isolado de um indivíduo não imunizado e pertencer ao pulstotipo *BP.XbaI.0039*. A extração das proteínas totais foi bem-sucedida e o gel SDS-page das extrações está representado na Figura 7. Apenas pelo gel não é possível identificar se a diferença na expressão de proteínas entre a cepa BP137 e o isolado BP71. As amostras foram digeridas e quantificadas para a proteômica. A análise futura do perfil de proteômica permitirá estabelecer se houve expressão diferencial de proteínas entre as linhagens.



**Figura 7. Análise da extração de proteínas totais.** Gel de poliacrilamida 12% dos extratos resultantes da extração de proteína. M: marcador de peso molecular.

## 6. Conclusões

É possível concluir dos resultados apresentados que:

- Os dez isolados analisados demonstraram uma alta similaridade genética;
- Metade dos isolados testados pertencem ao perfil MLVA 70 ,91, 92 ou 137;
- Os perfis de MLVA encontrados são raros e mais comuns em países que utilizam a vacina celular;
- Houve pouca variação na análise de MLST entre os isolados, sendo o gene *fim3* a fonte de variação;
- Os isolados apresentam os alelos *prn9* e *ptsSI-13*, que são pouco frequentes;
- O alelo *ptxP3* com predominância mundial e que está relacionado ao aumento de virulência está presente nos isolados analisados;
- O perfil MLST de todos isolados é diferente do perfil da linhagem vacinal (BP137).
- Os isolados apresentam formação de biofilme forte ou moderada;
- Os isolados reduziram a viabilidade celular de células epiteliais in vitro após 24hrs de infecção.

Em conjunto, os dados demonstraram que os isolados analisados apresentam perfil genético diferente da linhagem vacinal. Além disto, todos os isolados apresentaram capacidade de formação de biofilme e potencial citotóxico, sugerindo que apresentam elevada capacidade de colonização da célula hospedeira. Análises posteriores com um maior número de isolados permitirá identificar qual o perfil alélico mais prevalente na região, permitindo, assim, avaliar se há necessidade de inserção de uma linhagem brasileira na produção da vacina.

## 7.Referências Bibliográficas

ADVANI, A.; DONNELLY, D.; HALLANDER, H. Reference System for Characterization of *Bordetella pertussis* Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 2890–2897, jul. 2004.

AKAMATSU, M. A. et al. Whole-Genome Sequence of a *Bordetella pertussis* Brazilian Vaccine Strain. **Genome Announcements**, v. 3, n. 1, p. e01570-14, /ga/3/1/e01570-14.atom, 26 fev. 2015.

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.

ARNAL, L. et al. *Bordetella pertussis* Isolates from Argentinean Whooping Cough Patients Display Enhanced Biofilm Formation Capacity Compared to Tohama I Reference Strain. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 8 dez. 2015.

ASLANABADI, A. et al. Emergence of whooping cough: notes from three early epidemics in Persia. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 12, p. 1480–1484, dez. 2015.

BAILON, H. et al. Increase in pertussis cases along with high prevalence of two emerging genotypes of *Bordetella pertussis* in Perú, 2012. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 422, dez. 2016.

BART, M. J. et al. Comparative genomics of prevaccination and modern *Bordetella pertussis* strains. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 627, 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, 22 abr. 2014.

BOLOTIN, S.; HARVILL, E. T.; CROWCROFT, N. S. What to do about pertussis vaccines? Linking what we know about pertussis vaccine effectiveness, immunology and disease transmission to create a better vaccine: Graphical Abstract Figure. **Pathogens and Disease**, v. 73, n. 8, p. ftv057, nov. 2015.

BOTTERO, D. et al. Genotypic and phenotypic characterization of *Bordetella pertussis* strains used in different vaccine formulations in Latin America: Genotypic and phenotypic characterization of *Bord. pertussis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 6, p. 1266–1276, jun. 2012.

