

_Tosse convulsa em Portugal: análise retrospectiva de casos clínicos suspeitos de infeção por *Bordetella pertussis* no período 2010-2014

Maria Augusta Santos¹, Brigida Pereira¹, Cristina Furtado²

m.augusta.santos@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência de *Bordetella Pertussis*. (2) Unidade de Referência e Vigilância Epidemiológica, Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

_Introdução

A tosse convulsa é uma doença infecciosa do trato respiratório, cujo agente etiológico é *Bordetella pertussis*, afetando com um maior grau de gravidade os lactentes e crianças jovens. Esta doença persiste a nível mundial e constitui um problema global de grande importância em Saúde Pública, quer pelo seu grau de contagiosidade quer pela elevada taxa de letalidade, uma vez que continua a ser uma das principais causas de morte em todo o mundo, no âmbito das doenças evitáveis pela vacinação (1).

Nos últimos anos e apesar da introdução da vacinação ter permitido a diminuição acentuada da incidência da doença (2), tem-se assistido a um aumento de casos de tosse convulsa em países desenvolvidos que apresentam elevadas coberturas vacinais, principalmente em lactentes com idades inferiores a 6 meses, mas também em adolescentes e adultos (3-7), facto que indica a elevada efetividade da vacina em prevenir a doença, mas não a transmissão do seu agente causal, entre a população (8).

Em Portugal e apesar da existência de uma elevada taxa de cobertura vacinal, o padrão reemergente da tosse convulsa tem sido semelhante ao dos outros países desenvolvidos, assinalando-se um pico relevante de casos notificados em 2012. Este pico de padrão endémico detetado, apesar de apresentar um nível de endemicidade sustentada, evidencia no entanto que a bactéria *Bordetella pertussis* permanece em circulação, pelo que é necessário conhecer a real situação epidemiológica da infeção provocada por este agente etiológico, como

também caracterizar a estirpe circulante, através de estudo de perfis genéticos.

No âmbito do seu core de funções, o Laboratório Nacional de Referência de *Bordetella pertussis* do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) no Porto colabora na vigilância epidemiológica da tosse convulsa em Portugal, confirmando todos os casos que lhe são enviados com clínica sugestiva e efetivando a notificação laboratorial dos casos positivos detetados para a Direção-Geral da Saúde.

O diagnóstico laboratorial para confirmação de caso clínico de tosse convulsa é predominantemente molecular utilizando-se para o efeito pelo menos dois dos alvos preconizados, IS 481 e *ptxA-Pr*, apesar da existência de outras técnicas nomeadamente técnicas microbiológica e imunológica.

_Objetivo

Analisar retrospectivamente os resultados laboratoriais dos casos clínicos suspeitos de tosse convulsa enviados ao Laboratório Nacional de Referência de *Bordetella pertussis* do INSA no Porto para confirmação laboratorial no período 2010-2014, tendo como finalidade alertar não só para a necessidade de conhecer-se melhor a real incidência da tosse convulsa nos grupos etários com idade superior a 13 anos, bem como de caracterizar geneticamente as estirpes circulantes em Portugal.

_Material e métodos

Foram analisados os dados demográficos disponíveis dos 512 doentes elegíveis para o período entre 2010 e 2014. As amostras recebidas no INSA para confirmação de infeção por *Bordetella pertussis* foram predominantemente secreções nasofaríngeas (70%) para estudo molecular, isolados (1%) para identificação e soros (29%) para deteção de anticorpos anti-Toxina pertússica.

No âmbito da identificação, os isolados foram cultivados em placas de Bordet-Gengou, das quais foi retirado inócuo para identificar através de provas bioquímicas e quando necessário foram utilizados antissoros monoclonais.

Relativamente à deteção de anticorpos anti-Toxina pertússica classe IgG e classe IgA, os 29% de soros foram submetidos a uma reação imunoenzimática, na qual foi utilizado como antigénio um marcador, a Toxina pertússica que pela sua grande especificidade confirma contacto com *B. pertussis*, sendo a concentração final de anticorpos detetada expressa em UI/ml.

