

PESQUISA DE ANTÍGENOS AGLUTINANTES "MAJOR" 1, 2 E 3 EM
CEPAS DE *BORDETELLA PERTUSSIS*, ISOLADAS DE CRIANÇAS
COM COQUELUCHE ATENDIDAS NO HOSPITAL DE ISOLAMENTO
EMÍLIO RIBAS DE SÃO PAULO, BRASIL

Sebastião Timó Iaria*

RSPU-B 373

IARIA, S. T. *Pesquisa de antígenos aglutinantes "major" 1, 2 e 3 em cepas de Bordetella pertussis, isoladas de crianças com coqueluche atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo, Brasil. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 11:410-5, 1977.*

RESUMO: *Em 30 cepas de Bordetella pertussis isoladas de crianças com coqueluche, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo, foram pesquisados os antígenos aglutinantes "major" 1, 2 e 3. Levando-se em conta a presença combinada dos três antígenos, as provas de soro-aglutinação rápida em lâmina revelaram que 25 (83,3%) cepas possuíam os fatores 1, 2 e 3, enquanto que 3 (10,0%) e 2 (6,7%) foram positivas, somente, para 1, 2 e 1, 3, respectivamente. Os resultados foram discutidos, considerando-se a importância deste antígeno no preparo de vacinas.*

UNITERMOS: *Coqueluche, diagnóstico de laboratório. Bordetella pertussis. Coqueluche, vacina.*

I N T R O D U Ç Ã O

No passado considerava-se a *Bordetella pertussis* como um único tipo antigênico. Leslie & Gardner^{1,2} (1931), porém, verificaram que estas bactérias podem apresentar-se em 4 fases: I, II, III e IV. Quando recentemente isoladas, elas se apresentam na fase I e lisa e, através de sub-culturas ou em culturas velhas, vão sofrendo modificações até chegarem à fase IV, tornando-se rugosa e avirulenta. As fases II e III são intermediárias.

Estudando cepas de *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*, muitos anos mais tarde, Andersen¹ (1952) observou,

através da prova de aglutinação, a presença de dois tipos de antígenos, sendo um do tipo "O", termoestável e comum às três espécies e um do tipo "K", de envoltório, compreendendo vários fatores termolábeis. Esse autor denominou os fatores "K" termolábeis de *a*, *a1*, *a2*, *a3*, *a4*, *a5* e *f* para *B. pertussis*, *b*, *b1* e *g* para *B. parapertussis* e *c*, *cl*, *d*, *dl* e *g* para *B. bronchiseptica*. Um ano mais tarde, os antígenos "K" da *B. pertussis* foram denominados 1, 2, 3, 4 e 5, após terem sido estudadas cepas isoladas, empregando-se soros monoespecíficos absorvidos (Andersen², 1953).

* Do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP "Setor Saúde Pública" — Av. Dr. Arnaldo, 715 — São Paulo, SP — Brasil.

Eldering e col.⁹ (1957) num estudo sobre antígenos termolábeis, por meio da técnica de absorção de aglutininas e da prova de soro-aglutinação, identificaram nas bactérias do gênero *Bordetella*, 14 fatores antigênicos "K", numerados de 1 a 14. Segundo estes pesquisadores, na *B. pertussis* o antígeno 1 mostra-se presente em todas as cepas e as diferenças sorológicas são dadas pela presença ou ausência dos antígenos 2, 3, 4, 5 e 6, em combinações várias; na *B. paraptussis* o antígeno comum é o 14, porém pode conter também os de números 8, 9 e 10; com relação à *B. bronchiseptica*, o antígeno comum é o 12, podendo possuir também os de números 8, 9, 10 e 11. O antígeno 13 pode estar presente nas *B. pertussis* e *B. bronchiseptica* e o 7 é comum às três espécies. Este último é mencionado por Kendrick e col.¹¹ (1970) como "antígeno hipotético". Da forma "S" ou lisa de *B. pertussis*, vários componentes antigênicos têm sido isolados, como toxinas, aglutinogênios (Flosdorf & Kimball (1940), citados por Bradford³, 1965) e antígenos ditos protetores (Bradford³, 1965).

Pelo exposto, parece que a estrutura antigênica da *B. pertussis* não está, até o momento, totalmente bem conhecida. O seu conhecimento, porém, é muito importante porque dele depende o preparo de vacinas eficientes para a adequada imunoprofilaxia da coqueluche.

