

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Detecção de *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase e análise de prevalência no Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Daniela de Souza Martins

Porto Alegre, agosto de 2006

DANIELA DE SOUZA MARTINS

Detecção de *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase e análise de prevalência no Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Ciências Médicas

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Antonacci Carvalho

Porto Alegre, agosto de 2006

*Aos meus amados pais, Helio e Ione,
pelo apoio incondicional, pelas
preocupações que tiveram comigo, por todo
amor, carinho e estímulo, lhes dedico esta conquista.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Afonso Luís Barth, pelos ensinamentos, paciência e direcionamento na realização deste trabalho, a quem sou muito grata.

Ao Prof. Dr. Paulo Carvalho, pelo incentivo e apoio na fase inicial do projeto e pelas valiosas informações clínicas acerca do trabalho.

Às farmacêuticas bioquímicas Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado e Marisa Chesky, pelo fundamental auxílio no desenvolvimento da técnica de PCR e pela amizade, agradeço de coração.

Às colegas e amigas do HSL-PUCRS, Fabiana Corrêa Soares, Katia Pilger (agora no HCPA), Taísa Prochnow, Juliana Caierão e Maia Garcia, pela amizade e apoio nas horas difíceis, e em especial à Silvana Superti, pelo auxílio no EGQ e incentivo neste trabalho.

Ao Alessandro, por todo amor, compreensão e apoio que aqui não cabem em palavras.

A minha família, meus pais Helio e Ione, minha irmã querida Fabiane e meu amado afilhado.

À GlaxoSmithKline, pelos insumos laboratoriais gentilmente cedidos.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	6
REVISÃO DA LITERATURA.....	8
<i>Gênero Bordetella</i>	
1.1 Taxonomia e Descrição.....	8
1.2 Fatores de virulência.....	9
1.3 Habitats.....	10
2 Síndrome Coqueluche	
2.1 Incidência e Prevalência.....	11
2.2 Importância Clínica.....	13
3 Vacinação.....	14
4 Detecção de <i>Bordetella</i>	
4.1 Cultura.....	16
4.2 Imunofluorescência Direta.....	18
4.3 Provas Sorológicas.....	18
4.4 PCR.....	19
OBJETIVOS.....	23
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	24
ARTIGO	
Detection of <i>Bordetella pertussis</i> and <i>Bordetella parapertussis</i> by the Polymerase Chain Reaction and analysis of prevalence at Hospital de Clínicas in Porto Alegre.....	35
Versão em português do artigo “Detection of <i>Bordetella pertussis</i> and <i>Bordetella parapertussis</i> by the Polymerase Chain Reaction and analysis of prevalence at Hospital de Clínicas in Porto Alegre”.....	52

INTRODUÇÃO

A coqueluche é uma doença endêmica do trato respiratório, com picos epidêmicos que ocorrem a cada 3 a 5 anos. A síndrome é caracterizada por tosse progressiva e ofegante, de rápida transmissão e altamente contagiosa, infectando de 80 a 90% dos contactantes. A bactéria *Bordetella pertussis*, um cocobacilo Gram negativo, é a principal responsável pela grande maioria dos casos de coqueluche, e causa os mais severos sintomas respiratórios dentre as outras espécies de *Bordetella* associadas à síndrome, como a *B. parapertussis*.

O diagnóstico laboratorial da coqueluche se baseia no isolamento da bactéria a partir de material das vias respiratórias, sendo a cultura considerada como padrão-ouro devido a sua alta especificidade. Entretanto, a sensibilidade do método depende de vários fatores, como técnicas apropriadas de coleta e processamento do material, idade e imunidade do paciente, estágio da doença e tratamento com agentes antimicrobianos. Além disso, estas espécies são nutricionalmente exigentes e de crescimento lento, o que torna o exame cultural um método diagnóstico de baixo impacto clínico. Faz-se necessário, portanto, o desenvolvimento de métodos laboratoriais mais sensíveis e rápidos, que facilitem o diagnóstico da coqueluche.

Os testes de amplificação dos ácidos nucleicos, como o da reação em cadeia da polimerase (PCR), são muito adequados para a detecção de organismos fastidiosos de importância clínica, mesmo em indivíduos assintomáticos. Assim, a identificação de *Bordetella* por PCR tem sido utilizada como uma alternativa promissora no diagnóstico da coqueluche visto a sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez. Vários protocolos de PCR desenvolvidos apresentam uma sensibilidade diagnóstica comparável, ou então muitas vezes superior à cultura. Mas as diferenças na escolha dos genes alvos, nos primers de amplificação, nos sistemas de detecção e na própria metodologia prescindem de uma padronização.

Portanto, há a necessidade de uma extensiva validação pelo laboratório antes deste exame ser oferecido para diagnóstico.

REVISÃO DA LITERATURA

1 GÊNERO *Bordetella*

1.1 Taxonomia e Descrição

O nome *Bordetella* foi proposto por J. Bordet e O. Gengou, que descreveram a bactéria *Bordetella pertussis* em 1906. O gênero *Bordetella* contém sete espécies: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium* e três espécies de descrição recente: *B. hinzii*, *B. holmesii* e *B. trematum* (1-4). No passado, diversos membros de *Bordetella* foram classificados em outros gêneros, como *Haemophilus*, *Brucella* e *Alcaligenes*. Embora a análise filogenética baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA tem demonstrado que *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* e *B. holmesii* são estreitamente relacionadas entre si, a literatura ainda se refere como sendo distintas as sete espécies, pois existem diferenças genéticas, fenotípicas e imunológicas entre elas (1,5). Em 2003, Parkhill et al. realizaram o seqüenciamento das espécies *B. bronchiseptica* RB50 (5.338.400 pb; 5.007 genes), *B. parapertussis* 12822 (4.773.551 pb; 4.404 genes) e *B. pertussis* Tohama I (4.086.186 pb; 3.816 genes), e suas análises indicaram que *B. pertussis* e *B. parapertussis* são derivados independentes de ancestrais de *B. bronchiseptica* (6), isto é, podem ser considerados clones de *B. bronchiseptica* que se adaptaram ao hospedeiro humano de forma relativamente recente (7).

Os membros do gênero se apresentam como cocobacilos Gram negativos em materiais clínicos primários, e nos subcultivos tendem a se tornar mais pleomórficos. São aeróbios obrigatórios, apresentam crescimento ótimo a 35 – 37 °C, não têm capacidade de fermentar os carboidratos e são inativos na maioria das provas bioquímicas. São imóveis, exceto *B. bronchiseptica*, *B. avium* e *B. hinzii*, que possuem flagelos peritríquios (1,5). *B.*

pertussis é a espécie mais fastidiosa, e seu crescimento é inibido por constituintes presentes em muitos meios de cultura, como ácidos graxos, íons metálicos, sulfetos e peróxidos. As características fenotípicas diferenciais de *Bordetella* spp. podem ser vistas no quadro:

Quadro: Características diferenciais de *Bordetella* spp.

Característica	Resposta ^a						
	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. hinzii</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. trematum</i>
Crescimento em Ágar sangue	-	+	+	+	+	+	+
Crescimento em Agar MacConkey	-	±	+	+	+	+	+
Oxidase	+	-	+	+	+	-	-
Redução nitrato	-	-	+	-	-	-	±
Produção de Urease	-	+(24h)	+(4h)	-	±	-	-
Motilidade 37°C	-	-	+	+	+	-	+
Produção de Catalase	+	+	+	+	+	+ ^b	+

^a Respostas: +, atividade ou crescimento presente; -, ausente; ±, pode estar presente ou ausente.

^b Algumas cepas podem apresentar reação fraca.

1.2 Fatores de Virulência

A espécie *B. pertussis* produz uma gama de fatores de virulência que são responsáveis por sua patogenia. A toxina pertussis (TP, também denominada fator promotor de linfocitose, pertussígeno, fator ativador de ilhotas e fator sensibilizador de histamina) é o principal fator de virulência. A hemaglutinina filamentosa (FHA) é uma

adesina que possui atividade hemaglutinante e medeia a aderência da bactéria às células ciliadas do trato respiratório superior; a pertactina, uma proteína de membrana externa da bactéria, pode atuar junto com a FHA para mediar a fixação da bactéria. A adenilato ciclase hemolisina pode suprimir a expressão de resposta imune local, inibindo a quimiotaxia dos neutrófilos e a fagocitose; a citotoxina traqueal (TCT) danifica as células epiteliais ciliadas, e pode ser responsável pela tosse característica da coqueluche clínica; a toxina termolábel (HLT), que produz inflamação local, e as fimbrias, que participam na fixação das bactérias às células efetoras (5,8). As espécies *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* produzem pertactina e FHA, e os genes promotores e estruturais para TP também estão presentes em ambas, mas não são expressos (1). Portanto, as diferenças na virulência das espécies podem ser devido à perda das funções regulatórias ou de controle dos genes (6).

Através da comparação genômica entre as espécies de *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* foi possível a análise da patogênese destas bactérias. Ao contrário do que se esperava, a grande virulência da espécie *B. pertussis* em humanos não se deve à aquisição de novos fatores de adaptação adquiridos, e sim a mecanismos de superexpressão de características virulentas (6)

1.3 Habitats

O ser humano é o único hospedeiro de *B. pertussis*, e apesar desta espécie ter sido considerada um patógeno restrito ao trato respiratório superior, sua detecção em macrófagos alveolares e isolamento em hemocultura indica seu potencial para infecção invasiva. *B. parapertussis*, apesar de ser patógeno apenas em humanos, também pode ser encontrado em ovelhas, mas a análise genotípica de cepas isoladas de humanos e ovinos mostra que estas são distintas entre si. *B. bronchiseptica* é encontrada no trato respiratório

de animais mamíferos selvagens e domésticos (o nome *bronchiseptica* deriva do grego *bronchus*, que significa “traquéia”) e *B. hinzii* em aves domésticas, mas ambas apenas ocasionalmente causam doenças em humanos. *B. avium* é um patógeno veterinário estrito, e *B. holmesii* e *B. trematum* raramente são associadas com infecções respiratórias e não respiratórias no homem (1,5).

Durante a evolução de *B. pertussis* e *B. parapertussis* verificou-se que muitas de suas características individuais ocorreram devido à inativação gênica em larga escala. Portanto, o limitado grupo de hospedeiros destas duas espécies, comparado com *B. bronchiseptica*, pode ser explicado pela perda de mecanismos de interação com novas classes de hospedeiros (6).

2 SÍNDROME COQUELUCHE

2.1 Incidência e Prevalência

A coqueluche é uma doença endêmica do trato respiratório, e uma das 10 causas mais comuns de morte por doenças infecciosas no mundo, com mais de 350000 óbitos anualmente, principalmente entre crianças muito jovens que ainda não completaram a primeira série de vacinação (9,10). Nos EUA, a incidência anual da coqueluche em crianças com menos de quatro meses de idade aumentou de 63,4 casos por 100.000 nos anos 80 para 88,7 casos por 100.000 nos anos 90, e entre crianças com menos de dois meses houve um aumento de 49% nestes mesmos períodos analisados (11). Durante os últimos 10 anos, em países desenvolvidos como Japão, EUA, Espanha e Alemanha, os casos reportados da doença variaram de 0,1 a 200 casos por 100.000 habitantes (10). Entre 1998 a 2000 foram registrados, nos EUA, mais de 7000 casos, com a ocorrência de surtos relatados em várias cidades

americanas (12-14). No Canadá, houve um aumento do número de casos de 1350 em 1984 para 10150 em 1994 (15).

No Brasil, no início da década de 80, foram notificados mais de 40 mil casos anuais e o coeficiente de incidência era superior a 30 casos por 100.000 habitantes. Esta incidência caiu a partir de 1983, quando se iniciou a vacinação sistemática das crianças brasileiras e mantém-se, desde então, com uma tendência decrescente. Em 1990 foram notificados 15.329 casos (10,64/100.000 habitantes), e a partir de 1996 o número de casos anuais não excedeu dois mil, com incidência em torno de 1/100.000 habitantes (16,17).

