

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

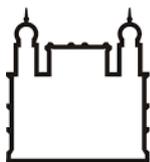
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
PARA *BORDETELLA PERTUSSIS* USANDO REAGENTES PRODUZIDOS
NO BRASIL**

NAJUA MOHAMAD ZAHRA POLAK

CURITIBA

2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

NAJUA MOHAMAD ZAHRA POLAK

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL PARA *BORDETELLA PERTUSSIS* USANDO REAGENTES PRODUZIDOS NO BRASIL

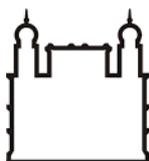
Dissertação apresentada ao Instituto Carlos Chagas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador(es): Prof. Dr. Luis Gustavo Morello

Prof. Dr. Alexandre Dias Tavares Costa

CURITIBA/PR

2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

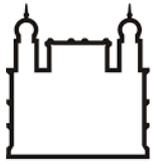
DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL PARA *BORDETELLA PERTUSSIS* USANDO REAGENTES PRODUZIDOS NO BRASIL

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Najua Mohamad Zahra Polak

A coqueluche é uma doença infecciosa causada por bactérias do gênero *Bordetella*. Atualmente, o teste diagnóstico padrão-ouro é a cultura obtido através de swab nasal profundo. No entanto, sendo uma bactéria fastidiosa, a cultura torna-se um exame demorado, dificultando o tratamento correto. Neste projeto, realizamos a padronização e otimização de um teste de diagnóstico multiplex, baseado em PCR em Tempo Real (qPCR), capaz de detectar, discriminar e identificar as principais espécies de *Bordetella* patogênicas para humanos. O teste também foi padronizado no formato gelificado, o que permite eliminar a cadeia de transporte e armazenamento refrigerado. A detecção de alvos no genoma humano (rRNA 18S ou *RNaseP*) foi usada para garantir a funcionalidade do sistema, avaliando a qualidade do DNA extraído, a presença de inibidores e a integridade dos reagentes. Seguindo a política do Governo Federal de fortalecimento do Parque Tecnológico da Saúde, o presente teste foi desenvolvido com insumos produzidos pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP/Fiocruz-PR), contribuindo para a redução dos custos de produção. Os resultados indicam que os reagentes nacionais permitem a mesma eficiência de reação que os reagentes importados, quando analisados no formato líquido da reação. A reação gelificada exibe a mesma sensibilidade que o formato tradicional, capaz de detectar até 0,02 genomas equivalentes da bactéria. Obtivemos sucesso na eliminação de contaminação ambiental por amplicons com a adição de UNG nas reações líquidas. A avaliação do teste foi realizada com amostras previamente caracterizadas e cedidas pelo LACEN-PR. O uso de um kit de diagnóstico baseado em qPCR confere agilidade e sensibilidade analítica necessárias ao diagnóstico preciso da doença, contribuindo para o manejo clínico adequado do paciente.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL PARA *BORDETELLA PERTUSSIS* USANDO REAGENTES PRODUZIDOS NO BRASIL

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Najua Mohamad Zahra Polak

Whooping cough is an infectious disease caused by bacteria of the *Bordetella* genus. Currently, the gold-standard diagnostic test is the culture obtained from deep nasal swab. However, being a fastidious organism, culturing becomes a time-consuming test, hampering the correct treatment. In this project, we performed the standardization and optimization of a multiplex diagnostic test, based on Real Time PCR (qPCR), able to detect, discriminate and identify the main species of *Bordetella* that are pathogenic to humans. The test was also standardized in a gelified format, which allows the elimination of the cold chain during transportation and storage. Detection of human genomic targets (18S rRNA or *RNaseP*) was used to ensure the functionality of the system, assessing the quality of the extracted DNA, the presence of inhibitors and the integrity of reagents. In line with the federal government policies to strengthen the Health Technological Sector, the present test was developed using reagents produced by the Molecular Biology Institute of Parana (IBMP/Fiocruz-PR), thus contributing to the reduction of production costs. The results indicate that local reagents allow for similar reaction efficiencies as the imported ones, when analyzed in the reaction's liquid format. The gelified reaction exhibits the same sensitivity as the traditional format, capable of detecting up to 0.02 bacterial genome equivalents. We succeeded in eliminating environmental contamination caused by amplicons with the addition of UNG in the liquid reactions. The evaluation of the test was performed using samples previously characterized by LACEN-PR. The use of a qPCR-based diagnostic kit confers agility and sensitivity for an accurate diagnosis of the disease, contributing to the proper clinical management of the patient.

DEDICATÓRIA

A toda a minha família, marido, amigos e colegas de trabalho pelo apoio incondicional, pelas preocupações que tiveram comigo, pela paciência e todo o estímulo, lhes dedico esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Toda a caminhada percorrida até aqui não teria valido a pena se ao meu lado não tivessem pessoas que me mantiveram firme, principalmente nas horas difíceis. Se essas mesmas pessoas, que fizeram a diferença, me mantiveram focada e determinada durante aqueles momentos em que você pensa em desistir de tudo.

Dentre essas pessoas, sem dúvida a mais importante é o meu amado marido Leonardo Polak, me incentivando e me ajudando sempre. Obrigada por todo amor, compreensão, carinho, paciência e tudo mais que aqui não cabe em palavras.

O meu querido amigo e co-orientador Dr. Alexandre Dias Tavares Costa, por ter aberto as portas em uma etapa tão importante na minha vida, sempre acreditando no meu potencial, me direcionando, encorajando e me acalmando nas horas difíceis.

Não poderia também deixar de agradecer o meu orientador Dr. Luis Gustavo Morello, por estar sempre disponível e acessível para esclarecer as dúvidas que apareceram durante o desenvolvimento deste projeto.

À Dra. Rita Rampazzo, pelo incentivo, ao longo dos anos, pelos ensinamentos durante a minha carreira científica e pela amizade.

Ao Dr. Stenio Perdigão Fragoso por ter me estendido a mão na reta final, um dos momentos mais importantes deste trabalho.

Ao Dr. Luciano Luna por estar sempre disposto a me ajudar, compartilhando todo o seu conhecimento científico.

Às amigas e colegas de trabalho Keren Kariene Leite, Jhully Anni Surdi e Maria Isabel Stets por todos os momentos de aprendizagem e companheirismo que passamos juntos, pelo apoio emocional e braçal durante o desenvolvimento do projeto.

Não poderia deixar de agradecer ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia do Instituto Carlos Chagas, pela oportunidade e apoio institucional.

Ao Dr. Marco Aurélio Krieger por acreditar no meu potencial, me dando a oportunidade de trabalhar no seu grupo

À Dra. Rosângela Torres, pesquisadora do LACEN-PR, por ter fornecido as amostras para a validação deste estudo.

Aos meu colegas do Instituto de Biologia Molecular e aos colegas do Laboratório de Genômica Funcional por todo apoio dado nessa trajetória.

À minha família, meu pai, minha mãe (em memória), irmãos e sobrinhos, por todo apoio dado nessa caminhada.

A todos os meus amigos, por torcerem e acreditar em mim.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Bordetella pertussis</i>	1
1.1.1. Histórico.....	1
1.1.2. Etiologia.....	2
1.1.3. Patogenia	4
1.2. COQUELUCHE.....	7
1.2.1. Vacinação.....	7
1.2.2. Epidemiologia da coqueluche no mundo	9
1.2.3. Coqueluche no Brasil.....	13
1.3. DIAGNÓSTICOS.....	16
1.3.1. Métodos laboratoriais para o diagnóstico	16
1.3.2. Coleta e transporte de secreção nasofaríngea	17
1.3.3. Cultura	18
1.3.4. Métodos imunológicos	21
1.3.5. Métodos moleculares e genes alvo	23
1.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	24
1.4.1. Limitações da qPCR e possíveis soluções	27
1.4.2. Uracil-N-Glicosilase (UNG).....	29
1.4.3. Gelificação.....	30

2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1. Sequências-alvo e amostras de DNA:.....	33
3.2. Iniciadores e Sondas:.....	33
3.3. Determinação da temperatura de anelamento	36
3.4. Adição de cofatores na reação.....	36
3.4.1. Variação na concentração do cofator magnésio (Mg ²⁺)	36
3.4.2. Adição de ROX, albumina de soro bovino (BSA), glutamato de potássio e acetato de amônio	36
3.5. PCR em Tempo Real	37
3.6. Purificação do amplicon e incorporação da enzima Uracil-N-Glicosylase (UNG).....	37
3.6.1. Incorporação de controles internos: alvos humanos rRNA 18S e <i>RNaseP</i>	38
3.6.2. PCR em Tempo Real: Gelificação	38
3.7. Teste de Especificidade Analítica	39
3.8. Validação da reação com amostras previamente caracterizadas pelo LACEN-PR.....	40
3.9. Clonagem do amplicon de 100 ag de <i>B. pertussis</i>	41
3.10. Sequenciamento do amplicom de 100 ag de <i>B. pertussis</i>	41
4. RESULTADOS	42
4.1. Determinação da concentração dos cofatores MgSO ₄ e MgCl ₂	42
4.2. Determinação da concentração de oligonucleotídeos e protocolo de amplificação	42
4.3. Adição de ROX, albumina de soro bovino (BSA), acetato de amônio e glutamato de potássio	44
4.4. Substituição de dTTP por dUTP no mix de nucleotídeos	45
4.5. Incorporação da enzima Uracyl N-Glicosylase (UNG).....	46

4.6. Incorporação de controles internos: alvos humanos rRNA 18S e <i>RNaseP</i>	47
4.7. Limite de detecção e análise de sensibilidade do teste.....	49
4.8. Teste de Especificidade Analítica	53
4.9. Validação da reação com amostras previamente caracterizadas pelo LACEN-PR.....	53
4.10. Confirmação da detecção de IS481 nas amostras de pacientes por sequenciamento.....	54
4.10.1. Sequenciamento do amplicom de 100 ag de <i>B. pertussis</i>	57
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÃO	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Patogênese de infecção causada por <i>B. pertussis</i>	6
Figura 1.2: Casos reportados de coqueluche após a introdução da vacina nos Estados Unidos.	9
Figura 1.3: Número de casos de coqueluche notificados confirmados e prováveis em Washington de janeiro de 2011 a julho de 2012.	12
Figura 1.4: Distribuição dos casos confirmados de coqueluche em unidades sentinelas do Estado de São Paulo, segundo mês e ano, 2008 a 2011.	14
Figura 1.5: Coqueluche: casos por meses de vida no ano de 2014	15
Figura 1.6: Casos de coqueluche notificados na região sul.....	16
Figura 1.7: Estágios da coqueluche e os diferentes diagnósticos recomendados para as distintas fases da doença.	17
Figura 1.8: Técnica adequada para obtenção de uma amostra de nasofaringe para o isolamento de <i>B. pertussis</i>	18
Figura 1.9: Cultivo de <i>B. pertussis</i> em placa de Petri contendo meio específico RL.....	19
Figura 1.10: Colônias de <i>B. pertussis</i> em meio específico RL.	20
Figura 1.11: <i>B. pertussis</i> submetida à coloração de Gram e visualizada no microscópio óptico (aumento 100x)	20
Figura 1.12: Reação de qPCR utilizando o sistema TaqMan®.....	26
Figura 1.13: Corante SYBR® Green (verde) intercaladona dupla-fita de DNA.	27
Figura 1.14: Atuação da enzima Uracil-N-Glicosilase (UNG) na fita de DNA contendo uracila.	30
Figura 1.15: Esquema geral de exemplificação uma reação de Gelificação. ..	31
Figura 3.1: Curva de diluição de amplicom de <i>B. pertussis</i> (IS481). Concentrações de 1 pg a 1 fg de DNA.....	38
Figura 4.1: Reação para a detecção do alvo IS481 com iniciadores, sonda e cofator MgSO ₄ padronizados. Concentrações de DNA de 10 pg a 1 fg. Traçados representativos de 10 experimentos	43
Figura 4.2: Reação para a detecção do alvo <i>ptxS1</i> com iniciadores, sonda e cofator MgSO ₄ padronizados. Concentrações de DNA de 10 pg a 10fg. Traçados representativos de 9 experimentos.	43

Figura 4.3: Reação para a detecção do alvo IS481 com adição de 30nM de ROX. Concentrações de DNA de 10 pg a 1 fg. Traçados representativos de 8 experimentos.....	44
Figura 4.4: Reação para a detecção do alvo <i>ptxS1</i> com adição de 30nM de ROX. Concentrações de DNA de 100 pg a 100 fg. Traçados representativos de 11 experimentos.....	44
Figura 4.5: Reação para a detecção do alvo IS481 com adição de 0,5 µg de BSA. Concentrações de DNA de 10 fg a 100 ag. Traçados representativos de 14 experimentos.....	45
Figura 4.6: Substituição do mix contendo dTTP (rosa) pelo mix contendo dUTP (verde) para o alvo <i>ptxS1</i> (1 ng-100 fg). Traçados representativos de 9 experimentos.....	45
Figura 4.7: Substituição do mix contendo dTTP (vermelho) pelo menos contendo dUTP (azul) para o alvo IS481 (10 pg-1 fg). Traçados representativos de 8 experimentos.....	46
Figura 4.8: Contaminação artificial da reação com amplicon contendo dUTP purificado de <i>B. pertussis</i> (em azul). Traçados representativos de 5 experimentos.....	46
Figura 4.9: Adição da enzima UNG na reação, eliminando a presença do amplicon (em azul). Traçados representativos de 5 experimentos.	47
Figura 4.10: Reação padronizada com inserção do controle interno humano <i>RNaseP</i> (verde) para detecção de IS481 (vermelho). Diluição de 1 pg-100 ag em triplicata. Cepa 10536. Traçados representativos de 15 experimentos.....	48
Figura 4.11: Reação padronizada com inserção do controle interno humano rRNA 18S (azul) para detecção de IS481 (vermelho). Diluição de 1pg-100ag em triplicata. Cepa 10536. Traçados representativos de 15 experimentos.....	48
Figura 4.12: Reação padronizada com inserção do controle interno humano <i>RNaseP</i> (verde) para detecção de <i>ptxS1</i> (rosa). Diluição de 100 pg-100 fg em triplicata. Cepa 10536. Traçados representativos de 15 experimentos.....	48
Figura 4.13: Reação padronizada com inserção do controle interno humano rRNA 18S (azul) para detecção de <i>ptxS1</i> (rosa). Diluição de 1 ng-100 fg em triplicata. Cepa 10536. Traçados representativos de 15 experimentos.....	49

Figura 4.14: Regressão linear do alvo IS481. O Experimento foi realizado em triplicata utilizando a cepa 10536. Concentração de DNA: 1 pg a 100 fg. Traçados representativos de 15 experimentos.	50
Figura 4.15: Regressão linear do alvo <i>ptxS1</i> . O Experimento foi realizado em triplicata utilizando a cepa 10536. Concentração de DNA: 1 ng a 100 fg. Traçados representativos de 15 experimentos.	51
Figura 4.16: Regressão linear de uma curva de diluição do alvo IS481 no formato líquido (bola) e no formato gelificado (triângulo). Traçados representativos de 13 experimentos.....	52
Figura 4.17: Regressão linear de uma curva de diluição do alvo <i>ptxS1</i> no formato líquido (triângulo) e no formato gelificado (bola). Traçados representativos de 13 experimentos.....	52
Figura 4.18: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio utilizando 2 ng de DNA de <i>B. pertussis</i> , em duplicata, como DNA alvo. Marcador 1 kb Plus (Invitrogen).	54
Figura 4.19: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo utilizando 100 ag de DNA de <i>B. pertussis</i> , em duplicata. Marcador 50 kb Plus (Invitrogen). ..	55
Figura 4.20: Gel de agarose após amplificação de DNA plasmidial purificado obtido da reação com concentração de 2 ng de DNA utilizando iniciadores de <i>B. pertussis</i>	56
Figura 4.21: Gel após amplificação de DNA plasmidial purificado na concentração de 100 ag utilizando iniciadores M13 do vetor pGEM®-T easy (Invitrogen®).....	56
Figura 4.22: Figura: Alinhamento de nucleotídeos de amplicons da PCR em tempo real (2 ng e 100 ag), regiões genômicas de <i>B. pertussis</i> (cepa de referência Tahoma I, <i>accession number</i> BX470248), e oligonucleotídeos de detecção. Os pontos representam identidade	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Espécies de <i>Bordetella</i> spp. associadas a doenças em seres humanos.....	3
Tabela 1.2: Representação clínica da coqueluche.	6
Tabela 1.3: Vacina contra a coqueluche, calendário de vacinação nos países europeus estudados.....	11
Tabela 1.4: Características bioquímicas para diferenciação das espécies do gênero <i>Bordetella</i>	21
Tabela 3.1 Padronização dos iniciadores para os alvos IS481 e <i>ptxS1</i>	35
Tabela 3.2 Padronização de cofatores utilizados na reação para os alvos IS481 e <i>ptxS1</i>	36
Tabela 3.3: Microrganismos utilizados no teste de especificidade analítica. ...	40
Tabela 4.1: Iniciadores e sondas selecionados para otimização da reação para detecção IS481 e <i>ptxS1</i>	43
Tabela 4.2: Valores obtido na regressão linear de qPCR no formato líquido e gelificado, e limite de detecção para IS481 e <i>ptxS1</i>	53
Tabela 5.1: Algoritmo proposto para detecção dos casos de Coqueluche.	62

LISTA DE ABREVIATURAS

- AC** – Toxina adenilato ciclase
- Ac** – anticorpo
- ag** – atogramas
- AMPc** – adenosina monofosfato cíclico
- Bvg** – *Bordetella virulence genes*
- BvgA** – *Bordetella virulence genes activated*
- BvgS** – *Bordetella virulence genes supressor*
- BHQ1** – *Black Hole Quencher 1*
- BSA** – Albumina de Soro Bovino
- CDC** – *Centers for Disease Control and Prevention*
- CDPH** – Departamento de Saúde Pública da Califórnia
- CR-3** – Receptores específicos presente nos macrófagos
- CT** – Citotoxina traqueal
- C_t** – *Cycle threshold*
- DFA** – Anticorpo fluorescente direto
- dT** – difteria e tétano
- DTP** – difteria, tétano e coqueluche
- dTTP** – desoxitimidina trifosfato
- dUTP** – desoxiuridina trifosfato
- DTPw** – tríplice Bacteriana de células inteiras
- dTpa** – Tríplice Bacteriana acelular
- ELISA** – *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- FAM** – 6-carboxyfluorescein
- F** – iniciador *foward*
- FIM-2** – Fimbrias 2
- FIM-3** – Fimbrias 3

fg – fentogramas

FHA – Hemaglutinina filamentosa

GPI – *Global Pertussis Initiative*

HLT – Toxina dermonecrótica ou toxina termo-lábil

IL-1 – interleucina-1

IS – sequência de inserção

LACEN – Laboratório Central

LB - Meio Luria Bertani

LOD – limite de detecção

LPS – lipopolissacarídeo

mbar – Milibar

mM – milimolar

min – minutos

MgSO₄ - sulfato de magnésio

MgCl₂ – cloreto de magnésio

ng – nanogramas

nM – nanomolar

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

PRN – Pertactina

PT – Toxina pertussis

ptxS1 – Subunidade 1 da toxina pertussis

ptxA – a subunidade da toxina A de pertussis

ptxP – promotor para toxina de pertussis

P – *probe*

pg – picogramas

qPCR – PCR em Tempo Real

R – iniciador *reverse*

R² – coeficiente de correlação

RL – meio Regan Lowe

RNaseP – ribonuclease P humana

rRNA 16S – RNA ribossomal 16S

Sinan – Sistema de Informações sobre Agravos de Notificação

SNP – polimorfismo de nucleotídeo único

S1 – subunidade 1

S2 – subunidade 2

S3 – subunidade 3

S4 – subunidade 4

S5 – subunidade 5

UNG – Uracil N-Glicosilase

μL – microlitro

UV – radiação ultravioleta

μg – micrograma

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Bordetella pertussis*

1.1.1. Histórico

A coqueluche foi mencionada pela primeira vez em 1540 na Inglaterra, e a primeira epidemia registrada no ano de 1578, em Paris. A epidemia ocorrida foi estudada pelo médico francês Guillaume de Baillou e seus resultados foram publicados e discutidos apenas em 1640 (CHERRY, 1999).

A doença era conhecida como “the Kink” nas Ilhas Britânicas, termo escocês que significa ataque ou paroxismo e no norte da Europa ficou conhecida como “Kindhoest”, do termo alemão que significa tosse de criança. Diversos outros termos foram designados para a doença, tais como: tosse em guincho, tosse perene, tosse perene infantil, tosse convulsiva, tosse quinta, tosse quintana e tosse comprida (CHERRY, 1999).

No ano de 1900, Jules Bordet e Octave Gengou observaram a presença de um microrganismo microscópico no escarro de um paciente com coqueluche. Posteriormente, em 1906, após várias tentativas, a bactéria foi isolada pelos mesmos pesquisadores. Eles observaram a presença de cocobacilos gram-negativos e também presença de leucócitos, demonstrando então a associação entre a presença de bactérias e os sintomas clínicos da doença (BORDET & GENGOU, 1906)

Em 1916, Chievitz e Meyer coletaram muco expelido de pacientes em soluções fisiológicas e semearam a bactéria no meio de cultura Bordet-Gengou, conseguindo então o isolamento de *B. pertussis*, inicialmente denominada *Haemophilus pertussis* (GONÇALVES, 2004; CHERRY, 2007).

Durante grande parte do século XX, *B. pertussis* foi isolada e cultivada no meio Bordet-Gengou. A coleta das amostras era realizada através de “placas de tosse” onde uma placa contendo o meio de cultura era colocada a uma determinada distância da boca do paciente durante a tosse do mesmo. Posteriormente, outra espécie, *B. parapertussis*, foi identificada por Eldering e Kendrick, descrita como uma espécie da bactéria que causava uma doença parecida. Mais recentemente, em 1995, *B. holmesii*, também foi identificada como agente causador de infecção semelhante à de *B. pertussis* (CHERRY, 2007; PITTET *et al.*, 2014).

