



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO de Ciencias Biológicas

Trabajo de Tesis Doctoral:
**Mejoramiento y evaluación de distintas estrategias de
vacunación contra pertussis empleando candidatos vacunales
noveles**

Tesista: Francisco Pablo Carriquiriborde

Directora: Dra. Daniela Hozbor

Codirector: Dr. Martin Rumbo

Año: 2020

El presente de tesis para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata fue realizado en el laboratorio VacSal del Instituto de Biotecnología y Biología Molecular dependiente de la FCE UNLP CONICET bajo la dirección de Prof. Dra. Daniela Hozbor y la co dirección del Prof. Dr. Martín Rumbo.

Perspectiva personal del trabajo

Antes de comenzar la tesis, que es un desarrollo muy complejo, quería aclarar desde que perspectiva se ha encarado.

Esta tesis doctoral fue realizada dentro del sistema público de ciencia, que en este caso particular necesitó de un entramado muy grande de instituciones públicas como el CONICET, la UNLP, la ANPCyT, y distintos hospitales, para conseguir los salarios, la infraestructura, los materiales y las muestras necesarias para su concreción. Es por esto que de ninguna manera este trabajo es una victoria individual, sino por el contrario es un logro del conjunto del pueblo, y a él le pertenece; por esto el término “agradecimientos”, no me resulta el más adecuado para describir el vínculo de las personas con una tesis. ¿Por qué se le va a agradecer a alguien una cosa, si también es para él/ella?

Sumado a esto me es necesario aclarar que al igual que muchos otros trabajos, que esta tesis se haya podido terminar es en gran medida producto de la lucha contra la precarización laboral que venimos dando hace varios años como colectivo de trabajadorxs, y que en el último periodo se agudizó brutalmente, impidiendo esta misma suerte a muchxs compañerxs. Esta lucha es de suma importancia ya que permite mantener vivo el sistema científico público y nacional, que con el eje puesto en la resolución de las necesidades del pueblo y articulado con un sistema público que pueda contener, producir y desarrollar las investigaciones que se realizan, se transforma en un actor clave que aporte a la soberanía de nuestros pueblos.

Además, en este momento me gustaría revalorizar el carácter colectivo del proceso de realización de las tesis. Como toda investigación, este trabajo lo realizamos en un grupo de investigación con líneas determinadas donde yo en particular me sumé a aportar a las mismas. La tesis se basó en trabajos previos realizados en el grupo, y además en ideas que se iban desarrollando en paralelo; la misma servirá de base para trabajos que realizarán quienes continúen aquí. Muchos de los experimentos presentados acá han sido realizados en alguna etapa por muchxs de mis compañerxs de trabajo, y yo mismo me he encontrado empezando/terminando muchos experimentos de todxs ellxs. Todos los experimentos aquí presentados los hemos podido realizar gracias a que entre todxs garantizamos la compra de materiales, el mantenimiento del bioterio, etc, y para poder hacerlos hemos necesitado de una facultad y un instituto debidamente equipado.

Para ir cerrando esta presentación, no quería dejar de hacer una mención especial y compartir la alegría personal que me genera haber transitado este doctorado con quienes de alguna manera compartimos el proceso:

A Dani Hozbor por acompañarme en esta primera etapa y brindarme una mirada global anti reduccionista, actitud sumamente valiosa y clave para encarar cualquier investigación; y también por su empuje y dedicación al grupo.

A Martin por aportar su mirada integral de los problemas, así como también por recibirme a continuación.

A Pau por tanta alegría compartida en tan poco tiempo, tan necesaria para este último trayecto

A mi familia por acompañarme en todas

A todo el grupo VacSal: Zuri, Emi, mama Bottero, Pol, Rudi, Celin, Fede y Juli, Nico, Kei, Zacca, Paz, Maga, Neri y también Gri y Mai; pero también a lxs que ya no están, pero son parte: Solcito, Bartel, Dario y Maxi, por todo el aprendizaje y alegrías vividas, que claramente impacto en mi formación

A mis compañerxs de mi querido JCP, con quienes continuamos construyendo esta bella herramienta organización, y a quienes la historia lxs puso en otros lugares: Juli, Mati, Agus, Irene, Seba, Nacho, Marti, Teje, Pesco y El Colo; por las hermosas luchas y los festejos librados.

A mis compañerxs delegadxs de ATE-CONICET: Andres, El teje, Flavio, Elena, Agus, Marcelo, Nico, Trivi, Mauro, Roberto Gaston, Ana y Ana, con quienes venimos construyendo un gremio de lucha para el conjunto de lxs trabajadorxs de nuestra región

A mis compañerxs del Frente Popular Darío Santillán-Corriente Nacional, en particular a lxs COMUNA y Fragua por con quienes caminamos los sueños de cambio social para nuestro pueblo, y de quienes tanto aprendo a diario.

A mis compañerxs de la Corriente Político Sindical Rompiendo Cadenas, especialmente aquellxs vinculadxs al CONICET y las universidades, por mostrarme que los sueños de construcción de cambio social también se pueden llevar adelante desde un sector tan reacio como el nuestro.

A mis amigxs: Corti, Ro, Toto, Cyn, Viki, Santi, Dolo, Fede, Andi, La Mica Caro etc por ser mi cable a tierra entre tanta locura.

A mi ahijadita Ami por ser tan libre, linda y loca.

A todo el IBBM, en especial a lxs chicxs del laboratorio de CPAs, el taller, y Gise y Juli, cuyas tareas son de vital importancia dentro del instituto, y pocas veces reconocidas como tal; a VA, RPS, R3, R4 y VV por permitirnos movernos como en nuestro laboratorio y la buena onda brindada.

A la Secretaria de postgrado y a las chicas del dpto de biológicas, por su inconmensurable paciencia y sabiduría

A las cátedras de biología y Microbiología por aportar otra mirada sobre el quehacer de la ciencia y permitirme descubrir lo lindo de la enseñanza en la universidad publica

Para cerrar quería resaltar los 2 aprendizajes más importantes que me llevo de esta tesis: por un lado, que por el impacto en la salud humana que tienen las vacunas no pueden pensarse como una “justificación de proyectos”, sino que debe pensarse como una política pública que se va implementar para controlar una epidemiología particular; que para su diseño no hay un camino único, sino que se debe pensar a partir de las características particulares de cada enfermedad, como lo es su epidemiología, su causal, el nicho ecológico del agente, etc. Y por el otro lado, que, ante todo

Investigar es trabajar



Índice

Resumen	1
Introducción.....	3
La enfermedad.....	4
Historia de la enfermedad	6
Agente causal	8
Factores de virulencia	12
Patogénesis e interacción con el huésped.....	17
Diagnóstico de la enfermedad.....	20
Tratamiento.....	22
Vacunación.....	23
Epidemiología.....	27
Causas de la resurgencia	32
Desarrollo de una nueva vacuna contra	37
Hipótesis y Objetivos.....	45
Capítulo I	48
Caracterización de la población bacteriana circulante local	48
Resultados.....	51
Discusión.....	54
Capítulo II.....	57
Vesículas de membrana externa derivada de <i>Bordetella pertussis</i> como modificador de la respuesta inmune inducida por vacunas comerciales	57
Resultados.....	64
Análisis de la posible interferencia como resultado de combinar las OMVs derivadas de <i>B. pertussis</i> con la vacuna acelular comercial.....	64
Caracterización de la respuesta inmune inducida por las formulaciones combinadas OMVP+aP	69
Capacidad protectora de las formulaciones combinadas OMVP+aP frente aislamientos clínicos de <i>B. pertussis</i> actualmente circulantes	73
Discusión.....	78
Capítulo III	82
El cultivo en biofilm de <i>Bordetella pertussis</i> como fuente para la obtención de OMVs	82
Resultados.....	85
Evaluación de la presencia de vesículas de membrana en cultivos biofilm de <i>B. pertussis</i>	85
Obtención y caracterización inmunogénica de las OMVs derivadas de <i>B. pertussis</i> AR106 cultivadas en biofilm	90
Evaluación de la capacidad protectora de las formulaciones basadas en OMVs provenientes del cultivo en biofilm de BpAR106.....	94
Discusión.....	97
Discusión final y Conclusiones.....	100
Materiales y Métodos	105

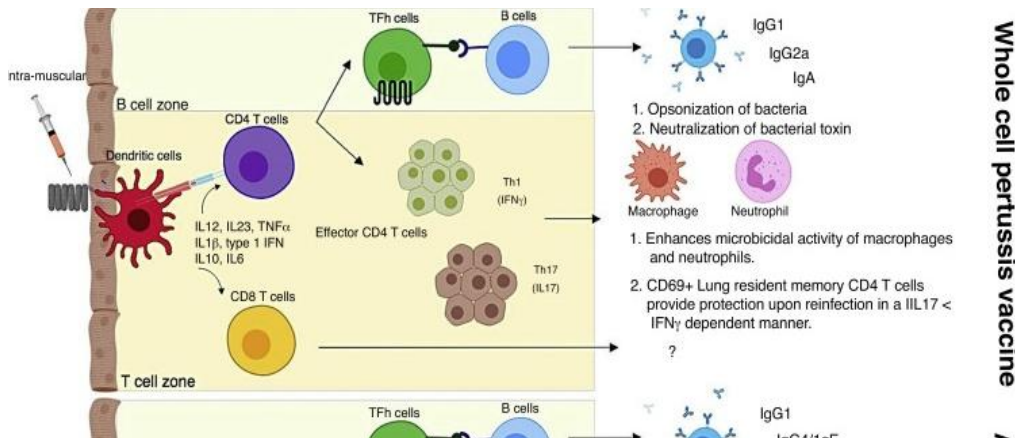
Cepas y aislamientos clínicos de <i>B. pertussis</i> utilizados en este trabajo.....	105
Genotipificación de los aislamientos clínicos de <i>B. pertussis</i>	105
Medios y condiciones de cultivo para <i>B. pertussis</i>	106
Aislamiento OMVs	107
Microscopía electrónica de transmisión – Tinción negativa.....	107
Microscopía electrónica de barrido.....	107
Cuantificación de proteínas	108
Formulación de vacunas.....	108
Determinación de los niveles de Il-6 empleando sangre fresca humana	108
Ensayos en animales	108
Cuantificación de anticuerpos en sueros policlonales por ELISA	109
Determinación de perfil de reconocimiento de sueros inmunes	110
Estudio de proteómica comparativa entre muestras obtenidas de cultivo planctónico y biofilm	111
Análisis estadístico.....	113
Referencias	115