No Rio Grande do Sul, a partir de 1987, o coeficiente de incidência não ultrapassou 15 casos por 100.000 habitantes (18). Na região da Grande Porto Alegre, foram notificados 32 novos casos da doença no período de janeiro a julho de 2004, e foi emitido um alerta epidemiológico pela Vigilância em Saúde do Município de Porto Alegre devido ao aumento significativo do número de casos no início deste ano (19).

Embora a maioria dos casos de coqueluche reportados no mundo sejam de crianças, houve um aumento acentuado entre adolescentes e adultos (20). Investigações de surtos têm documentado que os adultos que desenvolvem a infecção podem transmiti-la a crianças susceptíveis ou outros adultos. Portanto, embora os programas de vacinação (que são direcionados para crianças) tenham reduzido em muito a incidência da doença na população infantil, os adolescentes e adultos tendem a permanecer como reservatórios da bactéria para crianças não vacinadas (21,22).

A partir da década de 80 foram realizados estudos que analisaram a prevalência da bactéria *B. pertussis* em adolescentes e adultos com sintomatologia inespecífica de doença do trato respiratório, caracterizado principalmente por tosse prolongada. Nos EUA, entre 1986 e 1989, Mink *et al.* verificaram uma porcentagem de 26% de infecção pela bactéria entre jovens universitários sintomáticos (23); em outras localidades norte-americanas, os dados citados nos

trabalhos de Wright *et al.* (Nashville), Nennig *et al.* (San Francisco) e Strebel *et al.* (Minnesota) mostram uma freqüência de 21, 12 e 13% de tosse prolongada em adultos devido à infecção (24-26). Na Alemanha, dois estudos realizados entre 1991 e 1994 mostraram uma prevalência de 15% e 11% em adultos que tiveram entre seus familiares um caso índice da doença, respectivamente (27,28). Na França, em 2002, um estudo que avaliou a prevalência da infecção em adultos sintomáticos confirmou em 32% destes a presença da bactéria, concluindo que, apesar da ampla cobertura da vacinação na população infantil, a coqueluche é mais comum em adultos do que se previa anteriormente, e a investigação de *B. pertussis* é importante no diagnóstico diferencial de doenças do trato respiratório (29).

2.2 Importância Clínica

A coqueluche é caracterizada por tosse progressiva e ofegante, de rápida transmissão e altamente contagiosa, infectando de 80 a 90% dos contactantes não-imunizados. O período de incubação da pertussis é geralmente de 7 a 10 dias, com duração de aproximadamente 4 a 21 dias. Os sintomas que se desenvolvem no decorrer do período de incubação podem ser classificados como típicos (clássicos) ou atípicos.

A síndrome clássica consiste de estágio catarral ou prodômico, com duração média de 1 a 2 semanas, o estágio paroxístico, de 1 a 6 semanas, e o estágio de convalescência, que pode se estender de 2 semanas a vários meses. A sintomatologia do paciente nas primeiras semanas é inespecífica, apresentando febre baixa e rinorréia. Neste período a doença é altamente contagiosa. A tosse aparece em uma fase tardia e se torna cada vez mais freqüente, se caracterizando por “tosse convulsiva” (estágio paroxístico) que finaliza com uma prolongada retomada respiratória audível ao término do acesso, com freqüência acompanhada por cianose e vômito. Durante o estágio de convalescência observa-se um declínio dos acessos e da severidade da tosse (1,5).

Os sintomas atípicos em crianças mais velhas e adultos consistem de tosse prolongada e inespecífica. O diagnóstico diferencial para coqueluche atípica inclui bronqueolites e infecção do trato respiratório superior causada por adenovírus, parainfluenza vírus, vírus sincicial respiratório, *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* (1).

A bactéria *B. pertussis* é a principal responsável pela grande maioria dos casos de coqueluche, e causa os mais severos sintomas respiratórios dentre as outras espécies de *Bordetella* associadas à síndrome. A infecção sintomática por *B. parapertussis* normalmente apresenta tosse inespecífica ou bronqueolite (30). *B. bronchiseptica* e *B. holmesii* têm sido relatadas como causas infrequentes da síndrome e outras doenças respiratórias (31-33).

3 VACINAÇÃO

Os estudos para o desenvolvimento de vacinas e tratamentos para a coqueluche iniciaram assim que o seu principal patógeno, a espécie *B. pertussis*, foi isolado. As primeiras vacinas consistiam de células bacterianas íntegras mortas, e verificou-se que havia uma correlação direta entre o número de organismos na vacina e a produção de anticorpos séricos, com aumento da proteção imunológica. Mas, também foi comprovado que a toxicidade aumentava proporcionalmente com a quantidade de bactérias na vacina (34,35).

Nos anos 30, muitos estudos foram realizados para desenvolvimento de vacinas com células íntegras, que eram preparadas por diferentes métodos. Neste período foi reconhecido que as condições da cultura, como o uso de sangue humano ao invés de sangue de cavalo, resultaria em produtos menos reatogênicos, mas continuavam com um alto número de células bacterianas. Em meados dos anos 40, foi desenvolvido um teste para a avaliação da eficácia e segurança das vacinas em modelos animais, o teste da potência em camundongos, pois até então estes parâmetros só eram avaliados em ensaios clínicos. A partir daí, vacinas

padronizadas por este teste foram extensivamente avaliadas em ensaios clínicos conduzidos, dentre outros, pelo British Medical Research Council após a 2ª Guerra (34).

Nos Estados Unidos, a rotina de imunização de crianças para coqueluche iniciou-se nos anos 40, com vacinas contendo células íntegras, e em 1947 foram avaliadas e recomendadas vacinas combinadas com toxinas da difteria e tétano (vacina DTC: difteria-tétano-coqueluche). A DTC é administrada em três doses intramusculares, sendo a primeira entre a 6ª e 8ª semana de vida, e os reforços são ministrados dos seis aos 12 meses e dos 4 aos 6 anos de idade (5,34).

A partir dos anos 50 esta prática de vacinação difundiu-se em vários países, reduzindo a incidência anual da doença onde a DTC era obrigatória. Na era pré-vacina, a proporção anual de casos reportados de coqueluche na população dos EUA era de 157 por 100.000 habitantes, reduzindo para <1 em 100.000 nos anos 70, anos após a implantação da rotina de vacinação. Mas, houve relatos de casos de encefalopatia grave e seqüelas neurológicas permanentes, que acarretaram na busca de vacinas isentas de células, ou “subunitárias” (34). O isolamento e a caracterização dos componentes celulares e dos fatores de virulência de *B. pertussis* permitiram elaborar diversas vacinas acelulares compostas por um ou mais antígenos. Sato *et al.*, em 1984 no Japão, foram os primeiros a desenvolverem vacinas acelulares com componentes quantificáveis (36). Desde então, foram licenciadas neste país seis diferentes vacinas para imunização de crianças (34).

Nos anos 90 foram realizados estudos para a determinação da eficácia das vacinas acelulares em diversos países. Na Suécia, em 1995, Trollfors *et al.* realizaram uma coorte prospectiva duplo-cega controlada por placebo onde avaliaram a vacina DTP (com TP inativada), e verificaram uma eficácia de 71% desta, concluindo que a vacina era segura e eficaz (37). No ano seguinte, no mesmo país, um outro estudo com o mesmo desenho comparando 3 tipos de vacinas (DTP acelulares de dois componentes, cinco componentes e

com células íntegras) concluiu que a vacina acelular com cinco componentes era a mais segura e com maior eficácia, de 85% (38). Na Itália, Greco *et al.* também compararam 3 tipos de vacinas (duas acelulares e uma com célula íntegra) quanto à toxicidade e eficácia, mas verificaram que não havia diferença entre as acelulares, independente da sua composição, e que estas eram as mais seguras e eficazes (39). Na Alemanha, três estudos realizados entre 1996 e 1998 avaliaram a eficácia de diferentes vacinas acelulares em crianças, e obtiveram índices de 83 a 93% (40-42). Em 2005, Ward *et al.* analisaram a eficácia da vacina acelular em adolescentes e adultos, e concluíram que esta não somente protegia contra a coqueluche como também poderia evitar a transmissão da doença às crianças (43).

Em 2004, uma equipe multidisciplinar internacional de especialistas – a Global Pertussis Initiative – publicou uma série de estratégias de vacinação para coqueluche além da infância, visando um controle de sua propagação. Dentre as recomendações propostas está a vacinação universal de adultos, visando a redução de morbidade neste grupo e principalmente a diminuição da transmissão da bactéria às crianças mais jovens (10).

4 DETECÇÃO DE *Bordetella*

4.1 Cultura

O isolamento da bactéria por cultura é considerado padrão-ouro para o diagnóstico da coqueluche, devido a sua alta especificidade (44-50). Como esta espécie se fixa preferencialmente ao epitélio ciliado do trato respiratório superior, a amostra de eleição deve ser obtida com *swab* ou por aspiração do material da nasofaringe. O *swab* deve ser de ponta fina com alginato de cálcio ou de dácron, pois os *swabs* de algodão inibem o crescimento destes microrganismos (5,44).

Para o isolamento de *B. pertussis*, em particular, é necessária a utilização de um meio seletivo com adição de carvão e resinas de troca iônica ou 15% a 20% de sangue para neutralizar os efeitos inibitórios, que ocorrem devido ao aumento de determinadas substâncias, como ácidos graxos insaturados, sulfetos, peróxidos e metais pesados. Como as bordetelas têm crescimento mais lento do que a maioria dos constituintes da flora normal da nasofaringe, um agente seletivo antimicrobiano é incorporado ao meio *Bordetella* para prevenir contaminações. Atualmente, a cefalexina é o agente de escolha, pois se mostrou superior à penicilina, meticilina, lincomicina e cefsulodina, mas não é incomum o crescimento de flora resistente à cefalexina (principalmente *H. influenzae*, enterococos e *Pseudomonas*). As placas devem ser inspecionadas diariamente, para crescimento de possíveis contaminantes. As colônias de *B. parapertussis* geralmente são visíveis após 2 a 3 dias de incubação, e colônias de *B. pertussis* após 3 a 4 dias, mas as placas devem ser incubadas por até 7 dias antes do exame cultural ser considerado negativo (1).

Enquanto a especificidade da cultura é muito alta, sua sensibilidade depende de uma série de fatores laboratoriais, tais como métodos apropriados de coleta, condições e duração do transporte do material, escolha do meio de cultura e agentes seletivos, condições adequadas de incubação e a experiência do profissional com o método. O sucesso da cultura também depende da idade do paciente (diminuição de positividade em adultos), do tratamento prévio com antimicrobianos (macrolídeos e tetraciclina), com o número de doses de vacinas recebidas e com o estágio da doença (a positividade é maior na fase catarral até o início da fase paroxística). Devido a todos estes fatores, a sensibilidade da cultura é baixa, especialmente na população com coqueluche atípica (1,44).

4.2 Imunofluorescência Direta

Além do exame cultural podem ser realizados provas de imunofluorescência direta (DFA) para detecção de *B. pertussis* em esfregaços preparados a partir de amostras nasofaríngeas, que promovem o mais rápido e simples diagnóstico de coqueluche. Mas, a detecção direta usando DFA apresenta uma baixa sensibilidade e especificidade; comparado com a cultura, a sensibilidade deste exame variou entre 11 e 71% (46,49,51,52). A especificidade do DFA é muito variável, devido a reações cruzadas com os reagentes imunológicos e à subjetividade na interpretação da fluorescência. Devido às suas limitações, o teste DFA poderia ser empregado somente como uma técnica adjunta à cultura ou PCR, e os resultados deveriam ser considerados presuntivos (1).

4.3 Provas Sorológicas

Os métodos sorológicos utilizados para detectar anticorpos contra *B. pertussis* incluem ELISA, aglutinação, fixação do complemento, imunoblotting, hemaglutinação indireta e neutralização de toxina, que se baseiam na detecção de anticorpos (Ac) aglutinantes, Ac frente a lisados bacterianos de células completas ou Ac contra antígenos (Ag) purificados. Durante a última década, o ELISA tem sido o método sorológico de escolha, que inclui este último tipo de Ag (1,53).