1.1.2. Etiologia

As bactérias do gênero *Bordetella* pertencem à família *Alcaligenaceae*, ordem *Burkholderiales* e classe *Betaproteobacteria*, sendo que o termo “*Bordetella*” surgiu devido ao primeiro isolamento da bactéria feita por Jules Bordet e Octave Gengou em 1906 (BORDET & GENGOU, 1906).

Os organismos que pertencem a esse gênero são pequenos cocobacilos gram-negativos, aeróbio restrito, de cultivo exigente e sua temperatura ideal de crescimento é entre 35-37 °C (IRINO, 2010). As espécies de *Bordetella* spp. se movimentam através de flagelos peritríqueos, localizando-se e multiplicando-se nos cílios epiteliais do trato respiratório (SANDEN & WEYANT, 2005).

Atualmente, estão descritas na literatura oito espécies nesse gênero: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum* e *B. petrii* (SANDEN E WEYANT, 2005; WIRSING VON KÖNIG, 2011).

B. pertussis, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* e *B. holmesii* são as espécies de maior atenção por terem sido associadas a infecções respiratórias em humanos e outros mamíferos (Tabela 1.1) (MATTOO & CHERRY, 2005; GROSS *et al.*,2010). Por outro lado, pouco se sabe sobre o impacto das demais espécies do gênero na saúde humana (MATTOO *et al.*,2001).

Embora *B. trematum* já tenha sido isolada de ouvido e feridas na pele de seres humanos, nenhum caso de infecção respiratória relacionada a essa bactéria foi reportado (MATTOO & CHERRY, 2005). Já *B. hinzii*, que acomete principalmente aves, possui um grande potencial patogênico em pacientes imunocomprometidos (GROSS *et al.*,2010).

Estudos sobre a filogenia baseada no sequenciamento do gene que codifica para o RNA ribossomal 16S (rRNA 16S) mostrou que as espécies *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* e *B. holmesii* são altamente relacionadas (LOEFFELHOLZ, 2003; LOEFFELHOLZ & MIKE, 2007).

Existem estudos mostrando que as espécies *B. pertussis* e *B. parapertussis* evoluíram a partir de um mesmo ancestral comum de *B. bronchiseptica* e se adaptaram ao hospedeiro humano. Porém, apesar do parentesco genético entre algumas espécies de *Bordetella*, ainda são consideradas espécies distintas,

especialmente em relação às diversidades genéticas, imunológicas e fenotípicas entre elas (LOEFFELHOLZ, 2003; LOEFFELHOLZ & MIKE , 2007)

B. pertussis, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* são espécies que apresentam semelhanças quando se trata da morfologia da colônia formada após o seu crescimento, bem como o tamanho das células presentes. Entretanto, essas espécies podem ser diferenciadas por outras características particulares, através de atividades bioquímicas e antígenos presentes na superfície celular (CHERRY, 1999).

Tabela 1.1: Espécies de *Bordetella* spp. associadas a doenças em seres humanos.

Organismo	Derivação histórica
<i>B. pertussis</i>	<i>per</i> , muito ou “grave”; <i>tussis</i> , “tosse” (tosse grave)
<i>B. parapertussis</i>	<i>para</i> , “semelhante” (semelhante a <i>pertussis</i>)
<i>B. bronchiseptica</i>	<i>bronchus</i> , a traquéia; <i>septicus</i> , séptico (brônquio infectado)
<i>B. holmesii</i>	Denominada em homenagem ao microbiologista Barry Holmes

Fonte: (PATRICK R. MURRAY, KEN S. ROSENTHAL, 2013).

A bactéria *B. pertussis* é o agente etiológico da coqueluche endêmica e epidêmica. Essa bactéria foi adaptada exclusivamente ao hospedeiro humano e não há evidências de infecções em animais (MATTOO *et al.*,2001).

É uma bactéria imóvel, sendo considerada a espécie mais fastidiosa do gênero e requerendo um meio altamente nutricional para o seu crescimento. A espécie *B. pertussis* é susceptível a substâncias e metabólitos tóxicos, como íons metálicos e peróxidos frequentemente presentes em alguns meios de cultura. Para o seu isolamento e cultivo, utiliza-se atualmente o meio de cultura Ágar Regan-Lowe (RL). Os meios de cultura devem ser suplementados com carvão, sangue ou albumina para que ocorra absorção das substâncias tóxicas, adicionando também cefalexina para impedir o crescimento da flora natural do trato respiratório (LOEFFELHOLZ *et al.*,2003; PATRICK R. MURRAY, KEN S. ROSENTHAL, 2013).

A espécie *B. bronchiseptica* infecta uma ampla gama de animais, que inclui pequenos ratos, cobaias, coelhos, gatos, cães, porcos, ovelhas, cavalos e ursos (MATTOO & CHERRY, 2005). Porém, ocasionalmente, pode causar infecções respiratórias graves em seres humanos imunocomprometidos, como por exemplo, pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (CHERRY & HEININGER, 2004; WOOLFREY & MOODY, 1991).

A *B. holmesii* é a mais recente espécie do gênero associada à infecção do trato respiratório em humanos. Foi isolada a partir de sangue de adultos e jovens e foi encontrada com menor frequência em amostras de escarro, podendo até mesmo, em alguns casos, causar sepse (WEYANT *et al.*, 1995; TANG *et al.*, 1998; PATRICK R. MURRAY, KEN S. ROSENTHAL, 2013)

A bactéria *B. parapertussis* que acomete humanos é uma espécie que sofreu adaptações, causando a síndrome coqueluchóide, uma doença semelhante à coqueluche (MATTOO & CHERRY, 2005). Porém, é uma doença com sintomas mais brandos e não causa linfocitose (MATTOO & CHERRY, 2005; GROSS *et al.*, 2010).

A *B. parapertussis* que infecta ovinos foi isolada das vias respiratórias tanto de ovelhas que apresentavam sintomas, assim como de ovelhas assintomáticas. As infecções de *B. parapertussis* que acometem ovinos podem estar relacionadas a pneumonias resultantes de infecções secundárias causadas por outros patógenos, como *Mannheimia haemolytica* (DEEB *et al.*, 1990).

1.1.3. Patogenia

B. pertussis é altamente contagiosa e de transmissão direta, a qual ocorre de uma pessoa doente para outra pessoa susceptível, através de gotículas de secreção da orofaringe eliminadas por tosse, espirro e ao falar. Essa espécie acomete apenas os seres humanos, não havendo nenhum tipo de animal ou reservatório ambiental conhecido (MATTOO & CHERRY, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Outros patógenos como *B. parapertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, adenovírus, vírus sincicial respiratório e vírus influenza e parainfluenza podem causar uma síndrome parecida, chamada de síndrome coqueluchóide (GUIA VE, 2005; WIRSING VON KÖNIG, *et al.*, 2011).

A infecção inicia-se quando ocorre a adesão de *B. pertussis* nas células epiteliais ciliadas do trato respiratório superior, evento promovido por fatores de virulência como adesinas e toxinas (Figura 1.1), que interferem no movimento ciliar normal. Após a colonização, ocorre a proliferação bacteriana no local, resultando em destruição da mucosa ciliada (ciliocitase), danos ao trato respiratório, liberação de muco e influxo do mesmo para o lúmen do trato respiratório, levando ao sintoma mais comum da doença, a tosse (MATTOO e CHERRY, 2005; TOZZI *et al.*,2005).

Após a exposição do ser humano à bactéria, quatro eventos ocorrem no processo de patogênese da doença: (1) fixação da bactéria no epitélio ciliado do trato respiratório; (2) evasão da resposta imune do hospedeiro; (3) danos locais e danos sistêmicos, levando a (4) um declínio dos mecanismos de defesa do paciente (cílios e neutrófilos), dificultando a expulsão da bactéria. A *B. pertussis* não atravessa a camada epitelial e os efeitos locais e sistêmicos são causados pela absorção das toxinas produzidas durante o processo de patogênese (HEWLETT, 1999; GENTILE, 2010).

Além da tosse paroxística, quando o paciente realiza inspira o ar profundamente, libera um som de “guincho”, que também caracteriza a fase paroxística. A tosse paroxística é mais intensa nas primeiras duas semanas e diminui gradativamente até desaparecer, dando lugar a crises de tosse comum e iniciando a última fase da doença denominada fase de convalescença (GUIA VE, 2005; TOZZI *et al.*,2005).

A terceira e última fase dura cerca de 2-6 semanas e, em alguns casos, pode prolongar-se por até 3 meses. Ela é marcada pela diminuição da intensidade do paroxismo, tornando-se semelhante a uma bronquite (Tabela 1.2) (GUIA VE, 2005; TOZZI *et al.*,2005).

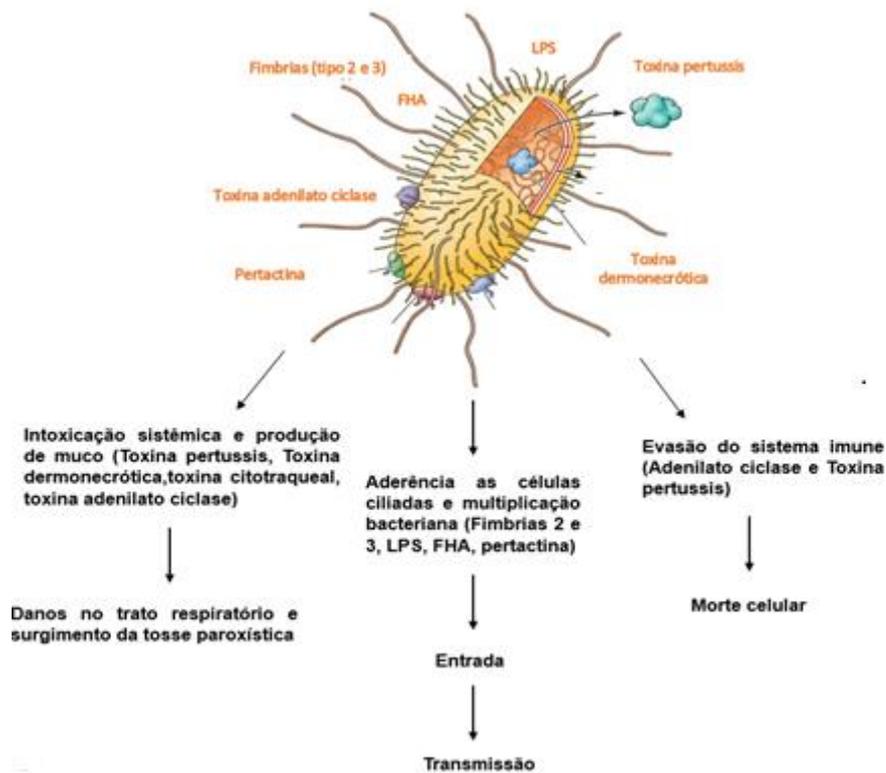


Figura 1.1: Patogênese de infecção causada por *B. pertussis*.

Fonte: extraído e adaptado de Museum of Health Care, 1990.

Tabela 1.2: Representação clínica da coqueluche.

	Incubação	Fase Catarral	Fase Paroxística	Fase Convalescença
Duração	7-10 dias	1-2 semanas	2-6 semanas	2-6 semanas (até 3 meses)
Sintomas	Nenhum	Febre baixa, coriza, mal-estar, espirros	Tosse paroxística, vômitos, leucocitose	Diminuição da tosse paroxística, desenvolvimento de complicações secundárias (pneumonia, encefalopatias, convulsões)

Fonte: Modificado de Murray *et al.*, 2013.

1.2. COQUELUCHE

1.2.1. Vacinação

As primeiras vacinas experimentais utilizadas no combate e prevenção da doença foram desenvolvidas na década de 30. Porém, somente em 1944 foi demonstrada a eficácia das vacinas celulares contra a coqueluche, quando o Conselho de Farmácia e Química da Associação Médica Americana aceitou a introdução da vacina celular aprovando a imunização contra a coqueluche (CHERRY, 1999).

As vacinas celulares contra a coqueluche são constituídas através de uma suspensão bacteriana inativada pelo calor. As primeiras vacinas celulares foram licenciadas primeiro nos Estados Unidos e somente em 1948 a vacina tornou-se disponível. Porém, essas vacinas causavam vários efeitos colaterais, como febre e outros eventos sistêmicos, além de vermelhidão, dor e inchaço no local da aplicação. Para diminuir as reações causadas pelas vacinas celulares, foram desenvolvidas as vacinas acelulares, que apresentam menores reações adversas, e diferindo apenas pela quantidade de toxóide diftérico-tetânico e de componentes celulares de *B. pertussis* (CDC, 2015).

Todas as vacinas acelulares são compostas de proteínas purificadas da bactéria alvo. No caso da vacina contra coqueluche, atualmente usa-se a toxina pertussis em conjunto com uma, duas ou quatro adesinas (FHA; FHA com PRN; FHA com PRN e FIM2/FIM3), quimicamente ou geneticamente detoxificadas (WEBER *et al.*,2001).

Quando comparadas, ambas as vacinas possuem eficácia similares e a variabilidade entre elas pode estar relacionada à composição da vacina e aos processos de fabricação. Um fator que pode estar relacionado com a diferença na eficiência das vacinas é a discrepância entre a composição antigênica das cepas vacinais, em relação às cepas de *B. pertussis* circulantes onde foram produzidas as vacinas (MOOI *et al.*,2001; WEBER *et al.*,2001).

A vacina contra a coqueluche é combinada com tétano e difteria, conhecida comumente como vacina tríplice bacteriana, (DTP- difteria, tétano e coqueluche). Ela

pode também estar associada a outras vacinas, chamadas de vacinas combinadas, sendo tetra, penta e hexa. As possíveis apresentações das vacinas são: Tríplice Bacteriana pediátrica de células inteiras (DTPw), Tríplice Bacteriana pediátrica acelular (dTpa) e Tríplice Bacteriana adulto acelular (dTpa). As vacinas podem ser combinadas com outros patógenos, como:

- Tetra de células inteiras - DTPw + Hib (contra difteria, tétano e coqueluche e infecções graves causadas pelo *Haemophilus influenzae*);
- Tetra acelular - DTPa + Hib;
- Penta acelular – DTPa + Hib + Pólio Injetável;
- Hexa acelular – DTPa + Hib + Pólio Injetável + Hepatite B

A vacinação contra a coqueluche em crianças possui três doses e dois reforços: doses aos 2,4 e 6 meses e reforços aos 18 meses e entre 5 e 6 anos de idade com DTPw, mantendo a criança protegida por cerca de 10 anos após a última dose. Após esse período, os níveis de anticorpos vão diminuindo, deixando os adultos e adolescentes suscetíveis, fazendo-se necessário o reforço da vacina na idade adulta (VACCINI, 2015).

Apesar da coqueluche causar uma doença branda ou até mesmo assintomática em jovens e adultos, a vacinação se torna importante, pois esses portadores têm sido os maiores transmissores da doença e os responsáveis pelo aumento da incidência da doença nos últimos anos, principalmente aqueles que convivem com bebês e crianças. Nesses pacientes é utilizado o esquema básico de três doses de DTPw ou DTPa ou dT (difteria e tétano) que devem receber uma dose de dTpa, dez anos após o último reforço de DTPw ou DTPa, com objetivo de diminuir o risco da transmissão do agente etiológico desses para a criança com esquema de vacinação incompleto. Recomenda-se também, a vacinação em gestantes (DTPa) entre a 27 e 32 semanas de gestação, independentemente do tempo transcorrido da última dose administrada nessas pacientes (VACCINI, 2015).

Em 2015, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) realizou um estudo nos 50 estados dos EUA, demonstrando a importância da vacinação e o seu impacto até 2010. Após a introdução da vacinação, houve um período (1955 a 1974)

em que nenhum caso de coqueluche foi reportado. Porém, após 1974, foi possível observar o ressurgimento da doença, onde vários casos foram reportados até o ano de 2010 (Figura 1.2) (TYNAN & FRIEDMAN, 2015).

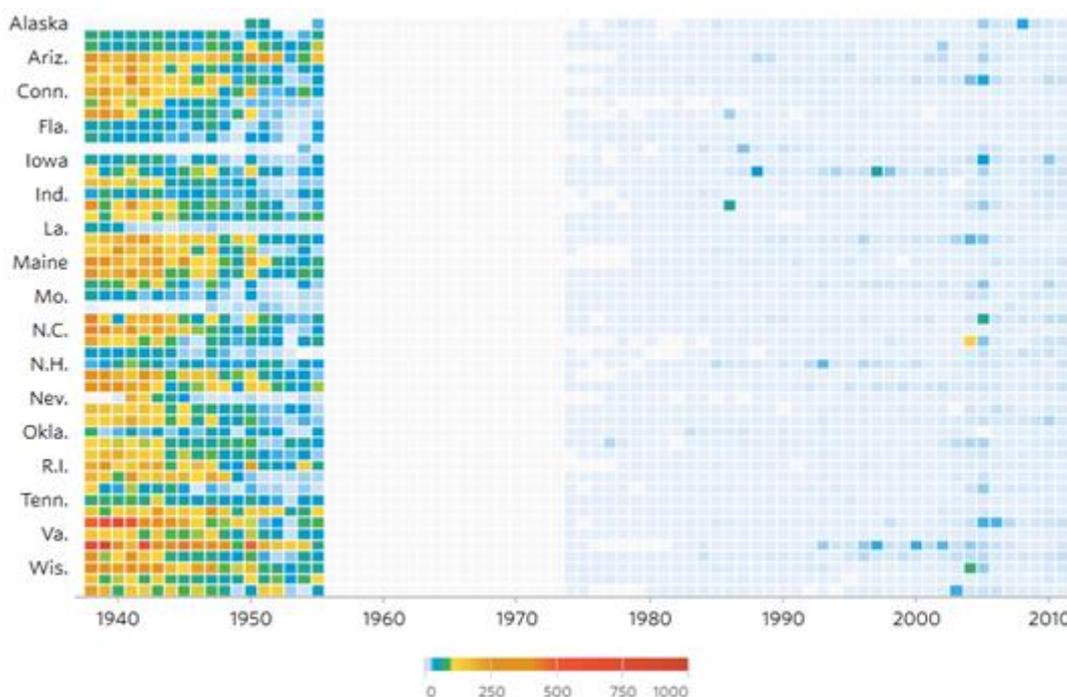


Figura 1.2: Casos reportados de coqueluche após a introdução da vacina nos Estados Unidos.

Fonte: CDC, 2015.

1.2.2. Epidemiologia da coqueluche no mundo

A coqueluche é um problema de saúde pública e apesar de haver o controle da doença em diversos países, ela é uma importante causa de morbidade e mortalidade infantil. O maior registro de casos ocorre principalmente em regiões com baixa cobertura vacinal. Em todo o mundo, estima-se que existam 16 milhões de casos de coqueluche e que 195 mil crianças vão a óbito todo o ano. A maioria das mortes, ocorrem em bebês não vacinados ou com a imunização incompleta. A bactéria *B. pertussis* vem circulando em todo o mundo e as taxas da doença são mais altas em países em desenvolvimento. Já em países desenvolvidos, a incidência dos casos vem

umentando devido à contaminação em bebês não vacinados e adolescentes (CDC, 2015).

A incidência dos casos de coqueluche ocorre em épocas quentes do ano, principalmente no verão e na primavera, devido ao aumento de pessoas que circulam nas ruas, facilitando a transmissão da doença. Não existe uma distribuição geográfica preferencial da coqueluche e não há características conhecidas que predisponham a doença. O que predispõe humanos a serem ou não susceptíveis à doença é a presença ou ausência de imunidade específica (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2009).

Os casos da doença registrados em adolescentes e adultos são considerados os principais reservatórios para *B. pertussis*, além de serem uma das principais fontes de transmissão para lactentes e crianças parcialmente imunizadas. Como a coqueluche é conhecida por ser uma doença infantil, provavelmente em adultos os casos são subnotificados, mesmo que estes apresentem os sintomas típicos da doença. As subnotificações de casos em adultos estão relacionadas principalmente com o desempenho insuficiente de técnicas laboratoriais não padronizadas e diferentes definições de casos (WIRSING VON KÖNIG *et al.*,2002; TAN *et al.*,2005; RENDI-WAGNER *et al.*,2010).

Na Europa, foi desenvolvido um programa de vigilância denominado “Programa de Pesquisa Europeu para melhorar a caracterização de cepas e de vigilância de *B. pertussis*” (Eupertstrain). Um dos objetivos desse programa é estudar as diversas cepas por meio de metodologia padronizada para determinar a extensão do polimorfismo das bactérias circulantes, a fim de evitar surtos, reduzir as taxas de morbidade e a mortalidade associadas à doença. Os países participantes desse programa incluem Finlândia, Suécia, Alemanha, Holanda e França, sendo seus programas de vacinação são comparados na Tabela 1.3 (VAN AMERSFOORTH *et al.*,2005).

Tabela 1.3: Vacina contra a coqueluche, calendário de vacinação nos países europeus estudados.

PAÍS	VACINA	ÍNÍCIO DA VACINAÇÃO	COBERTURA VACINAL (%)	CALENDÁRIO DE VACINAÇÃO
Finlândia	Celular	1952	96%	3, 4, 5, 24 meses
Suécia	Acelular	1996	100%	3, 5, 12 meses
Alemanha	Acelular	1995	95%	3, 4, 5, 11-14 meses, 9-17 anos e profissionais da saúde
Holanda	Celular	1953	96%	3, 4, 5, 11 meses
França	Celular	1959	90%	2, 3, 4, 16-18 meses (até 1998)
	Acelular	1998	90%	2, 4, 6, 16-18 meses, 11-13 anos

Fonte: extraído e modificado de Amersfoorth *et al.*,2005.

No ano de 2012, um grande surto de coqueluche ocorreu na Inglaterra, com 9.711 de casos confirmados e levando ao óbito de 14 crianças menores de três meses. Esses números foram superiores ao surto de 2008, que teve 8 mil casos notificados, confirmando o ressurgimento da doença (SEALEY *et al.*,2014).

Apesar de haver diversos programas de vacinação eficazes, vários relatos mostram nitidamente um aumento no número de casos da doença em hospitais, e também em crianças recém-nascidas, levando às complicações da doença e consequentemente a óbito (WIRSING VON KÖNIG *et al.*,2002, YAO *et al.*,2005).