Resumen

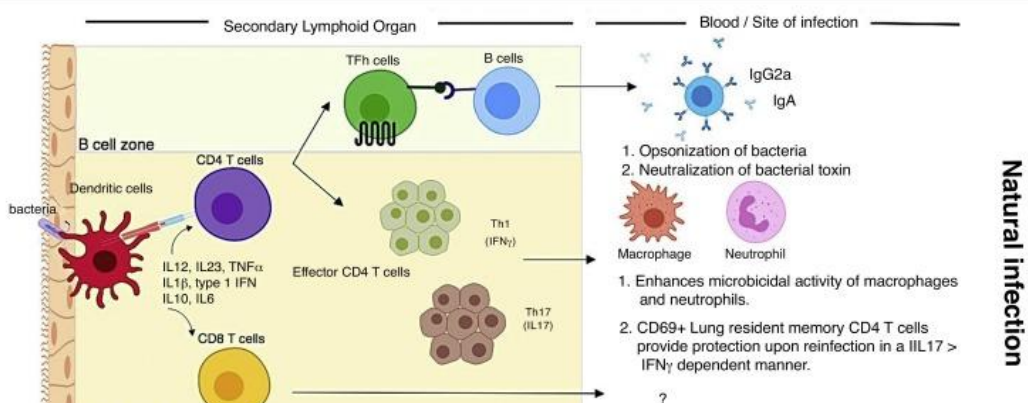
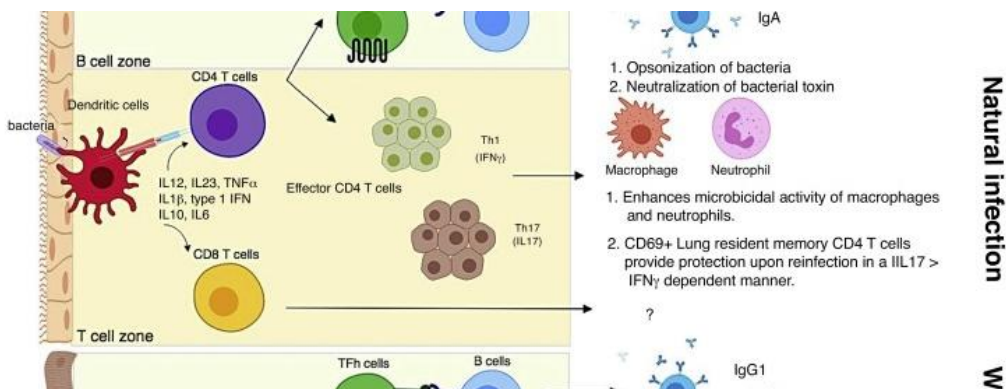
En este trabajo de tesis hemos abordado el diseño de diferentes formulaciones vacunales con el objetivo de hacer frente a una enfermedad respiratoria inmunoprevenible que ha resurgido en las últimas décadas en muchos países [1,2] a pesar de la introducción de vacunación masiva desde los años 60 con calendarios de vacunación que contienen al menos 4 dosis de vacunas (https://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/diseases). Esta enfermedad denominada pertussis afecta a todas las edades siendo el grupo de los lactantes menores de 6 meses los más vulnerables y en los que se registran las tasas más altas de letalidad [3,4]. Trabajamos con dos enfoques que, aunque diferentes, ambos buscaron superar debilidades de las actuales formulaciones vacunales contra pertussis. En particular, buscamos superar las debilidades de las modernas vacunas acelulares (aP) que: 1- ejercen una presión de selección sobre la población bacteriana del agente causal (*Bordetella pertussis*) más fuerte que las tradicionales vacunas celulares favoreciendo la prevalencia de bacterias más resistentes a la inmunidad conferida por vacunación [5,6]; y 2- inducen una respuesta inmune más débil de corta duración y con un perfil mayormente del tipo Th2 [7,8]. Uno de nuestro enfoques se refirió a combinar a nuestro candidato vacunal multiepitope basado en vesículas de membrana externa (del inglés OMVs, cuya patente fue aceptada en Estados Unidos) [9-16] con la vacuna aP comercial de diferentes farmaceuticas que están formuladas a partir de pocos inmunógenos del agente causal de la enfermedad. Esta combinación buscó no sólo direccionar la respuesta inmune inducida por la aP hacia el perfil mixto Th1/Th17 recomendado para alcanzar una protección robusta de más largo plazo sino también posicionar a nuestro candidato vacunal basado en OMVs de cara a los ensayos clínicos que hoy resultan engorrosos o impracticables de realizar. Esta dificultad en los ensayos clínicos reside en el hecho que no existe un correlato de protección para pertussis sencillo de medir y porque muchos diseños incluirían grupos placebo que atentan contra el derecho del hombre a la vacunación actualmente vigente. La combinación de vacunas que incluye una vacuna en uso y una formulación novel permitiría diseñar ensayos clínicos de no inferioridad. Estos ensayos no sólo evitan trabajar con un grupo placebo que conllevaría a la negación de un derecho, sino que permiten realizar de mediciones sencillas de respuesta inmune (título de anticuerpos específico) en forma comparativa con un grupo vacunado con la vacuna en uso. El otro enfoque buscó fundamentalmente superar el efecto negativo en la protección de la divergencia entre la

población bacteriana circulante y las cepas vacunales tratando de no incrementar y en lo posible disminuir, la presión de selección que ejercen las actuales vacunas aP por estar constituidas por pocos inmunógenos en altas concentraciones. Decidimos para ello obtener a nuestro candidato vacunal basado en OMVs de cultivos *B. pertussis* en biofilm. Esta decisión se basó en: 1- que los aislamientos de *B. pertussis* se diferencian de las cepas vacunales en el hecho que estas últimas se adaptaron a las condiciones de cultivo de laboratorio dejando de expresar componentes propios del desarrollo *in vivo* del patógeno [17,18], 2- la detección de la formación de biofilm *in vivo* [19,20]; y 3- expresión de proteínas con potencial poder protector en condiciones de cultivo en biofilm [21,22].

Estos dos diseños vacunales fueron evaluados en el modelo murino de desafío subletal intranasal ya puesto a punto en nuestro laboratorio. La seguridad de estas vacunas se evaluó mediante ensayos de liberación de IL-6 en sangre entera murina. Los resultados de los ensayos demostraron que ambas formulaciones que contienen a las OMVs de *B. pertussis* exhiben menor capacidad endotóxica que las vacunas celulares comerciales y muy próxima a la de las vacunas aP. Respecto de la capacidad protectora detectamos que ambas vacunas son efectivas contra las cepas a partir de las cuales se formularon las vacunas aquí testeadas pero también contra los aislamientos circulantes, incluidos los que no expresan el antígeno vacunal pertactina cuya prevalencia ha aumentado en los últimos años en países que solo usan aP en sus calendarios [23,24]. La vacuna aP en uso frente a estos aislamientos que fueron seleccionados luego de realizar la caracterización genotípica y fenotípica de ellos [25] se mostró muy poco efectiva ($p < 0,05$). Nuestro candidato vacunal obtenido de cultivos planctónicos, aunque mejora la protección contra aquellos aislamientos respecto de la vacuna aP comercial, el mismo presenta alguna debilidad que no se detectó en las formulaciones aquí ensayadas. Más aún, ambos candidatos vacunales en contraposición a la vacuna aP comercial indujeron un perfil mixto de respuesta celular con una robusta respuesta humoral. En resumen, nuestros diseños que contienen a OMVs derivados de *B. pertussis* conteniendo un mayor número de inmunógenos en conformaciones cercanas a las encontradas al agente causal se presentan como superadoras de las actuales vacunas acelulares y con potencialidad de transformarse en la tercera generación de vacunas contra pertussis.



Introducción



La enfermedad

Pertussis, tos convulsa o simplemente coqueluche son algunos de los sinónimos que se emplean para designar a una enfermedad respiratoria aguda, sumamente contagiosa, causada principalmente por el patógeno *Bordetella pertussis*, y en menor medida por *Bordetella parapertussis* (*hu*) [26]. Esta enfermedad inmunoprevenible afecta a todos los grupos etarios, pudiendo ser mortal principalmente en los recién nacidos y en los lactantes menores de

6 meses de edad no vacunados [27]. El único reservorio de *B. pertussis* hasta ahora conocido es el hombre y la vía de transmisión de la enfermedad es a través gotitas o aerosoles expelidos desde un individuo infectado hacia un individuo susceptible.

El cuadro clínico de la enfermedad depende de

la edad del paciente, de su estado inmune y de su estado sanitario en general [28]. Es así que el cuadro típico se observa generalmente en una primera infección, de un paciente pediátrico sin inmunidad previa contra pertussis. Este cuadro clínico comienza a manifestarse luego de un periodo de incubación asintomático que suele durar entre 7 a 12 días, a través de signos y síntomas cuya aparición y desaparición resulta ser progresiva en el tiempo. Se distinguen así tres etapas sintomáticas secuenciales (Figura 1) [29]: **la fase catarral**, que tiene una duración de 10-14 días y se caracteriza por presentar una sintomatología similar a un resfriado común con rinitis, tos y alguna febrícula. Los lactantes suelen presentar cianosis y apnea. Esta etapa es la de mayor contagiosidad. **La siguiente etapa se denomina fase paroxística** y se caracteriza por la presencia de tos que aumenta tanto en frecuencia como en intensidad. Se producen los paroxismos o ataques de tos violenta que se repiten varias veces. Estos eventos de tos

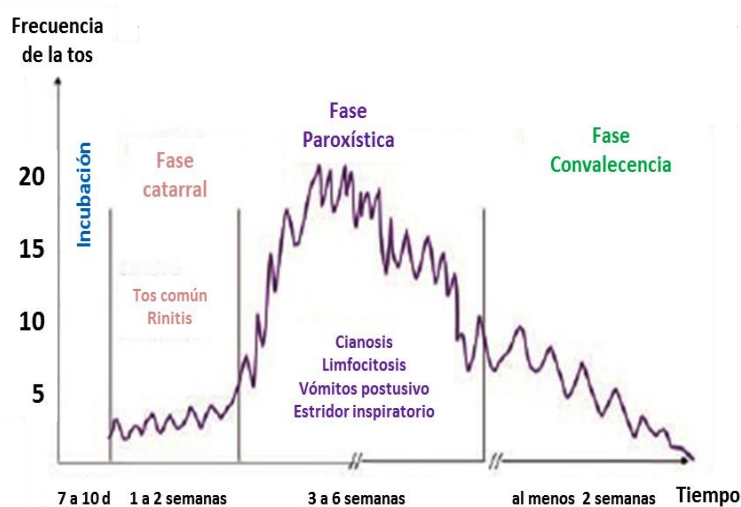


Figura 1: Frecuencia de la tos y aparición de síntoma según la etapa clínica de la enfermedad.

Fuente: https://www.academia.edu/16093405/Manual_of_Clinical_Microbiology

terminan generalmente en una inspiración profunda que produce el silbido característico (estridor inspiratorio). Es frecuente también el vómito postusivo. Estos ataques se dan con mayor frecuencia durante la noche, llegando a promediar los 15 por día. Entre los ataques de tos, el paciente se presenta normal, sin aparente enfermedad respiratoria. En esta fase, los recién nacidos y lactantes menores de 6 meses suelen presentar cianosis y apneas. Durante esta etapa el paciente sufre un gran deterioro físico, presentando cansancio extremo, deshidratación, pérdida del apetito y descenso de peso. Suele presentarse leucocitosis con marcada linfocitosis. Esta etapa es la más larga de la enfermedad y, a pesar de que suele durar entre 1 y 6 semanas, puede extenderse hasta 10 semanas.

Luego de esta etapa extenuante, en la fase convaleciente, la tos comienza a reducirse en intensidad y frecuencia, y los paroxismos tos también disminuyen. A pesar de que la tos paroxística puede llegar a desaparecer a las 2-3 semanas, generalmente se reportan ataques de tos normal por varios meses. Si no hay complicaciones la fase de convalecencia dura alrededor de 1-3 semanas [29,30].

A pesar de que la enfermedad afecta personas de distintas edades, en niños de 0-6 meses se observan las complicaciones más severas y la mayor tasa de mortalidad. Estas dificultades suelen clasificarse en 3 grandes grupos: respiratorias, nutricionales y del sistema nervioso central. La complicación respiratoria más frecuente y la asociada a la mayor tasa de mortalidad es la neumonía, ya sea causada por *B. pertussis* o por una infección secundaria. Resultan frecuentes también los casos de neumotórax provocados por los fuertes accesos de tos. Las complicaciones nutricionales se vinculan a la alta cantidad de casos de vómitos y la incapacidad de retener alimentos por causa de la tos.

Tabla 1: Complicaciones frecuentes, muertes y hospitalizaciones reportados en un hospital de Estados Unidos durante el periodo 1997-2000 <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5104a1.htm>

Edad del grupo	N° con pertussis	Complicaciones									
		Hospitalizados		Neumonía		Convulsiones		Encefalopatías		Muertes	
		N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
<6 meses	7.203	4.543	63,1	847	11,8	103	1,4	15	0,2	56	0,8
6-11 meses	1.073	301	28,1	92	8,6	7	0,7	1	0,1	1	0,1
1-4 años	3.137	324	10,3	168	5,4	36	1,2	3	0,1	1	<0,1
5-9 años	2.756	86	3,1	68	2,5	13	0,5	0	0	2	0,1
10-19 años	8.273	174	2,1	155	1,9	25	0,3	4	0,1	0	-
≥20 años	5.745	202	3,5	147	2,6	32	0,6	3	0,1	2	<0,1
Total	28.187	5.630	20,0	1.477	5,2	216	0,8	26	0,1	62	0,2

La mala alimentación de los bebés aumenta el riesgo de muerte asociados a la enfermedad [28,30]. Respecto a las complicaciones del sistema nervioso, se han reportado convulsiones y encefalopatías, causadas por hipoxia cerebral que generan los fuertes ataques de tos en combinación la acción de toxinas propias de *B. pertussis*. Asociado al paroxismo también pueden reportarse casos de enfisema pulmonar producto de ruptura de alveolos, hernias umbilicales, desgarros del diafragma y quebradura de costillas por el esfuerzo sufrido durante los ataques de tos [28,30]. Dentro de otras complicaciones que se ha detectado están: anorexia, deshidratación, otitis media y epistaxis luego de los accesos de tos. En la tabla 1, a modo de ejemplo, se muestran los síntomas más frecuentes reportados en un hospital de Estados Unidos.

En adultos, adolescentes y niños con inmunidad parcial conferida por vacunación o infección previa el trascurso de la enfermedad es mucho más leve. En estos grupos pertussis suele transcurrir de manera asintomática con ataques de tos menos duraderos y carentes del estridor característico. Comúnmente las complicaciones en estos grupos están vinculadas a dificultad para dormir, e incontinencia urinaria, pero también se reportan casos de neumonía y quebraduras de costillas [31,32]. Muchos de estos casos son detectados estudiando a los contactos de los pacientes, principalmente los convivientes, donde no se detectan cuadros clínicos específicos de pertussis sino evidencias de infección por laboratorio. Por ejemplo, en un estudio de casos de contactos familiares realizados en USA, el 46% (52/114) de la población sana arrojó resultados positivos en el laboratorio para *B. pertussis*; de esta población solo el 23% mostró síntomas leves de enfermedad respiratoria (rinorrea, tos por más de 2 semanas y estornudo).