A este respeito, é importante referir as investigações realizadas por Preston & Punga²², Preston^{19,20} (1963 e 1965) Preston & Evans²¹ (1963), os quais relacionaram a eficiência de vacinas com os antígenos "K" presentes nas mesmas e em estirpes de *B. pertussis* isoladas de doentes.

No Brasil, poucas pesquisas foram feitas sobre a eficiência de vacinas contra a coqueluche, entre elas a de Lima & Arantes¹³ (1943) relativamente ao preparo e doses a serem aplicadas e, a de Sampaio²⁶ (1954)

o qual estudou, empregando vacina importada, a capacidade de produção de anticorpos em crianças, medida através de provas de soro-aglutinação. Entretanto, objetivando o conhecimento da presença dos antígenos aglutinantes "major" 1, 2 e 3 em cepas de *B. pertussis* isoladas de doente com coqueluche, apenas uma investigação foi realizada em nosso meio, no Rio de Janeiro (Ubatuba & Salmito³⁰, 1970).

O presente estudo tem por finalidade verificar a presença desses antígenos em cepas de *B. pertussis*, isoladas de crianças com coqueluche, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Logo após terem sido identificadas morfológica, bioquímica e sorologicamente, 30 cepas de *B. pertussis*, isoladas em 1969 e 1970 de crianças com coqueluche atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo (Iaria¹⁰, 1973), foram submetidas a provas de soro-aglutinação rápida, a fim de ser determinada a presença dos antígenos aglutinantes "major" 1, 2 e 3.

Nestas provas foram empregados soros mono-específicos contra os antígenos aglutinantes 1, 2 e 3*.

As referidas provas de soroaglutinação foram realizadas empregando-se a técnica de Preston¹⁹ (1963). Assim, inicialmente, prepararam-se suspensões espessas das cepas de *B. pertussis*, em solução de cloreto de sódio a 0,85%, partindo-se de culturas com 48 horas a 35°C, em meio de Bordet & Gengou contendo 50% de sangue desfibrinado de carneiro. A seguir foram misturadas, em lâminas separadas, uma gota de suspensão bacteriana e uma gota de soros monoespecíficos anti-antígenos 1, 2 e 3. A homogeneização das misturas

* Soros preparados e gentilmente cedidos pela Dra. Arlete Ubatuba, do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro — Brasil.

Dra. Arlete Ubatuba, do Instituto Oswaldo Cruz

foi feita, inicialmente, com alça de níquel-cromo e, posteriormente, por movimentação manual das lâminas.

As leituras, para a verificação da presença ou não de aglutinação, foram realizadas, sempre, até cinco min. após o início da prova, com o auxílio de uma lupa.

Paralelamente realizaram-se provas controles, misturando-se, em lâminas, uma gota da suspensão bacteriana em prova, com uma gota de solução de cloreto de sódio a 0,85%, a fim de se verificar a ocorrência ou não de auto-aglutinação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 30 cepas de *B. pertussis* submetidas a provas de soro-aglutinação, frente a soros monoespecíficos anti-fatores "major" 1, 2 e 3, todas revelaram-se possuidoras do antígeno 1, como era esperado. Por outro lado, 28 (93,0%) apresentaram o antígeno 2, e 27 (90,0%) mostraram-se positivas para o 3.

Entretanto, levando em conta a presença combinada dos três antígenos, por cepa, as provas de soro-aglutinação revelaram que das 30 cepas, 25 (83,3%) possuíam os fatores 1, 2 e 3, enquanto 3 (10,0%) mostraram-se positivas apenas para 1 e 3 e somente 2 (6,7%) para 1 e 2.

Apesar do número de observações ser relativamente pequeno, podemos verificar que pelos resultados houve grande predominância de cepas apresentando, simultaneamente, os fatores 1, 2 e 3.

Este mesmo fato, entre nós, foi também observado por Ubatuba & Salmite³⁰ (1970) no Rio de Janeiro, onde de 116 cepas isoladas de crianças com coqueluche, 70,0% revelaram-se positivas para os fatores 1, 2 e 3, 18,0% somente para 1 e 3 e 12,0% apenas para 1 e 2. Assim, esses autores obtiveram, no Rio de Janeiro, um percentual menor de cepas apresentando os três fatores e, maior, respectivamente daquelas possuidoras dos fatores 1, 3 e 1, 2.