Os testes de ELISA têm sido usados para a dosagem dos níveis de IgA, IgG e IgM para PT, FHA, pertactina e fímbrias, e aproximadamente 90% dos pacientes infectados desenvolvem IgG para PT e FHA, embora esta última apresente epítomos que possam apresentar reação cruzada com outras bactérias, como *H. influenzae*. A sensibilidade

diagnóstica é muito dependente do momento de coleta da amostra e da escolha do Ag e da classe de imunoglobulina (1,44).

A sorologia para Ac IgG de PT e FHA é muito sensível para os casos da síndrome clássica, em particular na primeira infecção, mas são menos sensíveis nos membros contactantes e no casos atípicos, provavelmente devido à maior chance de resposta imune secundária. O diagnóstico em crianças vacinadas, entretanto, torna-se mais difícil, devido ao rápido aumento nas concentrações séricas dos Ac. A detecção de IgA para os diferentes Ag de *B. pertussis* têm sido descrita como um indicador de infecção, embora os Ac IgA também podem ser encontrados em indivíduos não vacinados e assintomáticos (44,45).

A especificidade das metodologias sorológicas descritas depende de cada ensaio em particular e do ponto de corte empregado. Por não haver somente um marcador sorológico identificado, há a necessidade de uma melhor padronização destes procedimentos para uma validação inter-laboratorial (44,53).

4.4 PCR

Os testes de amplificação dos ácidos nucleicos, como o da reação em cadeia da polimerase (PCR), são muito adequados para a detecção de organismos fastidiosos de importância clínica, mesmo em indivíduos assintomáticos. A identificação de *Bordetella* por PCR tem sido utilizada como uma alternativa promissora no diagnóstico da pertussis, visto a sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez (44,46,48,50,51,54-64). Em comparação à cultura, é um método mais rápido, pode apresentar resultados positivos para pacientes vacinados, sob pré-tratamento com antibióticos e em estágios mais tardios da doença. Entretanto, esta técnica é mais onerosa e sofisticada do que a cultura, e não permite distinguir entre organismos mortos ou viáveis (44).

Vários protocolos de PCR desenvolvidos apresentam uma sensibilidade diagnóstica comparável, ou então muitas vezes superior à cultura. Mas as diferenças na escolha dos genes alvos, nos primers de amplificação, nos sistemas de detecção e na própria metodologia prescindem de uma padronização. A não padronização da técnica pelo Food and Drug Administration (FDA) e a falta de testes comerciais de PCR para *Bordetella* são importantes vieses para a utilização desta técnica diagnóstica na prática laboratorial. Para contornar isto, faz-se necessária uma extensiva validação por parte do laboratório antes da implantação do exame na sua rotina (1).

Dentre os consensos recomendados para a utilização do PCR no diagnóstico da coqueluche, destacam-se a garantia de programas de controle de qualidade na execução da técnica, para a prevenção de resultados falso-positivos devido a contaminações por DNA amplificado, e a utilização de controles positivos e negativos (1). Em 1994, Taranger et al. detectaram amostras PCR-positivas para *Bordetella* provenientes de bancadas de salas onde eram aplicadas vacinas e de roupas e mãos da equipe técnica (44). Portanto, o estabelecimento de um fluxo de trabalho unidirecional, de uma área livre de DNA para a preparação dos reagentes, outra para o processamento da amostra e, por fim, para a área onde a amplificação e detecção ocorrem, pode minimizar essas contaminações. Para cada área deve-se designar todo o equipamento necessário para a realização de cada etapa do protocolo de PCR e para a descontaminação de áreas e superfícies de trabalho, é recomendado a utilização de solução de hipoclorito de sódio a 2 a 10% e a exposição à luz UV (65).

Os seguintes fatores são descritos como possíveis causas de resultados falso-negativos na técnica de PCR: número insuficiente de organismos na nasofaringe ou no material devido à coleta inadequada, estágio muito inicial ou tardio da doença, presença de um agente inibidor, perda ou dano do DNA devido a más condições de armazenamento, problemas com a execução da técnica e baixa sensibilidade do sistema de detecção do DNA amplificado (44).

Os primers descritos para utilização na técnica podem amplificar as seguintes regiões de DNA cromossomal: região promotora da TP (específica para *B. pertussis*), região do gene da porina, seqüências de inserção (IS) repetidas IS481 de *B. pertussis* e IS1001 de *B. parapertussis* e gene da toxina adenilato ciclase. As IS vêm sendo relatadas em sua utilização como DNA alvo como sendo mais sensíveis do que a região promotora da TP, mas alguns estudos têm mostrado sensibilidade das IS comparáveis com o gene da porina (66) e à região da TP (67). De acordo com Van der Zee et al., o número de cópias da IS481 em *B. pertussis* é de aproximadamente 100, e da IS1001 em *B. parapertussis* varia em torno de 20 cópias (7), mas com o seqüenciamento de *B. pertussis* em 2003 foi verificada a presença de 238 cópias da IS481 (6).

Vários protocolos de PCR vêm sendo descritos, dentre estes os ensaios de PCR nested. Estes consistem de duas reações de PCR consecutivas, sendo que o produto da primeira amplificação servirá como alvo para a segunda, pois os primers da segunda amplificação estão localizados internamente aos iniciadores da primeira (61,68). Embora sejam altamente sensíveis e específicos, estes ensaios estão mais sujeitos a contaminação do que as reações não-nested (1,44). Recentemente, novos formatos de PCR baseados na detecção em tempo real do produto amplificado (Real-time PCR) estão sendo desenvolvidos (63,69-74). A técnica emprega o uso de duas sondas de hibridização conjugadas com fluoróforos que permitem a detecção da seqüência específica pela fluorescência emitida. Esta técnica reduz o tempo do resultado e o risco de contaminações, por não necessitar da etapa de revelação do produto amplificado (75).

OBJETIVOS

Desenvolver a técnica de PCR para detecção das bactérias *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* em amostras clínicas.

Analisar a prevalência destas bactérias em uma amostra de pacientes pediátricos atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. **Loeffelholz, M.** 2003. Bordetella, p. 780-788. *In* P. Murray, E. Baron, J. Jorgensen, M. Pfaller, and R. Tenover (eds.), Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington, D.C.
2. **Vandamme, P., J. Hommez, M. Vancanneyt, M. Monsieurs, B. Hoste, B. Cookson, C. Wirsing vonKonig, K. Kersters, and P. Blackall.** 1995. Bordetella hinzii sp. nov., isolated from poultry and humans. Int.J.Syst.Bacteriol. **45**:37-45.
3. **Weyant, RS, Hollis, DG, Weaver, RE, Amin, MF, Steigerwalt, AG, O'Connor, SP, Whitney, A, Daneshvar, MI, Moss, CW, and Brenner, DJ.** 1995. Bordetella holmesii sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. J Clin Microbiol. **33**: 1-7.
4. **Vandamme, P., M. Heyndrickx, M. Vancanneyt, B. Hoste, P. De Vos, E. Falsen, K. Kersters, and K. Hinz.** 1996. Bordetella trematum sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of Alcaligenes denitrificans Ranger and Tan 1983. Int J Syst Bacteriol. **46**:849-858.
5. **Koneman, E., W. Janda, P. Schreckenberger, and W. Winn Jr.** 2001. Diagnóstico Microbiológico. Medsi, Rio de Janeiro, RJ.
6. **Parkwill, J., M. Sebahia, A. Preston, L. Murphy, N. Thomson, D. Harris, M. Holden, C. Churcher, S. Bentley, K. Mungall, A. Cerdeño-Tárraga, L. Temple, K. James, B. Hassis, and M. Quail.** 2003. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. Nat Genet **35**:32-40.

7. **van der Zee, A., F. Mooi, J. Embden, and J. Musser.** 1997. Molecular Evolution and Host Adaptation of *Bordetella* spp.: Phylogenetic Analysis Using Multilocus Enzyme Electrophoresis and Typing with Three Insertion Sequences. *J Clin Microbiol* **179**:6609-6617.
8. **Hewlett, E.** 1999. A commentary on the pathogenesis of Pertussis. *Clin Infect Dis* **28**:S94-S98.
9. **Kerr, J. and R. Matthews.** 2000. *Bordetella pertussis* infection: pathogenesis, diagnosis, management, and the role of protective immunity. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* **19**:77-88.
10. **Forsyth, K., M. Marti, J. Caro, J. Cherry, D. Greenberg, N. Guiso, U. Heininger, J. Schellenkens, T. Tan, C. Wirsing vonKonig, and S. Plotkin.** 2004. New pertussis vaccination strategies beyond infancy: recommendations by the global pertussis initiative. *Clin Infect Dis* **39**:1802-1809.
11. **Tanaka, M., C. Vitek, F. Pascual, K. Bisgard, J. Tate, and T. Murphy.** 2003. Trends in pertussis among infants in the United States, 1980-1999. *JAMA* **290**:2968-2975.
12. **Lievano, F., M. Reynolds, A. Waring, J. Ackelsberg, K. Bisgard, G. Sanden, D. Guris, A. Golaz, D. Bopp, R. Limberg, and P. Smith.** 2002. Issues associated with and recommendations for using PCR to detect outbreaks of Pertussis. *J Clin Microbiol* **40**:2801-2805.
13. **Cherry, J.** 1999. Epidemiological, Clinical, and Laboratory aspects of Pertussis in adults. *Clin Infect Dis* **28**:S112-S117.

14. **Brennan, M., P. Strebel, H. George, W. Yit, R. Tachdjian, S. Lett, P. Cassidy, G. Sanden, and M. Wharton.** 2000. Evidence for transmission of Pertussis in schools, Massachusetts, 1996: Epidemiologic data supported by Pulsed-Field Gel Electrophoresis studies. *J Infect Dis* **181**:210-215.
15. 1996. Notifiable Diseases Annual Summary. *Can.Comm.Dis.Rep.* **24**:21-23.
16. **Luz, P., C. Codeço, and G. Werneck.** 2003. A reemergência da coqueluche em países desenvolvidos: um problema também para o Brasil? *Cad. Saúde Pública* **19**:1209-1203.
17. Ministério da Saúde. Coqueluche: Situação da doença no Brasil. http://portalweb05.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=22039 . 31-1-2006.
18. Secretaria da Saúde - Rio Grande do Sul. Coqueluche: coeficiente geral de incidência e cobertura vacinal de DPT em menores de 1 ano, RS, 1973-2002. <http://www.saude.rs.gov.br/cevs/documentos/coquelucche.pdf> . 20-3-2006.
19. 2004. Alerta Epidemiológico. Boletim Epidemiológico - Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre **Ano VI**.
20. **Senzilet, L., S. Halperin, J. Spika, M. Alagaratnan, A. Morris, and B. Smith.** 2001. Pertussis is a frequent cause of prolonged cough illness in adults and adolescents. *Clin Infect Dis* **32**:1691-1697.
21. **Yaari, E., Y. Zimmerman, P. Schwartz, P. Slater, P. Shvartzman, N. Andoren, D. Bransky, and E. Keren.** 1999. Clinical manifestations of *Bordetella pertussis* infection in immunized children and young adults. *Chest* **115**:1254-1258.