Na década de 1990, foram registrados 20-40 milhões de casos de coqueluche no mundo com 200-400 mil casos de morte por ano. A hipótese é de que apesar de haver uma diminuição dos casos da doença com o aumento da cobertura vacinal, vários países desenvolvidos vêm relatando o reaparecimento da doença em lactentes não vacinadas, crianças, jovens e adultos. Razões que explicam esse fato incluem imunidade incompleta de crianças (que não completaram as três doses da vacina) e imunidade relativamente curta (a infecção natural e a imunização não protegerem durante toda a vida), fazendo-se necessário a introdução dos reforços da vacina em jovens e adultos (TOZZI *et al.*,2005).

Nos EUA, a coqueluche é uma doença endêmica, com picos notificados a cada 3-5 anos e presença de surtos frequentes. Em 2001, foi criada a Iniciativa Global contra Pertussis (Global Pertussis Initiative - GPI), com o objetivo de estudar a doença em nível mundial e elaborar estratégias de prevenção e imunização para reduzir o número de casos (CDC, 2015; PLOTKIN, 2005). Em 2010, o CDC registrou mais de 27 mil casos de coqueluche, sendo 9.146 casos só na Califórnia (EUA), resultando em 10 óbitos em bebês menores de três meses. No ano seguinte, a incidência da doença continuou alta, registrando-se cerca de 2.462 casos até setembro (6,2 casos para cada 100 mil habitantes), sendo 8,8% (162) de hospitalizações e a maioria dos casos ocorrendo em crianças menores de seis meses de idade (CDPH, 2011).

O Departamento de Saúde Pública da Califórnia (CDPH), declarou ainda uma epidemia de coqueluche no ano de 2014, informando que a doença havia se difundindo não apenas em todas as regiões dos EUA, mas também em todo o mundo (CDPH, 2016). Em meados de 2011, houve um aumento substancial de casos no estado de Washington, com declaração de epidemia. Cerca de 2.520 casos foram notificados (37,5 casos por 100.000 habitantes), mostrando um aumento importante quando comparado com o mesmo período de 2011 (Figura 1.3) (CDC, 2012).

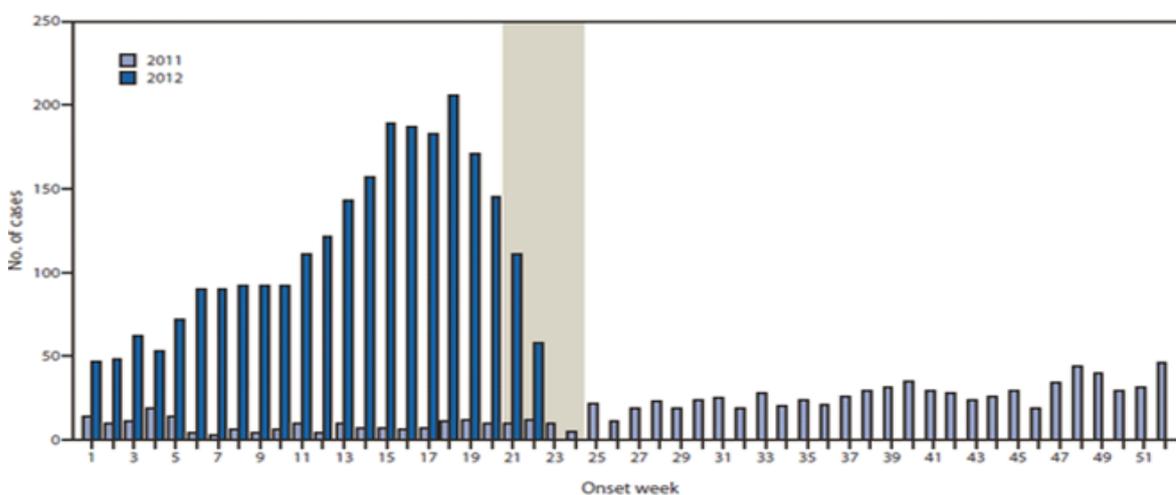


Figura 1.3: Número de casos de coqueluche notificados confirmados e prováveis em Washington de janeiro de 2011 a julho de 2012.

Fonte: CDC 2012.

Em 2012, foi registrado o maior número de casos nos EUA, com 48 mil casos, um dos maiores surtos do país. Em 2014, foram 32.971 casos registrados, representando um aumento de 15% quando comparados aos 28.639 casos de 2013, em que maioria dos óbitos ocorridos foram em recém-nacidos menores de 3 meses de idade (CDC, 2012).

1.2.3. Coqueluche no Brasil

A coqueluche é classificada como uma doença de notificação compulsória em todo o território nacional. Todo caso suspeito deve ser notificado ao Sistema de Informações sobre Agravos de Notificação (Sinan), órgão do Ministério da Saúde que contabiliza os casos de doenças no Brasil (Guia VE, 2009; BRASIL, 2010).

A morbidade da doença no Brasil já foi elevada. Na década de 80 eram notificados cerca de 40 mil casos anuais, quando a incidência da doença era superior a 30/100 mil habitantes. A partir de 1983, o número de casos despencou e no ano de 2008 o número de casos confirmados foi de aproximadamente 1.300. Acredita-se que esta diminuição seja devido à alta cobertura vacinal, principalmente a partir da década de 1990 (BRASIL, 2010).

Durante a década de 90, o cenário epidemiológico da coqueluche no Brasil apresentou uma importante redução na incidência, quando a cobertura vacinal alcançava cerca de 70% e a incidência da doença era 10,6/100 mil habitantes. Porém, quando a cobertura vacinal elevou-se para valores próximos a 95 e 100%, no período de 1998 a 2000, a incidência baixou para 0,9/100 mil habitantes. Com a manutenção das altas coberturas vacinais, observou-se variação da incidência para 0,32/100 mil habitantes, em 2010 (BRASIL, 2016)

Durante a 32ª semana epidemiológica de 2011, foram notificados 1.975 e confirmados 583 casos de coqueluche no país, dos quais 76,3% registrados em crianças menores de um ano, sendo 88,3% dos casos em crianças menores de seis meses. A incidência dos casos de coqueluche foi maior na região sudeste, com 0,5/100 mil habitantes e 0,2/100 mil habitantes nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, respectivamente. A região nordeste foi a terceira região do Brasil com a maior incidência de casos, com 0,7/100 mil habitantes no estado de Alagoas (GUIA VE 2009; CDPH, 2011).

No Estado de São Paulo, a Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória (CVE/CCD/SES-SP) implantou, no ano de 2000, o sistema de vigilância para a coqueluche com base em unidades sentinelas. Esse sistema tem como principal objetivo a triagem adequada de casos, a partir de uma definição padrão de caso suspeito e da confirmação laboratorial da doença por meio da coleta oportuna e correta da secreção da nasofaringe. A Figura 1.4 mostra a distribuição dos casos confirmados de coqueluche em unidades sentinelas do Estado de São Paulo ao longo de quatro anos (2008 a 2011) (CDPH, 2011).

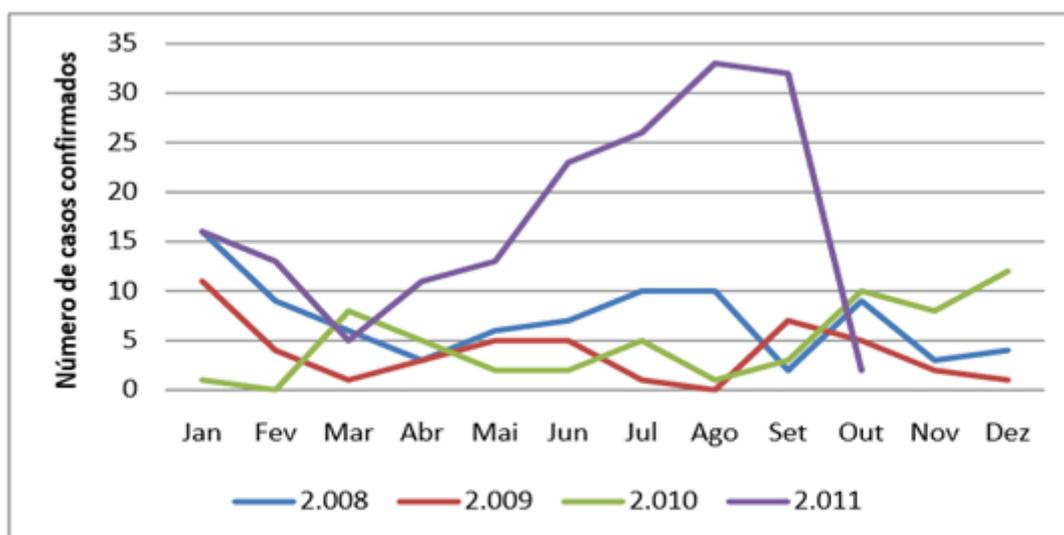


Figura 1.4: Distribuição dos casos confirmados de coqueluche em unidades sentinelas do Estado de São Paulo, segundo mês e ano, 2008 a 2011.

Fonte: SINANnet/DDTR/CVE/CCD/SES-SP.

No estado de Alagoas, em 2013, houve o ressurgimento da doença, que passou a ser monitorado pela Secretaria de Estado da Saúde. O aumento do número de casos ocorreu com as coberturas vacinais dentro dos níveis esperados de 95%. Contudo, vários fatores podem explicar o ocorrido, tais como a perda gradual da imunidade adquirida, mudanças genéticas na bactéria ou o aumento de portadores assintomáticos (SUSIVA, 2015).

No estado do Rio de Janeiro, a evolução da coqueluche ocorreu de forma semelhante ao cenário nacional. A partir de 2011, observa-se um crescimento no número de notificações, assim como no número de casos confirmados, com um crescimento ainda maior no ano de 2012, seguido de queda em 2013 e 2014. Em

relação a faixa etária, assim como em outros países e outros estados do Brasil, no estado do Rio de Janeiro cerca de 70% dos casos ocorrem em crianças menores de um ano de idade, mais precisamente em crianças menores de três meses, devido ao esquema incompleto de vacinação. Em 2014, foram confirmados 103 casos, sendo 75 destes em crianças menores de um ano. A Figura 1.5 representa a confirmação dos casos de acordo com os meses de vida (EPIDEMIOLÓGICO DO RIO DE JANEIRO, 2015).

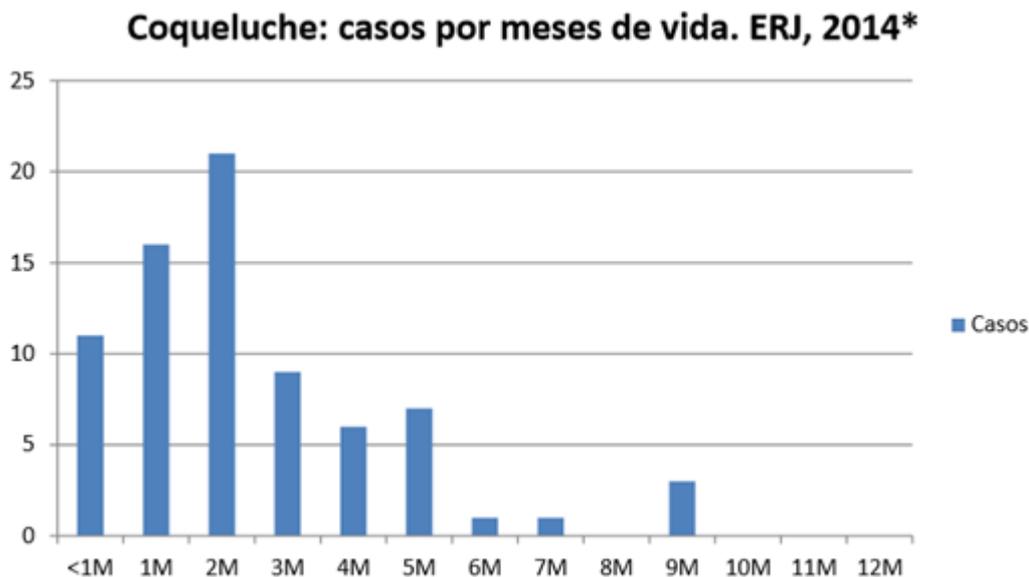


Figura 1.5: Coqueluche: casos por meses de vida no ano de 2014

Fonte: SINAN NET e Banco Estadual GDITR/SES-RJ.

Na região sul do Brasil, o Rio Grande do Sul registrou o maior número de casos, com 100 casos notificados no período de 2004 a 2009. Porém, em 2012, as notificações aumentaram para mais de 800 casos. No estado de Santa Catarina foram 265 casos notificados em 2012, bem superiores aos 48 casos em 2011. O estado do Paraná saltou para 391 casos em 2012, um aumento expressivo em relação aos 148 casos de 2011 (Figura 1.6) (SINAN, 2013).

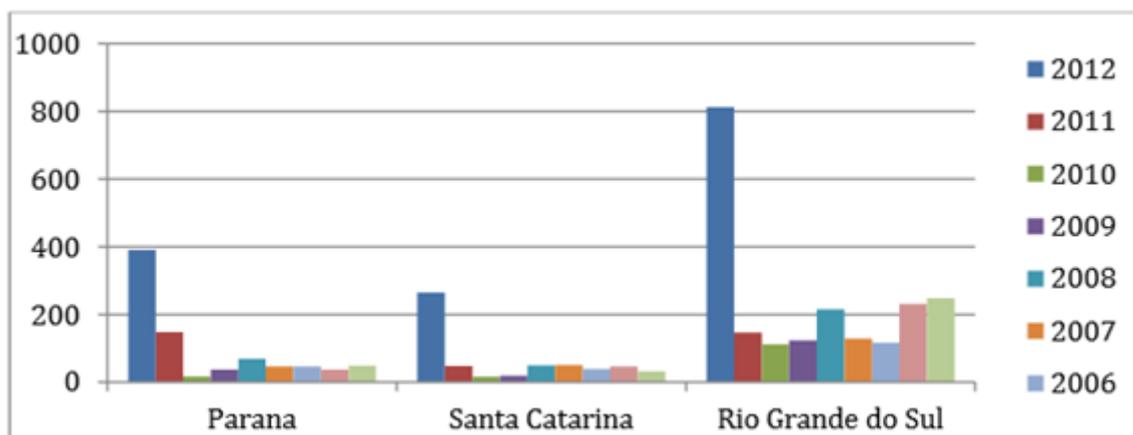


Figura 1.6: Casos de coqueluche notificados na região sul.

Fonte: Sinan/SVS/MS - 2013

Em 2015, o Brasil registrou 10.487 casos suspeitos de coqueluche no Sistema Nacional de Agravos de Notificações (Sinan) e, destes, 28,2% (2.955) foram confirmados. Dos casos confirmados, 738 foram encerrados pelo critério laboratorial. O grupo etário mais acometido pela doença foram crianças menores de 1 ano de idade, com 62,6% (1.850) dos casos, sendo a grande maioria deles, menores de 6 meses (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2016).

1.3. DIAGNÓSTICOS

1.3.1. Métodos laboratoriais para o diagnóstico

O diagnóstico da coqueluche pode apresentar alguns desafios, visto que existem apresentações atípicas da doença. Os métodos laboratoriais que confirmam a presença da doença são os diagnósticos baseados em cultura e testes imunológicos ou moleculares, que devem ser utilizados em diferentes fases da doença. Na fase inicial, recomenda-se utilizar os métodos de cultura e moleculares, enquanto os métodos imunológicos são particularmente úteis em adultos e nas fases tardias da doença (Figura 1.7) (DALBY *et al.*,2010).

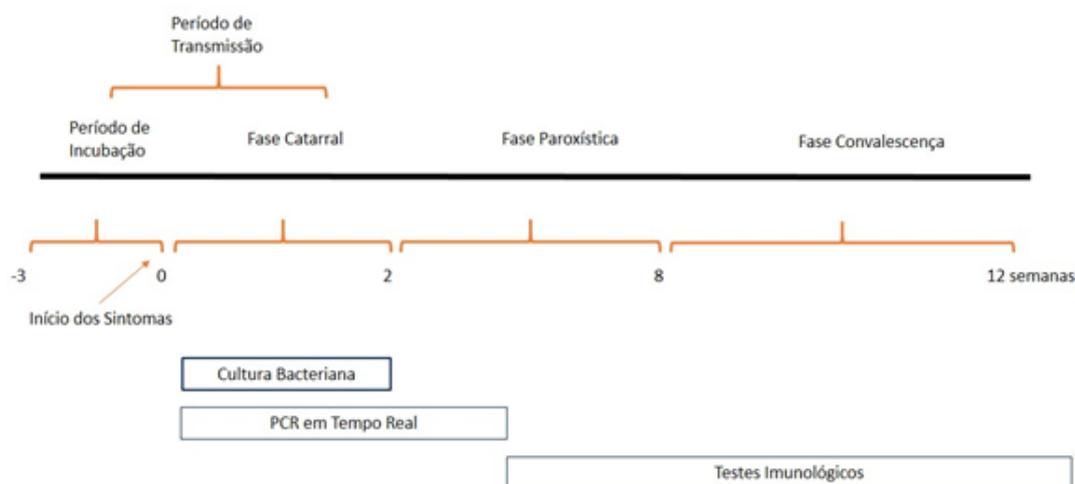


Figura 1.7: Estágios da coqueluche e os diferentes diagnósticos recomendados para as distintas fases da doença.

Fonte: Modificado de PAWLOSKI *et al.*, 2010.

1.3.2. Coleta e transporte de secreção nasofaríngea

A coleta do material de pacientes suspeitos de coqueluche deverá ser realizada preferencialmente no início dos sintomas característicos da doença (fase catarral). Esse processo deve ser realizado antes do tratamento ou no máximo com 3 dias de antibioticoterapia. Para a coleta, utiliza-se *swabs* finos com hastes flexíveis, onde a secreção nasofaríngea é coletada introduzindo o *swab* na narina até encontrar resistência na parede posterior da nasofaringe e realizando movimentos rotatórios. Após a coleta, o *swab* é introduzido em meio específico para transporte (Meio Regan Lowe - RL) que consiste de ágar carvão semi-sólido suplementado com 10% de sangue de carneiro ou cavalo e 40 µg/mL de cefalexina. Este meio nutritivo inibe o crescimento de flora normal da nasofaringe e favorece a sobrevivência de *B. pertussis* (Figura 1.8) (GUIA VE, 2005; MURRAY *et al.*, 2013; VAZ *et al.*, 2010;

Existem evidências de que os ácidos graxos presentes no algodão hidrófilo sejam tóxicos aos micro-organismos, sendo o material menos adequado para a coleta do material. Os *swabs* de alginato de cálcio são os mais indicados para a coleta do material destinados a cultura; enquanto os *swabs* de dracon ou rayon são preferíveis para a coleta de materiais submetidos a testes moleculares, como aqueles fundamentados na reação em cadeia da polimerase (PCR). O material é encaminhado

ao laboratório à temperatura ambiente e imediatamente após a coleta. Caso o exame não seja realizado logo após a coleta, deve-se armazenar o material em estufas a 35-37°C por no máximo 24 horas ; MURRAY *et al.*,2013; IRINO *et al.*,2010; CLOUD *et al.*, 2002).

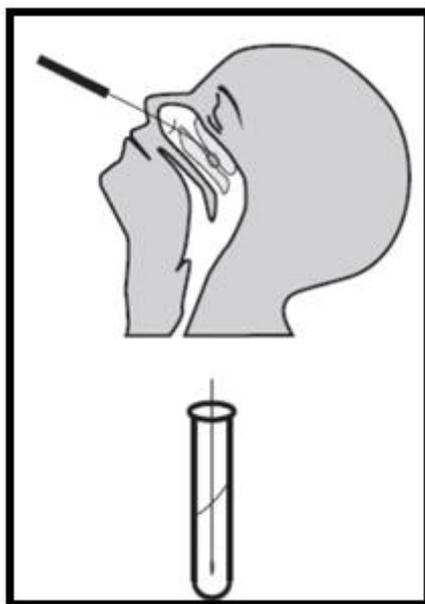


Figura 1.8: Técnica adequada para obtenção de uma amostra de nasofaringe para o isolamento de *B. pertussis*.

Fonte: Guia VE, 2005.

1.3.3. Cultura

A cultura é atualmente realizada em laboratórios para a confirmação dos casos de coqueluche, sendo considerada como diagnóstico padrão (gold standard). Possui uma especificidade de 100%, porém a sensibilidade é variável (cerca de 12-60%) mesmo quando usado meio RL padrão. O procedimento possui um sucesso maior quando realizado nas fases iniciais da doença (primeiras duas semanas), quando há alta quantidade de bactérias viáveis presentes na nasofaringe. Após esse período inicial, a sensibilidade do teste é reduzida, podendo ocorrer um aumento nos resultados falsos-negativos. Outros fatores que podem influenciar na sensibilidade da cultura são: antibioticoterapia, estado da doença, qualidade da coleta e do transporte do material, processamento da amostra, tipo de *swab* utilizado na coleta, tempo decorrido da coleta até o processamento da amostra e presença de outras bactéria na nasofaringe (PRESTON, 1970; REGAN e LOWE, 1977; ONORATO & WASSILAK,

1987; MORRILL *et al.*,1988; LOEFFELHOLZ *et al.*,1999; MCGOWAN, 2002; TATTI *et al.*,2008; CDC, 2015).

As colônias de *B. pertussis* crescem na placa a partir do 3º- 4º dia após o seu isolamento, enquanto que as colônias de *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* passam a ser visíveis já a partir do segundo dia. As colônias visíveis de *B. pertussis* apresentam-se de formas diminuídas (1mm de diâmetro), brancas acinzentadas e convexas (Figura 1.9 e Figura 1.10), sendo também caracterizadas pela Coloração de Gram como cocobacilos Gram-negativos (Figura 1.11). Após isso, são realizadas também provas bioquímicas para diferenciação das espécies (Tabela 1.4). A espécie *B. pertussis* é a mais fastidiosa e não cresce em meios de cultura comuns, além de oxidar aminoácidos e ser susceptível a substâncias e metabólitos tóxicos, como os ácidos graxos, íons metálicos e peróxidos, presentes em muitos meios de cultura. Para que ocorra a eliminação dessas substâncias tóxicas, os meios de cultura são suplementados com carvão, sangue, albumina ou amido (LOEFFELHOLZ, *et al.*,2003; IRINO *et al.*,2010; MURRAY, *et al.*,2013).



Figura 1.9: Cultivo de *B. pertussis* em placa de Petri contendo meio específico RL.