Considerando apenas os fatores "major" 1, 2 e 3 e comparando os resultados obtidos neste estudo com os valores encontrados em pesquisas realizadas em alguns países, podemos depreender que na Alemanha (Mebel¹⁵, 1968) e na Rússia (Demina & Permitina, 1967, citados por Ubatuba & Salmite³⁰, 1970) os isolamentos de cepas, apresentando aqueles três fatores, são também referidos como predominantes. Porém, em outros países como o Canadá (Chalvardjian⁴, 1965), Inglaterra (Preston²⁰, 1965), Holanda (Cohen⁵, 1968) e Estados Unidos (Eldering e col.⁸, 1969) são mais frequentes os isolamentos de cepas possuindo somente os fatores antigênicos 1 e 3.

O conhecimento da composição antigênica da *B. pertussis* é importante, levando-se em conta a sua identificação sorológica aplicada ao diagnóstico e à epidemiologia da coqueluche e, também, ao preparo de vacinas altamente eficientes para a adequada imunoprofilaxia desta doença.

Da forma "S" de *B. pertussis*, foram isolados vários componentes antigênicos, como toxinas termolábil e termoestável, aglutinógeno, não tóxico, com capacidade de determinar, em coelhos, níveis altos de aglutininas (Flosdorf & Kimbal, 1940, citados por Bradford³, 1965; Smolens & Mudd²⁸, 1943), hemaglutininas capazes de aglutinar hemácias humanas de camundongo e outros animais (Keogh & North, 1948, citados por Smith e col.²⁷, 1964). Estes últimos antígenos têm a propriedade de provocar a formação de anticorpos específicos em animais (Marsy¹⁴, 1952) e eventualmente no homem (Winter³¹, 1953), mas que não dão proteção contra a doença (Pillemer¹⁸, 1950; Thiele²⁹, 1950 e Winter³¹, 1953). Têm sido descritos também os chamados antígenos protetores, porém são ainda mal conhecidos (Bradford³, 1965). Já foi atribuída capacidade protetora a um carboidrato (Cruickshank & Freeman⁶, 1937 e Eldering⁷, 1942) enquanto que Flosdorf & Kimbal, 1940, (citados por Bradford³, 1965) e Smolens & Mudd²⁸

(1943) associaram o efeito protetor ao aglutinógeno. Por outro lado, Robbins & Pillemer²⁵ (1950) isolaram e purificaram um antígeno considerado protetor, a partir de um extrato aquoso de *B. pertussis*, o qual não era carboidrato, aglutinógeno, toxina e nem hemaglutinina.

Vários são os estudos sobre a eficácia das vacinas contra a coqueluche e destes serão referidos alguns realizados na Inglaterra.

Foi efetuado pelo Medical Research Council¹⁶ (1951) uma investigação em crianças com 6 a 18 meses de idade, divididos em dois grupos, sendo um vacinado contra a coqueluche e outro controle. Observadas por um período de dois a três anos, verificou-se que no grupo vacinado a incidência da coqueluche foi de 18,2% enquanto que no grupo controle foi de 87,3%. Alguns anos mais tarde, o próprio Medical Research Council¹⁷ (1965), num estudo, comprovou a correlação entre a eficiência das vacinas e a prova de proteção, realizada pela técnica de inoculação da *B. pertussis* por via intracerebral em camundongos, previamente vacinados.

Por outro lado, Preston^{19,20} (1963 e 1965) verificou que as amostras de vacinas por ele estudadas, preparadas na Inglaterra, apresentavam, dos antígenos termolábeis "major", na sua grande maioria, apenas os 1 e 2. Estas vacinas, segundo este pesquisador, eram altamente eficientes, pois a *B. pertussis* tipo 1, 2 que predominava naquele país antes de 1958, praticamente desapareceu. Verificou, também, que em 1963 e 1964 isolava-se o tipo 1, 2, 3 apenas de doentes não vacinados, e considerou que apesar de haver nas vacinas apenas os antígenos 1 e 2, elas davam também alguma proteção contra o tipo 1, 2, 3. Outrossim, de 155 cepas de *B. pertussis*, por ele isoladas de indivíduos vacinados e não vacinados, 85,0% pertenciam ao sorotipo 1, 3.

