

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

Maria Augusta Santos<sup>1</sup>, Brigida Pereira<sup>1</sup>, Cristina Furtado<sup>2</sup>

[m.augusta.santos@insa.min-saude.pt](mailto: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.

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.

### \_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

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.

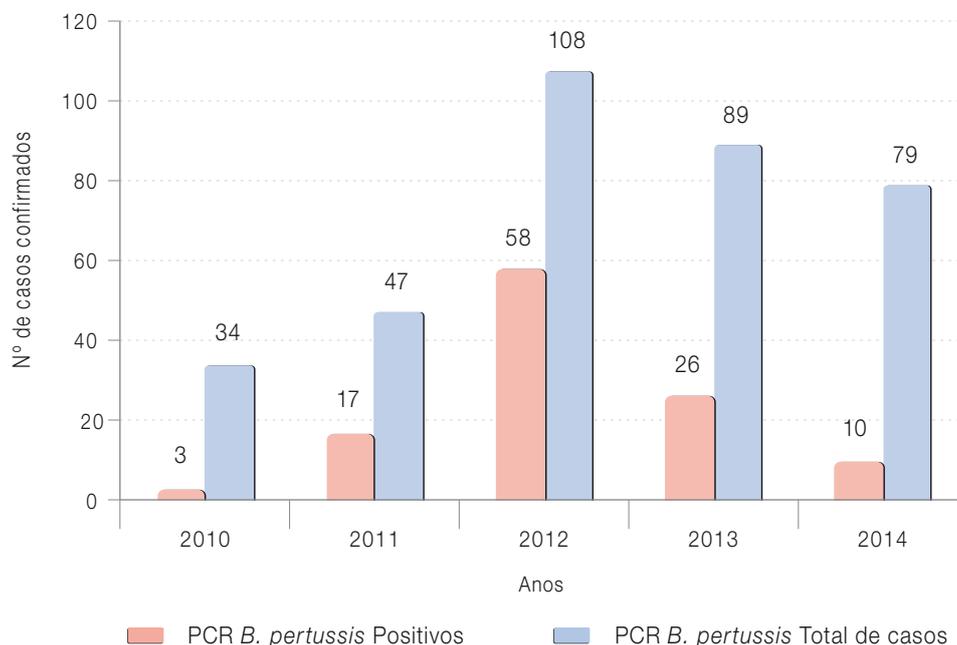
Todas as amostras recebidas para estudo imunológico e submetidas a técnica imunoenzimática, não evidenciaram contacto recente com *Bordetella pertussis* quer pela baixa concentração detetada de anticorpos anti-Toxina pertússica classes IgG e IgA, quer pela inexistência de uma segunda amostra (fase convalescente)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

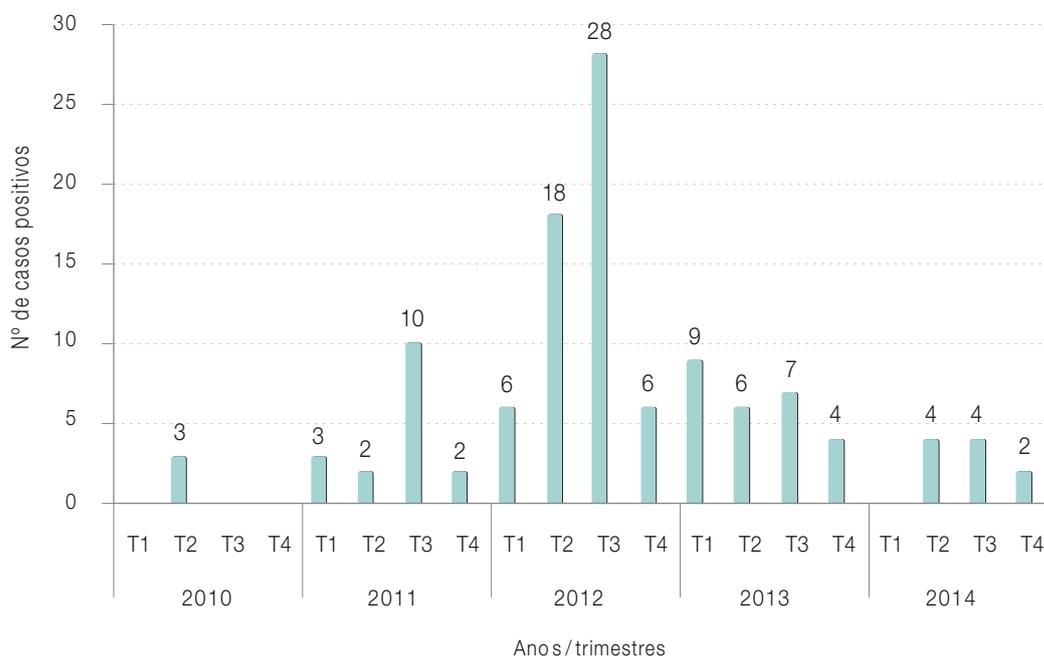
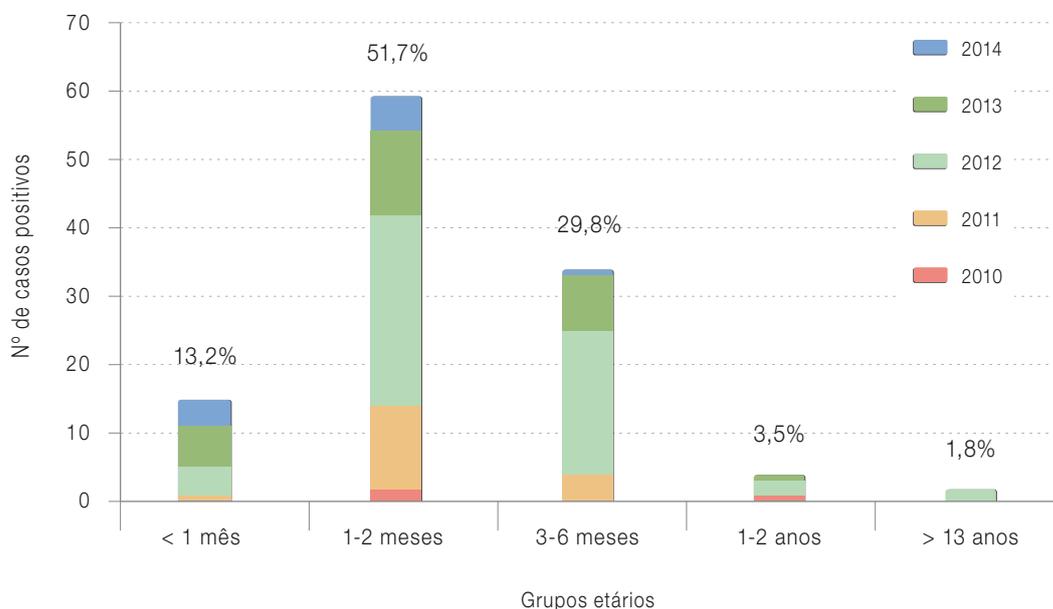


Gráfico 3: ▾ Distribuição por grupo etário de casos de tosse convulsa confirmados no INSA, 2010-2014.



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 descurada. 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](http://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](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/](http://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/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2763266/)
- (9) Güriş D, Strelbel 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](http://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](http://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](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/8/12-0082_article)