Fonte: (IRINO *et al.*,2010).



Figura 1.10: Colônias de *B. pertussis* em meio específico RL.

Fonte: (IRINO *et al.*,,2010).

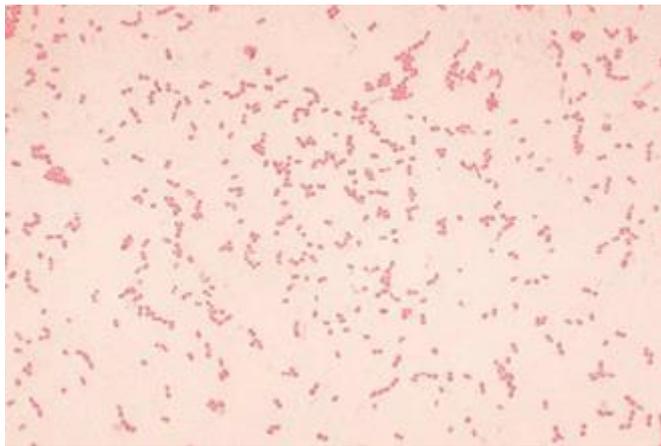


Figura 1.11: *B. pertussis* submetida à coloração de Gram e visualizada no microscópio óptico (aumento 100x)

Fonte: (IRINO *et al.*,,2010).

Tabela 1.4: Características bioquímicas para diferenciação das espécies do gênero *Bordetella*.

Características Bioquímicas	<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. petrii</i>	<i>B. trematum</i>
Oxidase	+	-	+	+	+	-	+	-
Catalase	+	+	+	+	+	10% P	+	+
Motilidade	-	-	+	+	+	-	-	+
Crescimento em ágar								
Ágar Regan-Lowe	3-4 dias	2-3 dias	1-2 dias	ND	ND	ND	ND	ND
Ágar Sangue	-	+	+	+	+	+	+	+
Ágar MacConkey	-	-	+	+	+	10% P	+	+
Ágar Citrato de Simmons	-	-	10% P	10%P	+	-	+	+

Fonte: (IRINO *et al.*,2010)

1.3.4. Métodos imunológicos

O método de Imunofluorescência Direta (DFA) é baseado na detecção de *B. pertussis* nas secreções da nasofaringe, usando anticorpos monoclonais ou policlonais contra estruturas da bactéria. O teste permite a visualização de antígenos em suspensão nos tecidos celulares, através de anticorpos marcados com fluorocromos que serão visualizados com auxílio de um microscópio de fluorescência (KNORR *et al.*,2006).

Apesar de ser um teste rápido, a sensibilidade e a especificidade são variáveis. A sensibilidade do teste pode variar de 11 a 71%, sendo inferior a sensibilidade da PCR, porém superior quando comparado com a cultura (LOEFFELHOLZ *et al.*,1999; TILLEY *et al.*,2000; LINGAPPA *et al.*,2002; KL., 2002).

A especificidade do DFA é muito variável, devido a reações cruzadas com os reagentes imunológicos e a subjetividade na interpretação da fluorescência. Assim, devido às dificuldades de interpretação, recomenda-se utilizar a técnica em paralelo à cultura ou a PCR (LOEFFELHOLZ, 2003; MURRAY, 2013; CDC, 2015; KL., 2002).

Para a detecção de anticorpos específicos, o teste sorológico de escolha nas últimas décadas é o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (LOEFFELHOLZ, 2003; PEREZ *et al.*,2012).

O teste ELISA tem se mostrado um método eficaz no processo de detecção e dosagem do aumento significativo dos títulos de anticorpos séricos de classe IgM e IgG e IgA contra estruturas antigênicas como hemaglutinina filamentosa, toxina pertussis, fimbrias, pertactina e outras presentes na bactéria, principalmente nas fases agudas e na convalescença (LOEFFELHOLZ, 2003; MÜLLER *et al.*,1997).

A sensibilidade do ELISA depende muito do momento da coleta da amostra, da escolha do antígeno e da classe da imunoglobulina. A sorologia para anticorpo da classe IgG para toxina pertussis e FHA é muito sensível para os casos clássicos da doença, porém menos sensíveis nos membros que já entraram mais de uma vez em contato, provavelmente devido à maior chance de resposta imune secundária (MÜLLER *et al.*,1997; HALLANDER, 1999). A sensibilidade de um teste de ELISA para detecção de IgG anti-PT chega a 76% de sensibilidade e 99% de especificidade (CROWCROFT & PEBODY, 2006).

Em crianças vacinadas, o diagnóstico se torna difícil devido ao aumento rápido nas concentrações séricas de anticorpos. A detecção de IgA para os diferentes antígenos de *B. pertussis* tem sido descrito como critério para definição de caso para coqueluche em crianças não-vacinadas (MÜLLER *et al.*,1997; HALLANDER, 1999; SANDEN E WEYANT, 2005 ; ANDRÉ *et al.*,2008).

1.3.5. Métodos moleculares e genes alvo

Em muitos laboratórios, o diagnóstico da coqueluche é realizado através da amplificação de diferentes alvos genômicos da bactéria, utilizando a técnica de PCR convencional, que foi descrito pela primeira vez em 1988 e a técnica de PCR em Tempo Real (qPCR) descrita no ano de 1993 (SAIKI *et al.*,1988).

Hoje, os principais testes para o diagnóstico molecular de *B. pertussis* são baseados na detecção de sequências de inserção (IS) escolhidas por apresentarem diversas cópias no genoma, permitindo que o ensaio seja altamente sensível (TIZOLO *et al.*,2013; TATTI *et al.*,2011)

Porém, as IS são detectadas nos genomas de várias espécies de *Bordetella* de tal modo que o alvo não é espécie específico (KNORR *et al.*,2006; TATTI *et al.*,2011).

Para a detecção de *B. pertussis*, IS481 é frequentemente escolhida por apresentar diversas cópias no genoma (50-238 cópias). Porém, IS481 está presente também em *B. holmesii* (8-10 cópias), e em raras amostras de *B. bronchiseptica* isoladas de humanos. O gene da toxina pertussis está presente também em *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*, mas devido a mutações na região promotora, o gene não é expresso por essas espécies (TATTI *et al.*,2011; PITTET *et al.*,2014).

A IS1001 é encontrada em todas *B. parapertussis*, incluindo aquelas isoladas de seres humanos e de animais, enquanto IS1002 se faz presente apenas em *B. parapertussis* que infecta humanos (ROORDA *et al.*,2011; LOEFFELHOLZ, 2012).

É importante ressaltar que, apesar dos testes moleculares serem mais sensíveis, a utilização de um único ensaio com apenas um alvo para detecção de *B. pertussis* pode levar a resultados falso-positivos, demonstrando assim a necessidade da combinação de, no mínimo, dois alvos para detecção e identificação de *B. pertussis* (KNORR *et al.*,2006; TATTI *et al.*,2011).

Assim, com o intuito de melhorar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico das infecções causadas por *B. pertussis*, foram desenvolvidos testes no qual o diagnóstico de coqueluche é dado pela detecção simultânea de IS481 e da subunidade S1 do gene da toxina pertussis (*ptxS1*) (KNORR *et al.*,2006; LOEFFELHOLZ, 2012; TATTI *et al.*,2008; TATTI *et al.*,2011).

Como controle interno das reações, alguns grupos utilizam o gene que codifica para ribonuclease P humana (*RNaseP*), que atua como controle da ausência de inibidores da reação de PCR e também como controle positivo da reação, indicando a integridade da amostra clínica do paciente e atestando a qualidade do método de extração do DNA (TATTI *et al.*,2008; TATTI *et al.*,2011).

1.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction* (PCR), vem sendo considerada o teste primário para o diagnóstico de diversas doenças, apresentando sensibilidade superior à cultura e ELISA. Por se tratar de uma técnica em que a obtenção do resultado é rápida, a PCR pode ser um fator crucial para diagnóstico de coqueluche durante surtos epidêmicos e para controle da doença. Apesar da técnica também detectar organismos não viáveis, a PCR fornece resultados positivos por um período maior da doença quando comparada com a cultura. O CDC recomenda que a PCR seja usada como um método paralelo à cultura (MÜLLER *et al.*, 1997; CDC, 2000; LOEFFELHOLZ, 2003).

A PCR ainda pode apresentar resultados positivos mesmo após dias de tratamento com antibióticos. Com esse intuito, Von König e colaboradores realizaram uma pesquisa a fim de avaliar a sensibilidade da PCR após a administração de antibióticos em pacientes. Foi observado, em crianças que foram tratadas com eritromicina durante quatro dias de tratamento, 56-89% de positividade para cultura e PCR a partir de amostras de nasofaringe. Já a partir do sétimo dia de tratamento, não houve nenhum resultado positivo para a cultura, mas 56% das amostras apresentaram-se positivas para PCR (MÜLLER *et al.*,1997; LOEFFELHOLZ, 2003).

Uma inovação tecnológica, denominada PCR em Tempo Real (qPCR), vem cada vez mais ganhando espaço nos diagnósticos e substituindo a PCR convencional. Além de ser possível quantificar o DNA ou RNA, ela permite o acompanhamento e monitoramento da reação para obtenção dos resultados, sendo então mais simples, rápida, sensível e específica, não exigindo análise em gel pós-amplificação, como é feito para PCR convencional (RAEYMAEKERS, 2000).

Devido à alta sensibilidade da técnica (70-100%), em alguns casos excedendo a sensibilidade de métodos convencionais, e a alta especificidade (86-100%), vários estudos tem mostrado a sua aplicabilidade na detecção de agentes patogênicos,

tornando-se um método alternativo para o diagnóstico de diversas doenças infecciosas, inclusive a coqueluche (TATTI *et al.*,2008).

A reação de qPCR é baseada na detecção de um sinal fluorescente que emite um sinal proporcional à amplificação do alvo durante a reação. No momento em que se atinge o limiar da fase exponencial da reação, denominado *Cycle Threshold* (C_t), é possível quantificar o alvo. A intensidade da fluorescência aumenta proporcionalmente de acordo com o produto amplificado na qPCR. Sendo assim, os valores da intensidade da fluorescência são gravados a cada ciclo, representando a quantidade e produto amplificado em tempo real. Portanto, quanto maior o número de cópias da amostra alvo, mais rapidamente se observa o sinal da fluorescência, ocorrendo um menor C_t (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION., 2012; NOVAIS e ALVES, 2004).

O método de qPCR oferece diversas vantagens como: a eliminação do processo pós-amplificação, maior sensibilidade e especificidade, redução no tempo de liberação dos resultados e redução no risco de contaminação ambiental proveniente da manipulação dos tubos pós-amplificação, sendo assim, um método promissor empregado ao diagnóstico de doenças (PODDAR, 2001; KÖSTERS *et al.*,2002; SLOAN *et al.*,2002).

Atualmente, existem diversos formatos de reações baseadas em qPCR, todos possuem o mesmo princípio e sensibilidade, variando apenas no tipo de conformação da sonda utilizada. Os formatos de qPCR mais comuns são sistemas fundamentados em sondas de hidrólise, como por exemplo TaqMan®, sistemas que utilizam-se de sondas de hibridização, como *Molecular Beacons*, e sistemas que empregam corantes intercalantes de DNA dupla fita, como SYBR® Green I que é um ligante que se intercala quando há formação de dupla fita de DNA (GONÇALVES, 2011).

O sistema TaqMan® é fundamentado em uma sequência de nucleotídeos complementar ao alvo, comumente conhecida como sonda, contendo uma molécula fluorescente ou fluoróforo na extremidade 5' e uma molécula que captura a fluorescência do fluoróforo, chamada *quencher*, na extremidade 3'. A sonda liga-se ao amplicon durante cada fase de anelamento e durante a reação de polimerização dos nucleotídeos no molde de DNA, a enzima Taq DNA-polimerase hidrolisa a sonda devido à atividade exonuclease 5'-3' da enzima. Esse fenômeno separa o fluoróforo do *quencher*, de forma que a fluorescência do fluoróforo seja liberada no meio e detectada pelo sistema (Figura 1.12) (ESPY *et al.*,2006; EUROGENTEC, 2016).

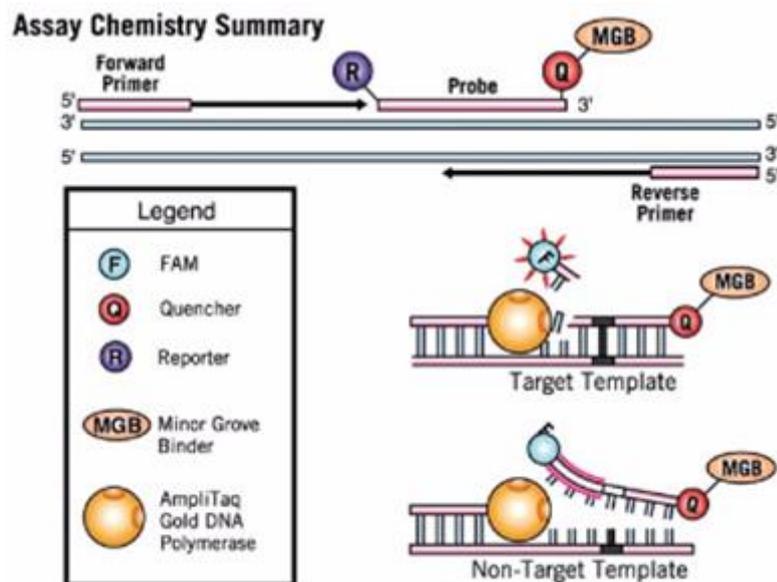


Figura 1.12: Reação de qPCR utilizando o sistema TaqMan®.

Fonte: Extraído de Biometrix Bioenergética, 2013.

O SYBR® *Green* I é um intercalante de DNA dupla fita (Figura 1.13), sendo utilizado para detecção não-específica. É um corante que emite fluorescência a cada vez que se liga ao DNA, sendo então necessário apenas um par de iniciadores específicos para o alvo. A quantidade de corante que se intercala no DNA é sempre proporcional à quantidade de alvo gerado. A sua vantagem é este método possui um custo relativamente baixo quando comparado com as sondas de hidrólise, assim como sua facilidade de uso. Porém, por ser um corante inespecífico, pode corar também dímero de primers e outros produtos inespecíficos, não detectando apenas o alvo da reação (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION., 2012; GONÇALVES, 2011).

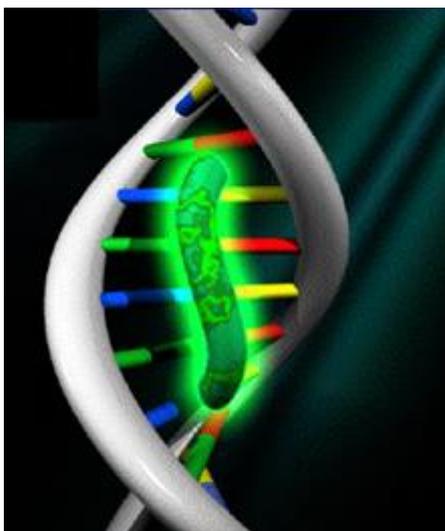


Figura 1.13: Corante SYBR® Green (verde) intercaladona dupla-fita de DNA.

Fonte: Life Technologies, 2012.

Outro tipo de sonda utilizadas em qPCR são as chamadas *Molecular beacons*, que são oligonucleotídeos usados como sondas de fita simples. Ao contrário do sistema de sonda de hidrólise, a *molecular beacon* forma um *hairpin* na sua estrutura se anelando com ela mesma, criando uma estrutura em grampo. Após hibridizar-se em seu alvo, elas se soltam, retornando à sua conformação original, e não sendo destruídas (GOEL *et al.*, 2005).

1.4.1. Limitações da qPCR e possíveis soluções

Devido ao enorme progresso no desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e biotecnologia, os métodos baseados na amplificação de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) são utilizados rotineiramente nos laboratórios que realizam diagnóstico de doenças infecciosas. Eles são considerados essenciais para o diagnóstico precoce, rápido e preciso, levando à administração do tratamento adequado e, naturalmente, promovendo qualidade de vida para o paciente (MIYACHI, 2001).

A qPCR é utilizada em diversos laboratórios de diagnósticos, e cada vez mais, se descobre os pontos positivos e negativos da técnica. Apesar das suas vantagens, a qPCR apresenta variáveis que necessitam ser controladas e evitadas. Dentre elas, as principais concentram-se normalmente nos resultados falsos-positivos e falsos-negativos. Os resultados falsos-positivos são conhecidos desde a década de 90,

sendo considerado uma das mais graves preocupações, e devem-se principalmente à contaminação gerada por produtos que foram anteriormente amplificados, conhecidos como amplicons (VALENTINE, 2002; PERSING, 1991; NIESTERS, 2002).

Apesar de ser um problema que também pode ser encontrado em outras metodologias de diagnóstico, no caso da qPCR à amplificação de amplicons contaminantes resulta em falso positivo, fato que está relacionado à alta sensibilidade do teste, capaz de detectar apenas uma cópia do alvo desejado.

As primeiras recomendações para evitar contaminações foram descritas por Kwok e Higuchi em 1989, que defendiam a importância de um protocolo bem delineado, sendo o instrumento mais importante e crucial para evitar esse tipo de problema (KWOK & HIGUCHI, 1989).

Para garantir a qualidade de um resultado verdadeiramente positivo, algumas regras devem ser implementadas em laboratórios que empregam a qPCR, entre elas:

O teste deve ser realizado em três salas diferentes: (i) sala para o preparo dos reagentes e mix de qPCR, (ii) sala para o preparo e aplicação da amostra e (iii) sala para amplificação e detecção (BURKARDT, 2000; HUBNER *et al.*, 1999).

- A organização do laboratório é essencial para evitar a contaminação. Cada área deve ter seu próprio EPI, não havendo troca entre áreas (BURKARDT, 2000; HUBNER *et al.*, 1999; CONRATHS & SCHARES, 2006);

- A utilização de controles na reação, positivos e negativos. Caso haja amplificação de um controle negativo, o ensaio deve ser repetido. Se o resultado se mantiver positivo, é um indicador de contaminação laboratorial e/ou de reagentes. Nesse caso, recomenda-se preparar uma nova reação utilizando novas alíquotas de reagentes e amostras, assim como os espaços devem ser devidamente desinfetados (BURKARDT, 2000);

- O cuidado com a manipulação do material e a pipetagem são muito importantes. A pipetagem deve ser feita de maneira precisa para evitar a formação de bolhas e aerossóis. É necessário também ter cuidados com a manipulação de equipamentos, termocicladores e pipetas (BURKARDT, 2000).

- A fonte de contaminação cruzada por amplicon é a mais comum e a que necessita de maior atenção dentro de um laboratório. O amplicon se forma através de um fragmento amplificado anteriormente de uma reação de PCR ou qPCR,

permanecendo no ar em forma de aerossol. Por se apresentar na forma de aerossol, a sua dispersão no ar pode permanecer em muitas superfícies por longos períodos de tempo, podendo depositar-se em pipetas, bancadas, refrigerados, maçanetas e puxadores, microtubos, placas de reações de experimentos posteriores, resultando em falsos-positivos (CHAMPLOT *et al.*,2010).

- Eliminar contaminações geradas por amplicons apresenta vários desafios, pois requer agentes de descontaminação que atuem com grande eficiência e que não interfiram na sensibilidade e reprodutibilidade da reação de qPCR e PCR.

1.4.2. Uracil-N-Glicosilase (UNG)

Um método enzimático, baseado na atuação da enzima Uracil N-Glicosilase (UNG), permite a eliminação de contaminação cruzada. (LONGO *et al.*,,1990). Durante a o preparo da reação, a mistura de dTTPs é substituído por uma mistura contendo dUTP, resultando em produtos de amplificação que contenham uracila ao invés de timina.

A atuação da UNG ocorre um passo antes de iniciar a qPCR propriamente dita. Durante seu processo de atuação, caso haja contaminação com amplicon de reações anteriores, isto é, contendo dUTP ao invés de dTTP, a UNG cliva-o, degradando-o e impedindo que haja sua amplificação (Figura 1.14) (LONGO *et al.*,1990; CHAMPLOT *et al.*,2010).

Esse fenômeno não afeta a reação de amplificação natural do DNA que estará sendo analisado. Dessa forma, esse processo, quando utilizado em qPCR, é altamente eficaz se o contaminante contiver uracila ao invés de timina (LONGO *et al.*,1990; CHAMPLOT *et al.*,2010).

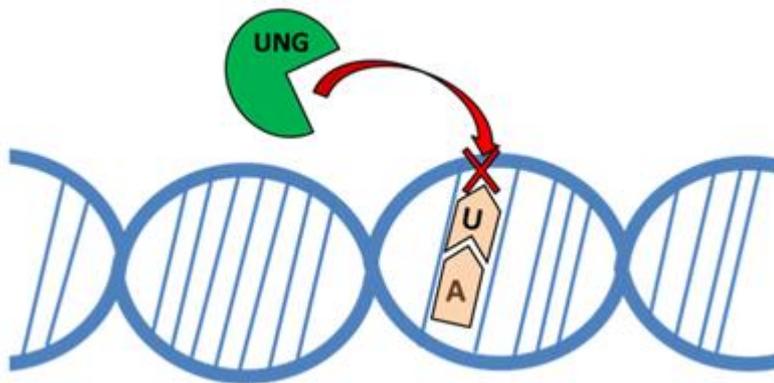


Figura 1.14: Atuação da enzima Uracil-N-Glicosilase (UNG) na fita de DNA contendo uracila.

Fonte: Applied Biosystems, 2013.

1.4.3. Gelificação

Para realizar as reações de qPCR no diagnóstico de doenças como a coqueluche é necessário que os laboratórios possuam elevada infraestrutura e sistema de logística para que haja o armazenamento e estocagem adequada de material e de reagentes. Como utilizam-se muitos reagentes para realizar uma reação padrão de qPCR (mastermix, conjunto de sondas e iniciadores, cofatores, potencializador da Taq® DNA-Polimerase, entre outros), a manipulação torna-se muito maior e as chances de contaminação e erros de operação aumentam. Atualmente, os testes de qPCR para coqueluche são realizados apenas em alguns LACENs e no Instituto Adolfo Lutz em São Paulo.