22. **Bisgard, K., C. Christie, S. Reising, G. Sanden, P. Cassidy, C. Gomersall, W. Wattignei, N. Roberts, and P. Strebel.** 2001. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis profile: Cincinnati, 1989-1996. *J Infect Dis* **183**:1360-1367.
23. **Mink, C., J. Cherry, P. Christenson, K. Lewis, E. Pineda, D. Shilian, J. Dawson, and D. Blumberg.** 1992. A search for *Bordetella pertussis* infection in university students. *Clin Infect Dis* **14**:464-471.
24. **Wright, S., K. Edward, M. Decker, and M. Zeldin.** 1995. Pertussis infection in adults with persistent cough. *JAMA* **273**:1044-1046.
25. **Nennig, M., H. Shinefield, K. Edward, S. Black, and B. Fireman.** 1996. Prevalence and incidence of adult pertussis in an urban population. *JAMA* **275**:1672-1674.
26. **Strebel, P., J. Nordin, K. Edward, J. Hunt, J. Besser, S. Burns, G. Amundson, A. Baughman, and W. Wattignei.** 2001. Population-based incidence of pertussis among adolescents and adults, Minnesota, 1995-1996. *J Infect Dis* **183**:1353-1359.
27. **Wirsing vonKonig, C., S. Postels-Multani, H. Bock, and H. Schmitt.** 1995. Pertussis in adults: frequency of transmission after household exposure. *Lancet* **346**:1326-1329.
28. **Schmitt-Grohé, S., J. Cherry, U. Heininger, M. Überall, E. Pineda, and K. Stehr.** 1995. Pertussis in German adults. *Clin Infect Dis* **21**:860-866.
29. **Gilberg, S., E. Njamkepo, I. du Châtelet, H. Partouche, P. Gueirard, C. Ghasarossian, M. Schlumberger, and N. Guiso.** 2002. Evidence of *Bordetella*

- pertussis* infection in adults presenting with persistent cough in a french area with very high whole-cell vaccine coverage. J Infect Dis **186**:415-418.
30. **Mastrantonio, P., P. Stefanelli, M. Giuliano, Y. Herrera Hojas, M. Atti, A. Anemona, and A. Tozzi.** 1998. *Bordetella parapertussis* infection in children: epidemiology, clinical symptoms, and molecular characteristics of isolates. J Clin Microbiol **36**:999-1002.
 31. **Tang, Y., M. Hopkins, C. Kolbert, P. Hartley, P. Severance, and D. Persing.** 1998. *Bordetella holmesii*-like organisms associated with septicemia, endocarditis, and respiratory failure. Clin Infect Dis. **26**:389-92
 32. **Mazengia, E., E. Silva, J. Peppe, R. Timperi, and H. George.** 2000. Recovery of *Bordetella holmesii* from patients with pertussis-like symptoms: use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize circulating strains. J Clin Microbiol **38**:2330-2333.
 33. **Russell, F., J. Davis, M. Whipp, P. Janssen, P. Ward, J. Vyas, M. Starr, S. Sawyer, and N. Curtis.** 2001. Severe *Bordetella holmesii* infection in a previously healthy adolescent confirmed by gene sequence analysis. Clin Infect Dis **33**:129-130.
 34. **Mattoo, S. and J. Cherry.** 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. Clin Microbiol Rev **18**:326-382.
 35. **Cherry, J.** 1996. Historical review of pertussis and the classical vaccine. J Infect Dis **174**:S259-S263.
 36. **Sato, Y., M. Kimura, and H. Fukumi.** 1984. Development of a pertussis component vaccine in Japan. Lancet **1**:122-126.

37. **Trollfors, B., J. Taranger, T. Lagergard, L. Lind, V. Sundh, G. Zackrisson, C. Lowe, W. Blackwelder, and J. Robbins.** 1995. A placebo-controlled trial of a pertussis-toxoid vaccine. *N Engl J Med* **333**:1045-1050.
38. **Gustafsson, L., H. Hallander, P. Olin, E. Reizenstein, and J. Storsaeter.** 1996. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N Engl J Med* **334**:349-355.
39. **Grecco, D., S. Salmaso, P. Mastrantonio, M. Giuliano, A. Tozzi, A. Anemona, M. Atti, A. Giammanco, P. Panei, W. Blackwelder, D. Klein, and S. Wassilak.** 1996. A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. *N Engl J Med* **334**:341-348.
40. **Stehr, K., J. Cherry, U. Heininger, S. Schmitt-Grohé, M. Überall, S. Laussucq, T. Eckhardt, M. Meyer, R. Engelhardt, and P. Christenson.** 1998. A comparative efficacy trial in Germany in infants who received either the Lederle/Takeda acellular pertussis component DTP (DTaP) vaccine, the Lederle whole-cell component DTP vaccine, or DT vaccine. *Pediatrics* **101**:1-11.
41. **Schmitt, H., C. Wirsing vonKonig, A. Neiss, H. Bogaerts, H. Bock, H. Schulte-Wissermann, M. Gahr, R. Schult, J. Folkens, W. Rauh, and R. Clemens.** 1996. Efficacy of acellular pertussis vaccine in early childhood after household exposure. *JAMA* **275**:37-41.
42. **Liese, J., C. Meschievitz, E. Harzer, J. Froeschele, P. Hosbach, J. Hoppe, F. Porter, S. Stojanov, K. Niinivaara, A. Walker, and B. Belohradsky.** 1997. Efficacy of a two-component acellular pertussis vaccine in infants. *Pediatr Infect Dis J.* **16**:1038-1044.

43. **Ward, P., J. Cherry, S. Chang, S. Partridge, H. Lee, J. Treanor, D. Greenberg, W. Keitel, S. Barenkamp, D. Bernstein, K. Edelman, and K. Edward.** 2006. Efficacy of an acellular pertussis vaccine among adolescents and adults. *N Engl J Med* **353**:1555-1563.
44. **Müller, F., J. Hoppe, and C. König.** 1997. Laboratory diagnosis of pertussis: state of the art in 1997. *J Clin Microbiol* **35**:2435-2443.
45. **Hallander, H.** 1999. Microbiological and serological diagnosis of pertussis. *Clin Infect Dis* **28**:S99-S106.
46. **Loeffelholz, M., C. Thompson, K. Long, and M. Gilchrist.** 1999. Comparison of PCR, culture, and direct fluorescent-antibody testing for detection of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* **37**:2872-2876.
47. **Mooi, F., H. Hallander, C. König, B. Hoet, and N. Guiso.** 2000. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: Recommendations for a standard methodology. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* **19**:174-181.
48. **Heininger, U., G. Schöpfer, J. Cherry, and K. Stehr.** 2000. Clinical validation of a PCR assay for the diagnosis of pertussis by comparison with serology, culture and symptoms during a large pertussis vaccine efficacy trial. *Pediatrics* **105**.
49. **Tilley, P., M. Kanchana, I. Knight, J. Blondeau, N. Antonishyn, and H. Deneer.** 2000. Detection of *Bordetella pertussis* in a clinical laboratory by culture, PCR, and direct fluorescent antibody staining; accuracy, and cost. *Diagn Microbiol Infect Dis* **37**:17-23.

50. **Dragsted, D., B. Dohn, J. Madsen, and J. Jensen.** 2004. Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. *J Med Microbiol* **53**:749-754.
51. **Lingappa, J., W. Lawrence, S. West-Keefe, R. Gautom, and B. Cookson.** 2002. Diagnosis of community-acquired pertussis infection: comparison of both culture and fluorescence-antibody assays with PCR detection using electrophoresis or Dot Blot hybridization. *J Clin Microbiol* **40**:2908-2911.
52. **McGowan, K.** 2002. Diagnostic tests for pertussis: Culture vs. DFA vs. PCR. *Clin Microbiol Newslett* **24**:143-149.
53. **Moreno, J. and F. Manchón.** 2002. Diagnóstico de laboratorio de tos ferina. Papel de la serología. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* **20**:212-218.
54. **Reizenstein, E., B. Johansson, L. Mardin, J. Abens, R. Möllby, and H. Hallander.** 1993. Diagnostic evaluation of PCR discriminative for *B. pertussis*, *B. parapertussis*, and *B. bronchiseptica*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **17**:185-191.
55. **van der Zee, A., C. Agterberg, M. Peeters, J. Schellenkens, and F. Mooi.** 1993. Polymerase Chain Reaction assay for pertussis: simultaneous detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *J Clin Microbiol* **31**:2134-2140.
56. **Buck, G.** 1996. Detection of *Bordetella pertussis* by Rapid-Cycle PCR and colorimetric Microwell hybridization. *J Clin Microbiol* **34**:1355-1358.

57. **Stefanelli, P., M. Giuliano, M. Bottone, P. Spigaglia, and P. Mastrantonio.** 1996. PCR for the identification of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **24**:197-200.
58. **Wadowsky, R., R. Michaels, T. Libert, L. Kingsley, and G. Ehrlich.** 1996. Multiplex PCR-based assay for detection of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swab species. *J Clin Microbiol* **34**:2645-2649.
59. **Brandberg, L., C. Olsson, T. Lagergard, J. Taranger, B. Trollfors, and G. Zackrisson.** 1998. Evaluation of PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections. *J Clin Microbiol* **36**:679-683.
60. **Dorson, O. and F. Doucet-Populaire.** 1999. Le diagnostic biologique de la coqueluche par PCR. *J.Pédiatr.Puériculture* **12**:474-479.
61. **Farrell, D., G. Daggard, and T. Mukkur.** 1999. Nested duplex PCR to detect *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* and its application in diagnosis of pertussis in Nonmetropolitan Southeast Queensland, Australia. *J Clin Microbiol* **37**:606-610.
62. **Farrell, D., M. McKeon, G. Daggard, M. Loeffelholz, C. Thompson, and T. Mukkur.** 2000. Rapid-Cycle PCR method to detect *Bordetella pertussis* that fulfills all consensus recommendations for use of PCR in diagnosis of pertussis. *J Clin Microbiol* **38**:4499-4502.
63. **Kösters, K., U. Reischel, J. Schmetz, M. Riffelmann, and C. König.** 2002. Real-Time Light-Cycle PCR for detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *J Clin Microbiol* **40**:1719-1722.

64. **Guiso, N.** 2003. Coqueluche: diagnostics biologiques. Arch Pediatr **10**:928-931.
65. **Nolte, S. and A. Caliendo.** 2003. Molecular detection and identification of microorganisms, p. 234-256. *In* Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington, D. C.
66. **Farrell, DJ, McKeon, M, Daggard, G, Loeffelholz, MJ, Thompson, CJ, and Mukkur, TKS.** 2000. Rapid-Cycle PCR method to detect *Bordetella pertussis* that fulfills all consensus recommendations for use of PCR in diagnosis of pertussis. J Clin Microbiol. **38**:4499-4502.
67. **Qin, X., D. Turgeon, B. Ingersoll, P. Monsaas, C. Lemoine, T. Tsosie, L. Stapp, and P. Abe.** 2002. *Bordetella pertussis* PCR: simultaneous targeting of signature sequences. Diagn Microbiol Infect Dis **43**:269-275.
68. **Reizenstein, E., L. Lindberg, R. Möllby, and H. Hallander.** 1996. Validation of nested *Bordetella* PCR in pertussis vaccine trial. J Clin Microbiol **34**:810-815.
69. **Mäkinen, J., M. Viljanen, J. Mertsola, H. Arvilommi, and Q. He.** 2001. Rapid identification of *Bordetella pertussis* pertactin genes variants using LightCycler real time PCR combined with melting curve analysis and gel electrophoresis. Emerg Infect Dis. **7**:952-958.
70. **Reischel, U., N. Lehn, G. Sanden, and M. Loeffelholz.** 2001. Real-Time PCR assay targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and molecular basis for detecting *Bordetella holmesii*. J Clin Microbiol **39**:1963-1966.
71. **Mäkinen, J., J. Mertsola, M. Viljanen, H. Arvilommi, and Q. He.** 2002. Rapid typing of *Bordetella pertussis* pertussis toxin gene variants by LightCycler Real Time

- PCR and fluorescence resonance energy transfer hybridization probe melting curve analysis. *J Clin Microbiol* **40**:2213-2216.
72. **Anderson, T., K. Beynon, and D. Murdoch.** 2003. Comparison of real-time PCR and conventional hemi-nested PCR for the detection of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal samples. *Clin.Microbiol.Infect.* **9**:746-749.
73. **Poddar, S.** 2003. Detection and discrimination of *B. pertussis* and *B. holmesii* by real-time PCR targeting IS481 using a beacon probe and probe-target melting analysis. *Mol Cell Probes* **17**:91-98.
74. **Templeton, K., S. Scheltinga, A. van der Zee, B. Dieren, A. Krujissen, H. Goosens, E. Kuijper, and E. Claas.** 2003. Evaluation of real-time PCR for detection of and discrimination between *B. pertussis*, *B. parapertussis*, and *B. holmesii* for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol* **41**:4121-4126.
75. **Cotrin, P.** 2001. Métodos de Biologia Molecular e de DNA Recombinante, p. 49-59. *In* A. Ferreira and S. Ávila (eds.), *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes.*

Detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* by the Polymerase Chain
Reaction and analysis of prevalence at Hospital de Clínicas in Porto Alegre

Daniela de Souza Martins*, Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado*, Marisa Chesky*,
Paulo Antonacci Carvalho** and Afonso Luís Barth*

*Microbiology Unit – Service of Clinical Pathology

**Medicine Faculty UFRGS

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

Author for correspondence:

Afonso Luís Barth

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Microbiology and Molecular Biology Unit – Service of Clinical Pathology

Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre – RS – Brasil, CEP 90035-903

Phone/Fax: (+51) 2101-8607 - E-mail: albarth@hcpa.ufrgs.br

Abstract

A polymerase chain reaction (PCR) assay which allows the simultaneous detection and discrimination of the two causative agents of whooping cough, *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*, was developed. Primer pairs were based on insertion sequence elements *IS481* for *B. pertussis* and *IS1001* for *B. parapertussis*. Discrimination of amplified DNA derived from these species was accomplished by differential spacing of the primers. The sensitivity of the combined PCR method was found to be very high and allowed the detection of 1 CFU/100 μ L of sample for *B. pertussis* and 10 CFU/100 μ L for *B. parapertussis*. This assay allowed to determinate the prevalence of these bacteria in a population of pediatric patients treated at Hospital de Clínicas in Porto Alegre (HCPA), a federal university hospital in southern Brazil. During July 2004 to May 2005 were analyzed 86 clinical samples derived from patients attending to HCPA with clinical symptoms of whooping cough, and 37 (43%) were positive to *B. pertussis*. In order to assess the prevalence in patients where there were no clear clinical symptoms of syndrome, 80 consecutives samples were analyzed, and only one (1.45%) was positive to *B. pertussis*. The PCR assay developed proved to be an important tool in the laboratorial diagnosis of whooping cough in symptomatic patients due to the rapid and accurate detection.

Keywords: *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, PCR, prevalence.

INTRODUCTION

Whooping cough is a disease of the respiratory tract caused mainly by *Bordetella pertussis* (1,2). Nine species of *Bordetella* have been identified, but only three members of the genus were associated to the infection in humans, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, and *B. holmesii*, but the last two are reported as infrequent causes of the syndrome (3). Despite the extensive vaccination programs, the disease is still endemic in various parts of the world, affecting mainly partially-vaccinated or unvaccinated children (3).

In children, the clinical symptoms of the whooping cough are typical, but in newborns and adults this respiratory disease may present general symptoms. Therefore the diagnosis of whooping cough in newborns and adults patients requires the use of laboratory tests. The culture is considered the gold-standard due to high specificity (100%) related to the disease, however its sensitivity varies greatly (6 to 95%) (4,5). The sensitivity of the culture depends on sample collection and processing and the patient conditions. Moreover, the result of bacteriological culture may require 3 to 12 days to be obtained (1,6). The direct immunofluorescence (DFA) which is performed in a shorter period presents a low sensitivity and specificity. On the other hand, the serology by ELISA for detecting antibodies against *B. pertussis* may be sensitive and specific, but the main problem is to obtain a sample in the acute phase of the disease. Moreover, the diagnostic by serology is highly influenced by vaccination children and needs sequential samples of the patient (6,7).

The polymerase chain reaction (PCR) for detecting *Bordetella* has been a promising alternative for diagnosing whooping cough due to its quickness and superior sensitivity to the culture (3,8). However, factors such as the choice of specific regions of the DNA sequence of the bacteria that will be amplified are fundamental for the sensibility and specificity of the assay. The repeated insertion sequence IS481, specific for *B. pertussis*, has been used

successfully in detecting this bacteria by PCR, as well as *IS1001* for *B. parapertussis* and *B. bronchiseptica* (9,10).

This work describes the development of a PCR protocol for the simultaneous detection of DNA of *B. pertussis* and *B. parapertussis* based on these specific sequences which allowed the discrimination between the two pathogens. We also performed a study of prevalence of these bacteria in a population of pediatric patients attending at Hospital de Clínicas in Porto Alegre (HCPA).

MATERIALS AND METHODS

Standardization

For the standardization of the PCR protocol, type strains of *B. pertussis* and *B. parapertussis* were used as positive controls. The isolates were grown on Charcoal-Agar (Oxoid) with 10% of horse blood and 20µg of cephalexin incubated aerobically at 37°C for up to 7 days. The colonies with typical morphology of the genus were evaluated by gram staining, production of oxidase, and serology with specific anti-sera (Difco®) for the two species of *Bordetella*.

PCR

The DNA of the samples was extracted with the commercial kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®, Germany) according to the manufacturer's instructions. The pairs of primers were based on the insertion sequences *IS481* and *IS1001*. BP1 (5'-GGG GTC ACC GCG CCG ACT GT-3') and BP4 (5'-GGG CCT GAT GCT CGT AGC GC-3') corresponding to the base pairs (bp) 208 to 228 and 476 to 496 of the *B. pertussis* *IS481*. The primers BPPA (5'-CGC CGC TTG ATG ACC TTG ATA-3') and BPPZ (5'-CAC CGC CTA CGA GTT GGA GAT C-3'), based on the *B. parapertussis* *IS1001*, correspond to the bp 1211 to 1232 and to

the pb 734 to 735, respectively (9). Due to the fact that the target DNA for the PCR of *B. pertussis* (IS481) is present in at least 80 copies per genome while that of the *B. parapertussis* (IS1001) is of 20 copies, the concentration of the primers was adjusted so that a preferential amplification would not occur by the DNA of *B. pertussis*. This effect was then minimized when 4pmol and 16pmol of primers was added to the mix of the reaction for detection of *B. pertussis* and *B. parapertussis*, respectively, in a rate of 1:4 (9).

Five microliters of DNA extracted from the samples were added to 20µL of a master mix (prepared immediately before use) containing 2.5µL of 10x PCR buffer (with 1.5mM of MgCl₂), 200µL of each dNTP, 4pmol of the primers BP1 and BP4, 16pmol of the primers BPPA and BPPZ, and 1.25U of enzyme Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen). The amplification was performed using the thermocycler MJR® with the following parameters: 40 cycles of 1 min at 95°C, 1.5 min at 65°C and 2 min at 72°C, followed by 1 cycle of 5 min at 72°C. The amplified products were detected after electrophoresis in 1% agarose gel containing 0.5 µL of ethidium bromide per mL and the visualization of DNA fragments of 288 bp and of 498 bp indicated the presence of *B. pertussis* and *B. parapertussis*, respectively.

The assay was evaluated for specificity using isolates of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Streptococcus oralis*.

Detection limits

Based on the positive controls obtained from *B. pertussis* and *B. parapertussis*, a suspension of 0.5 MacFarland (1x10⁸ UFC/mL) was diluted ten fold from 10⁷ to 10¹ UFC/mL. Viable counts of the dilutions were performed in order to confirm the presence of viable colonies in the suspensions. The DNA from these suspensions was extracted with the Qiagen® commercial kit and tested in the PCR protocol as above.

Validation of PCR assay

The validation of PCR assay was established according to the test of 10 blind samples (A001 to A010) sent to our laboratory by a reference laboratory (University of Mainz, Germany).

Evaluation of Inhibitors to the PCR in Clinical Samples

To study possible inhibitory effects on the PCR by compounds present in clinical samples, 1µL of DNA extracted from *B. pertussis* and *B. paraptussis* (10^6 UFC/mL) were diluted in 4µL of nasopharyngeal aspirate derived from 20 different healthy persons. Subsequently, the samples were used for PCR.

Clinical Samples

1. Inclusion Criteria

In order to determine prevalence of whooping cough in patients attending to HCPA with clinical symptoms of the syndrome, 86 samples of nasopharyngeal aspirate obtained from July 2004 to May 2005 were analyzed. In order to assess the prevalence of cases of whooping cough in patients where there were no clear clinical symptoms of whooping cough, 80 consecutive samples (between August and September 2004) were analyzed. These samples included nasopharyngeal aspirate from pediatric patients treated at HCPA with clinical symptoms of bronchiolitis due to respiratory viruses.

2. Sample Size

A pilot study developed in our institution indicated that 5.7% (2/35) of positive results for *B. pertussis* among patients with clinical symptoms of whooping cough. Thus, to detect a

prevalence of 6% of positive cases and considering 95% of confidence interval ($\alpha=0.05$), a total of 87 samples was established as a sample size.

3. Statistical Analysis

Frequency distributions were determined with the statistical package, SPSS 10.12. Reporting rates, with 95% confidence intervals (95% CI), were calculated. Differences between reporting rates were determined using the Chi-Square test for independence.

RESULTS

Detection limit (analytical sensitivity)

The analytical sensitivity of the PCR assay was established by extraction and amplification of a series of dilutions of bacterial suspensions in water. This methodology allowed the detection of DNA of *B. pertussis* in all suspensions tested (from 10^8 to 10^1 UFC/mL). On the other hand, DNA of *B. parapertussis* was detected only from 10^8 to 10^2 UFC/mL.

Analytical Specificity

The PCR assay proved to be specific because no DNA amplification was obtained using bacteria (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis*) other than *Bordetella*.

Validation of PCR assay

DNA of *B. pertussis* was detected in samples A001, A003, A007, and A009 (figure 1). The results were sent to the reference laboratory and presented 100% of specificity.

Evaluation of Inhibitors to the PCR in Clinical Samples

After amplification by PCR, no loss of sensitivity to detect *B. pertussis* and *B. parapertussis* was observed.

Evaluation of the PCR in Clinical Samples

Of the total of 86 patients treated at HCPA with clinical symptoms of whooping cough from July 2004 to May 2005, 37 presented a positive result for *B. pertussis*, indicating a prevalence of 43% ($p < 0.005$). The positive patients analyzed included mostly children under the age of six months (average: 3.86 ± 2.60), as follows: 6 (16.2%) of ambulatory origin, 26 (70.2%) from the pediatric unit, and 5 (13.5%) from the pediatric ICU. There was a clear seasonal distribution of prevalence as during the months of December, 2004 to February, 2005, when we found a prevalence of 82.6% (19/23) in contrast to the other periods (July to November, 2004 and March to May, 2005), when we found only 28.5% (18/63) of prevalence (figure 2).

Of the 80 consecutive patients in whom there was no clear clinical symptoms of whooping cough, only one sample (1.25%) was positive for *B. pertussis* according to the PCR protocol described. The patients were of ambulatory origin (46.3%), hospitalization (42.5%), and pediatric ICU (11.25%), and presented an average age of $3.24 \text{ months} \pm 1.84$.

DISCUSSION

The laboratory test diagnostic for whooping cough by bacteriological culture of bacteria from the respiratory tract is considered as the gold standard due to its high specificity, though its sensitivity has shown to be very variable (6,7).

The utilization of a molecular assay based on the amplification of a specific DNA sequence of a pathogen theoretically allows the detection of a single bacterium. In fact, the

use of a DNA sequence in multiple copies in the chromosome as a target allows an increase in sensitivity when compared to a single copy of the bacterial genome. The sequences of repeated insertions *IS481* and *IS1001* have been used as the target for *B. pertussis* and *B. parapertussis*, respectively. Some studies used PCR Real-Time have report detection limits that vary from 1 to 10 UFC/mL for *B. pertussis* and 5 to 10 UFC/mL for *B. parapertussis* (11-15). In our study, the analytical sensitivity was similar (1 and 10 UFC/mL for *B. pertussis* and *B. parapertussis*) using a conventional PCR assay. This would indicate that the sensitivity of the PCR does not depend on the detection method used.