A este respeito, numa investigação feita pelo Public Health Laboratory Service²⁴ (1969) foi constatado que, em 1966 a 1967, cerca de 50,0% das crianças vacinadas adquiriam coqueluche e de mais de 80,0% dos casos isolavam-se cepas do tipo 1, 3.

Mais recentemente, Preston & Stanbridge²³ (1974) fizeram observações importantes relativamente a variações de sorotipos de *B. pertussis*. Verificaram que, por subculturas, cepas 1, 2, 3 mudaram para 1, 2 e cepas 1, 3 e 1, 2 para 1. Observaram também que cepas 1 se transformavam em 1, 2 ou 1, 3 e cepas 1, 2 em 1, 2, 3. Esses autores crêem que isto pode explicar as mudanças em sorotipos que são observadas no curso de uma infecção por *B. pertussis*. Isto também deve ser considerado com relação à possível instabilidade antigênica de cepas de laboratório, principalmente as utilizadas no preparo de vacinas e na produção e absorção de soros aglutinantes empregados no diagnóstico.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem-nos apresentar as seguintes conclusões:

1. Das 30 cepas de *B. pertussis* isoladas de crianças com coqueluche, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo, 80,0% possuíam os antígenos aglutinantes "major" 1, 2 e 3; 10,0% e 6,7%, apresentaram, respectivamente, somente os antígenos 1 e 3 e 1 e 2.

2. Faz-se necessária em nosso meio, a atenção dos laboratórios relativamente à presença, nas vacinas contra a coqueluche, dos antígenos 1, 2 e 3, pelo fato da maioria das cepas isoladas dos casos clínicos da doença, possuírem esses antígenos.

IARIA, S. T. Pesquisa de antígenos aglutinantes "major" 1, 2 e 3 em cepas de *Bordetella pertussis*, isoladas de crianças com coqueluche atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde p úbl.*, S. Paulo, 11 :410-5, 1977.

RSPU-B/373

IARIA, S. T. [Determination of 1, 2 and 3 major antigens in *Bordetella pertussis* strains isolated from Brazilian children with whooping-cough.] *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo 11:410-5, 1977.

ABSTRACT: *The presence of major antigens, 1, 2 and 3 were determined in 30 strains of B. pertussis isolated from children with whooping-cough hospitalized at the Hospital Emílio Ribas, São Paulo Brazil. The method used was the slide-agglutination test. Tests showed that 25(83.3%) of strains were positives for factors 1, 2 and 3. Factores 1 and 3 alone were present in 3 (10%) of strains and 1 and 2 alone in 2 (6.7%).*

UNITERMS: *Whooping-cough diagnosis, laboratory. Bordetella pertussis. Pertussis vaccine.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSEN, E.K. Serological studies on *H. pertussis*, *H. parapertussis* and *H. bronchisepticus*: preliminary report. *Acta path. microbiol. scand.*, **30**: 54-8, 1952.
2. ANDERSEN, E.K. Serological studies on *H. pertussis*, *H. parapertussis* and *H. bronchisepticus*. *Acta path. microbiol. scand.*, **33**: 202-24, 1953.
3. BRADFORD, W.L.I. *Bordetella* group. In: DUBOS, R.J. & HIRSCH, J.G. *Bacterial and mycotic infections of man*. 4th ed. Philadelphia, Lippincott, 1965. p. 742-51.
4. CHALVARDJIAN, N. The content of antigens 1, 2 and 3 in strains of *B. pertussis* and in vaccine. *Canad. med. Ass. J.*, **92**: 1114-6, 1965.
5. COHEN, H.H. Pertussis vaccine research in the Rikjs Institut Voor de Volksgezondheid (The Netherlands). *Arch. roum. Path. exp.*, **27**: 33-50, 1968.
6. CRUICKSHANK, J.C. & FREEMAN, G.G. Immunizing fractions isolated from *Haemophilus pertussis*. *Lancet*, **2**: 567-70, 1937.
7. ELDERING, G. Study of the antigenic properties of *Haemophilus pertussis* and related organisms. *Amer. J. Hyg.*, **36**: 294-302, 1942.
8. ELDERING, G. et al. *Bordetella pertussis* serotypes in the United States. *Appl. Microbiol.*, **18**: 618-21, 1969.
9. ELDERING, G. et al. Serological study of *Bordetella pertussis* and related species. *J. Bact.*, **74**: 133-6, 1957.
10. IARIA, S.T. Isolamento de bactérias do gênero *Bordetella* e provas sorológicas, a partir de crianças com sintomas de coqueluche, atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, **7**: 409-32, 1973.
11. KENDRICK, P. et al. Whooping-cough. In: BODILY, H.L. et al. *Diagnostic procedures for bacterial mycotic and parasitic infections*. 5th ed. New York, American Public Health Association, 1970. p. 106-17.
12. LESLIE, P.H. & GARDNER, A.D. The phases of *Haemophilus pertussis*. *J. Hyg.*, **31**: 423-34, 1931.
13. LIMA, J.P.C. & ARANTES, M. Vacinação contra a coqueluche. *Rev. Inst. A. Lutz*, S. Paulo, **3**: 9-18, 1943.
14. MARSY, F.L.G. Production, extraction and purification of the hemagglutinin of *Haemophilus pertussis*. *J. gen. Microbiol.*, **7**: 201-10, 1952.
15. MEBEL, S. Zur serologie von *B. pertussis*. I — Verbreitung der serotypen. *Zbl. Bakt.*, **206**: 481-5, 1968.
16. MEDICAL RESEARCH COUNCIL. The prevention of whooping-cough by vaccination. *Brit. med. J.*, **2**: 1463-70, 1951.