Nos 70% de secreções nasofaríngeas, procedeu-se à extração de ADN que posteriormente foi amplificado efetuando-se duas reações independentes de PCR em tempo real, nas quais foram pesquisados individualmente, o alvo IS 481 e a *ptxA-Pr*, sendo que este alvo por ser de grande especificidade confirma infeção por *Bordetella pertussis*.

Resultados e discussão

No período compreendido entre o início de janeiro de 2010 e o final de dezembro de 2014 foram enviados ao Laboratório Nacional de Referência de *Bordetella pertussis* produtos biológicos de 512 doentes com suspeita clínica de infeção por *Bordetella pertussis*, dos quais 5 (1%) isolados para estudo fenotípico, 150 (29%) soros para estudo imunológico e os restantes 357 (70%) secreções nasofaríngeas para estudo molecular.

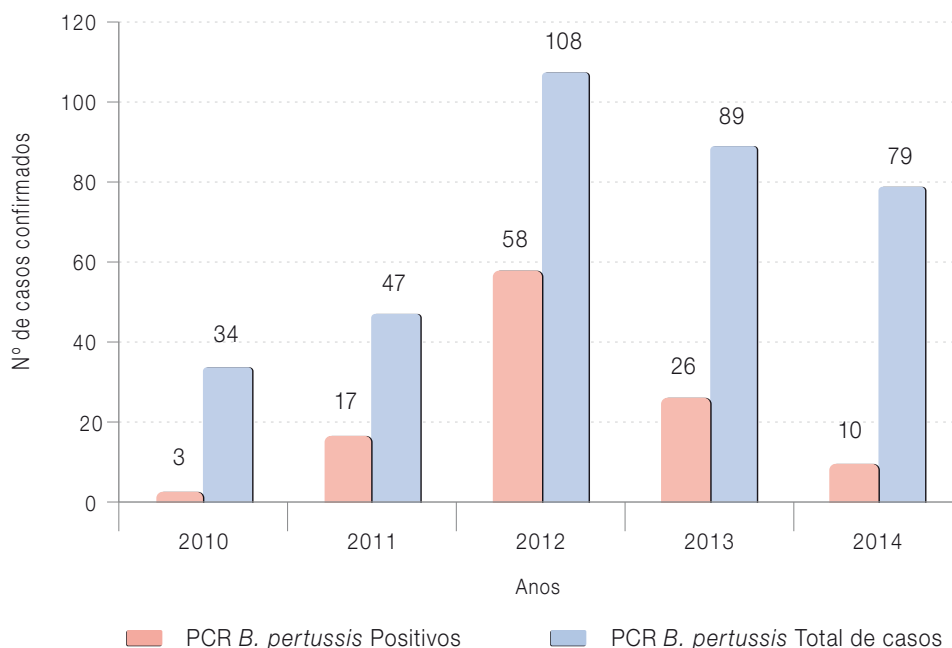
Todas as amostras recebidas para estudo imunológico e submetidas a técnica imunoenzimática, não evidenciaram contacto recente com *Bordetella pertussis* quer pela baixa concentração detetada de anticorpos anti-Toxina pertússica classes IgG e IgA, quer pela inexistência de uma segunda amostra (fase convalescente) que permitiria evidenciar um aumento significativo de anticorpos anti-Toxina pertússica ou seja uma seroconversão.

O mesmo foi constatado no estudo fenotípico, no qual não foi caracterizado nenhum isolado como sendo *Bordetella pertussis*.

Contudo nas 357 amostras de secreções nasofaríngeas enviadas para estudo molecular pela técnica de PCR em tempo real, confirmaram-se 114 (31,9%) casos de infeção por *Bordetella pertussis* (gráfico 1).

Entre 2010 e 2012 observou-se um aumento progressivo de casos suspeitos para confirmação laboratorial, respetivamente 34 em 2010, 47 casos em 2011 e 108 casos em 2012, seguindo-se um decréscimo nos dois anos subsequentes (gráfico 1).