The evaluation of false-positive results by the possible interference of bacteria present in the upper respiratory tract was analyzed with *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Streptococcus oralis*, bacteria common to the oral flora. The results obtained shows that none of these pathogens influenced the technique, which means that it proved to be specific for the detection of *B. pertussis* and *B. parapertussis*. However, this study did not evaluate rates of sensitivity and specificity because the PCR has not been compared with a gold standard, which many authors cite as being the isolation of the bacteria in a culture (3,4,6,7,15-20). But it is important to point out that despite this, the protocol analyzed was considered valid after applied to a series of blind samples sent by a reference center.

The prevalence of the *Bordetella* bacteria may vary according to different regions and especially according to the disease's seasonality, presence of outbreaks, and even by the difference in the methods to detect the pathogen. Mattoo *et al.* compared 13 studies performed in six countries and showed that there is a great variation in the percentage of the respiratory disease due to infection from *B. pertussis* in adolescents and adults (17 to 52%), which was attributed to the above factors (3).

The data described in patients that there were clear clinical symptoms showed a high prevalence (43%) with an increase of cases from December to February, confirming the

seasonal distribution of syndrome. This percentage was very high, especially when compared with data from international literature as well as with data from HCPA during the same period of the following year. The reason for the high prevalence in the period analyzed was due to an outbreak that occurred in the city of Porto Alegre, according to data from the local Sanitary Surveillance (21). This is in accordance with the occasional peaks of whooping cough epidemics.

The data obtained from the Microbiology and Molecular Biology Unit at HCPA during another period (July 2005 to January 2006, unpublished data) in patients with clinical symptoms showed that only 9 of 55 samples were positive for *B. pertussis*, showing a prevalence of 16%. In this patients it can also be clearly seen that there was a seasonal distribution in the cases, because the majority of the positive cases (8/23 cases) occurred in the period from October 2005 to January 2006.

On the other hand, in this study, only 1.25% of the positivity was found for *Bordetella* in a sample of children with no clear clinical symptoms of whooping cough. In 2006, Siberry *et al.* described the prevalence of whooping cough in infant patients with nosocomial infection during the RSV season, and PCR of *B. pertussis* was done for screening and isolation of these patients. These authors found, using the same design as our study, only 1 of 166 children with PCR positive, indicating a prevalence of only 0.6% (22). The data from Siberry *et al.*, as well as the data from our study, indicate a low prevalence of whooping cough during a non-epidemic period. Probably these low rates reflect correctly the prevalence of whooping cough in the infant population without specific symptoms of whooping cough. However, due to the high prevalence of whooping cough in patients with clinical symptoms, this study showed that the investigation of pertussis should not be omitted in patients with symptomatology compatible. Therefore, PCR is useful to confirm an infection with *Bordetella* in patients with

clinical symptoms since the prevalence data obtained with PCR provide knowledge to the epidemiology of whooping cough.

The PCR assay developed proved to be an important tool in the laboratorial diagnosis of whooping cough in patients with unspecific symptoms, but mainly in symptomatic patients due to the rapid and accurate detection.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos at Hospital de Clínicas de Porto Alegre to support this work.

REFERENCES

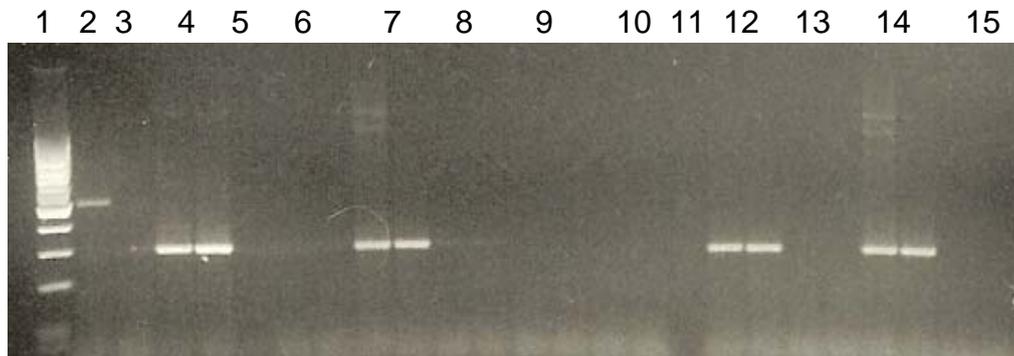
1. **Loeffelholz, M.** 2003. Bordetella, p. 780-788. *In* Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington, D.C.
2. **Hewlett, E.** 1999. A commentary on the pathogenesis of Pertussis. *Clin Infect Dis* **28**:S94-S98.
3. **Mattoo, S. and J. Cherry.** 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* **18**:326-382.
4. **Loeffelholz, M., C. Thompson, K. Long, and M. Gilchrist.** 1999. Comparison of PCR, culture, and direct fluorescent-antibody testing for detection of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* **37**:2872-2876.
5. **Tilley, P., M. Kanchana, I. Knight, J. Blondeau, N. Antonishyn, and H. Deneer.** 2000. Detection of *Bordetella pertussis* in a clinical laboratory by culture, PCR, and direct fluorescent antibody staining; accuracy, and cost. *Diagn Microbiol Infect Dis* **37**:17-23.
6. **Müller, F., J. Hoppe, and C. König.** 1997. Laboratory diagnosis of pertussis: state of the art in 1997. *J Clin Microbiol* **35**:2435-2443.
7. **Hallander, H.** 1999. Microbiological and serological diagnosis of pertussis. *Clin Infect Dis* **28**:S99-S106.

8. **Ieven, M. and H. Goosens.** 1997. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clin Microbiol Rev* **10**:242-256.
9. **van der Zee, A., C. Agterberg, M. Peeters, J. Schellenkens, and F. Mooi.** 1993. Polymerase Chain Reaction assay for pertussis: simultaneous detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *J Clin Microbiol* **31**:2134-2140.
10. **van der Zee, A., C. Agterberg, M. van Agterveld, M. Peeters, and F. Mooi.** 1993. Characterization of *IS1001*, an insertion sequence element of *Bordetella parapertussis*. *J Clin Microbiol* **175**:141-147.
11. **Templeton, K., S. Scheltinga, A. van der Zee, B. Diederren, A. Krujissen, H. Goosens, E. Kuijper, and E. Claas.** 2003. Evaluation of real-time PCR for detection of and discrimination between *B. pertussis*, *B. parapertussis*, and *B. holmesii* for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol* **41**:4121-4126.
12. **Cloud, J., W. Hymas, A. Turlak, A. Croft, U. Reischel, J. Daly, and K. Carroll.** 2003. Description of a multiplex *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* LightCycler PCR assay with inhibition control. *Diagn Microbiol Infect Dis* **46**:189-195.
13. **Kösters, K., M. Riffelmann, and C. König.** 2001. Evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Bordetella pertussis* in clinical samples. *J.Med.Microbiol.* **50**:436-440.

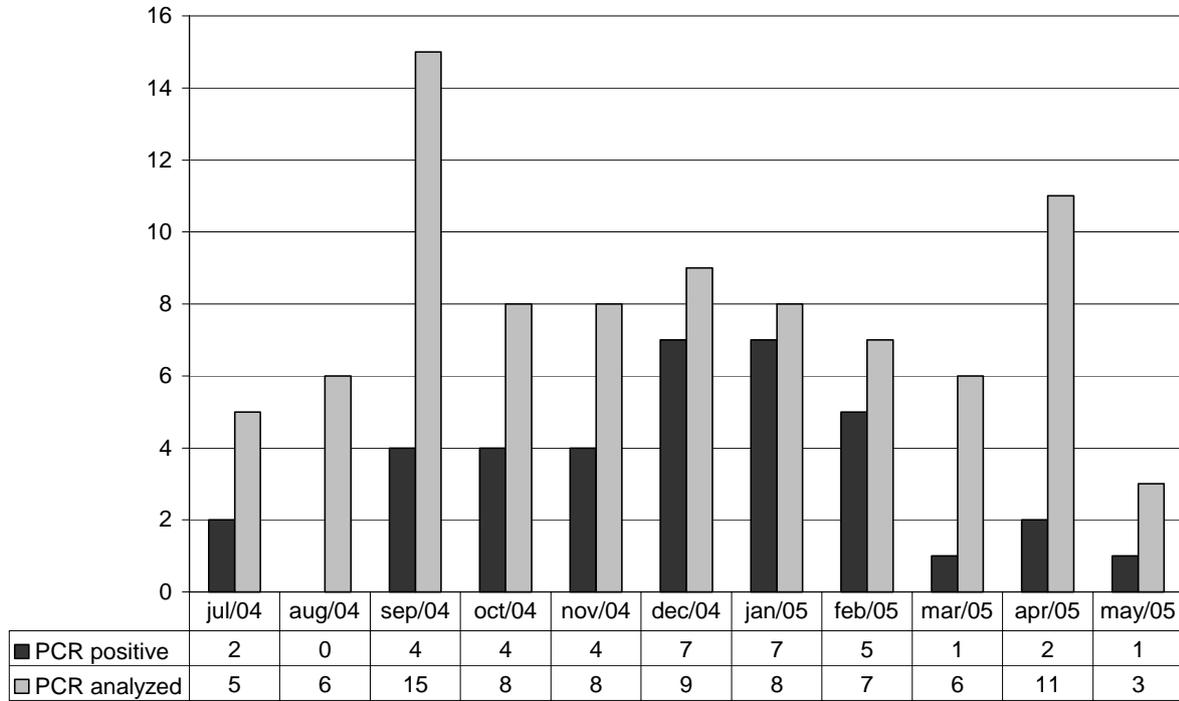
14. **Chan, E., N. Antonishyn, R. McDonald, T. Maksymiw, P. Pieroni, E. Nagle, and G. Horsman.** 2002. The use of TaqMan PCR assay for detection of *Bordetella pertussis* infection from clinical species. Arch.Pathol.Lab.Med. **126**:173-176.
15. **Buck, G.** 1996. Detection of *Bordetella pertussis* by Rapid-Cycle PCR and colorimetric Microwell hybridization. J Clin Microbiol **34**:1355-1358.
16. **Lievano, F., M. Reynolds, A. Waring, J. Ackelsberg, K. Bisgard, G. Sanden, D. Guris, A. Golaz, D. Bopp, R. Limberg, and P. Smith.** 2002. Issues associated with and recommendations for using PCR to detect outbreaks of Pertussis. J Clin Microbiol **40**:2801-2805.
17. **Mooi, F., H. Hallander, C. König, B. Hoet, and N. Guiso.** 2000. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: Recommendations for a standard methodology. Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. **19**:174-181.
18. **Farrell, D., M. McKeon, G. Daggard, M. Loeffelholz, C. Thompson, and T. Mukkur.** 2000. Rapid-Cycle PCR method to detect *Bordetella pertussis* that fulfills all consensus recommendations for use of PCR in diagnosis of pertussis. J Clin Microbiol **38**:4499-4502.
19. **Brandberg, L., C. Olsson, T. Lagergard, J. Taranger, B. Trollfors, and G. Zackrisson.** 1998. Evaluation of PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections. J Clin Microbiol **36**:679-683.
20. **Moreno, J. and F. Manchón.** 2002. Diagnóstico de laboratorio de tos ferina. Papel de la serología. Enferm.Infecc.Microbiol.Clin. **20**:212-218.

21. Alerta Epidemiológico. Boletim Epidemiológico - Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre Ano VI[22]. 2004. Prefeitura de Porto Alegre.
22. **Siberry, G., N. Paquette, T. Ross, T. Perl, and A. Valsamakis.** 2006. Low prevalence of pertussis among children admitted with respiratory symptoms during respiratory syncytial virus season. *Infect Control Hosp Epidemiol* **27**:95-97.

Figure 1: Analysis of blind samples sent by reference center (University of Mainz, Germany) to validation of PCR assay to detect *B. pertussis* and *B. parapertussis*.



Lanes: 1: Molecular weight (100bp); 2: *B.parapertussis* positive control (498 bp); 3: *B.pertussis* positive control (288 pb); 4: sample A001; 5: negative control; 6 to 10: samples A002 to A 006; 11: negative control; 12 to 15: samples A007 to A 010.

Figure 2: PCR assays to *Bordetella pertussis* analyzed at HCPA from July 2004 to May 2005.