Es importante tener en cuenta para la epidemiología de la enfermedad que existen individuos infectados asintomáticos que podrían transmitir la enfermedad [33]. A través de estudios de seroprevalencia, se estimó que por cada individuo diagnosticado con pertussis, habría 5 asintomáticos [34].

Historia de la enfermedad

Si bien los orígenes de esta enfermedad no están claros, su historia es relativamente corta en comparación con otras enfermedades, como Difteria. Los

reportes más antiguos de una persona con una sintomatología compatible con pertussis provienen del siglo séptimo en China [35]. En ese reporte el médico Yuanfang Chao describe en pacientes pediátricos una fuerte tos que se prolonga hasta 100 días, por lo que este médico la llamo “la tos de 100 días” [35]. Allí se menciona que, si la espalda del niño enfermo estaba fría, y clínicamente su tos no se resolvía dentro del mes y perduraba por 100 días, sólo 1 o 2 de cada 10 niños enfermos se recuperarían. La denominación de “tos de los 100 días” resulta de la adaptación de la traducción del texto original descripta para la evolución de la enfermedad en un niño. Otras observaciones tempranas de una enfermedad compatible con los signos y síntomas de la enfermedad que hoy conocemos como pertussis fueron las realizadas por Bahaoddin-bin-Ghasem-Bahaoddin Razi (médico iraní) quien en un manuscrito compilado en 28 capítulos informó sobre dos epidemias, una en Harat y otra en Rey (antigua Persia) en donde dio detalles sobre el pronóstico, los síntomas, la etiología y los factores predisponentes de una enfermedad compatible con pertussis. En 1578 se reportó otro brote; en este el médico francés Guillaume De Baillou (1538-1616) describió una epidemia de pertussis en París [36]. En aquel momento a la enfermedad se la llamó “quinta” debido a la periodicidad observada para los paroxismos (“episodios agudos de enfermedad”) los cuales ocurrían cada 5 horas. La sintomatología y los brotes de la enfermedad se pudieron así describir y detectar muchos años antes de la identificación del agente causal. Más adelante en el siglo XIX el médico alemán Adalbert Friedrich Marcus hizo la primera publicación con datos epidemiológicos sobre la enfermedad caracterizada por una tos convulsiva, sistematizando 37 epidemias reportadas en toda Europa [37]. Según la época y la zona geográfica la enfermedad tomaba distintos nombres: *quinta* (llamada así por Baillou), en la edad media *kink* (sinónimo de paroxismo en escoses) y *kindhoest* (tos de los niños), en Alemania *Wolfshusten* por el aullido de los lobos, “*tos de los 100 días*” en China y *Coqueluche* en Francia (de origen desconocido); recién en 1682 Thomas Sydenham y Thomas Willis llamaron pertussis (per, intensa + tussis, tos) a la

Figura 2. Cultivo de *Bordetella pertussis* en el medio Bordet Gengou suplementado con sangre.



enfermedad que afectaba principalmente niños causando una tos severa que solía terminar en un estridor y vómitos, y podía causar la muerte del paciente [30].

Las causas de pertussis no siempre estuvieron claras. En 1766 el profesor sueco Nils Rosen von Rosentein planteaba la idea de que “la verdadera causa de esta enfermedad era una materia heterogénea o semilla que se trasmite por infección y parte es atraída por la respiración hasta los pulmones” [38]. En contraposición a esto en 1850 médicos de Filadelfia postularon que la enfermedad en realidad era un desorden del sistema nervioso que generaba efectos en el tracto respiratorio [39]. Mas de trescientos años tuvieron que transcurrir hasta que en 1883 el científico alemán, Carl Burger detectara por primera vez bacterias en una muestra de esputo obtenida de un paciente con manifestaciones clínicas compatibles con pertussis. Diecisiete años después, el científico belga Jules Bordet visualiza pequeños bacilos gramnegativos en el esputo obtenido de su hija de 5 meses quien sufría de violentos ataques de tos, pero lamentablemente en aquel momento Bordet no pudo cultivarlos. Seis años después, el hijo de Bordet, sufrió también de pertussis y en esta oportunidad Bordet junto con Octave Gengou lograron aislar exitosamente al agente causal. “La pululación”, dijeron Bordet y Gengou al describir su hallazgo, “era de una abundancia tal y de una pureza tan perfecta, que era imposible rehusarse a admitir una relación de causalidad directa entre esta infección y la aparición de la coqueluche”. (Figura 2)

El descubrimiento del patógeno y su posterior caracterización generó un impacto muy importante para la salud humana, ya que para 1910 pertussis era considerada una de las principales causas de mortalidad infantil [40].

A partir de aquella identificación del agente causal, comenzó la era del desarrollo de vacunas contra la enfermedad.

Agente causal

Como se ha mencionado pertussis es una enfermedad causada por bacterias del género *Bordetella*, principalmente por *B. pertussis* y en menor medida *Bordetella parapertussis* (se estima que solo alrededor del 14% de los casos [26]). Sin embargo, en casos de pacientes inmunodeficientes también se han reportado infecciones por otras especies del mismo género, como *Bordetella bronchiseptica* y *Bordetella holmesii*

[26,41,42]. Todas estas especies causan una sintomatología similar pero debido a que la vigilancia de pertussis generalmente no incluye la distinción entre estas especies, el número real de infectados por cada una de las especies es desconocido.

El género *Bordetella* pertenece a la familia *Acaligenaceae*, orden *Burkholderiales*, clase *Betaproteobacteria*, que incluye 10 especies caracterizadas (Tabla 2): *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* (humana), *B. parapertussis* (ovina), *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. petrii* y *B. ansorpii*, y otras especies recientemente aisladas: *Bordetella muralis* sp. nov, *Bordetella tumulicola* sp. nov y *Bordetella tumbae* sp. nov [43]. Los microorganismos que pertenecen a este género son cocobacilos gram negativos de 1 a 2 µm, en su mayoría aerobios estrictos que emplean aminoácidos como fuente de carbono, nitrógeno y energía [44]. La temperatura óptima de crecimiento de estos microorganismos es de 35 °C a 37 °C. Todos son catalasa positivos, ninguno es esporulado y solo algunos, como *B. bronchiseptica*, son móviles por medio de flagelos peritricos [45]. Son sensibles a sulfuros y ácidos grasos por lo que los medios de cultivo incluyen sangre y/o carbón activado. En estos medios se necesitan de 3 a 6 días para visualizar las colonias debido a que en general son de crecimiento lento. También pueden crecer en un medio sintético que incluya tampones, sales, aminoácidos y factores de crecimiento como nicotinamida.

Tabla 2: Especies del género *Bordetella*

Especie	Rango de hospedador/fuente	Enfermedad	Referencia
<i>B. pertussis</i>	Humanos	Pertussis	Bordet y Gengou, 1906
<i>B. parapertussis</i> _{hu}	Humanos	Pertussis	Eldering y Kendrick, 1938
<i>B. parapertussis</i> _{ov}	Ovejas	Neumonía	Cullinane et al. 1987, Porter et al., 1996
<i>B. bronchiseptica</i>	Varios mamíferos	Enfermedad respiratoria	Ferry, 1912
<i>B. holmesii</i>	Humanos	Septicemia, tos	Weyant et al., 1995
<i>B. avium</i>	Pájaros	Rinotraqueítis	Kerstens et al., 1996
<i>B. trematum</i>	Humanos	Infecciones de heridas, otitis media	Vandamme et al., 1996
<i>B. hinzii</i>	Pollos, humanos	Infecciones oportunistas en humanos	Cookson et al., 1994
<i>B. petrii</i>	Ambiente, humanos	Infecciones oportunistas	Von Wintzingerode et al., 2001
<i>B. ansorpii</i>	Humanos	Infecciones oportunistas	Ko et al., 2005

Las especies *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis* conforman el grupo denominado *Bordetellas* clásicas por ser las más estudiadas dentro del género [46]. Las principales características de sus genomas se presenta en la Tabla 3 [47]. La relación filogenética y la evolución de estas especies ha sido dilucidada con más detalle que para las otras especies del género [47]. Musser *et al.* (1986) [48] en base a los datos de MLEE (del inglés, *Multilocus Enzyme Electrophoresis*) concluyeron que estas tres

especies presentan un bajo grado de diversidad si se lo compara con otros patógenos. La limitada diversidad genética parece ser causada por un reciente cuello de botella evolutivo [47]. *B. pertussis* y *B. parapertussis* son considerados clones de *B. bronchiseptica* que se han especializado para infectar al humano.

Tabla 3: Características génicas de las especies clásicas de *Bordetella*. Fuente: Parkhill y col. 2003 [21].

	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
Tamaño (bp)	4.086.186	4.773.551	5.338.400
Porcentaje G+C	67,72	68,10	68,07
Secuencias codificantes	3.816	4.404	5.007
Pseudogenes	358 (9,4%)	220 (5,0%)	18 (0,4%)
Densidad codificante (<i>genes intactos</i>)	82,9%	86,6%	91,4%
Densidad codificante (<i>todos los genes</i>)	91,6%	92,2%	92,0%
Tamaño promedio de los genes	978	987	978
Operones ARNr	3	3	3
ARNt	51	53	55
IS481	238	0	0
IS1001	0	22	0
IS1002	6	90	0
IS1663	17	0	0

Dentro del grupo de *Bordetellas* clásicas se han podido identificar mediante análisis de los datos de MLST (del inglés *Multilocus Sequence Typing*) cuatro poblaciones bacterianas diferentes que se han designado como complejos I al IV. Los complejos I y IV comprenden aislamientos/cepas de *B. bronchiseptica*, mientras que los complejos II y III incluyen a aislamientos de *B. pertussis* y *B. parapertussis_{hu}* de origen humano, respectivamente [49]. Según los resultados difundidos por Diavatoupolus *et al.* (2005) [49], *B. pertussis* y *B. parapertussis_{hu}* habrían evolucionado a partir de los complejos IV y I, respectivamente, lo que indicaría que la adaptación de estas dos especies a los seres humanos se produjo a través de dos eventos independientes recientes. En dicho estudio se demostró además que *B. parapertussis_{hu}* (de origen humano) y *B. parapertussis_{ov}* (de origen ovino) derivan claramente de grupos ST (del inglés *sequence type*) diferentes del complejo I.

Los integrantes de la especie *B. bronchiseptica* que pertenecen al complejo IV estarían más estrechamente relacionados a *B. pertussis* que los incluidos en el complejo I [49]. Casi todos los aislamientos del complejo IV fueron obtenidos de pacientes que presentaban sintomatología compatible con la enfermedad denominada coqueluche o

pertussis y la mayoría contiene una secuencia de inserción (*IS*) *IS1663* no encontrada en otros linajes. Los aislamientos de *B. bronchiseptica* obtenidos principalmente de humanos pertenecientes al complejo IV muestran la misma diversidad que los aislamientos de *B. bronchiseptica* del Complejo I, es decir que parecerían ser aislamientos más antiguos que los de *B. pertussis*.

En la evolución de *B. pertussis* y *B. parapertussis* a partir del complejo I de *B. bronchiseptica*, la adquisición de genes parece ser un evento raro.

B. holmesii por su parte, fue ubicada como una especie más estrechamente relacionada a *B. avium* y no a *B. pertussis* según lo indicaron los análisis realizados sobre la composición de los ácidos grasos, la caracterización de un locus denominado *bvgAS* (*Bordetella* *virulence* genes) y la secuencia de distintos genes que codifican para funciones básicas de las bacterias [50]. Esta especie del género ha sido recuperada de muestras de sangre, fluido pleural y esputo de pacientes inmunocomprometidos [51-53], aunque recientemente se la ha podido aislar también de las secreciones nasofaríngeas de pacientes con sintomatología compatible con coqueluche (también llamada pertussis o tos convulsa o pertussis) [41,42]. *B. avium*, por su parte, también causa enfermedades respiratorias pero en aves [54]. Esta especie se ha aislado también de pacientes que sufren otitis medias crónicas. *B. avium* al igual que *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* presenta tropismo por el epitelio ciliado del huésped y expresa una serie de adhesinas que juegan un rol esencial en las primeras etapas de la infección. *B. trematum* se ha aislado de heridas y de oídos infectados [55]. Son poco conocidos sus factores de virulencia, aunque se ha podido detectar en su genoma la presencia del locus *bvgAS* involucrado en la regulación de la síntesis de los factores de virulencia en las otras especies. *B. hinzii* ha sido aislada tanto de aves como de humanos [56]. Esta especie es un patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos. En ellos se la ha podido aislar de distintos sitios anatómicos (por ejemplo, tracto respiratorio, sangre, bilis) [57-59]. *B. hinzii* es capaz de expresar la toxina adenilato ciclasa también presente en otras especies del género. En esta especie se ha detectado también la presencia de la secuencia codificante para BvgA. *B. petrii* fue aislada de un biorreactor que contenía sedimento de río [60]. Esta especie es la primera del género que fue aislada del medio ambiente. También se la ha podido aislar de pacientes con osteomielitis mandibular o con fibrosis quística [61]. Respecto de *B. ansoipii*, sólo una publicación hace referencia a esta especie. Fue aislada de un exudado purulento obtenido de un quiste epidérmico

en una paciente inmunodeprimida [62]. Dada su estrecha relación con *B. petrii* se cree que *B. ansorpii* es también una especie que puede sobrevivir en el medio ambiente.