Diante de todas essas dificuldades, a técnica da gelificação (Figura 1.15) pode ser utilizada como alternativa para redução de custos. Isso ocorre porque essa técnica minimiza fatores relacionados à logística de armazenamento, evita o risco de contaminação cruzada por reduzir a manipulação do operador, diminui os erros de operação e erros de pipetagem, elimina a cadeia gelada, melhora a comodidade do operador e simplifica o teste (SUN *et al.*,2013).

Reação de Gelificação

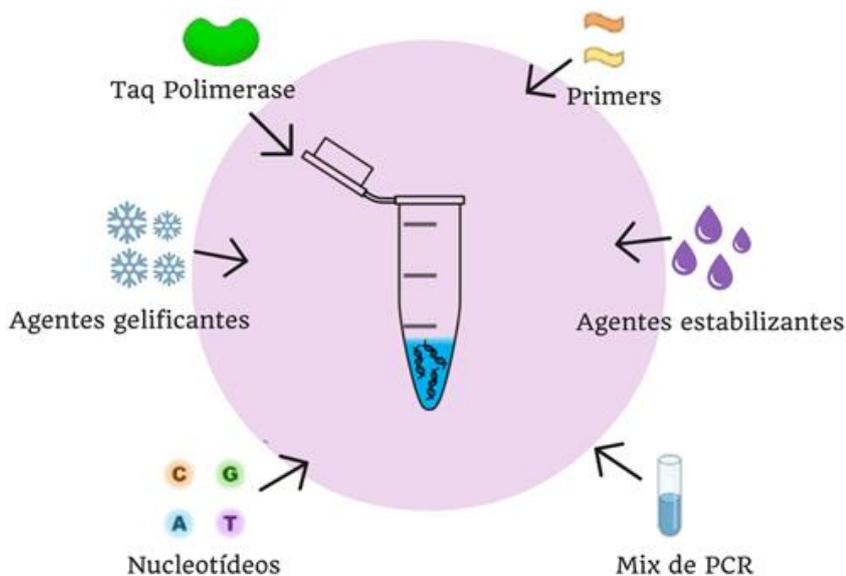


Figura 1.15: Esquema geral de exemplificação uma reação de Gelificação.

A metodologia baseia-se na eliminação da água solvente da reação com a adição de agentes estabilizantes e gelificantes e submissão da mistura à uma estufa de secagem a vácuo. Com isso, a água de todos os reagentes é quase totalmente eliminada, não havendo nenhuma reação adversa que interfira na atividade da Taq-DNA-Polimerase (IGLESIAS *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2013).

Para uso, é preciso somente reidratar a reação com água e com a própria amostra, em quantidade necessária para ajustar o volume da reação (IGLESIAS *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2013).

A gelificação é uma alternativa de baixo custo, podendo ser aplicada em laboratórios e hospitais de baixa infraestrutura. Isso acontece pois não há necessidade de estocagem de reagentes e o diagnóstico pode ser realizado no próprio centro médico, não necessitando enviar a amostra suspeita para os laboratórios de referência.

Em outros estudos realizados pelo nosso grupo, mostramos que a eficiência, sensibilidade e especificidade da reação gelificada se mantiveram igual aos resultados de reações convencionais (formato líquido) de qPCR (RAMPAZZO *et al.*, manuscrito em preparação, 2014).

2. OBJETIVOS

- **Objetivo Geral:**

- Desenvolver e aprimorar uma reação baseada em PCR em Tempo Real para o diagnóstico diferencial de *Bordetella*, usando insumos produzidos pelo IBMP.

- **Objetivos Específicos:**

- Desenvolver e padronizar o teste de qPCR para o alvo “IS481” de *Bordetella sp.* e para o alvo “*ptxS1*” de *Bordetella pertussis*;

- Incluir controles internos para genes humanos;

- Incorporar enzima descontaminante UNG nas reações de qPCR;

- Gelificar as qPCR obtidas para os alvos IS481 e *ptxS1*;

- Determinar a especificidade e sensibilidade analíticas das reações desenvolvidas com amostras clínicas previamente caracterizadas;

- Iniciar o estudo de estabilidade das reações gelificadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Neurologia de Curitiba (INC) em abril de 2016 sob o número: 52475215.4.0000.522.

3.1. Sequências-alvo e amostras de DNA:

Os dois alvos genômicos foram escolhidos a partir de trabalhos da literatura que preenchessem alguns requisitos, tais como utilizar o sistema TaqMan®, ser onipresente no gênero *Bordetella* e ser específico para discriminar as espécies dentro do gênero. Foram escolhidos como alvos genômicos onipresente no gênero a região IS481 (GenBank accession nº. M28220) e o gene da toxina *ptxS1* (GenBank accession nº. M14378) como alvo específico de *B. pertussis* (TATTI *et al.*,2008; TATTI *et al.*,2011; PITTET *et al.*,2014).

O DNA de duas cepas de *Bordetella pertussis* foram adquiridos da empresa ATCC (*American Type Culture Collection*): cepa Tahoma 1 (ATCC-BAA-589D-5) e cepa 18323 (ATCC-9797D-5). O DNA da cepa 10536 (ATCC-10380) foi gentilmente cedido pela Dra. Rosângela Stadnick Lauth de Almeida Torres (LACEN-PR).

A concentração do DNA recebido foi determinada em espectrofotômetro Denovix através da absorbância da luz no comprimento de onda de 260 nm e as soluções estoques foram preparadas e armazenadas a 10 ng/μL em ultrafreezer a -80 °C. A partir destes estoques, diluições seriadas (1:10) foram realizadas para estabelecer os pontos das curva de concentração utilizados para determinar a sensibilidade analítica do teste (1 nanograma até 10 atogramas). Os dois últimos pontos da curva (100 atogramas e 10 atogramas) foram avaliados em replicatas com 12 pontos para cada concentração. Considera-se o limite de detecção como o ponto onde houver detecção entre 25 a 75% das replicatas (Dra. Helen Murphy, FDA/USA, comunicação pessoal). Posteriormente, este limite foi validado com amostras reais.

3.2. Iniciadores e Sondas:

Os oligonucleotídeos, apresentados na Tabela 3.1, foram obtidos de três fornecedores distintos: das empresas Biosearch Technologies e Sigma Aldrich, ou sintetizados no Setor de Síntese de Oligonucleotídeos do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP/Fiocruz PR). Os conjuntos de oligonucleotídeos são

compostos por um par de iniciadores e uma sonda TaqMan® específicos para cada um dos genes alvo.

Para otimização da reação para os alvos IS481 e *ptxS1*, testamos diversas concentrações de iniciadores *forward* e *reverse*. As concentrações das sondas se mantiveram de acordo com os estudos já publicados, sendo 0,1 µM para IS481 (PITTET *et al.*,2014) e 0,3 µM para *ptxS1* (TATTI *et al.*,2008).

Tabela 3.1 Padronização dos iniciadores para os alvos *IS481* e *ptxS1*.

Alvo	Iniciadores e sonda	Sequência (5'→3')	Concentração (µM)	Modificações 5'-3'	Tamanho do amplicon (pb)	Referências
<i>B. pertussis</i> IS481	IS481-109F	CCGGTGAACACCCTAAGC	0,4	FAM-BHQ1	70	(PITTET, <i>et al.</i> ,2014)
	IS481-179R	CGATCAATTGCTGGCCATTT	0,4			
	IS481-130T ^P	TGCCCGATTGACCTTCCTACGTCGA	0,1			
Toxina B. pertussis ptxS1	402U16	CGCCAGCTCGTACTTC	0,7	FAM-BHQ1	55	(TATTI <i>et al.</i> ,2008)
	442L15	GATACGGCCGGCATT	0,7			
	419U22P ^P	AATACGTCGACAC <u>I</u> TATGGCGA ⁱ	0,3			
RNaseP	<i>RNasePF</i>	AGATTTGGACCTGCGAGCG	0,4	HEX-BHQ1	65	(WHO, 2009)
	<i>RNasePR</i>	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	0,4			
	<i>RNasePP_H</i>	TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG	0,2			
rRNA 18S	18S2F	GAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCA	0,4	HEX-BHQ1	144	(Rampazzo <i>et al.</i> , submetido)
	18S2R	CCCGTCGGCATGTATTAGCTCT	0,4			

^P: Sondas; ⁱ: BHQ1 posicionado no nucleotídeo 14 T (sublinhado).

3.3. Determinação da temperatura de anelamento

Para o alvo *IS481*, Tatti e colaboradores (2008) e Pittet e colaboradores (2014), utilizam temperatura de 60°C. Já para *ptxS1*, a temperatura de anelamento publicada é de 57°C (TATTI *et al.*,2011).

A fim de reduzir os gastos e otimizar o ensaio, foram testadas quatro temperaturas (57°C, 60°C, 62°C, e 65°C), visando realizar as duas detecções na mesma placa.

3.4. Adição de cofatores na reação

3.4.1. Variação na concentração do cofator magnésio (Mg²⁺)

As reações para os dois alvos genômicos, *IS481* e *ptxS1*, foram otimizadas utilizando-se dois sais de magnésio, MgSO₄ ou MgCl₂, com concentrações que variaram de 1,5 mM até 15 mM (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 Padronização de cofatores utilizados na reação para os alvos *IS481* e *ptxS1*.

Cofator	
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄)	Cloreto de Magnésio (MgCl ₂)
1,5 mM	1,5 mM
2 mM	2 mM
3 mM	3 mM
6 mM	6 mM
9 mM	9 mM
12 mM	12 mM
15 mM	15 mM

3.4.2. Adição de ROX, albumina de soro bovino (BSA), glutamato de potássio e acetato de amônio

Para aumentar a estabilidade e reprodutibilidade do teste, as reações para os dois alvos genômicos foram testadas também na presença de ROX (30 ou 300 nM) (Sigma, Cat. N° 21965) como referência passiva, BSA (0,5 ou 1,0 µg) (Roche, Cat. N° 10738328103), glutamato de potássio (20mM, Sigma, cat n° 6106-04-3) ou acetato de amônio (60 mM, Sigma, cat n° 631-61-8).

3.5. PCR em Tempo Real

As reações qPCR foram realizadas no equipamento ABI7500 (Life Technologies, EUA) em placas de 96 poços. Os componentes da PCR, tais como tampão para mistura de PCR 2X (tampão e sais), cofatores (sulfato de magnésio ou cloreto de magnésio), ROX, BSA e dNTPs foram produzidos e/ou fornecidos pelo IBMP/Fiocruz PR.

As reações foram padronizadas para o volume final de 20 μ L, considerando adição de 5 μ L de amostra (DNA extraído).

As otimizações foram feitas para todos os alvos separadamente. A ciclagem a seguir foi utilizada para os dois alvos, alterando apenas a temperatura de anelamento (ver item 3.3). A ciclagem seguiu com 1 ciclo a 95°C por 10 minutos, seguido por 50 ciclos de (95°C/15 segundos e 62°C ou 60°C ou 57 ou 65°C por 1 minuto. Nas reações contendo UNG, um ciclo de 50°C por 2 min foi adicionado no início da ciclagem mencionada acima para ativação da enzima (ver item 3.4.3).

3.6. Purificação do amplicon e incorporação da enzima Uracil-N-Glicosylase (UNG)

Em todas as reações, nucleotídeos dTTP foram substituídos por dUTP no mix de nucleotídeos, visando futura incorporação da enzima UNG no sistema. O produto de uma qPCR para o alvo *IS481*, já contendo dUTP no mix, foi purificado com o kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Cat N° 11796828001) e quantificado através de absorvância UV em 260 nm. O amplicon purificado foi adicionado em diferentes concentrações às reações de PCR a fim de simular uma contaminação ambiental num laboratório de rotina. Diante de diferentes níveis de contaminação, um deles foi escolhido para avaliar a eficiência da enzima UNG em eliminar o amplicon no presente ensaio multiplex.

Ainda, foram testados diferentes níveis de contaminação (Figura 3.1), sendo que a concentração de 1 fg foi escolhida por simular uma contaminação ambiental (aproximadamente em Ct 32). A enzima UNG é ativada por incubação a 50°C por 2 minutos para degradação do amplicon, e posteriormente inativada a 95°C por 10 minutos juntamente com a ativação da Taq DNA Polimerase Hot Start.

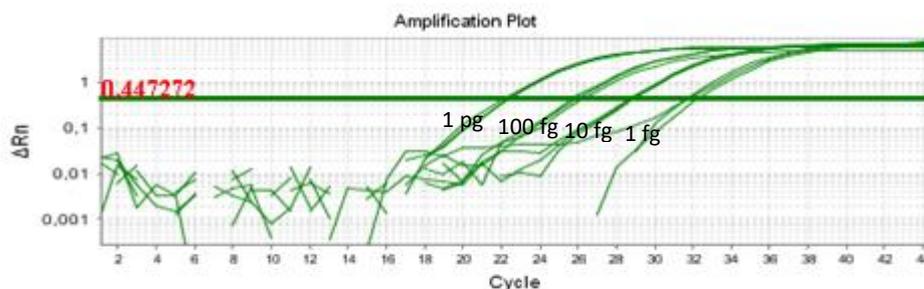


Figura 3.1: Curva de diluição de amplicom de *B. pertussis* (IS481). Concentrações de 1 pg a 1 fg de DNA.

3.6.1. Incorporação de controles internos: alvos humanos rRNA 18S e *RNaseP*

A detecção de genes humanos na reação de qPCR para diagnóstico humano é utilizada como controle de diversos parâmetros da reação, tais como presença da amostra na reação e qualidade da amostra (integridade e pureza do DNA), além de validar o correto funcionamento dos reagentes (mastermix, dNTPs, etc) e do sistema de detecção (*hardware e software*).

Para o presente projeto, avaliamos a presença da sequência de dois genes no genoma humano, sendo o RNA ribossomal 18S (GenBank acesso nº gb|DQ287955.1) e *RNaseP* (GenBank acesso nº NM006413). As sequências dos oligonucleotídeos para *RNaseP* foram obtidas da literatura (WHO, 2009b). As sequências dos oligonucleotídeos para 18S foram desenvolvidas pelo nosso grupo. Ambos os conjuntos, sequências e concentrações usadas estão descritos na Tabela 3.1.

3.6.2. PCR em Tempo Real: Gelificação

Após a padronização da reação no formato convencional (líquido), a reação de qPCR gelificada foi preparada para o volume final de reação de 20 µL, com remoção de água da receita e adição de 5 µL de mistura de gelificação (B&M, 2012).

Os reagentes da qPCR são misturados aos compostos estabilizantes e gelificantes e são aliquotados na placa de qPCR. Em seguida, a mistura foi submetida a ciclos de secagem a vácuo sob pressão de 30 mbar (B&M, 2012) por aproximadamente 2 horas. Desta forma, aproximadamente 15-20% das moléculas de

água permanecem na amostra, diminuindo o efeito inibitório do ressecamento na atividade enzimática necessária para a qPCR.

As placas gelificadas permaneceram armazenadas a 4°C por 12 a 24 horas para estabilizar a reação, sendo utilizadas em até uma semana após a gelificação. A ciclagem para as reações gelificadas foram as mesmas utilizadas nas reações líquidas (ver ítem 3.3).

3.7. Teste de Especificidade Analítica

Para confirmar a especificidade da reação, foram utilizados DNA de 51 microrganismos (31 bactérias e 12 fungos) relacionados a infecções do trato respiratório (Tabela 3.3). Os testes foram realizados com as reações padronizadas tanto no formato líquido quanto gelificado.

Tabela 3.3: Microrganismos utilizados no teste de especificidade analítica.

Identificação dos microrganismos	
<i>Staphylococcus aureus</i> (strain MRSA C1A2)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (strain 16)
<i>Staphylococcus aureus</i> (strain MRSA C1A3)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (strain 35)
<i>Enterococcus faecalis</i> (strain C1A4)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (strain 204)
<i>Enterococcus faecalis</i> (strain C1A6)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (strain 635)
<i>Enterococcus faecium</i> (strain VANA)	<i>Morganella morganii</i> (strain 46C)
<i>Enterococcus faecium</i> (strain VANB)	<i>Streptococcus pyogenes</i> (strain ERMA)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (strain 31)	<i>Streptococcus pyogenes</i> (strain ERMB)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (strain 35)	<i>Listeria monocytogenes</i> (strain 384L)
<i>Burkholderia cepacia</i> (strain C11)	<i>Listeria monocytogenes</i> (strain 394L)
<i>Burkholderia cepacia</i> (strain C15)	<i>Streptococcus pyogenes</i> (strain R4)
<i>Burkholderia stabilis</i> (strain 12)	<i>Streptococcus pyogenes</i> (strain R5)
<i>Burkholderia multivorans</i> (strain 31)	<i>Citrobacter freundii</i> (strain 866)
<i>Acinetobacter baumannii</i> (strain 28)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (strain PAE8)
<i>Acinetobacter baumannii</i> (strain 39)	<i>Candida albicans</i> (strain 296)
<i>Streptococcus agalactidae</i> (strain C1A6)	<i>Candida albicans</i> (strain 297)
<i>Streptococcus agalactidae</i> (strain C1A10)	<i>Candida parapsilosis</i> (strain 140)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (strain 8)	<i>Candida parapsilosis</i> (strain 159)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (strain 10)	<i>Candida glabrata</i> (strain 56)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (strain 440)	<i>Candida glabrata</i> (strain 57)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (strain 6430)	<i>Candida tropicalis</i> (strain 76)
<i>Enterobacter cloacae</i> (strain 254)	<i>Candida tropicalis</i> (strain 81)
<i>Enterobacter cloacae</i> (strain 407)	<i>Candida krusei</i> (strain 27)
<i>Proteus mirabilis</i> (strain 95)	<i>Candida krusei</i> (strain 28)
<i>Proteus mirabilis</i> (strain 341)	<i>Aspergillus fumigatus</i> (strain 71)
<i>Serratia marcescens</i> (strain 27)	<i>Aspergillus fumigatus</i> (strain 75)
<i>Serratia marcescens</i> (strain 290)	

3.8. Validação da reação com amostras previamente caracterizadas pelo LACEN-PR

Para a validação interna do teste desenvolvido, o LACEN-PR cedeu DNA de 123 amostras de diferentes classificações diagnósticas, de acordo com os resultados obtidos pelo LACEN-PR. As amostras foram classificadas em: Amostras PCR positivo, amostras *border line*, amostras PCR negativo, amostras PCR e cultura negativo e amostras controle PCR e cultura negativo (pacientes sem sintomas). As amostras foram testadas em duplicata com as reações padronizadas no formato líquido para os alvos IS481 e *ptxS1*. Parte das amostras foi testada também com a reação em formato gelificado.

3.9. Clonagem do amplicon de 100 ag de *B. pertussis*

Para confirmar o limite de detecção para o alvo de *B. pertussis*, realizamos uma PCR convencional utilizando duas concentrações diferentes de DNA de *B. pertussis* (2 ng e 100 ag), utilizando os iniciadores para detecção de IS481. A ciclagem utilizada foram de 95°C por 2 minutos seguidos de 30 ciclos a 95°C por 15 segundos, 55°C por 20 segundos e 72°C por 20 segundos. Ao final da ciclagem, adicionamos um passo final de 72°C por 7 minutos. Os produtos da reação foram visualizados em um gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Para estimar o tamanho dos amplicons, utilizamos o marcador 1 kb e 50kb (Invitrogen®).

Após a visualização das bandas, o amplicon foi clonado no vetor pGEM®-Teasy (Promega), sendo posteriormente usado para transformar *E. coli* (cepa Top 10). Após o crescimento e seleção das colônias, foi realizada PCR de colônia das amostras selecionadas utilizando os iniciadores de *B. pertussis* (IS481).

Os clones selecionados foram cultivados em 3 mL de LB meio líquido e antibiótico ampicilina (25mg/ml) para seleção. No dia seguinte, os plasmídeos foram purificados com o kit NucleoSpin® Plasmid QuickPure (Macherey Nagel Cat. N° 740588.10). Posteriormente, para visualização e confirmação dos clones, realizamos uma reação de PCR convencional. Para a reação com concentração de DNA inicial de 2 ng, utilizamos os iniciadores IS481. Já para a concentração de DNA inicial de 100 ag foi realizada uma reação com iniciadores M13 do vetor (pGEM®-Teasy® Promega). Todos os produtos foram visualizados em gel 2% de agarose corado com brometo de etídeo. Após a confirmação dos tamanhos dos amplicons, as amostras selecionadas foram enviadas para o sequenciamento de Sanger.

3.10. Sequenciamento do amplicon de 100 ag de *B. pertussis*

A preparação de plasmídeos contendo os amplicons das diluições de 2 ng e 100 ag foram enviados para sequenciamento Sanger na empresa WemSeq.

Posteriormente, as sequências obtidas pelo sequenciamento foram analisadas pelo programa online BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) para verificação de homologia com sequências genômicas de *B. pertussis*, depositadas no GenBank, referentes à amplificação do gene IS481 de *B. pertussis*, e somente com o genoma da cepa Tohama I de *B. pertussis* (accesseion number BX470248).

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da concentração dos cofatores $MgSO_4$ e $MgCl_2$

O íon Mg^{2+} é um importante cofator da enzima Taq DNA polimerase, e sua concentração tem grande influência na eficiência da qPCR. Assim, realizamos diversas qPCR para os alvos *IS481* e *ptxS1* variando a concentração dos cofatores sulfato de magnésio (Mg_2SO_4) e cloreto de magnésio ($MgCl_2$), de acordo com a Tabela 3.2. Iniciadores e sondas foram usados nas concentrações padronizadas por outros grupos (PITTET *et al.*,2014; TATTI *et al.*,2011).

De acordo com as curvas de diluição de DNA obtidas, a reação que apresentou melhor eficiência (analisada através do coeficiente de regressão linear) e menor limite de detecção das diluições de DNA foi aquela na presença de $MgSO_4$ na concentração de 6mM para *IS481* (FIGURA 4.1) e também para o alvo *ptxS1* (FIGURA 4.2). Concentrações maiores do que 6 mM não modificaram a eficiência da reação. Curiosamente, as reações realizadas na mesma concentração de $MgCl_2$ não tiveram o mesmo desempenho.