Detecção de *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase e análise de prevalência no Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Daniela de Souza Martins*, Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado*, Marisa Chesky*,

Paulo Antonacci Carvalho** and Afonso Luís Barth*

*Unidade de Microbiologia – Serviço de Patologia Clínica

**Faculdade de Medicina UFRGS

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil

Autor para correspondência:

Afonso Luís Barth,

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular – Serviço de Patologia Clínica

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre – RS – Brasil

CEP 90035-003

Fone/FAX: (+51) 2101-8607

E-mail: albarth@hcpa.ufrgs.br

Resumo

Foi desenvolvido um protocolo de PCR que permite a detecção simultânea de DNA dos dois principais agentes da coqueluche, *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis*. Os pares de primers utilizados na técnica foram baseados nas seqüências de inserção IS481 para *B. pertussis* e IS1001 para *B. parapertussis*. A técnica de PCR permitiu a detecção de até 1 UFC/100µL de amostra para *B. pertussis* e 10 UFC/100µL para *B. parapertussis*. Este protocolo de PCR permitiu a análise da prevalência destas bactérias em uma população de pacientes pediátricos atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Durante os meses de Julho de 2004 a Maio de 2005 foram analisadas 86 amostras de aspirado de nasofaringe oriundas de pacientes com sintomas clínicos de coqueluche, e destas 37 (43%) foram positivos para *B. pertussis*. A fim de analisar a prevalência destas bactérias em pacientes que apresentavam sintomas clínicos inespecíficos da síndrome, foram incluídas 80 amostras clínicas consecutivas, e destas somente uma (1,45%) foi positiva para *B. pertussis*. Este estudo mostrou que a técnica de PCR descrita pode ser uma importante ferramenta no diagnóstico laboratorial da coqueluche, visto a sua rapidez e acurácia na detecção dos patógenos.

Palavras chaves: *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, PCR, prevalência.

INTRODUÇÃO

A coqueluche é uma doença do trato respiratório altamente contagiosa que tem como principal patógeno a espécie *Bordetella pertussis*, um bacilo Gram negativo (1,2). Até o momento nove espécies de *Bordetella* foram identificadas, sendo que apenas três outros membros do gênero foram associados à infecção em humanos, como *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* e *B. holmesii*, sendo as duas últimas relatadas como causas infrequentes da síndrome (3). Apesar dos extensos programas de vacinação, a doença continua endêmica em várias partes do mundo, afetando principalmente crianças parcialmente ou não vacinadas (3).

Em muitos casos os sintomas clínicos são típicos, mas em particular os neonatos e os adultos podem apresentar um quadro atípico da doença, que necessita de confirmação por métodos laboratoriais. A cultura é ainda considerada o padrão-ouro devido a sua alta especificidade (100%), mas a sua sensibilidade varia muito (6 a 95%) (4,5) e depende de várias condições do paciente e do processamento da amostra, além do resultado demorar de 3 a 12 dias (1,6). A utilização de provas de imunofluorescência direta (DFA) promove o mais rápido e simples diagnóstico de coqueluche, porém apresenta uma baixa sensibilidade e especificidade. A sorologia por ELISA para detecção de anticorpos contra *B. pertussis* pode ser sensível e específica, mas o principal problema é a obtenção da amostra na fase aguda da doença, além do diagnóstico ser problemático em crianças vacinadas e com somente uma amostra, e de possíveis reações cruzadas (6,7).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de *Bordetella* tem sido uma alternativa promissora no diagnóstico da coqueluche, devido a sua rapidez e sensibilidade superiores à cultura (3,8). Para isso, fatores como a escolha de regiões específicas da sequência de DNA da bactéria que serão amplificadas são fundamentais para a sensibilidade e especificidade da técnica. A sequência de inserção repetida IS481, específica para *B.*

pertussis, tem sido usada com sucesso na detecção desta bactéria por PCR, assim como a IS1001 para *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* (9,10).

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um protocolo de PCR para a detecção simultânea de DNA de *B. pertussis* e *B. parapertussis* a partir destas seqüências específicas e a discriminação entre os dois patógenos, assim como a análise de prevalência destas bactérias em uma população de pacientes pediátricos atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

MATERIAIS E MÉTODOS

Padronização

Para a padronização do protocolo de PCR, foram utilizados como controles positivos da técnica cepas padrões de *B. pertussis* e *B. parapertussis* que, após serem semeadas em meio de cultura específico [Charcoal-Agar (Oxoid) com 10% de sangue de cavalo e 20µg de cefalexina] por esgotamento, foram incubadas a 37 °C em aerobiose por até 7 dias. As colônias com morfologia típica do gênero foram avaliadas por coloração de Gram, produção de oxidase e sorologia com antisoros específicos (Difco®) para as duas espécies de *Bordetella*.

PCR

O DNA das amostras foi extraído com o kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. Os pares de primers utilizados foram baseados nas seqüências de inserção IS481 e IS1001, sendo os oligonucleotídeos BP1 (5'-GGG GTC ACC GCG CCG ACT GT-3') e BP4 (5'-GGG CCT GAT GCT CGT AGC GC-3') correspondentes aos pares de bases (pb) 208 a 228 e 476 a 496 da IS481. Os primers BPPA (5'- CGC CGC TTG ATG ACC TTG ATA-3') e BPPZ (5'-CAC

CGC CTA CGA GTT GGA GAT C-3'), baseados na IS1001, correspondem aos pb 1211 a 1232 e aos pb 734 a 735, respectivamente (9).

Cinco microlitros de DNA extraído das amostras foram adicionados a 20 μ L de um master mix (preparado imediatamente antes do uso) contendo 2,5 μ L de tampão de PCR 10x (com 1,5mM de MgCl₂), 200 μ L de cada dNTP, 4 μ mol dos primers BP1 e BP4, 16 μ mol dos primers BPPA e BPPZ e 1,25U de enzima Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen). A amplificação foi realizada no termociclador MJR® com os seguintes parâmetros: 40 ciclos de 1 min a 95 °C, 1,5 min a 65 °C e 2 min a 72 °C, seguidos de 1 ciclo de 5 min a 72 °C. Os produtos amplificados foram detectados após eletroforese em gel de agarose a 1% contendo 0,5 μ L de brometo de etídio por mL, e a visualização de fragmentos de DNA de 288 pb e de 498 pb indicaram a presença de *B. pertussis* e *B. parapertussis*, respectivamente.

Como controles para avaliação da especificidade da técnica, foram utilizados isolados de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus oralis*.

Limites de detecção

A partir dos controles positivos obtidos do cultivo de *B. pertussis* e *B. parapertussis*, foram realizadas suspensões de 0,5 MacFarland (1x10⁸ UFC/mL) e sucessivas diluições 1:10 (1x10⁷, 1x10⁶, 1x10⁵, 1x10⁴, 1x10³, 1x10², 1x10 UFC/mL). Para a determinação das colônias viáveis, foram semeados no meio de cultura 20 μ L das concentrações de 1x10⁸ a 1x10³ UFC/mL, e confirmou-se que as suspensões bacterianas testadas apresentavam colônias viáveis de crescimento nas quantificações estabelecidas. O DNA destas amostras foi extraído com o kit comercial Qiagen® e foram testadas para detecção destas bactérias pelo protocolo de PCR proposto.

Validação da técnica de PCR

A validação da técnica foi realizada a partir de 10 amostras “cegas” (A001 a A010) enviadas ao laboratório do HCPA por laboratório de referência (University of Mainz, Alemanha).

Avaliação de Inibidores do PCR em Amostras Clínicas

Para analisar os possíveis efeitos inibitórios na reação de PCR causados por compostos presentes nas amostras clínicas, foi adicionado 1µL de DNA extraído de *B. pertussis* (10^6 UFC/mL) em 4µL de 20 amostras de aspirado de nasofaringe que apresentavam resultado negativo para as duas espécies de *Bordetella*. As mesmas concentrações foram utilizadas para análise de *B. parapertussis* nos aspirados.

Amostras clínicas

1. Critérios de inclusão

Para a determinação da prevalência da coqueluche em pacientes atendidos no HCPA com suspeita clínica da síndrome, foram analisadas 86 amostras de aspirado de nasofaringe obtidas entre julho de 2004 a maio de 2005. A fim de avaliação da prevalência de casos de coqueluche de pacientes que apresentavam sintomatologia semelhante à síndrome, foram incluídas neste estudo 80 amostras consecutivas (entre agosto e setembro de 2004) de aspirado de nasofaringe provenientes de pacientes pediátricos atendidos no HCPA (ambulatoriais e internados) com suspeita de bronquiolite aos quais foi solicitado exame de detecção de vírus respiratório. Por este ser um exame de solicitação freqüente em pacientes com problemas respiratórios e pela clínica de bronquiolite ser muito semelhante à infecção por *Bordetella* em fase inicial, uma alíquota do aspirado foi utilizado para a realização da técnica de PCR.

2. Tamanho da amostra

Um estudo-piloto desenvolvido no HCPA permitiu determinar 5,7% (2/35) de resultados positivos para *B. pertussis* entre pacientes com suspeita clínica de coqueluche. Assim, considerando que seja possível encontrar uma prevalência de 6% de PCR positivo para as bactérias pesquisadas e com um nível de confiança de 95% ($\alpha=0,05$), um total de 87 amostras seja necessário para a composição de uma amostragem adequada para a análise de prevalência.

3. Análise estatística

As diferenças entre as frequências da amostra analisada e a esperada tiveram a sua significância determinada pelo teste de Qui-quadrado, assim como foi calculado o percentual de ocorrência da síndrome em crianças atendidas no HCPA, com intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

Limite de detecção (sensibilidade analítica)

A sensibilidade analítica da técnica de PCR foi estabelecida pela extração e amplificação de uma série de diluições de suspensões bacterianas em água. Esta metodologia permitiu a detecção de DNA de *B. pertussis* em todas as concentrações analisadas (de 1×10^8 a 1×10^1 UFC/mL) e de *B. parapertussis* até o limite de 1×10^2 UFC/mL. A sensibilidade da técnica permitiu, então, a detecção de até uma e 10 unidades formadoras de colônia por 100 μ L de amostra (volume inicial utilizado na técnica de extração) de *B. pertussis* e *B. parapertussis*, respectivamente.

Especificidade analítica

A técnica de PCR mostrou ser específica, pois não houve amplificação de DNA obtido de bactérias comensais ou potencialmente patogênicas (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus oralis*) que não fossem do gênero *Bordetella*.

Validação da Técnica

Foi detectado DNA de *B. pertussis* nas amostras A001, A003, A007 e A009 (figura 1). Os resultados foram enviados ao laboratório de referência e apresentaram 100% de concordância com os resultados esperados.

Avaliação de inibidores da técnica de PCR em amostras clínicas

Após amplificação por PCR, nenhum decréscimo de sensibilidade para detecção de *B. pertussis* e *B. parapertussis* foi observado.

Avaliação do PCR em amostras clínicas

No total de 86 pacientes atendidos no HCPA com suspeita clínica de coqueluche no período de julho de 2004 a maio de 2005, na qual houve solicitação médica para a realização do exame diagnóstico por PCR, 37 apresentaram resultado positivo para *B. pertussis*, mostrando uma prevalência de 43%, superior àquela obtida pelo estudo-piloto ($p < 0,005$). Os pacientes positivos analisados eram, em sua maioria, crianças com idade inferior a seis meses (média: $3,86 \pm 2,60$), sendo que 6 (16,2%) eram de origem ambulatorial, 26 (70,2%) da internação pediátrica e 5 (13,5%) da UTI pediátrica. Durante os meses de dezembro de 2004 a fevereiro de 2005 foram realizados 23 exames de PCR para *Bordetella*, e destes 19 (82,6%) foram positivos. Nos demais períodos analisados (julho a novembro de 2004 e março a maio

de 2005), dos 63 exames executados, 18 (28,5%) apresentaram positividade para coqueluche (figura 2).