Recientemente se han aislado de la superficie de la pared de yeso de una pintura mural en Nara, Japón, tres nuevas especies del género *Bordetella*: *Bordetella muralis* sp. nov, *Bordetella tumulicola* sp. nov y *Bordetella tumbae* sp. nov [43]. Estos hallazgos apoyan la evidencia previa de que algunas especies de *Bordetella* existen en el medio ambiente y pueden encontrarse en el suelo y/o agua.

Factores de virulencia

Las distintas especies patógenas del género *Bordetella* expresan factores que se conocen en conjunto como factores de virulencia. En el caso del grupo de las *Bordetella* clásicas estos factores de virulencia han sido ampliamente estudiados. Los mismos han sido clasificados en dos grandes categorías

funcionales diferenciales: **adhesinas** y **toxinas**, (Figura 3). También existen otros factores más complejos, como el sistema de secreción tipo III, que juegan un rol clave en la patogenia causada por *B. pertussis* [63,64]. Así, mientras que las adhesinas median la adhesión a células del huésped (como las del epitelio ciliado, macrófagos y neutrófilos), las toxinas son conocidas por contribuir a la patogénesis y en muchos de los casos están involucradas en la evasión de la respuesta inmune montada por el huésped. En la Tabla 4 se describen las características más relevantes de los principales factores de virulencia.

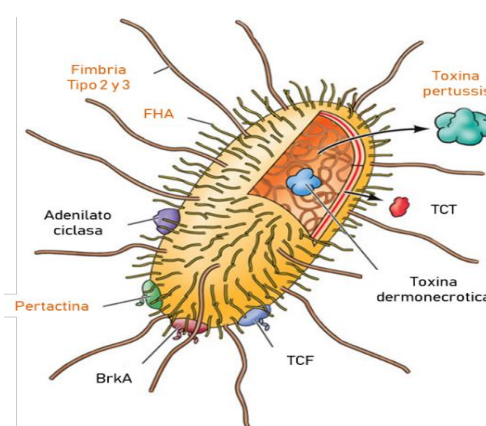


Figura 3: Esquema de los factores de virulencia *Bordetella pertussis*. BrkA se emplea como sigla para designar a la proteína asociada con la resistencia a la muerte por complemento, TCF: Factor de Colonización Traqueal, TCT: Toxina citotraqueal, FHA hemaglutinina filamentosa. Fuente

<http://www.museumofhealthcare.ca/explore/exhibit>

Tabla 4: Características estructurales y funcionales relevantes de los principales factores de virulencia de *B. pertussis*.

Denominación	Características estructurales y funcionales relevantes
Hemaglutinina filamentosa (FHA)	Es la principal adhesina que expresa <i>B. pertussis</i> . Esta proteína de 220 kDa es necesaria para las primeras etapas de colonización y para la formación de biofilm [65]. En ensayos <i>in vitro</i> se ha evidenciado su rol en la invasión de la bacteria a macrófagos y células epiteliales. Esta proteína es inmunogénica y posee capacidad inmunomoduladora [66,67]. Sus propiedades inmunogénicas han motivado su inclusión en las formulaciones vacunales acelulares contra la enfermedad [68]. <i>B. parapertussis</i> y <i>B. bronchiseptica</i> expresan proteínas estrechamente relacionadas con la sintetizada por <i>B. pertussis</i> [69,70].
Fimbrias (Fim)	Son estructuras filamentosas de naturaleza proteica que se extienden desde la superficie bacteriana y participan en la adhesión a distintas células del huésped [71]. Los distintos aislamientos clínicos y las diferentes cepas de <i>B. pertussis</i> pueden expresar distintos serotipos de fimbrias en su superficie (Fim2 o Fim3 o ambas). Tanto Fim2 como Fim3 han mostrado ser muy inmunogénicas y por ello se las ha incluido en las vacunas contra pertussis. El serotipo predominante de los aislamientos de <i>B. pertussis</i> ha cambiado con el tiempo en la mayoría de los países, pero aún se discute si este cambio está asociado con la posible presión de selección ejercidos por las vacunas. Estudios recientes han demostrado que tanto Fim2 como Fim3 se expresan durante la infección y que Fim2 es más inmunogénica que Fim3 [72].
Pertactina (PRN)	Es una proteína de la familia de las proteínas auto-transportadoras que está presente en la membrana externa de las especies clásicas de este género. Participa en el proceso de adhesión de la bacteria al huésped [73]. Se ha demostrado que esta proteína tiene un rol relevante no sólo en la patogenicidad de las tres especies, sino también en la protección contra la enfermedad y por ello es otro de los componentes proteicos de muchas de las vacunas acelulares en uso. En el caso de pertussis, los altos títulos de anticuerpos contra PRN asociados a los de toxina pertussis o a los de fimbria en general han sido correlacionados con la protección contra las formas severas de la enfermedad [74].
Factor de colonización traqueal (TCF)	Esta proteína también es autotrasportador que solamente es expresado por <i>B. pertussis</i> . Se trata de una proteína rica en prolina con motivos RGD. Su PM es de 68 kDa, pero después de la escisión de una secuencia señal procarionota pesa 64 kDa [75]. La secuencia C terminal de la proteína muestra una identidad del 50% con la secuencia C terminal de la pertactina. Su función está relacionada a la adhesión y colonización de la bacteria [76].
Toxina pertussis (PTx)	Este factor de virulencia es sintetizado exclusivamente por <i>B. pertussis</i> . A esta toxina del tipo AB ₅ se le han atribuido la mayor parte de los síntomas de pertussis. También se le adjudica la linfocitosis en sangre periférica. Dado su poder inmunogénico y protector, la toxina pertussis fue el primer antígeno purificado que se incorporó en las formulaciones de vacunas acelulares [77]. Es el único antígeno empleado en todas las vacunas acelulares comerciales actualmente.
Adenilato ciclasa-Hemolisina (AC-Hly)	Es uno de los principales factores de virulencia no sólo de <i>B. pertussis</i> sino también de otras especies del género que infectan mamíferos. Esta toxina de 1300 aminoácidos es bifuncional ya que exhibe actividad catalítica como adenilato ciclasa (AC) y otro con actividad hemolítica (Hly) [78]. La actividad AC le permite a <i>B. pertussis</i> afectar las funciones fisiológicas de

	la célula eucariota, mediante la síntesis descontrolada de cAMP a partir de ATP y activada por calmodulina. Por otra parte, mediante el dominio con actividad hemolisina, es capaz de formar canales selectivos de cationes en las membranas eucariotas. Así, esta toxina es otra de las principales responsable de los efectos citotóxicos causados por <i>Bordetella pertussis</i> [79-81].
Toxina dermonecrótica (TDN)	Se la ha denominado así por su capacidad de producir lesiones necróticas en piel cuando se la inyecta subcutáneamente en animales de experimentación como conejos, ratones y cobayos [82]. Es una proteína de 160 kDa termolábil sintetizada en el citoplasma de la bacteria, y secretada al medio extracelular.
Toxina citotraqueal (TCT)	Esta toxina es un disacárido-tetrapeptido derivado de la síntesis de peptidoglicano que produce la citopatología característica de la infección de <i>B. pertussis</i> sobre células ciliadas en tejido traqueal. Además esta toxina también actúa sobre otras células; inhibe la quimiotaxis y el metabolismo oxidativo de neutrófilos, lo cual podría contribuir a la persistencia de <i>B. pertussis</i> en el huésped [83].
Lipopolisacárido (LPS)	Es una molécula anfifílica localizada en la membrana externa de las bacterias Gram negativas. El rol del LPS en la patogénesis estaría relacionado con el proceso de colonización [70,84].
Proteína asociada a la resistencia a la muerte por complemento (del inglés BrkA)	Esta proteína de 73 kDa inhibe la actividad bactericida del complemento. Se ha demostrado que este polipéptido inhibe la vía clásica de activación del complemento y evita la acumulación de C4 depositado [81,85].
Sistemas de Secreción de Tipo III (TTSS)	Compuesto por una estructura proteica compleja del tipo de jeringas inyectoras con capacidad de traslocar proteínas efectoras directamente en el citoplasma o en la membrana de células eucariotas [17,18,63].
BipA	Esta proteína la describimos aquí ya que es característica de la fase intermedia del género <i>Bordetella</i> (<i>Bordetella intermediate protein A</i>). Es una proteína de 1578 aminoácidos cuya región n-terminal está anclada a la membrana, y su dominio C-terminal queda expuesto a la superficie, siendo muy antigénico. Si bien su función no está aclarada aun, se ha piensa está vinculada a la trasmisión de la bacteria y a la formación de biofilm [21] [86] [87].

Con excepción del LPS y la TCT, la expresión de todos estos factores de virulencia se encuentra bajo el control de un locus denominado *Bordetella* virulence gene (*bvg*) antiguamente designado *vir* por estar asociado con la regulación de la expresión de los factores de virulencia [79] [88]. Ese locus *bvg* que codifica para un sistema de dos componentes denominado BvgAS, fue identificado por Weiss y su grupo en 1989 cuando observaron que la inserción del transposón Tn5 dentro del mismo, eliminaba simultáneamente la síntesis de PTX, FHA, AC-Hly y TDN (cuyos genes se denominan *vag* por *v*irulence *a*ctivated genes) [89]. Posteriormente se demostró que la pertactina también es una proteína *bvg*-regulada. Las bacterias que tienen suprimida la expresión coordinada de los genes *bvg*-activados poseen menor capacidad para causar la

enfermedad y por ello se las designa bacterias avirulentas. Mutaciones espontáneas en el locus *bvg* pueden llevar también a las bacterias al estado de avirulencia [90] [91]. Este fenómeno irreversible se lo denomina cambio de fase y se refiere a la aparición de variantes avirulentas que no expresan los factores de virulencia descritos previamente, sino que expresan otra serie de proteínas cuyo rol hasta hoy no ha sido clarificado. Naturalmente la frecuencia de aparición de estos mutantes es del orden de 10^{-6} .

Otro fenómeno mediado por el locus *bvg* es la denominada modulación fenotípica que, a diferencia del cambio de fase, se trata de una alternancia reversible entre las fases virulentas y avirulentas (designadas Bvg^+ o Bvg^- respectivamente). La modulación fenotípica ocurre en respuesta a ciertas señales del entorno llamadas moduladores. Hasta el presente sólo se conocen señales que ejercen su acción *in vitro*, ellas son: bajas temperatura (por debajo de los 25°C), presencia de $MgSO_4$ o ácido nicotínico en el medio de cultivo. En ausencia de cualquiera de estas señales las proteínas del sistema BvgAS regulan positivamente la expresión de los genes que codifican para los factores de virulencia y negativamente los genes denominados *vrg* (“virulence repressed gene”). En realidad, la modulación de fase no se trata de un proceso on - off sino que hay una variación continua de expresión de genes en cuyos extremos se encuentra fase virulenta por un lado y la fase avirulenta por el otro. De hecho, recientemente se ha descrito y caracterizado una tercer fase denominada fase intermedia o Bvg^i que se obtiene al emplear determinadas concentraciones de los agentes moduladores. Esta fase se caracteriza por expresar algunos factores de virulencia, como hemaglutinina filamentosa, pertactina y adenilato ciclasa-hemolisina y una serie de proteínas cuya expresión es máxima y exclusiva de esta fase, entre las que se destaca Bip (*Bordetella* intermediate protein). La caracterización de esta fase intermedia ha sido de suma importancia ya que ha permitido describir el funcionamiento del sistema BvgAS como un mecanismo tipo reóstato cuya actividad varía en respuesta a la intensidad de las señales censadas y no del tipo interruptor de encendido apagado observado en otros sistemas de dos componentes.