4.2. Determinação da concentração de oligonucleotídeos e protocolo de amplificação

Variamos as concentrações de iniciadores e sondas para amplificação, em separado, dos alvos *IS481* e *ptxS1*. A concentração que apresentou maior qualidade de detecção, caracterizada por uma curva uniforme e melhores eficiências de amplificação, foi o conjunto de oligonucleotídeos com 0,4 μM dos primers *forward* e *reverse* e sonda a 0,1 μM para *IS481* (Figura 4.1); e 0,7 μM dos primers *forward* e *reverse* e sonda a 0,3 μM para *ptxS1* (Figura 4.2). As concentrações dos controles humanos internos já foram padronizadas anteriormente pelo grupo, sendo fixadas com as mesmas concentrações nas presentes reações (Tabela 4.1).

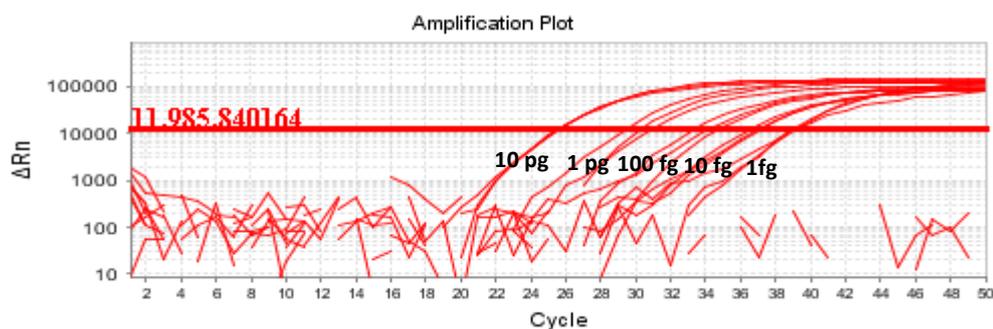


Figura 4.1: Reação para a detecção do alvo IS481 com iniciadores, sonda e cofator MgSO₄ padronizados. Concentrações de DNA de 10 pg a 1 fg. Traçados representativos de 10 experimentos

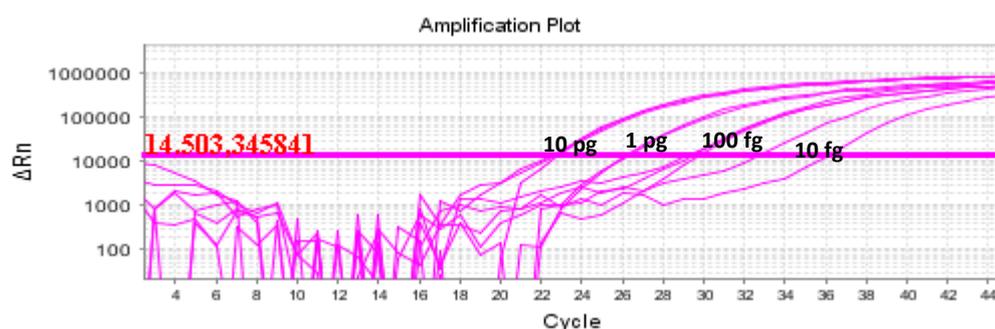


Figura 4.2: Reação para a detecção do alvo *ptxS1* com iniciadores, sonda e cofator MgSO₄ padronizados. Concentrações de DNA de 10 pg a 10fg. Traçados representativos de 9 experimentos.

Tabela 4.1: Iniciadores e sondas selecionados para otimização da reação para detecção IS481 e *ptxS1*.

Alvo	IS481	<i>ptxS1</i>	18S
Iniciador <i>forward e reverse</i>	0,4 μM	0,7 μM	0,4 μM
Sonda	0,1 μM	0,3 μM	0,2 μM

Para determinar a melhor temperatura de anelamento, partimos da premissa que ambas as reações ocorreriam na mesma placa, portanto a temperatura de anelamento deve ser a mesma. Entretanto, as temperaturas ótimas publicadas são de 60°C para o alvo IS481 (PITTET *et al.*,2014) e 57°C para *ptxS1* (TATTI I., 2011). Quando as reações foram testadas a 60°C, apenas o alvo IS481 foi amplificado. Quando as reações foram testadas a 57°C, ambos os alvos foram amplificados. Assim, 57°C foi a temperatura escolhida para continuidade dos experimentos.

4.3. Adição de ROX, albumina de soro bovino (BSA), acetato de amônio e glutamato de potássio

O corante de referência passiva ROX foi testado em duas concentrações, 30 e 300 nM. Observamos que ambas as condições proporcionaram resultados semelhantes, portanto, optou-se por continuar os experimentos com a concentração de 30 nM. As Figuras 4.3 e 4.4 mostram, respectivamente, traçados representativos para a detecção dos alvos *IS481* e *ptxS1* na presença de 30 nM de ROX. O efeito da presença de ROX pode ser visualmente observado ao se comparar as curvas das figuras 4.3 e 4.4 com as curvas das figuras 4.1 e 4.2, realizadas na ausência de ROX.

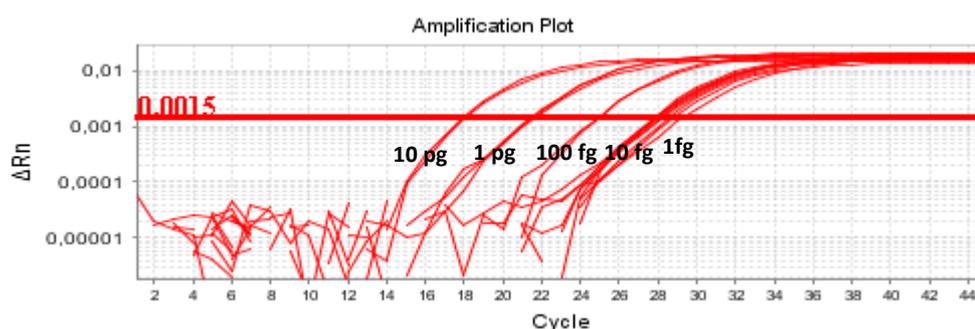


Figura 4.3: Reação para a detecção do alvo *IS481* com adição de 30nM de ROX. Concentrações de DNA de 10 pg a 1 fg. Traçados representativos de 8 experimentos.

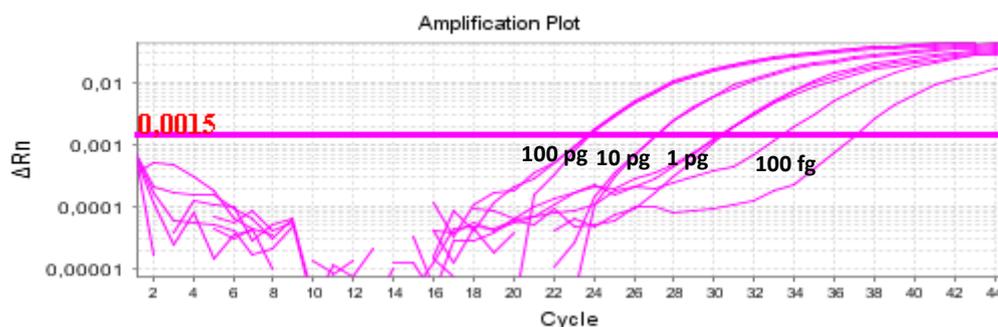


Figura 4.4: Reação para a detecção do alvo *ptxS1* com adição de 30nM de ROX. Concentrações de DNA de 100 pg a 100 fg. Traçados representativos de 11 experimentos.

Testamos também a adição de BSA em duas concentrações diferentes (0,5 e 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Nas reações contendo 0,5 μg de BSA, na presença de ROX, foi possível aumentar um log no limite de detecção para o alvo *IS481*, detectando a partir de agora até 100 ag de DNA de *B. pertussis* (Figura 4.5).

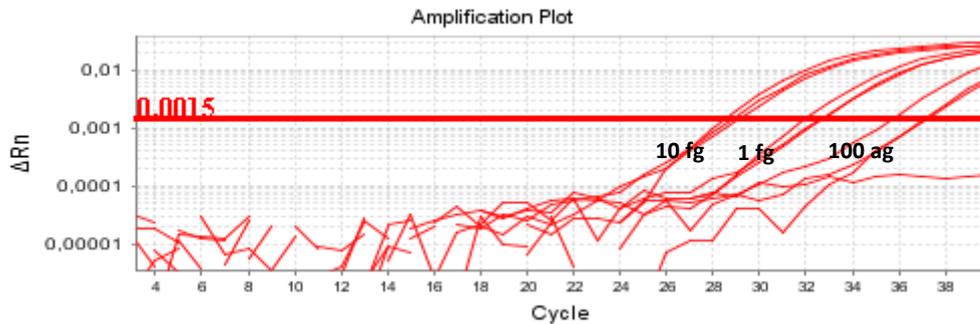


Figura 4.5: Reação para a detecção do alvo IS481 com adição de 0,5 µg de BSA. Concentrações de DNA de 10 fg a 100 ag. Traçados representativos de 14 experimentos.

Já a adição de glutamato de potássio (20mM) ou acetato de amônio (60mM) não tiveram efeito algum sobre as reações para ambos os alvos.

4.4. Substituição de dTTP por dUTP no mix de nucleotídeos

Para ambos os alvos, foi realizada a substituição de dTTP por dUTP no mix de nucleotídeos, visando futura incorporação da enzima UNG na reação. Foi possível observar que a substituição de dTTP por dUTP no mix de nucleotídeos não apresentou diferença nas curvas de amplificação quando sobrepostas para ambos os alvos como mostram as Figuras 4.6 para o alvo *ptxS1* e Figura 4.7 para o alvo IS481.

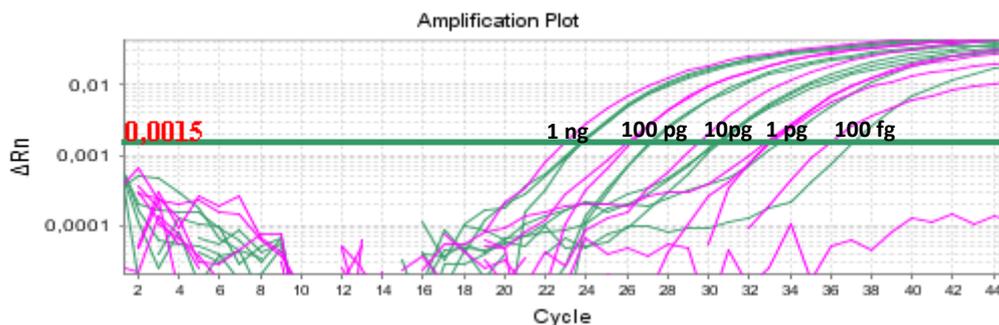


Figura 4.6: Substituição do mix contendo dTTP (rosa) pelo mix contendo dUTP (verde) para o alvo *ptxS1* (1 ng-100 fg). Traçados representativos de 9 experimentos.

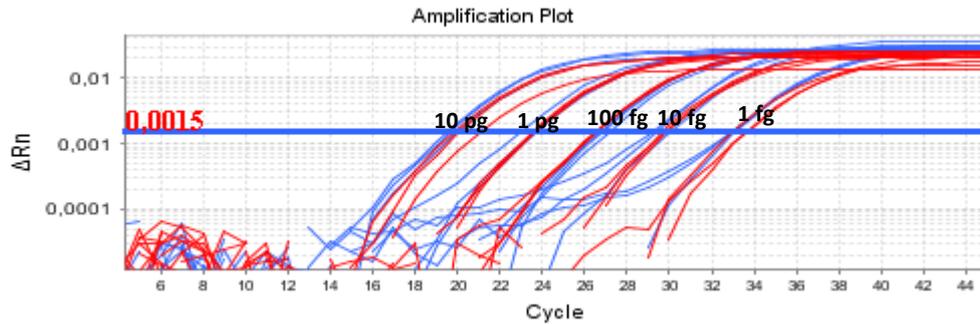


Figura 4.7: Substituição do mix contendo dTTP (vermelho) pelo menos contendo dUTP (azul) para o alvo IS481 (10 pg-1 fg). Traçados representativos de 8 experimentos.

4.5. Incorporação da enzima Uracyl N-Glicosylase (UNG)

Após a substituição de dTTP por dUTP no mix de nucleotídeos, avaliamos a capacidade da enzima UNG em eliminar uma contaminação ambiental, simulada através da contaminação artificial da qPCR com 1 fg de amplicon de IS481, purificado de uma qPCR realizada na presença de dUTP. A Figura 4.8 mostra a reação com DNA a ser detectado (laranja), e a reação controle NTC, onde nenhum DNA deveria ser detectado mas está artificialmente contaminada com o amplicon (em azul).

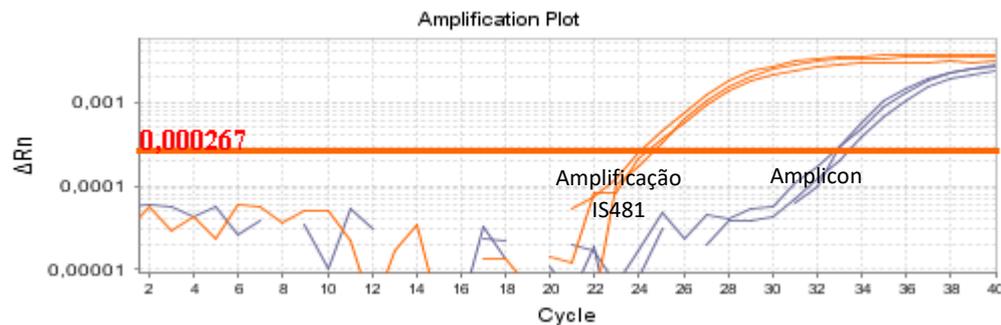


Figura 4.8: Contaminação artificial da reação com amplicon contendo dUTP purificado de *B. pertussis* (em azul). Traçados representativos de 5 experimentos.

Já quando adicionamos a enzima UNG (Figura 4.9) no mix de qPCR, a enzima UNG se torna eficiente, eliminando o amplicon presente no controle negativo (em azul).

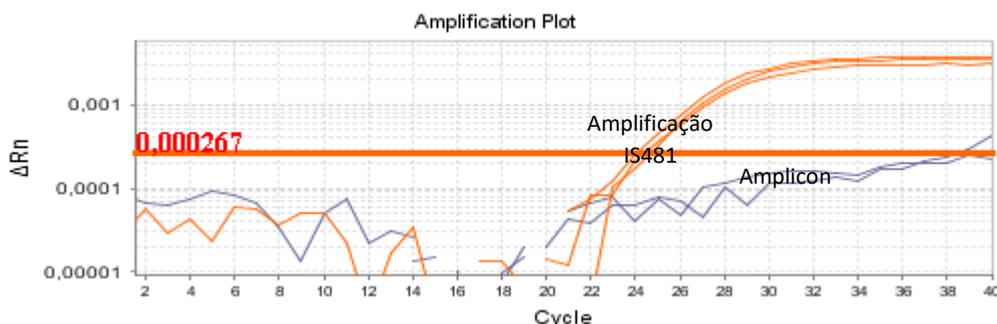


Figura 4.9: Adição da enzima UNG na reação, eliminando a presença do amplicon (em azul). Traçados representativos de 5 experimentos.

Nossos resultados mostram que a adição da enzima UNG é eficaz na eliminação dos amplicons introduzidos artificialmente nas reações de qPCR, minimizando potencial obtenção de resultados falsos-positivos e não interferindo na amplificação da amostra real.

4.6. Incorporação de controles internos: alvos humanos rRNA 18S e *RNaseP*

Após a padronização da reação para os alvos em formato singleplex, adicionamos na reação controles internos de amplificação, baseados na detecção dos alvos humanos (*RNaseP* ou rRNA 18S), obtendo-se, dessa forma, reações duplex. Foram avaliadas reações tanto para IS481 (Figura 4.10 e Figura 4.11) quanto para *ptxS1* na presença de *RNaseP* ou rRNA 18S (Figura 4.12 e Figura 4.13). De acordo com os resultados obtidos, as melhores combinações foram ambos os alvos utilizando o rRNA 18S. Isso porque o alvo 18S é um gene com inúmeras cópias no genoma humano, o que torna sua detecção mais sensível e consistente.

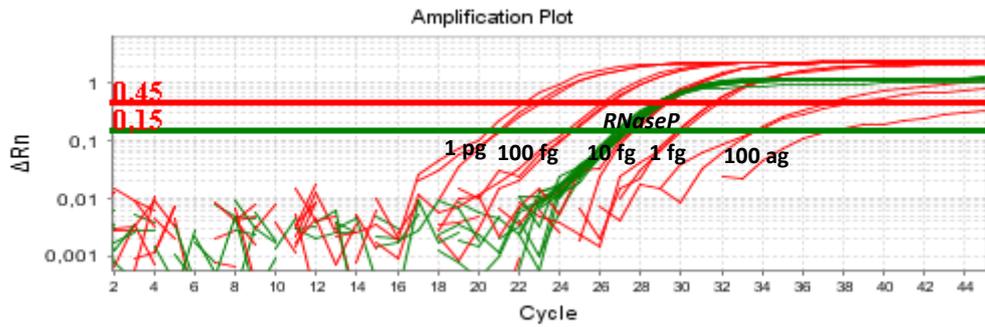


Figura 4.10: Reação padronizada com inserção do controle interno humano *RNaseP* (verde) para detecção de *IS481* (vermelho). Diluição de 1 pg-100 ag em triplicata. Cepa 10536. Traçados representativos de 15 experimentos.

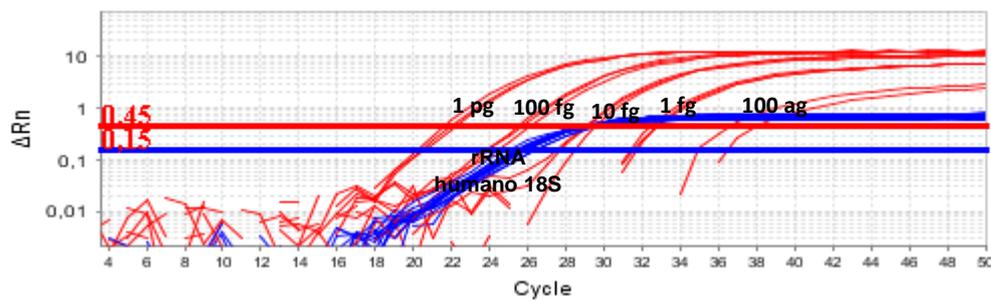


Figura 4.11: Reação padronizada com inserção do controle interno humano rRNA 18S (azul) para detecção de *IS481* (vermelho). Diluição de 1pg-100ag em triplicata. Cepa 10536. Traçados representativos de 15 experimentos.

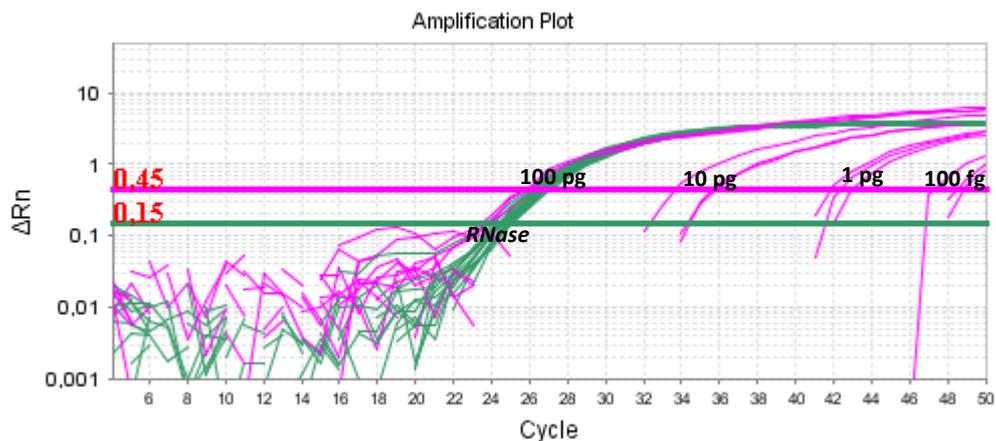


Figura 4.12: Reação padronizada com inserção do controle interno humano *RNaseP* (verde) para detecção de *ptxS1* (rosa). Diluição de 100 pg-100 fg em triplicata. Cepa 10536. Traçados representativos de 15 experimentos.

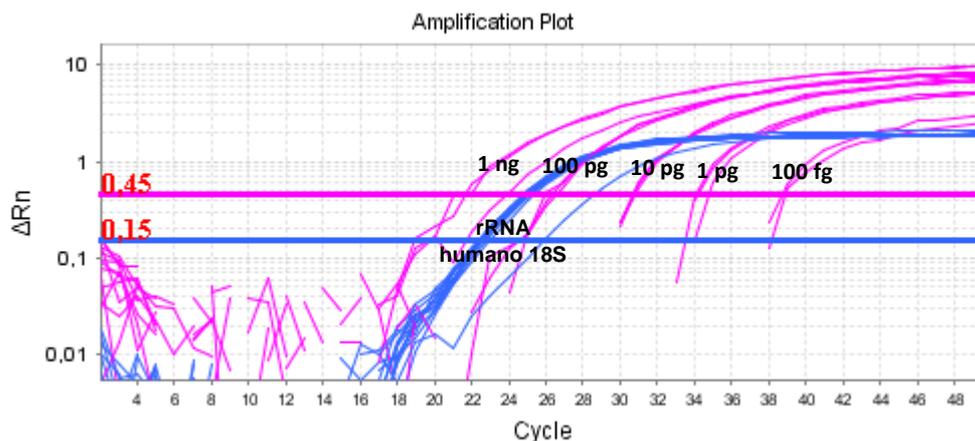


Figura 4.13: Reação padronizada com inserção do controle interno humano rRNA 18S (azul) para detecção de *ptxS1* (rosa). Diluição de 1 ng-100 fg em triplicata. Cepa 10536. Traçados representativos de 15 experimentos.

4.7. Limite de detecção e análise de sensibilidade do teste

De acordo com parâmetros de qPCR avaliados nas diversas condições testadas, foi possível estabelecer reações com valores ótimos de eficiência e coeficiente de determinação (R^2). Idealmente, uma reação de qPCR precisa e reprodutível deve apresentar eficiência próxima de 100% (variando entre 90 a 110%), significando que o alvo duplica a cada ciclo durante a fase exponencial. A eficiência da qPCR pode ser medida através da inclinação da regressão linear dos pontos da curva de diluição da amostra, apresentando valor de -3,32 quando a reação está com 100% de eficiência. Já o R^2 é a medida do quão distantes estão os pontos experimentais dos pontos da regressão linear obtida com estes pontos, sendo considerados aceitáveis valores acima de 0,95. (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION., 2012).