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

BOULANGER, A. et al. In vivo phosphorylation dynamics of the *Bordetella pertussis* virulence-controlling response regulator 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, 1 out. 2014.
- BOWDEN, K. E. et al. Genome Structural Diversity among 31 *Bordetella pertussis* Isolates from Two Recent U.S. Whooping Cough Statewide Epidemics. **mSphere**, v. 1, n. 3, 22 jun. 2016.
- BYRNE, S.; SLACK, A. T. Analysis of *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin types from Queensland, Australia, 1999–2003. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 53, dez. 2006.
- 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.
- CASSIDAY, P. K. et al. Changes in Predominance of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profiles of *Bordetella pertussis* Isolates, United States, 2000–2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 3, p. 442–448, mar. 2016.
- 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, dez. 2017.
- CHANG, C.-H. et al. VNTRDB: a bacterial variable number tandem repeat locus database. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Database, p. D416–D421, 3 jan. 2007.
- CHEN, Q. et al. Novel architectural features of *Bordetella pertussis* fimbrial subunit promoters and their activation by the global virulence regulator BvgA: *B. pertussis* fimbrial subunit promoter architecture. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1326–1340, set. 2010.
- CONOVER, M. S. et al. The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin: Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis*. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 6, p. 1439–1455, set. 2010.
- CONOVER, M. S.; MISHRA, M.; DEORA, R. Extracellular DNA Is Essential for Maintaining *Bordetella* Biofilm Integrity on Abiotic Surfaces and in the Upper Respiratory Tract of Mice. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e16861, 11 fev. 2011.
- 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.
- CUMMINGS, C. A. et al. *Bordetella* Species Are Distinguished by Patterns of Substantial Gene Loss and Host Adaptation. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1484–1492, 1 mar. 2004.
- DE GOUW, D. et al. Pertussis: a matter of immune modulation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 3, p. 441–474, 1 maio 2011.
- DE GOUW, D. et al. The vaccine potential of *Bordetella pertussis* biofilm-derived membrane proteins. **Emerging Microbes & Infections**, v. 3, n. 8, p. e58, ago. 2014.
- DECKER, K. B. et al. The *Bordetella pertussis* model of exquisite gene control by the global transcription factor BvgA. **Microbiology**, v. 158, n. Pt\_7, p. 1665–1676, 1 jul. 2012.

- DE SERRES, G. et al. Morbidity of Pertussis in Adolescents and Adults. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 1, p. 174–179, jul. 2000.
- 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.
- DOMENECH DE CELLÈS, M. et al. The pertussis enigma: reconciling epidemiology, immunology and evolution. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 283, n. 1822, p. 20152309, 13 jan. 2016.
- DORJI, D. et al. Biofilm forming potential and antimicrobial susceptibility of newly emerged Western Australian *Bordetella pertussis* clinical isolates. **Biofouling**, v. 32, n. 9, p. 1141–1152, 20 out. 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.
- EBY, J. C. et al. Quantification of the Adenylate Cyclase Toxin of Bordetella pertussis In Vitro and during Respiratory Infection. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 5, p. 1390–1398, 5 jan. 2013.
- FLAK, T. A. et al. Synergistic epithelial responses to endotoxin and a naturally occurring muramyl peptide. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1235–1242, mar. 2000.
- GAMBHIR, M. et al. A Change in Vaccine Efficacy and Duration of Protection Explains Recent Rises in Pertussis Incidence in the United States. **PLOS Computational Biology**, v. 11, n. 4, p. e1004138, 23 abr. 2015.
- GANGULY, T. et al. The *Bordetella pertussis* Bps polysaccharide enhances lung colonization by conferring protection from complement-mediated killing: *Bordetella pertussis* and complement resistance. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 1105–1118, jul. 2014.
- GORRINGE, A. R.; VAUGHAN, T. E. *Bordetella pertussis* fimbriae (Fim): relevance for vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 13, n. 10, p. 1205–1214, out. 2014.
- GROSS, R.; KEIDEL, K.; SCHMITT, K. Resemblance and divergence: the “new” members of the genus *Bordetella*. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 199, n. 3, p. 155–163, 1 ago. 2010.
- GUEVARA, C. et al. Highly differentiated human airway epithelial cells: a model to study host cell–parasite interactions in pertussis. **Infectious Diseases**, v. 48, n. 3, p. 177–188, 3 mar. 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, n. 1, dez. 2015.
- GUISO, N. Bordetella pertussis: Why is it still circulating? **Journal of Infection**, v. 68, p. S119–S124, jan. 2014.