Los genes regulados por BvgAS se clasifican en cuatro clases según su cinética de expresión. Los primeros genes en ser expresados son los de la clase 2 que incluyen el loci *vag* que codifica para adhesinas (FHA), fimbrias y a BvgAS. La región promotora de estos genes posee secuencias repetidas e invertidas de siete nucleótidos (TTC(C/G)TA) centradas en la posición -88.5 respecto del origen de la transcripción. Estas

secuencias son sitios de unión de BvgA. Aunque BvgA desfosforilada puede unirse a este sitio es incapaz de activar la transcripción. La fosforilación de BvgA aumenta su afinidad por este sitio y también las interacciones entre los dímeros de BvgA~P. Para lograr la activación de la transcripción de estos genes otros dos dímeros de BvgA~P deben unirse a la zona -35. Esta unión, a diferencia de la anterior, es cooperativa e independiente de la secuencia nucleotídica. Finalmente, la RNA polimerasa interacciona con uno de estos dímeros a través de su subunidad α y se inicia la transcripción.

Los promotores de los genes clase 1, como *cyaA* y *ptxA*, no poseen sitios de alta afinidad para la unión de BvgA. Estos promotores contienen múltiples heptámeros diferentes a la secuencia consenso y se encuentran variablemente espaciados a lo largo del ADN, río arriba de cada uno de los genes y lejos de la secuencia promotora. La fosforilación de BvgA es absolutamente requerida para la unión a estos sitios y la concentración de los dímeros es mucho mayor que la requerida para la activación de los genes clase 2 y por esto los genes clase 1 se transcriben más tardíamente. Así, la activación transcripcional de estos genes requiere de la unión cooperativa de múltiples dímeros fosforilados de BvgA a varios sitios de relativamente baja afinidad.

Los genes clase 3 (por ej. *bipA*) presentan un patrón de expresión más complejo. El inicio de la transcripción requiere de la unión cooperativa de BvgA~P a secuencias consenso de baja y alta afinidad. Las secuencias de alta afinidad se encuentran río arriba y actuarían de igual manera que en el caso de *fhaB*, mientras que las de baja afinidad se encuentran río abajo del inicio de la transcripción. La unión de BvgA~P a éstas últimas inhibiría el inicio de la transcripción, probablemente impidiendo estéricamente la unión de la RNA polimerasa al sitio de inicio de la transcripción. Así, el balance entre las dos formas de BvgA permitirían o no la expresión de los genes de la fase intermedia. Mientras que la concentración de BvgA~P es alta, tanto los sitios de alta afinidad como los de baja se encuentran ocupados por lo que los genes no se expresan. Al descender el nivel de la forma activa de BvgA los sitios de baja afinidad son liberados y el gen *bipA* es expresado. Finalmente, una vez que la cantidad de BvgA~P desciende notablemente, los sitios de alta afinidad son liberados y el gen de fase intermedia deja de ser expresado.

La información disponible acerca de los mecanismos de regulación de la transcripción de los genes clase 4 que corresponde a proteínas propias de la fase

avirulenta (genes *vrg*) es relativamente escasa. En *B. pertussis* se ha descrito que el mecanismo de inactivación de estos genes durante la fase virulenta es de manera indirecta a través de la participación de una proteína reguladora denominada BvgR, la cual posee motivos de reconocimiento de secuencias consenso presentes en los promotores de los genes *vgr* [92].

Todos estos datos conducen a la elaboración de un modelo en el cual BvgAS distingue y regula diferencialmente varias clases de genes basado en la localización y la afinidad de unión de BvgA a sitios promotores. La concentración intracelular de BvgA~P varía en respuesta a cambios de las condiciones del entorno. BvgS sería la encargada de ajustar los niveles de BvgA~P en respuesta a diferencias sutiles en la intensidad de determinadas señales.

En la actualidad se conocen algunas señales que modulan *in vitro* a BvgAS, pero el funcionamiento de este sistema *in vivo* y el rol que tiene en el ciclo infeccioso del genero *Bordetella* no han sido esclarecidos completamente; menos aún cuáles serían las señales que se estarían censando durante la infección natural. Experimentos realizados con mutantes de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* bloqueados en Bvg⁺ o Bvg⁻ demostraron que la fase Bvg⁺ es necesaria y suficiente para que se desarrolle la infección, mientras que la fase Bvg⁻ sería incapaz de iniciar la infección. En el caso de *B. bronchiseptica* la fase avirulenta es considerada la más apta para el desarrollo de la bacteria en condiciones limitantes de cultivo. Estos datos sugieren que la función de BvgAS es censar si la bacteria se encuentra dentro o fuera del tracto respiratorio del mamífero. Dado que solamente *B. bronchiseptica* ha sido encontrado fuera del hospedador, se ha sugerido que la fase Bvg⁻ en *B. pertussis* es un remanente evolutivo sin una función actual. Se requiere de más investigación para poder avanzar en el conocimiento de este aspecto.

Patogénesis e interacción con el huésped

La infección por *B. pertussis* comienza cuando las bacterias provenientes de aerosoles expelidos por una persona infectada ingresan a las vías respiratorias de una persona susceptible. Una vez dentro del huésped *B. pertussis* se vale de las adhesinas anteriormente descritas para adherirse a la mucosa nasofaríngea induciendo una leve

inflamación local. Si bien *B. pertussis* tiene tropismo por el epitelio ciliado, también puede adherirse e infectar otras células, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas [93,94]. La formación de biofilm ha mostrado ser un paso clave no solo en la colonización de *B. pertussis* sino para su sobrevivencia dentro del huésped y para la transmisión de la enfermedad. Se ha demostrado que para la formación de biofilm la adhesina FHA desempeña un rol clave [95-97]. Para el mantenimiento de la integridad de estos biofilms, se ha asignado un rol clave al ADN extracelular (eDNA) y al Bps (*Bordetella* polysaccharide) [98].

Una vez que la bacteria logra establecerse y colonizar al epitelio ciliado, comienza a liberar varias toxinas que, entre otras cosas, generan ciliostasis y liberación de grandes cantidades de mucus que dificultan la eliminación del patógeno. Estas toxinas también producen inflamación del lumen del tracto respiratorio e inhiben muchas de las funciones de las células del sistema inmune del huésped.

La disrupción de la función normal de la mucosa ciliada y el daño del epitelio respiratorio parecen ser las causantes de la tos paroxística característica de la enfermedad [94]. Sin embargo, el período de duración de la tos es mayor que el que dura el daño tisular, por lo que probablemente existan otros factores de virulencia, aún no identificados, que contribuyan a la persistencia de los síntomas [30].

A nivel del árbol respiratorio inferior la lesión comienza como una hiperplasia linfoide de los nódulos linfáticos peribroncoalveolares y traqueobronquialveolares. Se ha visto también que *B. pertussis* puede generar necrosis y descamación del epitelio bronquial que termina siendo cubierto por tejido fibroso. De todas las enfermedades infecciosas, pertussis es única porque no hay infiltración celular en parénquima ni neumonitis a menos que haya una infección bacteriana o viral secundaria.

En un estudio reciente se registró que solo el 2% de pacientes con pertussis presentaron temperatura ≥ 38 ° C. La falta de fiebre es importante para el diagnóstico clínico. Los reportes sobre los desenlaces fatales por pertussis son pocos, pero de la información existente se evidencia una posible asociación clínica de leucocitosis con linfocitosis y muertes en bebés pequeños. La leucocitosis con linfocitosis es causada por la toxina pertussis (PTx). En 2008 se sugirió que un mecanismo para la muerte infantil era el agregado de leucocitos en arteriolas pulmonares, venas y canales linfáticos lo que conduce a una hipertensión pulmonar irreversible. En acuerdo con esta hipótesis y antes de la postulación de la misma, los médicos consideraban a la transfusión de sangre

como un tratamiento eficaz para los casos infantiles graves. Hoy también se aconseja para estos casos intubar y administrar oxígeno para episodios apneicos y administrar agentes ionotrópicos / vasoactivos para el shock cardiogénico [99].

Los modelos animales, en particular el modelo murino y el de lechoncitos también han contribuido a esclarecer aspectos claves de la patogenia de *B. pertussis* [100].

Diversos grupos han propuesto que *B. pertussis* a través de distintos mecanismos puede evadir la respuesta inmune para persistir dentro del huésped, y así generar focos de transmisión del patógeno. Ensayos *in vitro* han revelado que esta bacteria puede invadir y replicarse dentro de células inmunes del huésped, principalmente macrófagos y neutrófilos, pero también células epiteliales respiratorias; para esto pareciera ser que la actividad de la CyaA y la PTx son claves para el éxito de la infección [73,101-108]. Un estudio realizado por el grupo de la Dra. Rodríguez de nuestra Facultad (FCE-UNLP) reveló una serie de mecanismos moleculares y celulares por los cuales *B. pertussis* evade las defensas inmunes y causa infecciones persistentes. Estos investigadores mostraron que *B. pertussis* es capaz de modular la respuesta microbicida e inflamatoria de la célula inmune luego de un evento de fagocitosis, asegurando su supervivencia en ese nicho protegido [108]. Pero este no es el único mecanismo de supervivencia que *B. pertussis* puede adoptar dentro del huésped ya que como hemos mencionado más arriba la formación de biofilm pareciera ser también una estrategia que la bacteria adopta para sobrevivir y replicarse dentro del huésped [19,20,109]. La mayoría de los estudios que involucran formación de biofilm de *B. pertussis* provienen del modelo murino en el cual se ha evidenciado que esta bacteria es capaz de formar biofilm en la tráquea y en las fosas nasales de ratones infectados [19,96]. En humanos se han visto estructuras de estas características en la cavidad nasal de personas infectadas, además de detectarse anticuerpos específicos contra antígenos específicos de la matriz del biofilm [19,109]. Recientemente se ha detectado que los aislamientos provenientes de pacientes enfermos con coqueluche presentan una mayor capacidad de formar biofilm que las cepas de *B. pertussis* adaptadas al crecimiento en condiciones de laboratorio, sugiriendo nuevamente su rol en la infección [98,110].

Diagnóstico de la enfermedad

El diagnóstico clínico de la enfermedad se realiza de acuerdo a los criterios recomendados por la OMS (WHO---Pertussis Surveillance. WHO/V&B/01.19.) que, según lo establecido en el año 2000, define caso clínico de pertussis a aquel que presenta una tos persistente de al menos 2 semanas con al menos uno de los siguientes síntomas: paroxismos (es decir, ataques de tos), estridor inspiratorio y/o vómitos después de toser sin otra causa aparente. En la Argentina, desde el nivel central (Autoridades del Ministerio de Salud de la Nación y los Laboratorios Nacionales de Referencia) y basado en los criterios de la OMS, se han consensuado a partir del 2010 las siguientes definiciones según la edad del paciente:

- Menores de 6 meses: Toda infección respiratoria aguda, con al menos uno de los siguientes síntomas: apnea, cianosis, estridor inspiratorio, vómitos después de toser o tos paroxística.
- Mayores de 6 meses hasta 11 años: Tos de 14 o más días de duración acompañado de uno o más de los siguientes síntomas: tos paroxística, estridor inspiratorio o vómitos después de la tos, sin otra causa aparente.
- Mayores de 11 años: tos persistente de 14 o más días de duración, sin otra sintomatología acompañante.

La determinación de quién tiene pertussis y quien no, suele ser difícil. Así es que siempre que sea posible, se debe tomar muestras clínicas de aquellos pacientes en los que se sospecha de coqueluche para realizar el diagnóstico laboratorial de la enfermedad. Los criterios para la confirmación de laboratorio son 3: el aislamiento del agente causal, o la detección de secuencias genómicas específicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o serología positiva. Debido a que la bacteria se aloja en el tracto respiratorio superior, las muestras más recomendadas para realizar el diagnóstico por cultivo y molecular (PCR) son el aspirado (ANF) o hisopado nasofaríngeo (HNF) tomados de la nasofaringe posterior.

El diagnóstico microbiológico es la prueba de oro para el diagnóstico de pertussis que presenta una especificidad del 100%. Pero la posibilidad de recuperación del agente causal no es sencilla; su éxito depende de varios factores, entre ellos: la toma y el transporte adecuados de la muestra, la etapa de la enfermedad en que la muestra ha sido

recolectada (la sensibilidad del cultivo es mayor durante la fase catarral y comienza a disminuir durante la primera mitad de la fase paroxística), el uso de antimicrobianos previo a la toma de muestra, la inmunidad conferida por una infección pasada o por la vacunación y la edad del paciente (se observan bajas tasas de recuperación en personas vacunadas y/o en personas mayores) [111,112].

B. pertussis requiere condiciones especiales para lograr su recuperación. Los medios aptos para el cultivo de estas especies son el agar Bordet Gengou y/o el medio Regan Lowe, ambos suplementados con sangre de carnero o caballo en una concentración de 7-15 %. Estos medios contienen complejantes de sustancias inhibitorias del crecimiento como lo son los ácidos grasos presentes en las secreciones nasofaríngeas, e incluso en los mismos medios de cultivo. Los cultivos deben incubarse a 35-37°C, en aerobiosis y atmósfera de humedad del 7 %. Nuestro grupo que funciona como Laboratorio de Referencia de pertussis recomienda el empleo del agar Regan Lowe, para la siembra inicial de las muestras clínicas y posterior subcultivo de las colonias sospechosas en agar Bordet Gengou para la observación de la producción de hemólisis. Las colonias compatibles se examinan con una tinción de Gram y la realización de pruebas bioquímicas.