Gráfico 1: Distribuição dos casos de tosse convulsa identificados por PCR, 2010-2014.



artigos breves_ n. 5

Esta tendência crescente do número de casos suspeitos de tosse convulsa acompanhou o aumento da frequência de casos confirmados pelo laboratório no triénio 2010-2012, ou seja 8,8% (3/34) em 2010 dos casos suspeitos foram positivos, pois evidenciaram contacto recente com *Bordetella pertussis*, 36,2% (17/47) em 2011 e 53,7% (58/108) em 2012, diminuindo no biénio 2013-2014 respetivamente para 29,2% (26/89) e 12,6% (10/79). Quanto à distribuição trimestral dos casos confirmados de infeção por *Bordetella pertussis*, observou-se que o seu predomínio ocorreu no terceiro trimestre dos anos civis em estudo (gráfico 2).

Salienta-se que apesar de não serem enviados ao INSA todos os casos clínicos suspeitos para confirmar, esta tendência crescente de casos de tosse convulsa confirmados no Laboratório Nacional de Referência de *Bordetella pertussis*, foi igualmente observada através do Sistema de Doenças de Declaração Obrigatória (DDO) da Direção-Geral da Saúde (DGS) (tabela 1).

À semelhança do observado a nível mundial, a distribuição dos 114 casos de tosse convulsa, confirmados laboratorialmente no INSA entre 2010-2014, evidenciou que a infeção por *B. pertussis* foi

Tabela 1: Distribuição dos casos de tosse convulsa notificados ao sistema DDO e confirmados no INSA, 2010-2014.

Anos	Nº casos DDO	Nº casos INSA
2010	14	3 (21,4%)
2011	32	17 (53,1%)
2012	225	58 (25,8%)
2013	114*	26 (22,8%)
2014	70*	10 (14,3%)

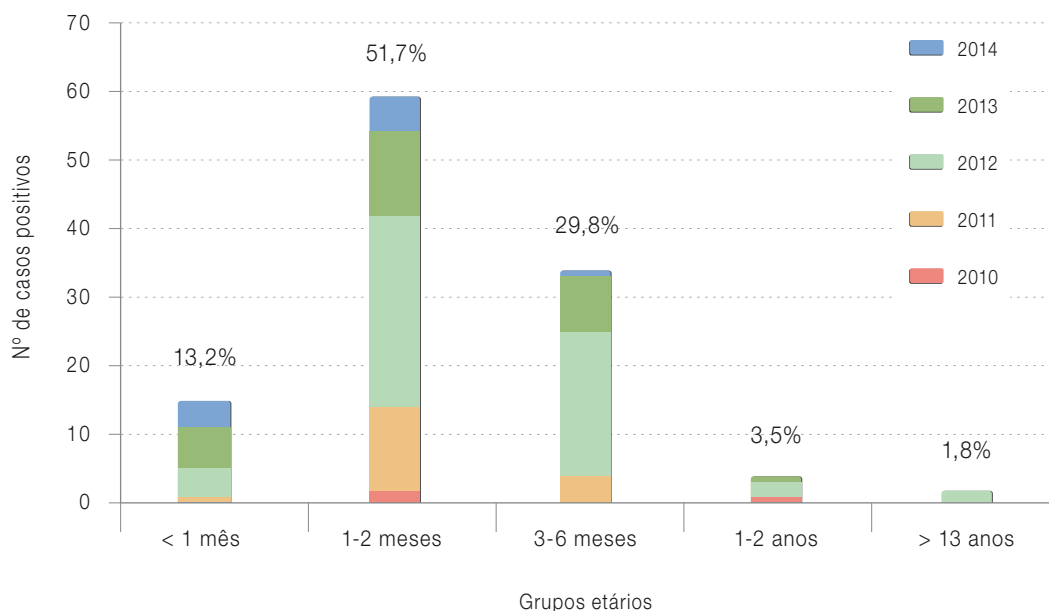
*dados provisórios, Direção-Geral da Saúde, setembro 2015.

predominante na faixa etária inferior a 6 meses de idade, sendo que 13,2% (15/114) pertenciam ao grupo etário com idade inferior a 1 mês, 51,7% (59/114) ao grupo etário entre 1-2 meses e 29,8% (34/114) ao grupo etário entre os 3 e 6 meses, o que corresponde a uma percentagem global de 94,7% (108/114). Em relação aos restantes 6 casos dos 114 casos confirmados, o que corresponde a 5,3%, verificou-se que 3,5% (4/114) pertenciam ao grupo de idades entre 1-2 anos e 1,8% (2/114) ao grupo etário superior a 13 anos de idade (gráfico 3).