- GUTIÉRREZ-FERMAN, J. L. et al. Emerging of *ptxP* 3 lineage in *Bordetella pertussis* strains circulating in a population in northeastern Mexico. **Epidemiology and Infection**, v. 146, n. 16, p. 2096–2101, dez. 2018.
- HARVILL, E. T. et al. Multiple Roles for Bordetella Lipopolysaccharide Molecules during Respiratory Tract Infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 12, p. 6720–6728, dez. 2000.
- HE, Q.; MERTSOLA, J. Factors contributing to pertussis resurgence. **Future Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 329–339, jun. 2008.
- HEGERLE, N.; GUIISO, N. Epidemiology of whooping cough & typing of *Bordetella pertussis*. **Future Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1391–1403, nov. 2013.
- 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.
- ISHIBASHI, Y.; NISHIKAWA, A. Bordetella pertussis infection of human respiratory epithelial cells up-regulates intercellular adhesion molecule-1 expression: role of filamentous hemagglutinin and pertussis toxin. **Microbial Pathogenesis**, v. 33, n. 3, p. 115–125, set. 2002.
- JULES BORDET; OCTAVE GENGOU. Le microbe de la coqueluche. **Annales Institute Pasteur**, v. 20, p. 731–40, 1906.
- KILGORE, P. E. et al. Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 449–486, jul. 2016.
- KING, A. J. et al. Genome-Wide Gene Expression Analysis of Bordetella pertussis Isolates Associated with a Resurgence in Pertussis: Elucidation of Factors Involved in the Increased Fitness of Epidemic Strains. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66150, 11 jun. 2013a.
- KING, A. J. et al. Genome-Wide Gene Expression Analysis of Bordetella pertussis Isolates Associated with a Resurgence in Pertussis: Elucidation of Factors Involved in the Increased Fitness of Epidemic Strains. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66150, 11 jun. 2013b.
- KINNEAR, S. M.; MARQUES, R. R.; CARBONETTI, N. H. Differential Regulation of Bvg-Activated Virulence Factors Plays a Role in Bordetella pertussis Pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 4, p. 1983–1993, abr. 2001.
- KMIETOWICZ, Z. Pertussis cases rise 10-fold among older children and adults in England and Wales. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 345, p. e5008, 23 jul. 2012.
- KURNIAWAN, J. et al. *Bordetella pertussis* Clones Identified by Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 297–300, fev. 2010.
- LE COUSTUMIER, A. et al. *Bordetella pertussis* Infection with Long-lasting Persistence in Human. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. 612–618, abr. 2011.
- LEBER, A. L. Pertussis: Relevant Species and Diagnostic Update. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 34, n. 2, p. 237–255, 1 jun. 2014.

LINZ, B. et al. Acquisition and loss of virulence-associated factors during genome evolution and speciation in three clades of *Bordetella* species. **BMC Genomics**, v. 17, p. 767, 30 set. 2016.

LOCHT, C. Live pertussis vaccines: will they protect against carriage and spread of pertussis? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, p. S96–S102, dez. 2016.

LUU, L. D. W. et al. Proteomic Adaptation of Australian Epidemic *Bordetella pertussis*. **PROTEOMICS**, p. 1700237, 21 fev. 2018.

MANGMOOL, S.; KUROSE, H. Gi/o Protein-Dependent and -Independent Actions of Pertussis Toxin (PTX). **Toxins**, v. 3, n. 7, p. 884–899, 15 jul. 2011.

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. *Bordetella* Dermonecrotic Toxin Undergoes Proteolytic Processing to Be Translocated from a Dynamin-related Endosome into the Cytoplasm in an Acidification-independent Manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 4, p. 2866–2872, 23 jan. 2004.

MAURICE, J. M.; DAVEY, S. **State of the world's vaccines and immunization**. 3rd ed ed. Geneva: World Health Organization, 2009.

Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on immunization, October 2017 – conclusions and recommendations. **Releve Epidemiologique Hebdomadaire**, v. 92, n. 48, p. 729–747, 01 2017.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Informe Epidemiológico Coqueluche da Secretaria de Vigilância em Saúde -Ministério da Saúde.**, 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/dezembro/18/Informe-epidemiol--gico-da-Coqueluche.%20Brasil,%202016%20a%202017.pdf>>. Acesso em: 6 abr. 2019

MIYAJI, Y. et al. Genetic Analysis of *Bordetella pertussis* Isolates from the 2008–2010 Pertussis Epidemic in Japan. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77165, 4 out. 2013.

MOOI, F. R. *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 36–49, jan. 2010.

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

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. 04, p. 685–694, abr. 2014.

- MOON, K. et al. The BvgAS Regulon of *Bordetella pertussis*. **mBio**, v. 8, n. 5, p. e01526-17, 11 ago. 2017.
- MORIUCHI, T. et al. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* in Cambodia determined by direct genotyping of clinical specimens. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 62, p. 56–58, set. 2017.
- MOSIEJ, E. et al. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis of *Bordetella pertussis* isolates circulating in Poland in the period 1959–2013. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 753–761, 1 jun. 2017.
- NATIONAL INSTITUTE FOR PUBLIC HEALTH AND THE ENVIRONMENT. **MLVA**. Disponível em: <<https://www.mlva.net/bpertussis/default.asp>>. Acesso em: 13 abr. 2019.
- 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*. In: SCHELD, W. M.; HUGHES, J. M.; WHITLEY, R. J. (Eds.). . **Emerging infections 10**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2016. p. 311–339.
- NOTTI, R. Q.; STEBBINS, C. E. The Structure and Function of Type III Secretion Systems. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 1, fev. 2016.
- NUCCIO, S.-P.; BAUMLER, A. J. Evolution of the Chaperone/Usher Assembly Pathway: Fimbrial Classification Goes Greek. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 4, p. 551–575, 1 dez. 2007.
- PANINA, E. M. et al. A genome-wide screen identifies a *Bordetella* type III secretion effector and candidate effectors in other species. **Molecular Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 267–279, out. 2005.
- PARK, J. et al. Comparative genomics of the classical *Bordetella* subspecies: the evolution and exchange of virulence-associated diversity amongst closely related pathogens. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 545, 2012.
- PARKHILL, J. et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. **Nature Genetics**, v. 35, n. 1, p. 32–40, set. 2003.
- Pertussis vaccines: WHO position paper, August 2015—Recommendations. **Vaccine**, v. 34, n. 12, p. 1423–1425, mar. 2016.
- PILLSBURY, A.; QUINN, H. E.; MCINTYRE, P. B. Australian vaccine preventable disease epidemiological review series: pertussis, 2006-2012. **Communicable Diseases Intelligence Quarterly Report**, v. 38, n. 3, p. E179-194, 30 set. 2014.
- 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. In: SCHELD, W. M.; HUGHES, J. M.; WHITLEY, R. J. (Eds.). . **Emerging infections** **10**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2016. p. 239–254.