El diagnóstico molecular basado en PCR es algo menos específico que el cultivo, por lo que los casos que tienen un resultado positivo se consideran confirmados sólo si su clínica es compatible con la definición de caso descrita anteriormente. A pesar de esto, esta metodología es de gran importancia y de amplio uso ya que muy rápidamente mediante distintos algoritmos de reacciones PCR se logra identificar si el agente causal es *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii* o *B. bronchiseptica* [113].

Los métodos moleculares de diagnóstico son entre 2 y 6 veces más sensibles que el cultivo, dependiendo de algunas variables como edad y estado vacunal del paciente, y duración de los síntomas [113] [114]. Como ocurre con los cultivos, la sensibilidad de la PCR disminuye con los días de evolución de la patología; de todas formas, por su gran sensibilidad, puede ser una herramienta útil para el diagnóstico aún con 4 a 6 semanas de tos [113] (Figura 5). Como hemos mencionado anteriormente la muestra de elección para realizar esta determinación es el aspirado nasofaríngeo o el hisopado nasofaríngeo. Para la interpretación de estas pruebas deben usarse cepas de referencia como controles positivos.

Otro método de diagnóstico de coqueluche es la aplicación de metodologías serológicas que constituyen un método indirecto; estas metodologías consisten en la determinación de la respuesta inmune específica que el paciente desarrolla frente a la infección. Es reconocido que la toxina pertussis resulta el único antígeno específico de *B. pertussis*. Las recomendaciones internacionales establecen el empleo del Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) para la titulación de anticuerpos IgG anti toxina pertussis (PTx) en una única muestra de suero. Según recomendaciones de la OMS, en menores de un año de edad es conveniente emplear el diagnóstico microbiológico y molecular; para niños pueden emplearse el cultivo y la PCR, y para adultos la metodología más útil es la serología y en segundo lugar la PCR [115]. Asimismo, la serología resulta de suma utilidad para estudios epidemiológicos [116]. Sin embargo, el resultado de las distintas metodologías no sólo depende de la edad del paciente sino también del transcurso de la enfermedad como se esquematiza en la Figura 5.

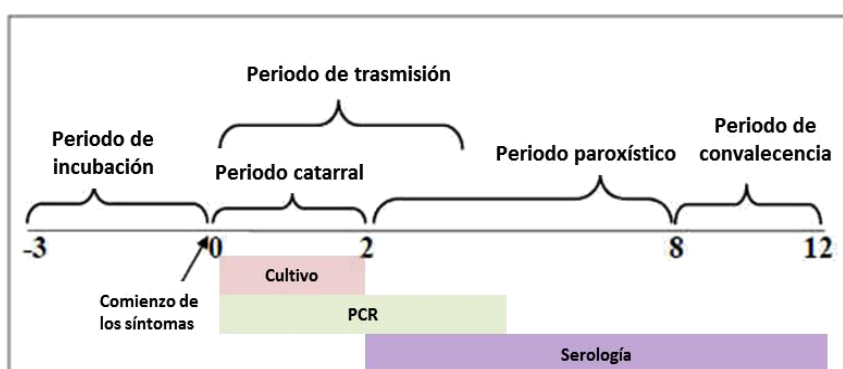


Figura 5: Metodologías diagnóstica de acuerdo a la etapa clínica de la enfermedad
<https://www.cdc.gov/pertussis/clinical/diagnostic-%C2%AD%E2%80%90testing/diagnosis-%C2%AD%E2%80%90confirmation.html>

Para reducir la transmisión y para el control de la enfermedad mediante la protección de contactos cercanos al paciente se recomienda el tratamiento antimicrobiano temprano [117]. Las personas con pertussis son infectivas desde el comienzo del período catarral hasta las primeras semanas después del inicio de los paroxismos. Con el tratamiento antimicrobiano efectivo los pacientes reducen los días de contagiosidad generalmente no superando el día 5 después del inicio del tratamiento.

La eritromicina ha sido históricamente el antimicrobiano de elección para el tratamiento o la profilaxis post-exposición de la pertussis [118]. Generalmente se

administra en 4 dosis diarias durante 14 días. Desafortunadamente, la eritromicina se acompaña de efectos secundarios incómodos o angustiantes que resultan en un cumplimiento deficiente del régimen de tratamiento. Se ha demostrado que otros dos agentes macrólidos (azitromicina y claritromicina) son efectivos contra *B. pertussis*. Ambos antibióticos son más resistentes al ácido gástrico, alcanzan concentraciones tisulares más altas y tienen una vida media más larga que la eritromicina, lo que permite una administración menos frecuente (1-2 dosis por día) y regímenes de tratamiento más cortos (5-7 días) [119]. Actualmente la azitromicina es el antimicrobiano preferido para su uso en bebés menores de 1 mes de edad; las dosis recomendadas para lactantes <6 meses consisten en un régimen de 10 mg / kg por día durante 5 días. Para pacientes mayores de 6 meses, se recomienda 10 mg / kg en el día 1, seguido de 5 mg / kg por día durante los próximos 4 días. Para adultos, se recomienda 500 mg en el día 1, seguido de 250 mg por día en los siguientes 4 días. El régimen recomendado para claritromicina en lactantes y niños mayores de 1 mes es de 15 mg / kg por día en 2 dosis divididas cada día por 7 días. Para adultos se recomienda 1 g por día en dos dosis divididas durante 7 días. La claritromicina no se prescribe en lactantes de menos de 1 mes de edad.

Trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SMZ) en un régimen de dos dosis al día durante 14 días se usa como alternativa a un antibiótico macrólido en pacientes de más de 2 meses de edad que tienen contraindicación o no puede tolerar agentes macrólidos, o que están infectados con una cepa de *B. pertussis* resistente a los macrólidos. La resistencia de *B. pertussis* a los macrólidos es rara, y las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos no se recomiendan de manera rutinaria. La prueba es apropiada en algunas circunstancias y se recomienda cuando se sospecha un fracaso del tratamiento. TMP-SMZ no debe usarse para tratar a bebés menores de 2 meses de edad [117].

Vacunación

Dado que pertussis es una enfermedad con alta contagiosidad y mortalidad, la medida de control más importante para la enfermedad es la vacunación. Las primeras experimentaciones con vacunas comenzaron después de que Jules Bordet y Octave Gengou del Instituto Pasteur de Bruselas identificaran el agente etiológico en 1906;

estas primeras vacunas se formularon a partir de células enteras de *B. pertussis* muertas por calor. En los años siguientes, este tipo de vacuna (llamadas wP whole Pertussis, o vacuna de células enteras) se utilizó en niños de diferentes países. Thorvald Madsen fue el primero en describir el uso de una vacuna wP a gran escala. Esta vacuna logró controlar dos brotes en las Islas Feroe (Dinamarca) entre 1923 y 1924, sin embargo, se reportaron algunas muertes dentro de las 48 horas posteriores a la vacunación.

En ese momento, los médicos utilizaron la vacuna como fórmula terapéutica o profiláctica y en ambos casos la vacuna se administró en tres inyecciones intramuscular o subcutáneamente con intervalos de tres a cuatro días. Madsen en su trabajo resumió algunos informes que concluyeron sic ... *Si la vacuna se administra en una etapa temprana en la fase catarral, la vacuna tendrá un buen efecto; Cuanto más tarde se administre la vacuna en la etapa convulsiva, menor será el efecto esperado.* En Estado Unidos Louis Sauer, de la Escuela de Medicina de la Northwestern University (Chicago) describió el uso de una vacuna contra pertussis de células completas formulada con adyuvante para la que se detectaron reacciones adversas menores [120].

Perla Kendrick, del Departamento de Salud del Estado de Michigan (Estados Unidos), perfeccionó aún más estas vacunas. Ella y Grace Eldering combinaron esta vacuna mejorada con toxoides tetánicos y diftérico para formular la hoy conocida vacuna triple bacteriana (DTP, Difteria Tétanos y Pertussis) [121]. El Comité de Enfermedades Infecciosas de la Academia Americana de Pediatría sugirió en 1944 y recomendó en 1947 el uso rutinario de esta vacuna que luego se expandió a otros países. Las coberturas de vacunación mejoraron cuando se estableció el Programa Ampliado de Inmunización (EPI) en 1974. La misión de la EPI es desarrollar y ampliar los programas de inmunización en todo el mundo. En particular, en 1977, el objetivo de EPI fue establecer y ampliar la inmunización no sólo contra pertussis sino también contra difteria, tétanos, poliomielitis, sarampión y tuberculosis para todos los niños del mundo para 1990. Así, la vacunación masiva contra pertussis redujo drásticamente la morbilidad y la mortalidad asociada a la enfermedad. Después de este importante logro en el control de la enfermedad, desafortunadamente, comenzaron a surgir dudas sobre la seguridad de las vacunas wP, lo que llevó a una disminución en la aceptación de este tipo de formulación por parte de la población e incluso en algunos países se rechazó su uso [122]. En Gran Bretaña, las preocupaciones sobre la seguridad de esta vacuna se diseminaron ampliamente por la prensa y, debido a esto, las coberturas disminuyeron

notablemente [123]. Entre las reacciones adversas se enumeraban desde reacciones locales (enrojecimiento, hinchazón y dolor en el lugar de la inyección) a reacciones sistémicas (fiebre, llanto persistente y, en casos raros, encefalopatía). Las preocupaciones sobre la seguridad finalmente condujeron al desarrollo de nuevas vacunas contra pertussis basadas en componentes proteicos purificados de *B. pertussis* [124]. Estas formulaciones de componentes o acelulares resultaron ser seguras y ello devolvió confianza a la población sobre la vacunación contra pertussis. Las primeras vacunas de este tipo se comenzaron a utilizar en Japón durante 1981. Su composición luego fue modificada incrementando el número de inmunógenos con los que se formulaban las vacunas. De esta forma estas formulaciones más bioseguras comenzaron a reemplazar paulatinamente las vacunas celulares en varios países, principalmente en los países industrializados.

La asociación de reacciones adversas severas con la vacunación con la vacuna wP nunca pudo ser demostrado y así la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó su posición respecto del uso de estas vacunas. En particular se difundió que las vacunas a células enteras pueden emplearse para cubrir las dosis primarias y los primeros refuerzos en niños menores de 7 años ya que no existe ninguna evidencia que contraindique su uso.

Debido a esto, para la población menor de 7 años de edad pueden emplearse vacunas celulares y vacunas acelulares de presentación pediátrica. Las vacunas acelulares pediátricas al igual que las vacunas celulares, puede presentarse combinada con otras vacunas además del componente tetánico y diftérico; por ejemplo, haemophilus influenzae (Hib) o polio inactivada (IPV). Para la población mayor de 7 años no se recomienda el uso de vacunas celulares para el componente pertussis; sólo se indica el uso de vacunas acelulares las cuales nuevamente se presentan combinadas con tétanos y difteria. Es importante destacar que las formulaciones acelulares para adolescentes y adultos contienen una dosificación menor tanto del componente pertussis (específicamente de la toxina pertussis) como del componente diftérico, comparadas con las formulaciones acelulares pediátricas. Por ello, y para diferenciarlas de las pediátricas, se las designa con letras minúsculas. Es así que las vacunas en sus componentes diftérico y pertussis en dosificación adulto se designa d y ap respectivamente, y combinadas con tétanos se designan dTap.

Hoy en día es sabido que los distintos tipos de vacunas inducen una respuesta inmune diferente [7]. Así las mientras que las vacunas celulares, al igual que la infección natural causada por *B. pertussis*, generan una respuesta inmune celular con perfil Th1 y poblaciones celulares CD4 T de memoria residentes en tejido pulmonar; mientras que las vacunas acelulares se caracterizan por inducir un perfil de respuesta mayormente del tipo Th2. La duración de la inmunidad inducida por ambas vacunas no es duradera siendo la de las vacunas acelulares las de más corto plazo [125]. Este conocimiento ha llevado a que la OMS recomiende no reemplazar las vacunas celulares de las dosis primarias por las vacunas acelulares y en caso que se haga los Ministerios de salud deben asegurar las dosis de refuerzos para prolongar la duración de la inmunidad.

En la actualidad no hay un calendario de vacunación consenso en todos los países respecto al número de dosis o al tipo de vacuna a utilizar. Sin embargo, todos los calendarios cumplen con la recomendación de la OMS sobre no emplear vacunas celulares a los mayores de 7 años de edad y sobre incluir una serie primaria de tres dosis tanto con vacuna celular como acelular, con la primera dosis administrada como mínimo a las 6 semanas de vida. Las dosis posteriores deben administrarse con una separación de 4 a 8 semanas, a la edad de 10-14 semanas y de 14-18 semanas. La última dosis de la serie primaria recomendada debe completarse idealmente a los 6 meses. También se recomienda una dosis de refuerzo para niños de 1 a 6 años, preferiblemente durante el segundo año de vida, y debe administrarse ≥ 6 meses después de la última dosis primaria [126].