Gráfico 2: Distribuição trimestral de casos de tosse convulsa, confirmados por PCR em tempo real, 2010-2014.



Gráfico 3: Distribuição por grupo etário de casos de tosse convulsa confirmados no INSA, 2010-2014.



Embora o número de casos positivos detetados na faixa etária superior a 13 anos seja baixo, é um facto que existem e que devem ser sempre investigados em qualquer diagnóstico clínico presuntivo considerando a sua expressão muitas vezes atípica (9).

Conclusões

Apesar da diminuição do número de casos de tosse convulsa observada nos dois anos subsequentes ao pico endémico de 2012 (tabela 1), esta doença continua a ser um problema de Saúde Pública, pelo que a sua monitorização constante não pode ser descuidada. Esta constatação reforça a necessidade de ser mantido um sistema ativo de vigilância epidemiológica de base molecular, porquanto é necessário não só conhecer a real incidência da infeção por *B. pertussis* nas crianças mas também nos adolescentes e adultos, como é crucial estudar os perfis genéticos das estirpes circulantes em Portugal.

Por outro lado e existindo evidências na Europa, como em outros continentes de mutações nas estirpes de *Bordetella pertussis*, associadas a expansões clonais, circulando predominantemente os tipos *ptxA1*, *ptxP3*, *fim3-2*, bem como *prn2* e *prn3* que terão

contribuído para o ressurgimento da tosse convulsa (10-12), há necessidade urgente de uma vigilância contínua da população bacteriana em circulação e da monitorização dos seus polimorfismos, nomeadamente em Portugal.

Em conclusão e no sentido de possibilitar conhecer-se o grau de virulência da estirpe, a taxa de falência vacinal e melhor caracterizar a epidemiologia da tosse convulsa, considera-se indispensável assegurar a colheita de amostras clínicas que permitam o isolamento do agente etiológico e subsequente estudo do seu genoma para deteção de possíveis mutações.

Agradecimentos

Aos médicos pelo envio de amostras clínicas ao INSA para confirmação laboratorial. À Direção-Geral da Saúde pelo sistema integrado de vigilância epidemiológica instituído.

Referências bibliográficas:

- (1) Crowcroft NS, Stein C, Duclos P, et al. How best to estimate the global burden of pertussis? *Lancet Infect Dis.* 2003;3(7):413-8.
- (2) Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis--United States, 1997-2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002;51(4):73-6.
www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5104a1.htm
- (3) Nteyayabo B, De Serres G, Duval B. Pertussis resurgence in Canada largely caused by a cohort effect. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22(1):22-7.
- (4) Celentano LP, Massari M, Paramatti D, et al.; EUVAC-NET Group. Resurgence of pertussis in Europe. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24(9):761-5.
- (5) World Health Organization. Immunization surveillance, assessment and monitoring: Data, statistics and graphics by subject [Em linha] [consult.11/12/2015].
http://apps.who.int/immunization_monitoring/data/data_subject/en/index.html
- (6) Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(2):326-82. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1082800/
- (7) Heining U. Recent progress in clinical and basic pertussis research. *Eur J Pediatr.* 2001;160(4):203-13.
- (8) Wearing HJ, Rohani P. Estimating the duration of pertussis immunity using epidemiological signatures. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):e1000647.
www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2763266/
- (9) Güriş D, Strebel PM, Bardenheier B, et al. Changing epidemiology of pertussis in the United States: increasing reported incidence among adolescents and adults, 1990-1996. *Clin Infect Dis.* 1999;28(6):1230-7.
- (10) Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, et al. *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(8):1206-13.
wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/8/08-1511_article
- (11) Zeddeman A, van Gent M, Heuvelman CJ, et al. Investigations into the emergence of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in six European countries, 1996 to 2012. *Euro Surveill.* 2014;19(33). pii: 20881.
www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20881
- (12) Schmidtke AJ, Boney KO, Martin SW, et al. Population diversity among *Bordetella pertussis* isolates, United States, 1935-2009. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(8):1248-55
wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/8/12-0082_article