POSTELS-MULTANI, S. et al. Symptoms and complications of pertussis in adults. **Infection**, v. 23, n. 3, p. 139–142, maio 1995.

RAPPSILBER, J.; MANN, M.; ISHIHAMA, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. **Nature Protocols**, v. 2, n. 8, p. 1896–1906, ago. 2007.

RIBOT, E. M. et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, p. 59–67, 2006.

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. 07, 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, 17 nov. 2015.

SAFARCHI, A. et al. Better colonisation of newly emerged *Bordetella pertussis* in the co-infection mouse model study. **Vaccine**, v. 34, n. 34, p. 3967–3971, 25 2016.

SCHOOLS, L. M. et al. Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Dutch *Bordetella pertussis* Strains Reveals Rapid Genetic Changes with Clonal Expansion during the Late 1990s. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 16, p. 5496–5505, 15 ago. 2004.

SEALEY, K. L.; BELCHER, T.; PRESTON, A. *Bordetella pertussis* epidemiology and evolution in the light of pertussis resurgence. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 40, p. 136–143, jun. 2016.

SERRA, D. O. et al. FHA-Mediated Cell-Substrate and Cell-Cell Adhesions Are Critical for *Bordetella pertussis* Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and in the Mouse Nose and the Trachea. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e28811, 22 dez. 2011.

SHUEL, M. et al. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* in Ontario, Canada reveals one predominant clone. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p. e413–e417, jun. 2013.

SPANGRUDE, G. J. et al. Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 135, n. 6, p. 4135–4143, dez. 1985.

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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 44, p. 17981–17990, 11 mar. 2017.

STEPANOVIC, S. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 428–432, maio 2004.

STOCKERT, J. C. et al. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v. 114, n. 8, p. 785–796, dez. 2012.

TANG, P. et al. Infection control in the new age of genomic epidemiology. **American Journal of Infection Control**, v. 45, n. 2, p. 170–179, fev. 2017.

VAN DEN BERG, B. M. et al. Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 3, p. 1056–1062, mar. 1999.

VAN GENT, M. et al. Small Mutations in *Bordetella pertussis* Are Associated with Selective Sweeps. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e46407, 28 set. 2012.

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, 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, 1 jun. 2002.

VAZ-DE-LIMA, L. R. A. et al. Serodiagnosis as Adjunct Assay for Pertussis Infection in São Paulo, Brazil. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 5, p. 636–640, 5 jan. 2014.

WANG, Z.; HE, Q. *Bordetella pertussis* Isolates Circulating in China Where Whole Cell Vaccines Have Been Used for 50 Years: Table 1. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 6, p. 1028–1029, 15 set. 2015.

WEIGAND, M. R. et al. The History of *Bordetella pertussis* Genome Evolution Includes Structural Rearrangement. **Journal of Bacteriology**, v. 199, n. 8, 15 abr. 2017.

**WHO.** Disponível em:  
<[http://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/burden/vpd/surveillance\\_type/passive/pertussis/en/](http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/pertussis/en/)>. Acesso em: 6 abr. 2019.

WILLIAMSON, Y. M. et al. A Proteomic Characterization of *Bordetella pertussis* Clinical Isolates Associated with a California State Pertussis Outbreak. **International Journal of Proteomics**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

WOLF, E. R.; ROWHANI-RAHBAR, A.; OPEL, D. J. The impact of epidemics of vaccine-preventable disease on vaccine uptake: lessons from the 2011-2012 US pertussis epidemic. **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 7, p. 923–933, jul. 2015.

XU, Y. et al. Whole-genome sequencing reveals the effect of vaccination on the evolution of *Bordetella pertussis*. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, out. 2015.

ZHANG, L. et al. Acellular vaccines for preventing whooping cough in children. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 1, p. CD001478, 19 jan. 2011.