Dado el costo de las vacunas acelulares, estas en general son empleadas en los países industrializados. Los países en vías de desarrollo utilizan vacunas celulares para cubrir las necesidades en la población pediátrica. Recientemente y como consecuencia del incremento de casos en muchos países tanto industrializados como en vías de desarrollo, se han incorporado nuevos refuerzos con vacuna acelular en la población adolescente adulta incluida a las mujeres embarazadas.

Argentina, como el resto del mundo, necesita obligadamente vacunar a su población incluyendo las regiones más apartadas e inaccesibles. Durante muchos años el esquema de vacunación nacional no tuvo modificaciones. Recién en 1998 se comenzaron a incorporar como medida de prevención primaria vacunas tales como la triple viral, anti-*Haemophilus influenzae* tipo B y anti-hepatitis B (vacunas cuádruple y

quíntuple respectivamente). Recientemente se ha incorporado la vacuna acelular para los adolescentes, personal de salud en riesgo y mujeres embarazadas (última incorporación en el año 2012). Sumado a estas modificaciones, en los últimos años el Calendario Nacional de Vacunación de nuestro país ha sido agrandado. La vacuna contra el HPV se ha incluido en el calendario para niñas de 11 años, y también se ha incorporado recientemente la vacuna contra el neumococo para combatir la meningitis por este patógeno en niños menores de 1 año (www.msal.gov.ar/index.php/...y.../184-calendario-nacional-de-vacunacion-2018).

Lamentablemente, dentro del calendario de vacunación nacional, una vacuna que Argentina importa en su totalidad es la vacuna anti-pertussis, incluida las formulaciones celulares (dosis pediátricas) y acelulares (dosis para adolescentes y adultos, aP, o también referida como Tdap).

Si bien el uso de estas formulaciones en nuestro país y en otros permitió disminuir la mortalidad y morbilidad de la enfermedad, ninguna de ellas cumple totalmente con los requerimientos para ser considerada una vacuna óptima, ya sea por la severidad de sus efectos colaterales (wP), su relativa baja eficacia (wP y aP), o su excesivamente corta duración de la inmunidad conferida (aP) [127-129]. Más recientemente se han detectado más inconvenientes asociados a estas formulaciones ya que el aumento en las tasas de notificación antes mencionado ocurrió y ocurre en poblaciones vacunadas, llevando a preguntas sobre la evolución de *B. pertussis* y su relación con la introducción de distintos tipos de vacunas.

En las siguientes secciones describiremos la epidemiología de pertussis en Estados Unidos y en Argentina. Mas adelante se detallan las causas que se han propuesto sobre la resurgencia de esta enfermedad en las últimas décadas.

Epidemiología

Pertussis se describe epidemiológicamente como una enfermedad endémica que presenta brotes cada 3 o 5 años. Gracias a la inmunización masiva, la morbi-mortalidad asociada a la enfermedad se redujo drásticamente. Sin embargo, en las últimas décadas en muchos países incluido Argentina la enfermedad ha resurgido. A modo de ejemplo

describiremos la situación epidemiológica de dos países: Estados Unidos y Argentina. El primero por la accesibilidad a la información y los datos y porque se trata de un país desarrollado que ha cambiado su calendario de vacunación hacia el uso de la vacuna acelular en todo su calendario. Argentina porque es donde nuestro laboratorio (VacSal IBBM FCE UNLP CONICET) realiza actividades como laboratorio de referencia de la patología y porque es el país donde realizamos nuestro trabajo de investigación.

Para Estados Unidos se ha estimado que en la era previa a la introducción de las vacunas la incidencia anual de pertussis era de 157 casos por 100.000 habitantes, valor que en realidad se considera cinco veces menor que el real dado el sub-reporte de esa época.

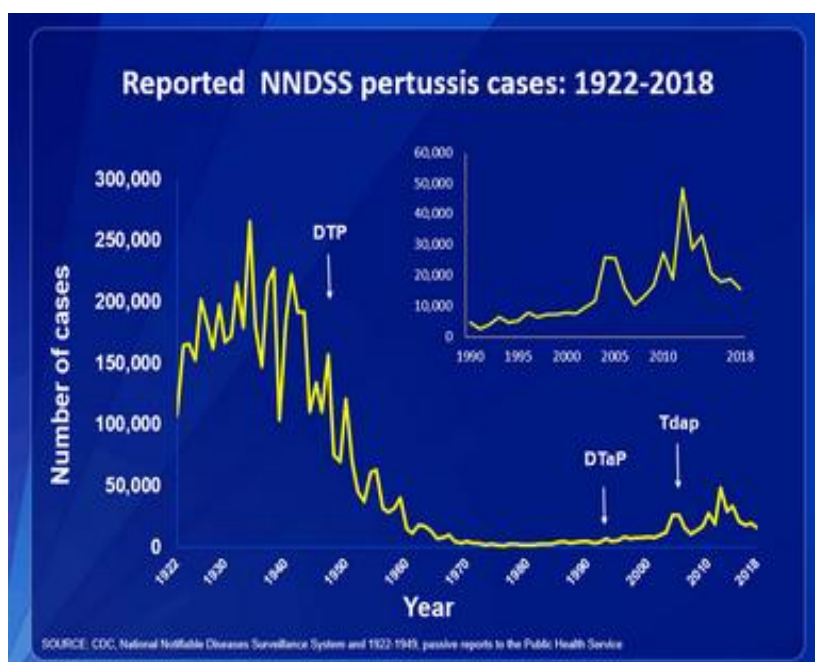


Figura 6: Distribución del número de casos de pertussis por año en los Estados Unidos durante el periodo 1922-2018. Fuente: CDC <http://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting.html>

Además, en los años 20 pertussis era la mayor causa de muerte infantil por infecciones en todo el mundo. La introducción de la vacunación masiva contra pertussis logró disminuir la incidencia en un 92,2% respecto a la era pre-vacunal, como se indica en la Figura 6, y también las muertes asociadas a la enfermedad.

Entre los años 1982 y 2002, sin embargo, la incidencia de esta enfermedad aumentó progresivamente, y en el año 2002 se registró un brote importante con una incidencia de 13/100.000; además en este mismo brote, se reportaron varias muertes. También se registró un aumento en adolescentes y adultos. Esta situación epidemiológica obligó a incorporar nuevos refuerzos en la población adolescente.

Hoy en día, en Estados Unidos pertussis es considerada la enfermedad inmunoprevenible más frecuente. El número de casos anuales notificados durante el período 1990 y 1999 varió entre 4.570 y 7.298; para el año 2005 se registraron 25.619

casos y en el 2012, 48.277 casos. En ese año ocurrieron 20 fallecimientos de bebés de menos de 3 meses de edad debidos a pertussis. La tasa de incidencia de la enfermedad en bebés superó a la de todos los otros grupos de edad. Se observaron tasas también altas en niños de 7 a 10 años y en adolescentes de 13 y 14 años (<https://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting.html>). En el año 2013 los casos notificados para el total país se redujeron prácticamente a la mitad (24.231), pero en varios estados como en Washington, D.C. se reportó un aumento con respecto a los del año 2012. Este aumento también se continuó en el 2014 en varios estados. En los años siguientes la tasa promedio fue de 5,9/ 100.000 representado 1.7 de incremento respecto de años anteriores. En el año 2018 la tasa fue de 5,6 casa 100.000 habitantes.

Estados Unidos emplea desde 1996 vacuna acelular para cumplimentar todas las dosis establecidas en el calendario nacional de vacunación. Una situación epidemiológica similar y por demás preocupante también se detectó en Australia [130]. En un brote en este país durante 2009, las tasas más altas se registraron en lactantes, mientras que, en 2011, 2015 y en 2016, las tasas fueron más altas en niños de 1 a 14 años.

En la Argentina, por su parte, se detectó un aumento sostenido de casos a partir del año 2003. La mayor tasa se registró en el año 2011: 6,9/100.000 habitantes. En dicho año también se registró el mayor número de fallecimientos asociados a la enfermedad (76 fallecimientos). Todas las muertes ocurrieron en el grupo de menores de 1 año, excepto cinco casos que ocurrieron en el grupo de 1-4 años (n: 3), 25 a 34 años (n: 1) y mayor de 75 años (n: 1). Entre 2002 y 2011, las coberturas de vacunación anti-pertussis a nivel nacional para la tercera dosis de la serie primaria y para la correspondiente al ingreso escolar estuvieron por encima del 90%, mientras que el refuerzo de los 18 meses presentó coberturas entre 80 y 90%. El refuerzo de los 11 años, incluido en el Calendario Nacional desde 2009, tuvo una cobertura del 54,6% y 72,8% en los años 2010 y 2011 respectivamente. Como consecuencia de esta situación, en el año 2012, el Ministerio de Salud de la Nación incorporó un refuerzo durante el embarazo. Esta estrategia parece estar teniendo efectos positivos ya que, en el brote de 2016, la incidencia y el índice de letalidad fueron de 3,9% y 0,6%, respectivamente. Estos datos son sustancialmente menores a los detectados en 2011: incidencia de 6,9/100.000 habitantes con una letalidad de 2,6/100.000.

Nuestro laboratorio como Laboratorio de Referencia actualmente sólo para la provincia de Buenos Aires (la provincia más poblada de Argentina) ha recopilado y analizado datos epidemiológicos de casos de pertussis detectados en esta provincia. En Buenos Aires, al igual que en todo el país, el calendario de vacunación contra pertussis consiste en 7 dosis, 5 cubiertas con wP y aplicadas durante la infancia hasta los 6 años y 2 refuerzos adicionales con la vacuna aP en adolescentes (introducida en 2009 en el Calendario Nacional de Vacunación) y durante el embarazo (introducido en 2012). Además, la vacuna aP se administra a los trabajadores de la salud que están en contacto con bebés y para los individuos que son contactos cercanos de recién nacidos que pesan menos de 1.500g. Las coberturas de vacunación se han mejorado en los últimos años, tal como se visualizó para la DTP3 (tercera dosis de vacuna DTP) [131].

Durante los años 2000-2017, nuestro laboratorio recibió el 75% del total de muestras clínicas (muestras nasofaríngeas) de casos sospechosos de pertussis detectados en la provincia de Buenos Aires e informados al Ministerio de Salud, incluyendo un total de 16.151 muestras, de las cuales 3.220 (19,9%) fueron casos confirmados por laboratorio. La distribución de casos por año reflejó el patrón de todo el país con los tres brotes detectados, en 2008, 2011 y 2016 (Tabla 5). En cada año del período analizado, la mayoría de los casos se detectaron en los grupos de lactantes de 0 a 4 meses de edad.

Tabla 5. Distribución de casos con sospecha de pertussis y casos con resultado positivo para *Bordetella pertussis* en el laboratorio.

Año	Número de casos con Sospecha de pertussis	Número de casos con resultado positivo en el laboratorio
2000	8	8
2001	8	8
2002	5	5
2003	38	27
2004	248	73
2005	139	58
2006	178	58
2007	816	209
2008	1.138	272
2009	958	262
2010	1.428	382
2011	1.894	471
2012	1.817	244
2013	1.548	265

2014	1.257	103
2015	1.371	185
2016	1678	359
2017	1622	231

Los datos sobre los síntomas del paciente y la edad estaban disponibles en el 85% del total de casos confirmados. La tos con apnea y cianosis se produjo con mayor frecuencia en lactantes menores de 6 meses, mientras que los paroxismos o vómitos después de la tos fueron más comunes en niños mayores de 6 meses. Como era de esperar, los niños pequeños no vacunados tenían más probabilidades de tener una enfermedad grave, sufrir complicaciones, requerir hospitalización o morir que los niños mayores y los adultos.

Con respecto a la distribución de casos confirmados de pertussis según la edad del paciente y el estado de vacunación, de los casos confirmados, en el 72,6% (2.338/3.220) esos datos estaban completos, con un 26,5% (619/2.338) no vacunados debido a una edad inferior a 2 meses. Del total de lactantes con menos de 6 meses de edad, el 45,3% y el 54,7% recibieron programas de vacunación completos e incompletos para la edad, respectivamente. El porcentaje de pacientes con esquemas incompletos para niños mayores de 6 años fue del 46,3% y para adolescentes mayores de 11 años aumentó hasta el 93,6%. Aunque este último porcentaje es alto, este grupo de edad contenía considerablemente menos individuos que los menores de 6 meses (44 individuos frente a 1.590).