Para o alvo IS481, o limite de detecção foi de 100 ag de DNA de *B. pertussis* por reação (C_t 35,5 \pm SD), correspondente a 0,02 genomas-equivalentes, demonstrando a grande sensibilidade do teste. A conversão de massa molecular para

calcular o equivalente de genomas foi feita através do tamanho médio do genoma de *B pertussis*, obtida no NCBI. As cepas escolhidas para o cálculo foram Tohama I, B1917 e B1920 (números de acesso NCBI: BX470248.1, CP009751.1 e CP009752.1 respectivamente), uma vez que o genoma da cepa trabalhada (10536 ATCC-10380) não foi encontrado. A reação para o alvo IS481 no formato líquido apresentou eficiência de 100%, R² de 0,99 e inclinação da reta (slope) de -3,31 como pode ser visto na regressão linear presente na Figura 4.14 e Tabela 4.2.

Para o alvo *ptxS1*, o limite de detecção foi de 100 fg de DNA por reação (C_t 39 ± SD), correspondente a 20 genomas-equivalentes (Figura 4.15 e Tabela 4.2). O teste apresentou eficiência de 93%, com slope de -3,49 e um R² de 0,99.

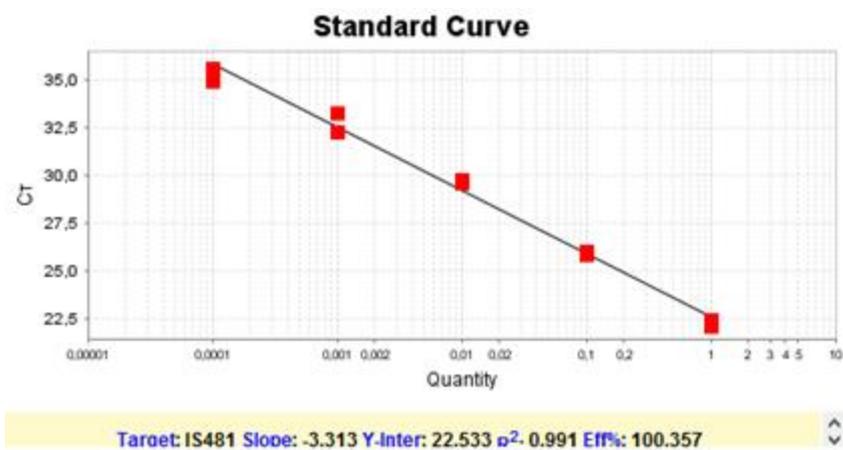


Figura 4.14: Regressão linear do alvo IS481. O Experimento foi realizado em triplicata utilizando a cepa 10536. Concentração de DNA: 1 pg a 100 fg. Traçados representativos de 15 experimentos.

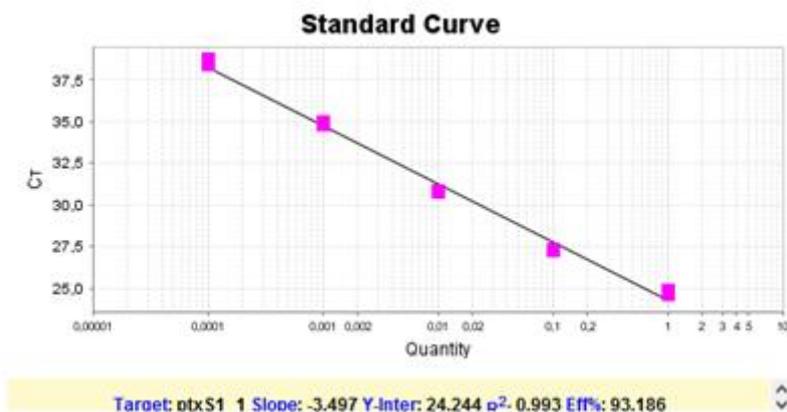


Figura 4.15: Regressão linear do alvo *ptxS1*. O Experimento foi realizado em triplicata utilizando a cepa 10536. Concentração de DNA: 1 ng a 100 fg. Traçados representativos de 15 experimentos.

As reações no formato gelificado foram realizadas com a mesma curva de diluição da reação em formato líquido, para facilitar a comparação dos resultados. Quando as regressões lineares de cada curva de diluição do DNA são comparadas, é possível observar que as reações para o alvo *IS481* (Figura 4.16) e *ptxS1* (Figura 4.17) no formato gelificado possuem parâmetros de desempenho semelhantes aos do formato líquido, apresentando o mesmo limite de detecção e eficiência, como mostra a Tabela 4.2.

É possível também observar a amplificação esporádica do alvo *ptxS1* na concentração de 10 fg de DNA durante os ensaios de reprodutibilidade da reação gelificada (Figura 4.17). Curiosamente, este ponto não foi detectado nas reações líquidas.

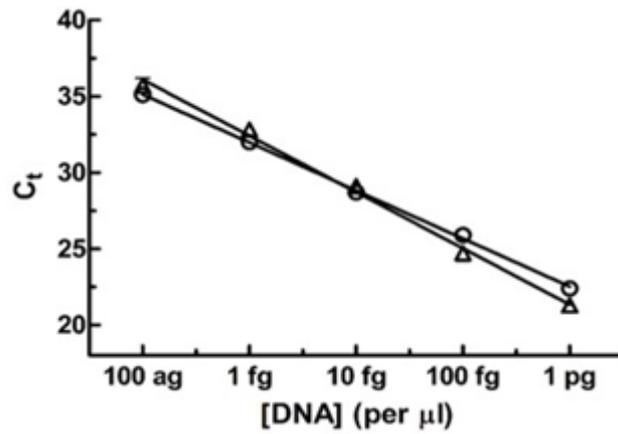


Figura 4.16: Regressão linear de uma curva de diluição do alvo IS481 no formato líquido (bola) e no formato gelificado (triângulo). Traçados representativos de 13 experimentos.

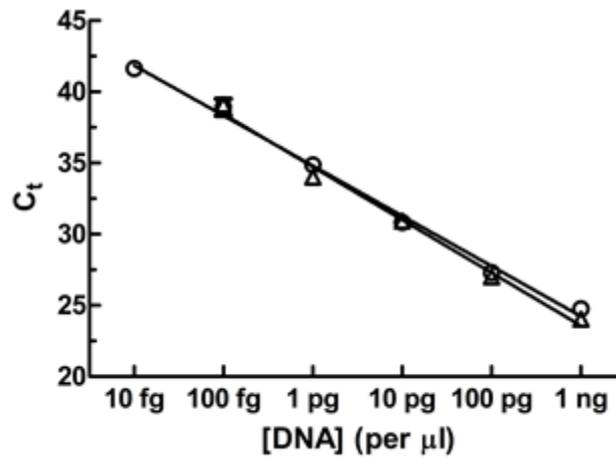


Figura 4.17: Regressão linear de uma curva de diluição do alvo *ptxS1* no formato líquido (triângulo) e no formato gelificado (bola). Traçados representativos de 13 experimentos.

Tabela 4.2: Valores obtido na regressão linear de qPCR no formato líquido e gelificado, e limite de detecção para IS481 e ptxS1.

Alvo	Formato	Eficiência	Inclinação da regressão linear	R ²	Limite de detecção
IS481	Líquido	100%	3,3	0,99	100 ag
	Gelificado	90%	3,6	0,99	100 ag
ptxS1	Líquido	93%	3,4	0,99	100 fg
	Gelificado	90%	3,5	0,99	100 fg

4.8. Teste de Especificidade Analítica

Utilizando os iniciadores e sondas específicos escolhidos para *B. pertussis*, nós não obtivemos à amplificação de IS481 em nenhum dos 51 microrganismos testados (Tabela 3.3), demonstrando a especificidade de 100% do teste em desenvolvimento.

4.9. Validação da reação com amostras previamente caracterizadas pelo LACEN-PR

A tabela presente no anexo 1 indica os resultados de C_t obtidos com as reações em ambos os formatos para o alvo IS481 e ptxS1 (Anexo 1). Os C_ts no formato líquido e gelificado foram muito próximos para cada amostra, demonstrando que a técnica de gelificação pode ser incorporada na rotina de diagnóstico de coqueluche.

É possível visualizar que algumas amostras estão acima do limite de detecção estabelecido pelo LACEN-PR (C_t 29), mas dentro do nosso limite de detecção (C_t 35), alterando então o diagnóstico final destes pacientes. Todos os pacientes caracterizados como positivos no LACEN-PR, também apresentam resultado positivo na qPCR. Já parte dos pacientes com resultado negativo se tornaram pacientes com resultados inconclusivos, em que houve amplificação apenas de um alvo, supondo então infecção por *Bordetella ssp.*

4.10. Confirmação da detecção de IS481 nas amostras de pacientes por sequenciamento

Realizamos a amplificação do alvo IS481 em reações qPCR e separamos o produto da reação em gel de agarose. As Figuras 4.18 e 4.19 mostram o produto de amplificação de 70 pb para duas concentrações de DNA de *B. pertussis* (2 ng na Figura 4.18 e 100 ag na Figura 4.19).

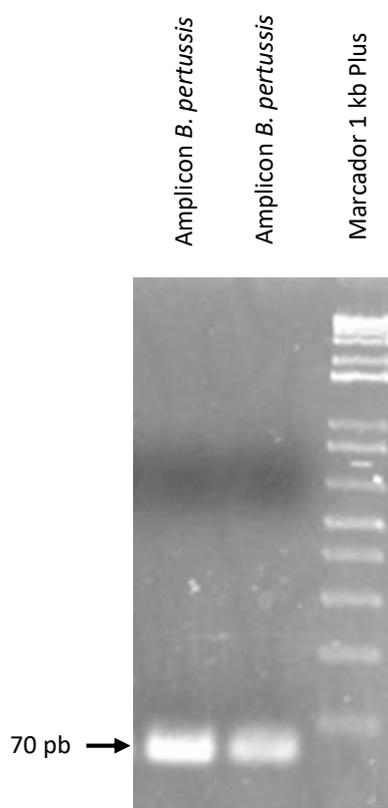


Figura 4.18: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio utilizando 2 ng de DNA de *B. pertussis*, em duplicata, como DNA alvo. Marcador 1 kb Plus (Invitrogen).

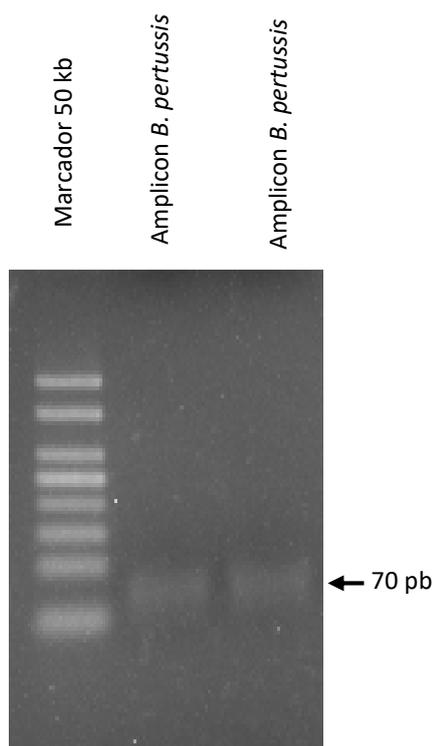


Figura 4.19: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo utilizando 100 ag de DNA de *B. pertussis*, em duplicata. Marcador 50 kb Plus (Invitrogen).

Após a transformação, as colônias foram selecionadas por PCR de colônia, utilizando os iniciadores IS481. Os plasmídeos selecionados apresentavam no gel amplicon de 70 pb tanto para a reação com 2 ng quanto para 100 ag, tamanho que corresponde ao amplicon de *B. pertussis* com os iniciadores IS481.

Após o crescimento por 12-14h e a purificação do plasmídeo, realizamos uma reação de PCR convencional, utilizando como DNA os plasmídeos purificados e os iniciadores de *B. pertussis* (IS481) para a concentração de 2 ng (Figura 4.20), em que após a corrida no gel de agarose, foi possível visualizar as bandas novamente com tamanho de 70 pares de bases. Já para a concentração de 100 ag, os plasmídeos foram amplificados utilizando iniciadores M13 do plasmídeo pGEM®-T easy (Invitrogen®) (Figura 4.21), em que foi possível também visualizar bandas com tamanho de 333 total (onde 263 pb seria o fragmento amplificado do vetor junto ao fragmento com 70 pb do amplicon de *B. pertussis*).

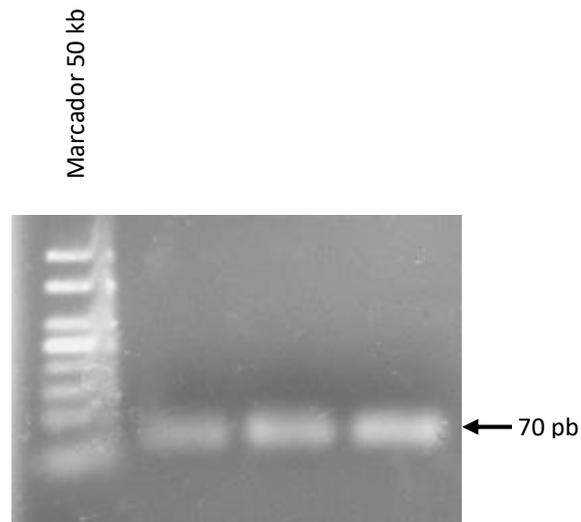


Figura 4.20: Gel de agarose após amplificação de DNA plasmidial purificado obtido da reação com concentração de 2 ng de DNA utilizando iniciadores de *B. pertussis*.

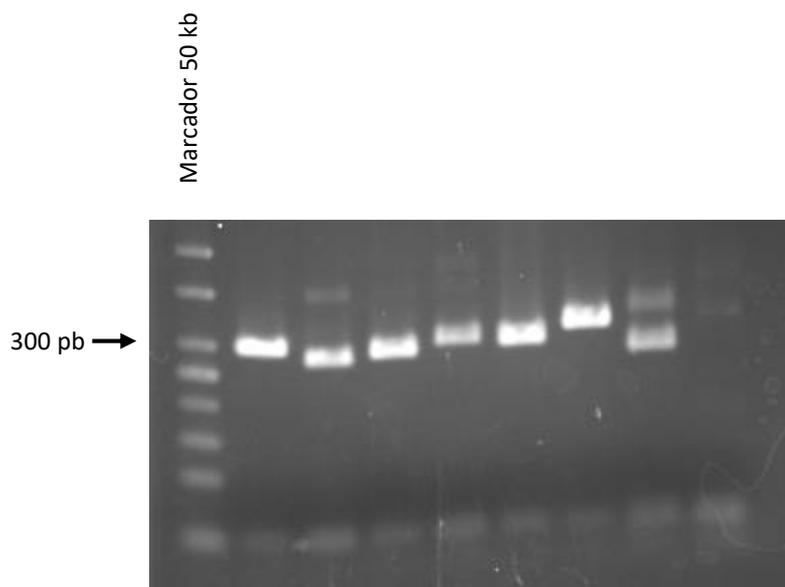


Figura 4.21: Gel após amplificação de DNA plasmidial purificado na concentração de 100 ag utilizando iniciadores M13 do vetor pGEM®-T easy (Invitogen®).

4.10.1. Sequenciamento do amplicom de 100 ag de *B. pertussis*

Os plasmídeos obtidos nas etapas anteriores foram sequenciados, o que confirmou que o amplicon obtido durante o teste de limite de detecção estabelecido no desenvolvimento do kit (100 ag), corresponde ao amplicon de *B. pertussis* esperado (IS481) (Figura 4.22), alinhando com 229 sequências ao longo de todo o genoma de *B. pertussis* (cepa de referência Tahoma I, *accession number* BX470248), conforme a análise com o software BLASTn (Anexo 2).

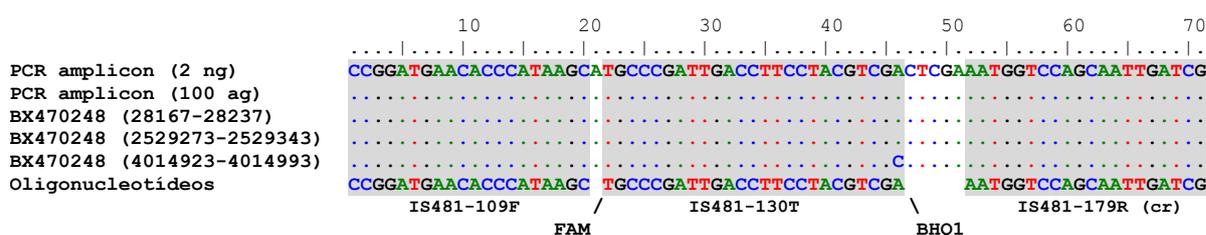


Figura 4.22: Figura: Alinhamento de nucleotídeos de amplicons da PCR em tempo real (2 ng e 100 ag), regiões genômicas de *B. pertussis* (cepa de referência Tahoma I, *accession number* BX470248), e oligonucleotídeos de detecção. Os pontos representam identidade

5. DISCUSSÃO

A coqueluche, que por muitos anos foi uma doença controlada devido à alta cobertura vacinal, ressurgiu nos últimos anos. Vários fatores genéticos e epidemiológicos podem estar relacionados ao seu reaparecimento, tais como a cepa vacinal não é antigenicamente igual à cepa circulante, imunização incompleta, perda da imunidade natural, subnotificação dos casos, baixa cobertura vacinal e movimentos anti-vacinas. A vacinação torna-se muito importante para reduzir o número de casos da doença, que foi controlada durante anos nos EUA, não havendo nenhum número de casos reportados. Porém, devido aos diversos fatores citados anteriormente, a doença reapareceu no ano de 1974 em diversos estados do EUA, como mostra a Figura 1.2 (LOEFFELHOLZ, M. J., C. J. THOMPSON, K. S. LONG, 2003; GENTILE, 2010; TYNAN & FRIEDMAN, 2015).

O cenário epidemiológico da coqueluche no Brasil, desde a década de 90, apresentou redução significativa da incidência de casos (10,6/100 mil), devido à cobertura vacinal que cobria 70% da população. À medida que as coberturas elevaram-se para valores próximos a 95 e 100%, no período de 1998 a 2000, a incidência reduziu para 0,9/100 mil habitantes. Porém, a partir de 2012, houve uma variação na incidência, ocorrendo um aumento no número de casos, principalmente em crianças menores de um ano de idade, correspondendo a cerca de 70% dos casos de coqueluche no país. Além disso, em relação ao total de casos confirmados de coqueluche entre menores de um ano de idade, observa-se que 85% ocorreu entre menores de seis meses de idade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Para minimizar sua propagação, diversos grupos vêm desenvolvendo protocolos baseados em PCR em Tempo Real para diagnosticar a coqueluche. A técnica de qPCR possui uma alta sensibilidade quando comparada com o ensaio padrão-ouro (cultura), principalmente por usar como alvo sequências específicas presentes em múltiplas cópias no genoma de *B. pertussis* (CHERRY; SEATON, 2012). Porém, mesmo estes protocolos possuem algumas desvantagens e dificuldades, tornando-se também um teste inacessível à população.

Dentre as desvantagens, os testes moleculares convencionais necessitam, além de equipamentos caros, de uma grande infra-estrutura laboratorial para que os reagentes sejam corretamente armazenados. Os reagentes normalmente são importados, o que encarece a reação, e há também possibilidade de haver erros

operacionais durante a manipulação dos reagentes, aumentando as chances de haver contaminação.

A gelificação é um método simples e eficiente que pode minimizar os erros de operação, visando diminuir a possibilidade de erros do operador ao simplificar o preparo da reação e o armazenamento de reagentes. O processo não interfere com a estabilidade/funcionalidade dos reagentes, que se dissolvem facilmente na reação quando reidratada, reduzindo claramente o risco de degradação e contaminação cruzada (SUN *et al.*,2013).

Todos os reagentes que usamos neste trabalho são 100% nacionais, produzidos pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP). Os reagentes nacionais (mastermix, iniciadores, e sonda fluorescente) demonstraram desempenho compatível com os insumos importados comerciais, reduzindo assim os custos do teste e proporcionando independência de empresas comerciais.

Apesar de ser o alvo mais bem descrito e validado para *B. pertussis*, a detecção apenas do alvo IS481 pode ser útil quando utilizado para o rastreamento da doença. Entretanto, têm valor epidemiológico limitado pois também encontra-se presente em *B. holmesii* e raramente em isolados humanos de *B. bronchiseptica*. (TATTI *et al.*,2011).

Diante dessa situação, a adição de um gene específico de *B. pertussis* é necessária para confirmação dos casos de coqueluche causados por esta espécie. Caso não haja possibilidade da adição de um alvo adicional, ou não ocorra a amplificação deste alvo, a reação para IS481 deve ser relatada como inconclusiva para *B. pertussis*. No desenvolvimento e execução desse projeto, utilizamos dois genes alvo: a sequência de inserção IS481 e a sequência S1 do gene da toxina pertussis (*ptxS1*).

Os resultados aqui apresentados são um primeiro passo para o objetivo de desenvolver um teste de diagnóstico para *B. pertussis* no formato “*ready-to-use*”, isto é, desenvolver um teste onde a manipulação seja mínima, pronta para uso, em que apenas é necessário ressuspender a reação e adicionar a amostra. Nós obtivemos resultados de qPCR similares quando comparadas as reações tanto no formato líquido quanto gelificado para IS481 e *ptxS1*.

A reação no formato líquido apresentou um limite de detecção superior a outros testes atualmente utilizados, chegando a detecção de 100 ag de DNA de *B. pertussis*, ou seja, 0,02 genomas equivalentes. A confirmação da presença do amplicon no limite de detecção estabelecido com o kit foi comprovada através de reação de sequenciamento de Sanger, indicando ausência de amplificação inespecífica.

Ao comparar a reação no formato gelificado para o alvo IS481, este apresentou o mesmo limite de detecção de 0,02 genomas equivalentes ou 100 ag, indicando assim, que a sua sensibilidade analítica não foi reduzida, além de apresentar eficiência de 90%, de acordo com os dados da regressão linear, e R^2 0,99.