IARIA, S. T. Pesquisa de antígenos aglutinantes "major" 1, 2 e 3 em cepas de *Bordetella pertussis*, isoladas de crianças com coqueluche atendidas no Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 11 :410-5, 1977.

17. MEDICAL RESEARCH COUNCIL. Vaccination against whooping-cough: relation between protection in children and results of laboratory tests. *Brit. med. J.*, 2: 454-62, 1956.
18. PILLEMER, L. Adsorption of protective antigen of *Haemophilus pertussis* on human red cell stromata. *Proc. Soc. exp. Biol.*, New York, 75: 704-5, 1950.
19. PRESTON, N.W. Type-specific immunity against whooping-cough. *Brit. med. J.*, 2: 724-6, 1963.
20. PRESTON, N.W. Effectiveness of pertussis vaccines. *Brit. med. J.*, 2: 11-3, 1965.
21. PRESTON, N.W. & EVANS, P. Type-specific immunity against intracerebral pertussis infection in mice. *Nature*, London, 197: 508-9, 1963.
22. PRESTON, N.W. & PUNGA, W.A. The relation between agglutinin production by pertussis vaccines and their immunising potency in mice. *J. Path. Bact.*, 78: 209-16, 1959.
23. PRESTON, N.W. & STANBRIDGE, T.N. Variation of serotype in strains of *Bordetella pertussis*. *J. Hyg.*, London, 73: 305-10, 1974.
24. PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE. Efficacy of whooping-cough vaccines used in the United Kingdom before 1968. *Brit. med. J.* 4:329-33, 1969.
25. ROBBINS, K. C. & PILLEMER, L. The separation of a protective antigen from a toxin-producing strain of *Haemophilus pertussis*. *J. Immunol.*, 65: 393-406, 1950.
26. SAMPAIO, F.C.M. Contribuição ao estudo da imunização contra a coqueluche. *Matern. e Inf.*, S. Paulo, 13: 31-59, 1954.
27. SMITH, D. T. et al. *Zinsser microbiology*. 13th ed, New York, Appleton-Century-Crofts, 1964. p. 479-86.
28. SMOLENS, J. & MUDD, S. Agglutinin of *Haemophilus pertussis*, phase I, for skin-testing: theoretical considerations, and a simple method of preparation. *J. Immunol.*, 47: 155-63, 1943.
29. THIELE, E.H. Studies on the hemagglutinin of *Haemophilus pertussis*. *J. Immunol.*, 65: 627-32, 1950.
30. UBATUBA, A. & SALMITO, A. Bacteriologia da coqueluche. II. Determinação dos fatores aglutinantes "major" nas amostras de *Bordetella pertussis* isoladas no Rio de Janeiro. *Hospital*, Rio de Janeiro, 78: 1301-10, 1970.
31. WINTER, J.L. Development of antibodies in children convalescent from whooping-cough. *Proc. Soc. exp. Biol.*, New York, 83: 866-70, 1953.

Recebido para publicação em 14/03/1977

Aprovado para publicação em 28/03/1977