Dos 80 pacientes consecutivos que apresentavam sintomatologia semelhante à coqueluche, somente um (1,25%) apresentou positividade para a espécie *B. pertussis* pela técnica de PCR descrita. Os pacientes eram de origem ambulatorial (46,3%), internação (42,5%) e UTI pediátrica (11,25%), e apresentavam uma média de idade de 3,24 meses \pm 1,84.

DISCUSSÃO

A detecção laboratorial de coqueluche pelo isolamento da bactéria do trato respiratório, por cultura, é considerada por muitos autores como padrão-ouro devido a sua alta especificidade, embora sua sensibilidade tenha se mostrado muito variável (6,7).

A utilização de uma técnica molecular baseada na amplificação de uma seqüência específica de DNA de um patógeno permite, teoricamente, a detecção de uma única bactéria. Portanto, o uso de uma seqüência de DNA que se apresenta em múltiplas cópias no cromossoma para realização do PCR é interessante, pois permite um aumento de sensibilidade quando comparado com uma cópia única no genoma bacteriano. As seqüências de inserção repetidas *IS481* e *IS1001* vêm sendo utilizadas como alvo para identificação de *B. pertussis* e *B. parapertussis*, respectivamente. Alguns estudos que utilizaram a técnica de PCR Real-Time relatam limites de detecção que variaram de 1 a 10 UFC/mL para *B. pertussis* e 5 a 10 UFC/mL para *B. parapertussis* (11-15). Em nosso estudo a sensibilidade analítica encontrada foi semelhante (1 e 10 UFC/mL para *B. pertussis* e *B. parapertussis*), utilizando-se uma técnica de PCR convencional. Isto indicaria que a sensibilidade da técnica de PCR independe do método de detecção empregado.

A avaliação de resultados falso-positivos pela possível interferência de bactérias presentes no trato respiratório superior foi analisada com *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus oralis*, bactérias comuns na flora oral. Os resultados obtidos mostram que nenhum destes patógenos influenciou a positividade da técnica, ou seja, esta se mostrou específica para detecção de *B. pertussis* e *B. parapertussis*. No entanto, este estudo não avaliou índices de sensibilidade e especificidade, pois a técnica de PCR não foi comparada com um padrão-ouro, que muitos autores citam como sendo o isolamento da bactéria por cultura (3,4,6,7,15-20). Mas é importante ressaltar que, apesar disto, o protocolo analisado foi considerado validado após ser aplicado a uma série de amostras cegas enviadas por centro de referência e aprovado com 100% de eficácia.

A prevalência da bactéria *Bordetella* pode variar conforme diferentes regiões, e principalmente pela sazonalidade da doença, presença de surtos e inclusive pela diferença nos métodos de detecção do patógeno. Mattoo *et al.* compararam 13 estudos, realizados em seis países, que mostram a grande variação na percentagem de doença respiratória devido a infecção por *B. pertussis* em adolescentes e adultos (17 a 52%), que foi atribuída a estes fatores (3).

Os dados descritos na amostragem de pacientes com sintomatologia clínica para coqueluche demonstram uma alta prevalência (43%), com aumento do número de casos nos meses de dezembro a fevereiro, confirmando a distribuição sazonal da síndrome. Este percentual foi muito alto, principalmente se comparado com dados de literatura internacional bem como com dados do próprio HCPA num mesmo período em um ano seguinte. A justificativa para o alto índice de prevalência no período estudado foi devido a um surto que ocorreu na cidade de Porto Alegre visto que, conforme dados da vigilância sanitária local (21), houve um considerável aumento no número de notificações de casos de coqueluche. Isto está de acordo com os picos ocasionais de epidemias de coqueluche.

Os dados obtidos da Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular do HCPA em um outro período (Julho de 2005 a Janeiro de 2006, dados não publicados) em pacientes com suspeita clínica mostraram que apenas 9 de 55 amostras foram positivas para *B. pertussis* indicando um índice de prevalência de 16%. Nesta população também pode ser visto claramente que houve uma distribuição sazonal dos casos sendo que a grande maioria dos casos positivos (8/23 casos) ocorreu no período de Outubro 2005 a Janeiro 2006.

Por outro lado, neste estudo, foram encontrados apenas 1,25% de positividade para *Bordetella* em uma amostra de crianças com sintomas inespecíficos de coqueluche. Em 2006, Siberry *et al.* descreveram a prevalência de coqueluche em pacientes nosocomiais infantis durante a época de infecção por VSR, onde foi realizado PCR de *B. pertussis* para *screening* e isolamento destes pacientes. Estes autores encontraram, usando o mesmo design do nosso estudo, somente 1 de 166 crianças com teste de PCR positivo indicando uma prevalência de somente 0.6% (22). Os dados de Siberry *et al.*, bem como os dados do nosso estudo, indicam uma baixa prevalência de coqueluche em um período não-epidêmico. Provavelmente estes baixos índices realmente reflitam a prevalência da coqueluche na população infantil em geral (sem sintomas específicos da doença). No entanto, devido à alta prevalência encontrada em pacientes com suspeita clínica de coqueluche, este estudo mostrou que não se deve negligenciar a pesquisa desta doença em pacientes com sintomatologia compatíveis com a síndrome. Assim, o método da PCR serve para confirmar uma efetiva infecção por *Bordetella* nos casos de suspeita clínica, sendo que os dados de prevalência obtidos com a técnica de PCR fornecem subsídios para a epidemiologia de casos relatados de coqueluche.

O protocolo de PCR descrito no presente estudo provou ser uma importante ferramenta no diagnóstico laboratorial de coqueluche em pacientes com sintomas inespecíficos, mas principalmente em pacientes sintomáticos, visto a sua rapidez e acurácia na detecção dos patógenos.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos ao FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo financiamento deste trabalho.

Referências Bibliográficas

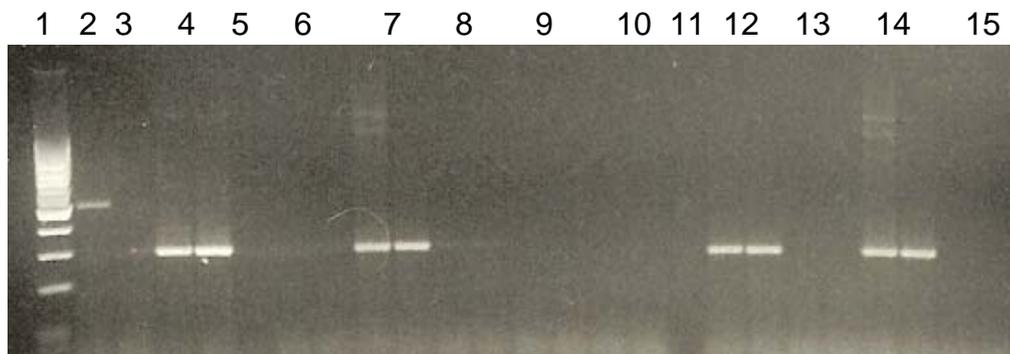
1. **Loeffelholz, M.** 2003. Bordetella, p. 780-788. *In* Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington, D.C.
2. **Hewlett, E.** 1999. A commentary on the pathogenesis of Pertussis. *Clin Infect Dis* **28**:S94-S98.
3. **Mattoo, S. and J. Cherry.** 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* **18**:326-382.
4. **Loeffelholz, M., C. Thompson, K. Long, and M. Gilchrist.** 1999. Comparison of PCR, culture, and direct fluorescent-antibody testing for detection of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* **37**:2872-2876.
5. **Tilley, P., M. Kanchana, I. Knight, J. Blondeau, N. Antonishyn, and H. Deneer.** 2000. Detection of *Bordetella pertussis* in a clinical laboratory by culture, PCR, and direct fluorescent antibody staining; accuracy, and cost. *Diagn Microbiol Infect Dis* **37**:17-23.
6. **Müller, F., J. Hoppe, and C. König.** 1997. Laboratory diagnosis of pertussis: state of the art in 1997. *J Clin Microbiol* **35**:2435-2443.
7. **Hallander, H.** 1999. Microbiological and serological diagnosis of pertussis. *Clin Infect Dis* **28**:S99-S106.

8. **Ieven, M. and H. Goosens.** 1997. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clin Microbiol Rev* **10**:242-256.
9. **van der Zee, A., C. Agterberg, M. Peeters, J. Schellenkens, and F. Mooi.** 1993. Polymerase Chain Reaction assay for pertussis: simultaneous detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *J Clin Microbiol* **31**:2134-2140.
10. **van der Zee, A., C. Agterberg, M. van Agterveld, M. Peeters, and F. Mooi.** 1993. Characterization of *IS1001*, an insertion sequence element of *Bordetella parapertussis*. *J Clin Microbiol* **175**:141-147.
11. **Templeton, K., S. Scheltinga, A. van der Zee, B. Diederren, A. Krujissen, H. Goosens, E. Kuijper, and E. Claas.** 2003. Evaluation of real-time PCR for detection of and discrimination between *B. pertussis*, *B. parapertussis*, and *B. holmesii* for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol* **41**:4121-4126.
12. **Cloud, J., W. Hymas, A. Turlak, A. Croft, U. Reischel, J. Daly, and K. Carroll.** 2003. Description of a multiplex *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* LightCycler PCR assay with inhibition control. *Diagn Microbiol Infect Dis* **46**:189-195.
13. **Kösters, K., M. Riffelmann, and C. König.** 2001. Evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Bordetella pertussis* in clinical samples. *J.Med.Microbiol.* **50**:436-440.

14. **Chan, E., N. Antonishyn, R. McDonald, T. Maksymiw, P. Pieroni, E. Nagle, and G. Horsman.** 2002. The use of TaqMan PCR assay for detection of *Bordetella pertussis* infection from clinical species. Arch.Pathol.Lab.Med. **126**:173-176.
15. **Buck, G.** 1996. Detection of *Bordetella pertussis* by Rapid-Cycle PCR and colorimetric Microwell hybridization. J Clin Microbiol **34**:1355-1358.
16. **Lievano, F., M. Reynolds, A. Waring, J. Ackelsberg, K. Bisgard, G. Sanden, D. Guris, A. Golaz, D. Bopp, R. Limberg, and P. Smith.** 2002. Issues associated with and recommendations for using PCR to detect outbreaks of Pertussis. J Clin Microbiol **40**:2801-2805.
17. **Mooi, F., H. Hallander, C. König, B. Hoet, and N. Guiso.** 2000. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: Recommendations for a standard methodology. Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. **19**:174-181.
18. **Farrell, D., M. McKeon, G. Daggard, M. Loeffelholz, C. Thompson, and T. Mukkur.** 2000. Rapid-Cycle PCR method to detect *Bordetella pertussis* that fulfills all consensus recommendations for use of PCR in diagnosis of pertussis. J Clin Microbiol **38**:4499-4502.
19. **Brandberg, L., C. Olsson, T. Lagergard, J. Taranger, B. Trollfors, and G. Zackrisson.** 1998. Evaluation of PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections. J Clin Microbiol **36**:679-683.
20. **Moreno, J. and F. Manchón.** 2002. Diagnóstico de laboratorio de tos ferina. Papel de la serología. Enferm.Infecc.Microbiol.Clin. **20**:212-218.

21. Alerta Epidemiológico. Boletim Epidemiológico - Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre Ano VI[22]. 2004. Prefeitura de Porto Alegre.
22. **Siberry, G., N. Paquette, T. Ross, T. Perl, and A. Valsamakis.** 2006. Low prevalence of pertussis among children admitted with respiratory symptoms during respiratory syncytial virus season. *Infect Control Hosp Epidemiol* **27**:95-97.

Figura 1: Análise das amostras cegas enviadas por centro de referência (University of Mainz, Germany) para validação da técnica de PCR para *B. pertussis* e *B. parapertussis*.



Linhas: 1: Marcador de peso molecular (100pb); 2: controle positivo *B.parapertussis* (498 pb); 3: controle positivo *B.pertussis* (288 pb); 4: amostra A001; 5: controle negativo; 6 a 10: amostras A002 a A006; 11: controle negativo; 12 a 15: amostras A007 a A010.

Figura 2: Exames de PCR para *Bordetella pertussis* realizados no HCPA entre Julho/2004 a Maio/2005.