O mesmo foi possível observar para o alvo *ptxS1*, em que a reação gelificada apresentou resultado similar com a de detecção linear da reação líquida de 100 fg, com eficiência de 90% e R^2 de 0,99. Além disso, com ambas as reações foi possível detectar o rRNA 18S humano, utilizado como controle interno. O limite de detecção de *ptxS1* corresponde ao equivalente a 20 genomas da bactéria.

Ao comparar o teste desenvolvido com outros grupos que trabalham com o mesmo microorganismo e mesma técnica, o limite de detecção (LOD) do teste aqui desenvolvido é até 200 vezes superior, pois outros grupos detectam até 20 fg de DNA para este mesmo alvo (LEITE *et al.*,2013). A curva de diluição seriada do nosso teste apresenta-se como uma curva de qPCR característica e, após a confirmação da amplificação por sequenciamento, consideramos como positiva as amostras com $C_t \leq 35,5$ para IS481 e ≤ 39 para *ptxS1*.

Outros parâmetros como eficiência, slope e R^2 do nosso teste também foram comparados com os dados publicados por outros grupos. A reação de qPCR descrita por Leite e colaboradores, apresenta eficiência de 85% para IS481 e 91% de eficiência para *ptxS1* (LEITE *et al.*,2013) com limites de detecção de C_t 29 para IS481 e 39 para *ptxS1* (LEITE *et al.*,2013).

Tatti e colaboradores também realizaram ensaios multiplex em formato tradicional (líquido) para detecção do *B. pertussis*, e obtiveram LOD de <1 genoma equivalente para IS481 e <10 genomas equivalentes para *ptxS1*, apresentando eficiência > 99% (TATTI *et al.*,2011).

Pittet e colaboradores ao realizarem ensaios de qPCR para detecção de IS481 e obtiveram um nível de sensibilidade em que foi possível identificar 8 genomas equivalentes da bactéria (PITTET *et al.*,2014).

Um estudo realizado por Lanotte e colaboradores, visou comparar a funcionalidade e eficiência de quatro kits comerciais para detecção de *B. pertussis* em qPCR, sendo que todos eles utilizaram IS481 como alvo, assim como o presente trabalho (LANOTTE *et al.*,2011). Todos os kits comerciais possuem a mesma especificidade analítica do nosso teste (100%), contudo apresentaram sensibilidade variável e inferior comparado com o resultado que obtivemos. Além disso, todos os kits comerciais necessitam de transporte e armazenamento refrigerado, possuindo altos custos de importação para o Brasil, o qual foi extremamente minimizado com a introdução do protocolo de gelificação.

Os testes apresentados no nosso projeto permitem gestões clínicas rápidas e precisas, sendo os resultados de fácil interpretação através do algoritmo mostrado na Tabela 5.1. Nosso algoritmo classifica os pacientes acometidos e os não acometidos pela doença, e ainda aqueles que apresentam resultados inconclusivos (detecção de um gene, não sendo possível confirmar presença de DNA de *B. Pertussis*).

A gelificação apresentou-se como uma técnica promissora no desenvolvimento desse trabalho, sendo possível eliminar o armazenamento dos reagentes em freezer. Não havendo necessidade de manutenção da temperatura a -20°C durante o transporte e armazenamento, não há necessidade de grandes investimentos em infraestrutura. Não havendo necessidade de manipulação dos reagentes, diminui a chance de erro e também a necessidade de um operador muito qualificado para analisar os resultados. Assim, o teste aqui desenvolvido pode ser disponibilizado em diversos centros descentralizado de atendimentos, postos de saúde e pequenos hospitais.

Os próximos passos deste projeto consistem no desenvolvimento de reações para *Bordetella parapertussis* (IS1001) e *B. holmesii* (hIS1001), pois apesar de não estarem relacionadas com a maioria dos casos de coqueluche, existem casos de infecção por *B. papapertussis* (síndrome coqueluchóide) e infecções de pacientes com septicemia por *B. holmesii*. A padronização de uma reação líquida e gelificada para os quatro alvos (IS481, IS1001, hIS1001 e *ptxS1*) nos permitira diagnosticar com mais precisão os casos reportados e montar um algoritmo completo.

Uma outra opção que buscaremos é o formato triplex, buscando a identificação dos genes *IS481* e *ptxS1* na mesma reação, conjuntamente com o alvo genômico humano. Este formato aumentará a processividade do teste e diminuirá os custos pois o diagnóstico será feito com apenas uma reação qPCR. Estes dois novos formatos serão avaliados com as amostras em nosso poder e prosseguiremos para elaboração e execução de um estudo multicêntrico de validação, visando registro do produto junto à ANVISA.

Tabela 5.1: Algoritmo proposto para detecção dos casos de Coqueluche.

Alvo		Interpretação dos resultados
<i>IS481</i>	<i>ptxS1</i>	<i>B. pertussis</i>
Positivo $C_t \leq 35,5$	Positivo $C_t \leq 39$	Positivo para <i>B. pertussis</i>
Negativo $C_t \geq 38$	Negativo $C_t \geq 40$	Negativo
Positivo $C_t \leq 35,5$	Negativo $C_t \geq 40$	Inconclusivo ^a (<i>B. pertussis</i> / <i>B. holmesii</i>)
Negativo $C_t \geq 38$	Positivo ≤ 39	Inconclusivo ^b
Inconclusivo C_t 35,6 a 37	Positivo ≤ 39	Inconclusivo ^b

^aPode ser infecção causada por *B. holmesii*, faz-se necessário a confirmação do diagnóstico.

^bResultado inconclusivo, faz-se necessário a repetição do teste.

6. CONCLUSÃO

Como resultados desse projeto, foi possível realizar a padronização para os alvos IS481 e *ptxS1* para detecção de *B. pertussis*, tanto em formato líquido quanto no formato gelificado. As reações no formato gelificado apresentaram desempenho similar às reações convencionais, podendo ser implementada em laboratórios e pequenos centros médicos.

A inserção de um controle interno da reação, o rRNA humano 18S, nos garante a funcionalidade do sistema como um todo, no que se refere a extração da amostra, integridade dos ácidos nucleicos, ausência de inibidores na reação, e correto funcionamento de equipamento e software.

A substituição de timina por uracila no mix de nucleotídeos foi eficiente para eliminar resultados falso-positivos obtidos através de contaminação ambiental proveniente de amplificações prévias com a utilização da enzima UNG, que degrada produtos de PCR contendo uracila, garantindo maior confiabilidade do teste.

O teste de especificidade analítica nos garantiu que nossos iniciadores são específicos para detecção de *B. pertussis*, não havendo amplificação em outros microrganismos, reações cruzadas e nem resultados falso-positivos.

A validação das reações com amostras clínicas demonstra que o teste pode ser implementado em diversos centros médicos e pequenos hospitais, além de que nosso teste possui grande eficácia, detectando de maneira igual ou melhor ao teste de PCR em Tempo Real utilizado atualmente no LACEN-PR.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRÉ, P. *et al.* Comparison of serological and real-time PCR assays to diagnose *Bordetella pertussis* infection in 2007. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1672–1677, 2008.

B&M, B. **Method for preparing stabilised reaction mixtures, which are totally or partially dried, comprising at least one enzyme, reaction mixtures and kits containing said mixtures EP 1374827 A2**, 2012.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de bolso**. Doenças infecciosas e parasitárias. 8º ed revista. Brasília-DF. 2010.

BRASIL, M. DA S. M. DA S. S. DE V. EM S. **Ministério da Saúde alerta sobre a situação epidemiológica da coqueluche no Brasil**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/profissional-e-gestor/vigilancia/noticias-vigilancia/7569-ministerio-da-saude-alerta-sobre-a-situacao-epidemiologica-da-coqueluche-no-brasil>> Acessado em 12 de março de 2015.

BORDET, J.; OCTAVE, G. Le microbe de la coqueluche. **Ann. Inst. Pasteur**, v. 20, p. 731–741, 1906.

BURKARDT, H. J. Standardization and quality control of PCR analyses. **Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC**, v. 38, n. 2, p. 87–91, 2000.

CALIFORNIA DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH, I. B. **Situação epidemiológica atual da coqueluche**. Divisão de Doenças Transmissão Respiratória. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac. v.9, p.26-35. São Paulo, 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Guidelines for the Control of Pertussis Outbreaks**. Atlanta, GA.: [s.n.].

CHAMPLOT, S. *et al.* An Efficient Multistrategy DNA Decontamination Procedure of PCR Reagents for Hypersensitive PCR Applications. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. e13042, 2010.

CHERRY, J. D. Pertussis in the preantibiotic and prevaccine era, with emphasis on adult pertussis. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 28 Suppl 2, n. Suppl 2, p. S107–S111, 1999.

CHERRY, J. D. Historical perspective on pertussis and use of vaccines to prevent it. **Microbe**, v. 2, n. 3, p. 139–144, 2007.

CHERRY, J. D.; HEININGER, U. Pertussis and other *Bordetella* infections. **Textbook of pediatric infectious diseases, 5th ed.**, v. 5, p. 1588–1608., 2004.

CHERRY, J. D.; SEATON, B. L. Patterns of *Bordetella parapertussis* respiratory illnesses: 2008-2010. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 4, p. 534–537, 2012.

CLOUD, J. L.; HYMAS, W.; CARROLL, K. C. Impact of nasopharyngeal swab types on detection of *Bordetella pertussis* by PCR and culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3838–3840, 2002.

CONRATHS, F. J.; SCHARES, G. **Validation of molecular-diagnostic techniques in the parasitological laboratory** Veterinary Parasitology. **Anais...**2006

- CROWCROFT, N. S.; PEBODY, R. G. Recent developments in pertussis. **Lancet**, 2006.
- DALBY, T.; HARBOE, Z. B.; KROGFELT, K. A. Seroprevalence of pertussis among Danish patients with cough of unknown etiology. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 12, p. 2016–2023, 2010.
- DEEB, B. J. *et al.* Pasteurella multocida and Bordetella bronchiseptica infections in rabbits. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 70–75, 1990.
- ESPY, M. J. *et al.* **Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing** *Clinical Microbiology Reviews*, 2006.
- EUROGENTEC. **qPCR guide**. Disponível em: www.eurogentec.com | info@eurogentec.com. Acessado em 22 de março de 2015.
- GENTILE, Á. Infección por Bordetella pertussis Bordetella pertussis infection. **Arch Argent Pediatr**, v. 108, n. 1, p. 78–81, 2010.
- GOEL, G. *et al.* Molecular beacon: A multitask probe. **Journal of Applied Microbiology**, 2005.
- Gonçalves CR. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Bordetella pertussis***. 2004. Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação da Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.
- Gonçalves MG. **Perfil mutacional dos genes responsáveis pela resistência de *Mycobacterium tuberculosis* a rifampicina (*rpoB*) e isoniazida (*katG*) em cepas isoladas no Estado de São Paulo e avaliação do uso da PCR em tempo real para detecção rápida destas mutações**. 2011. Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.
- GROSS, R.; KEIDEL, K.; SCHMITT, K. Resemblance and divergence: The “new” members of the genus Bordetella. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 199, n. 3, p. 155–163, 2010.
- GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Coqueluche**. p. p.209-224., 2005.
- GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Coqueluche**. v. 7º edição., p. p.01-013, 2009.
- HALLANDER, H. O. Microbiological and serological diagnosis of pertussis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 28 Suppl 2, n. Suppl 2, p. S99–S106, 1999.
- HEWLETT, E. L. A commentary on the pathogenesis of pertussis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 28 Suppl 2, p. S94–S98, 1999.
- HUBNER, P. *et al.* Detection of genetically modified organisms in food: critical points for duality assurance. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 4, p. 292–298, 1999.
- IGLESIAS, N. *et al.* Performance of a new gelled nested PCR test for the diagnosis of imported malaria: Comparison with microscopy, rapid diagnostic test, and real-time PCR. **Parasitology Research**, v. 113, p. 2587–2591, 2014.
- IRINO, K.; VAZ T; LEITE D. Manual de Diagnóstico Laboratorial: coqueluche. **INSTITUTO ADOLFO LUTZ - CENTRO DE BACTERIOLOGIA**. São Paulo, 2010.

- KL., M. G. Diagnostic Tests for Pertussis: Culture vs. DFA vs. PCR. **Clin Micro Newsletter**, v. 24, p. 143–150, 2002.
- KNORR, L. *et al.* Evaluation of real-time PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. **BMC infectious diseases**, v. 6, p. 62, 2006.
- KÖSTERS, K. *et al.* Real-time LightCycler PCR for detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1719–1722, 2002.
- KWOK, S.; HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. **Nature**, v. 339, n. 6221, p. 237–8, 1989.
- LANOTTE, P. *et al.* Evaluation of four commercial real-time PCR assays for detection of *Bordetella* spp. in nasopharyngeal aspirates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 11, p. 3943–3946, 2011.
- LAURE F PITTET, STÉPHANE EMONET, JACQUES SCHRENZEL, CLAIRE-ANNE SIEGRIST, KLARA M POSFAY-BARBE. *Bordetella holmesii*: an under-recognised *Bordetella* species. **Lancet Infect Dis.**, v. 14, p. p.510–519, 2014.
- LEITE, D. *et al.* Implementation and Assessment of the Use of Real-Time PCR in Routine Diagnosis for *Bordetella pertussis* Detection in Brazil. **Archives of Pediatric Infectious Diseases**, v. 2, n. 4, p. 196–202, 2013.
- LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION. **Real-time PCR handbook**. Disponível em: <
http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf> Acessado em 3 de abril de 2015.
- LINGAPPA, J. R. *et al.* Diagnosis of community-acquired pertussis infection: Comparison of both culture and fluorescent-antibody assays with PCR detection using electrophoresis or dot blot hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2908–2912, 2002.
- LOEFFELHOLZ, M. J. *et al.* Comparison of PCR, culture, and direct fluorescent-antibody testing for detection of *Bordetella pertussis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2872–2876, 1999.
- Loeffelholz MJ, Sanden GN. *Bordetella*, p. 803-814. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. (ed) . **Manual of Clinical Microbiology**, 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 2007.
- Loeffelholz MJ. *Bordetella*, p. 780-786. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. (ed) . **Manual of Clinical Microbiology**, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 2003.
- LOEFFELHOLZ, M. Towards improved accuracy of *Bordetella pertussis* nucleic acid amplification tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 7, p. 2186–2190, 2012.
- LONGO, M. C.; BERNINGER, M. S.; HARTLEY, J. L. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. **Gene**, v. 93, n. 1, p. 125–128, 1990.

LUCIA C. PAWLOSKI; LAUREN G. PITTENGER; KATHLEEN M. TATTI. Current methods for the diagnosis of pertussis infections. **Pertussis and Diphtheria Laboratory, Meningitis and Vaccine Preventable Diseases Branch, Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases Centers for Disease Control and Prevention**, 2010.

MATTOO, S. *et al.* Mechanisms of Bordetella Pathogenesis. **Frontiers in Bioscience**, v. 6, p. 168–186, 2001.

MATTOO, S.; CHERRY, J. D. **Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to Bordetella pertussis and other Bordetella subspecies** **Clinical Microbiology Reviews**, 2005.

MIYACHI, H. [The present status and future prospect of the molecular diagnostic tests]. **Rinsho Byori**, v. 49, n. 2, p. 139–149, 2001.

MOOI, F. R.; VAN LOO, I. H. M.; KING, A. J. Adaptation of Bordetella pertussis to vaccination: A cause for its reemergence? **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 526–528, 2001.

MORENO PEREZ, F. BAQUERO ARTIGAO, C. RODRIGO GONZALO DE LIRIA, M. J. C. O. Diagnóstico de laboratório de tos ferina. **Protocolos diagnóstico-terapêuticos de la AEP**, n. 1, 2012.

MORRILL, W. E. *et al.* Effects of transport temperature and medium on recovery of Bordetella pertussis from nasopharyngeal swabs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 9, p. 1814–1817, 1988.

MÜLLER, F. M. C.; HOPPE, J. E.; WIRSING VON KÖNIG, C. H. Laboratory diagnosis of pertussis: State of the art in 1997. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 2435–2443, 1997.

NIESTERS, H. G. Clinical virology in real time. **J Clin Virol**, v. 25 Suppl 3, p. S3-12, 2002.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. Em Tempo Real. **Cycle**, p. 10–13, 2004.

ONORATO IM, W. S. Laboratory diagnosis of pertussis: the state of the art. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 6(2), p. 145–151., 1987.

PATRICK R. MURRAY, KEN S. ROSENTHAL, M. A. P. **Medical Microbiology**. 7 ed. ed. Philadelphia, PA: 2013, 2013.

PERSING, D. H. Polymerase Chain-Reaction - Trenches to Benches. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 7, p. 1281–1285, 1991.

PITTET, L. F. *et al.* Diagnosis of whooping cough in Switzerland: Differentiating Bordetella pertussis from Bordetella holmesii by polymerase chain reaction. **PLoS ONE**, v. 9, 2014.

PLOTKIN, S. The global pertussis initiative: process overview. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 24, p. S7–S9, 2005.

PODDAR, S. K.; LE, C. T. Bordetella pertussis detection by spectrofluorometry using polymerase chain reaction (PCR) and a molecular beacon probe. **Mol Cell Probes**, v. 15, n. 3, p. 161–167, 2001.

Preston NW. Technical problems in the laboratory diagnosis and prevention of whooping-cough. **Lab Prat.** 1970; 19:482-486.

- RAEYMAEKERS, L. Basic Principles of Quantitative PCR. **Molecular Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 115–122, 2000.
- REGAN, J.; LOWE, F. Enrichment medium for the isolation of Bordetella. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 303–309, 1977.
- RENDI-WAGNER, P. *et al.* The seroepidemiology of Bordetella pertussis in Israel-- Estimate of incidence of infection. **Vaccine**, v. 28, n. 19, p. 3285–90, 2010.
- ROORDA, L. *et al.* A real-time PCR assay with improved specificity for detection and discrimination of all clinically relevant Bordetella species by the presence and distribution of three Insertion Sequence elements. **BMC research notes**, v. 4, n. 1, p. 11, 2011.
- SAIKI, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 239, n. 4839, p. 487–491, 1988.
- SANDEN E WEYANT. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Second Edi. The Proteobacteria. Part C, The Alpha-, Beta-, Delta- and Epsilonproteobacteria, 2005.
- SAÚDE, M. DA. **Ministério da Saúde alerta sobre a situação epidemiológica da coqueluche no Brasil.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/profissional-e-gestor/vigilancia/links-vigilancia?start=105>>. Acessado em: 10 jan. 2017.
- SEALEY, K. L. *et al.* Genomic Analysis of Isolates From the United Kingdom 2012 Pertussis Outbreak Reveals That Vaccine Antigen Genes Are Unusually Fast Evolving. **The Journal of infectious diseases**, p. 1–8, 2014.
- SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE ALAGOAS SUPERINTENDÊNCIA DE VIGILÂNCIA À SAÚDE. **Coqueluche**.
- SLOAN, L. M. *et al.* Multiplex lightcycler PCR assay for detection and differentiation of Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis in nasopharyngeal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 96–100, 2002.
- SUN, Y. *et al.* Pre-storage of gelified reagents in a lab-on-a-foil system for rapid nucleic acid analysis. **Lab on a chip**, v. 13, p. 1509–14, 2013.
- TAN, T.; TRINDADE, E.; SKOWRONSKI, D. Epidemiology of pertussis. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 24, n. 5 Suppl, p. S10-8, 2005.
- TANG, Y. W. *et al.* Bordetella holmesii-like organisms associated with septicemia, endocarditis, and respiratory failure. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 26, n. 2, p. 389–92, 1998.
- TATTI, K. M. *et al.* Development and evaluation of dual-target real-time polymerase chain reaction assays to detect Bordetella spp. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 61, n. 3, p. 264–272, 2008.
- TATTI, K. M. *et al.* Novel multitarget real-time PCR assay for rapid detection of Bordetella species in clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 4059–4066, 2011.

TILLEY PA, KANCHANA MV, KNIGHT I, BLONDEAU J, ANTONISHYN N, D. H. Detection of *Bordetella pertussis* in a clinical laboratory by culture, polymerase chain reaction, and direct fluorescent antibody staining; accuracy, and cost. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 37(1), p. 17–23., 2000.

TIZOLOVA, A.; GUIISO, N.; GUILLOT, S. Insertion sequences shared by *Bordetella* species and implications for the biological diagnosis of pertussis syndrome. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, n. 1, p. 89–96, 2013.

TOZZI, A. E. *et al.* Diagnosis and management of pertussis. **CMAJ: Canadian Medical Association journal**, v. 172, n. 4, p. 509–15, 2005.

TYNAN DE BOLD; DOD FRIEDMAN. **Battling Infectious Diseases in the 20th Century: The Impact of Vaccines.**

Vaccini. **Clinica de Vacinação.** Disponível em: <http://www.vaccini.com.br/viva-prevenido/46-coqueluche.html>. Acessado em 27 de abril de 2015.

VALENTINE-THON, E. Quality control in nucleic acid testing--where do we stand? **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 25 Suppl 3, p. S13-21, 2002.

VAN AMERSFOORTH, S. C. *et al.* Analysis of *Bordetella pertussis* populations in European countries with different vaccination policies. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 6, p. 2837–2843, 2005.

WEBER, C. *et al.* Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4396–4403, 2001.

WEYANT, R. S. *et al.* *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 1–7, 1995.

WHO. **CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A(H1N1).** Atlanta, 2009

WHO. CDC protocol of realtime RTPCR for swine influenza A (H1N1). **World Health Organization Collabotating Centre for influenza at CDC Atlanta**, v. 1, n. April, 2009b.

WIRSING VON KÖNIG, C. H. *et al.* Pertussis of adults and infants. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 12, p. 744–750, 2002.

Wirsing von Konig CH, Riffelmann M, Coenye T. *Bordetella* and related genera, p. 739-750. In Versalovic J, Carrol KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. American Society for Microbiology, Washington, D. 2011. CDC.

WOOLFREY, B. F.; MOODY, J. A. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. **Clinical microbiology reviews**, v. 4, n. 3, p. 243–55, 1991.

YAO, S. M. *et al.* Antigenic divergence of *Bordetella pertussis* isolates in Taiwan. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 11, p. 5457–5461, 2005.