Los datos aquí presentados muestran que, aunque los programas de vacunación han sido altamente efectivos para reducir la incidencia de la enfermedad (pertussis) en Buenos Aires y en la Argentina coqueluche todavía es endémica y ocurre cíclicamente, con picos epidémicos generalmente cada 2 a 5 años como se informó en otros países [41,132]. La mayoría de los casos se detectaron en niños menores de seis meses con esquemas de vacunación incompletos, pero también con esquemas completos como se esperaba, ya que la efectividad de las vacunas contra pertussis es inferior al 100%. En este grupo de edad, la cianosis y las apneas son los síntomas más frecuentes, en contraste, la tos paroxística se hace más evidente en los adultos. Todos estos datos son similares a los observados en otros países como los Estados Unidos, Canadá, el Reino Unido y Australia [26,35,133]. El bajo número de casos detectados en las poblaciones de adolescentes y adultos podría ser consecuencia de la débil vigilancia realizada en este

grupo de edad, ya sea porque los pacientes no acuden a los médicos o porque los médicos no sospechan la presencia de tos ferina en los adultos adolescentes.

Si bien el número de individuos en los grupos con > 6 -11 años o > 11 años es bajo, cabe destacar que la mayoría de los individuos de estos grupos no completaron su calendario de vacunación. Estos datos señalan la necesidad de continuar mejorando la cobertura de vacunación no solo en el grupo de los más vulnerables, sino en los niños, adolescentes y adultos, que constituyen la principal fuente de infección para los bebés [41,42]. La distribución de los casos de tos ferina por edad parece mantenerse año tras año durante el período estudiado, pero cuando se compararon los brotes antes y después de la introducción de la vacunación materna, se observó una disminución en el número de casos en niños menores de 2 meses, detectada después de la incorporación de la inmunización materna, como hemos informado anteriormente [134]. Más importante fue la reducción de la tasa de letalidad detectada en lactantes con menos de 2 meses después de la introducción de la inmunización materna. Estos datos y los que se están recopilando en otros países muestran que la inmunización materna es una estrategia eficaz para la reducción de casos en niños menores de 2 meses [2,135]. La cobertura de vacunación materna en nuestro país durante el año pasado fue del 67%, cifra que es aceptable considerando que se incorporó recientemente. Para aumentar su beneficio es importante aumentar el esfuerzo para alcanzar una mayor cobertura de vacunación.

Causas de la resurgencia

Varias son las hipótesis que intentan explicar el porqué de la resurgencia de pertussis. Algunas de estas hipótesis van teniendo respaldo experimental contundente y han servido de base para el diseño de estrategias tendientes a mejorar el control de la enfermedad. No puede negarse que desde hace unos años se ha mejorado la vigilancia de la enfermedad debido a la mayor sensibilización de los médicos en la sospecha clínica y a la incorporación de métodos de diagnóstico de laboratorio más sensibles y específicos. Sin duda el aumento de notificaciones podría ser consecuencia en los primeros tiempos del aumento de registros de la enfermedad, sin embargo, han transcurrido más de 5 años y en algunos países más de 10 años en que estas mejoras han sido introducidas y a pesar de ello el aumento de casos continúa notándose.

Entre las causas que se proponen actualmente se incluyen debilidades de las vacunas hoy en uso, no sólo en cuanto a la efectividad, sino a la relativamente corta inmunidad conferida por las mismas y a la adaptación de las bacterias circulantes a la inmunidad conferida por las vacunas haciendo que éstas sean aún menos efectivas [136]. Canadá, por ejemplo, atribuyó el aumento en el número de casos a una **vacuna pobremente efectiva** ya que además de la incidencia elevada en los niños pequeños, este país evidenció lo que describieron como una “cohorte en movimiento”, es decir que la incidencia pico por edad se modificaba cada año y era mayor que el promedio histórico. Este hecho revelaba la existencia de una cohorte sensible a la infección que había recibido una vacuna celular contra pertussis menos efectiva [137].

Holanda por otra parte detectó un importante aumento de casos entre pacientes vacunados de un amplio rango etario, que comenzó 2 años antes del brote ocurrido en 1996. Este cambio fue atribuido a la evolución de los microorganismos circulantes [136,138-140]. En este caso se demostró por primera vez que la estructura de la población de *B. pertussis* circulante se modificó, quizás como consecuencia de años de inmunización masiva. Allí, en un estudio realizado por van der Zee *et al* (1996) [138] se compararon los patrones de Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) obtenidos mediante IS1002 para cepas pertenecientes a los períodos 1950-1954, 1978-1990, 1991-1993 y 1994, que fue un año epidémico en ese país. Doce de 15 aislamientos estudiados del periodo 1950-1954 pertenecían al mismo grupo A y ninguno de los aislamientos de otros periodos se agrupaban en este grupo A. Los aislamientos de los dos periodos siguientes incluyendo los de la epidemia de 1994 pertenecían a los grupos B y C respectivamente. Estos resultados reflejan que la estructura de la población de *B. pertussis* en Holanda fue cambiando en el tiempo, siendo la diferencia más notable la que se observó entre el periodo 1950-1954 y en los períodos subsiguientes. El perfil D1 de RFLP encontrado en todos los periodos estudiados en Holanda, correspondería a un perfil de RFLP que persistió por más de 40 años y que podría haberse expandido gracias a ser menos afectado por la inmunidad inducida por las vacunas gracias a cambios antigénicos que las diferenciarían de las cepas empleadas para la fabricación de las vacunas. Más aún, los resultados concuerdan con la hipótesis de que los cambios en la población de *B. pertussis* circulantes en Holanda pueden ser consecuencia de la presión de selección ejercida por la vacuna que fue introducida en 1953. En este estudio los autores detectaron además cambios en dos

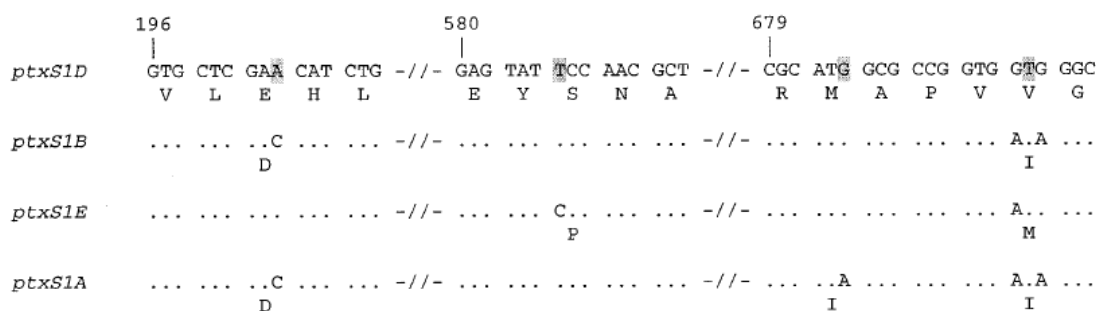


Figura 9: Regiones polimórficas en el gen de la subunidad A (antes S1) de la toxina pertussis *ptxA* (antes *ptxSI*). Las 3 regiones polimórficas se muestran con las bases en sombra. Las diferencias se muestran en relación a *ptxSID*. Los puntos indican identidad de secuencia, los números la posición de las bases en el gen *ptxSI* relativos al codón de inicio. Fuente: Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. Mooi, F. R., H. van Oirschot, K. Heuvelman, H. G. van der Heide, W. Gaastra, and R. J. Willems. 1998. *Infect Immun* 66:670-5 [136].

En Holanda se detectó por primera vez que la secuencia que codifica para el antígeno superficial pertactina presentaba variantes alélicas características de cada período. Así en el periodo 1949-1980, sólo se encontraba la variante *prn1*, en 1981 aparecen 2 tipos nuevos de variantes *prn2* y *prn3* que comprenden del 20 al 30% de los aislamientos de ese periodo hasta 1988. Desde 1989 en adelante aproximadamente el 90% de los aislamientos correspondieron a los alelos *prn2* y *prn3*. Es importante remarcar en este punto que las dos cepas empleadas en las formulaciones vacunales de Holanda contenían la variante *prn1*.

Para la toxina pertussis se encontraron cuatro variantes alélicas: 1-4. La frecuencia de aparición de los alelos 2 y 4 para la toxina pertussis disminuyen en el tiempo, llegando en el período 1990 -1996 a valores cercanos al 12% en el caso del alelo 2 y a la desaparición en el segundo. Luego la frecuencia de aparición del alelo *ptxA1* se incrementó hasta el presente. Estos resultados descriptos por primera en Holanda [136] permitieron vislumbrar la necesidad de estudiar la evolución de este patógeno no sólo en términos de la extensión de la biodiversidad génica sino en términos funcionales respecto de la implicancia de la misma en la protección y control de la enfermedad. Los autores introducen con sus resultados la hipótesis sobre la presión de selección que la vacunación estaría ejerciendo sobre las cepas cuyas variantes alélicas estarían más adaptadas a superar la respuesta inmune generada por el huésped [140,141].

Los estudios sobre la divergencia antigénica se fueron profundizando [142] y gracias a ello comenzó a detectarse polimorfismos en otras secuencias génicas [5]. Un ejemplo de ellos son las fimbrias. Los genes que codifican para estas proteínas están ubicados en dos loci cromosomales no ligados, *fim2* y *fim3*, respectivamente. Se ha descrito la presencia de polimorfismo en la secuencia del gen que codifica para el antígeno Fim3, hallándose 4 variantes alélicas diferentes [143]. Por otra parte, para *fim2* también se encontraron 2 variantes alélicas, *fim2-1* y *fim2-2*. En los aislamientos más modernos se detectó la presencia de los alelos 2 para la *fim 2* y B para la *fim3*, mientras que en las cepas vacunales o en los aislamientos más antiguos se detecta la presencia del alelo 1 para la *fim2* y A para la *fim3* [143].

Posteriormente, se detectaron cepas de *B. pertussis* conteniendo variantes el promotor de la toxina pertussis (PTx) [12], [23]. En muchos países se detectó la variante *ptxP3* que ha reemplazado casi por completo a la variante *ptxP1*, presente en las cepas vacunales y predominante durante la era pre-vacunal [12] [59] [60]. Asimismo, se ha reportado que las cepas portadoras del alelo *ptxP3* producen mayor cantidad de PTx *in vitro*; lo que les otorgaría una mayor virulencia [51]. Más aún, en algunos países el surgimiento de *ptxP3* se relacionó con un incremento en la notificación de casos de pertussis [86,95].

Más recientemente, se pudo observar otro cambio sobre el antígeno pertactina asociado al uso de vacunas. En países donde exclusivamente se utiliza vacuna acelular en los calendarios de vacunación, se ha detectado una alta prevalencia de aislamientos clínicos que no expresan la PRN. El aumento en la frecuencia de aislamientos con esta deficiencia se correlacionó con el tiempo en que se ha utilizado la vacuna aP de manera rutinaria [23,144]. Es así que, en países donde se han utilizado vacunas acelulares por más de 10 años los porcentajes observados de aislamientos clínicos deficientes en pertactina fueron del 53 %, 78 %, 51,4 % y 32 % en Washington, Australia, Francia y Japón, respectivamente, durante los años 2005 y 2012 [145,146]. La ausencia de expresión de la PRN se ha descrito debida a distintas mutaciones como: inserciones IS481, deleción en la secuencia señal del extremo 5', codón de stop prematuro y eliminación del promotor [146]; siendo la inserción IS481 en el gen de la pertactina la mutación que con más frecuencia se ha encontrado hasta el momento [147]. En la mayoría de los países la diseminación de estos aislamientos ha sido el resultado de mutaciones independientes más que de la expansión de un clon simple. Corroborando la

hipótesis de la presión de selección ejercida por las vacunas acelulares y no las vacunas multiepitopes celulares, recientemente hemos publicado un trabajo en que el que mostramos que en nuestro país que emplea vacuna wP para las dosis primarias, la prevalencia de cepas de *B. pertussis* deficientes en PRN fue muy baja. Solo dos aislamientos deficientes en la expresión de este antígeno fueron detectadas [25].

Además de la evolución del agente causal hacia geno/fenotipos más resistentes a la vacunación, la disminución de la inmunidad inducida por la vacunación es otra de las posibles causas de la resurgencia de la enfermedad. En el caso de los países desarrollados en los que las vacunas acelulares han desplazado completamente a las vacunas celulares de los esquemas primarios de vacunación, el fenómeno de pérdida de la inmunidad y la presión de selección ejercida por las aP sobre la población bacteriana circulante parecen ser más acuciantes. Recientemente se ha demostrado que la pérdida de la inmunidad en poblaciones vacunadas con aP ocurre más temprano (2 a 3 años) que en poblaciones en las que se emplean esquemas con vacunas wP [148,149]. Actualmente existe consenso en toda la comunidad acerca de que la respuesta inmune inducida por las vacunas aP es menos robusta que la inducida por las vacunas wP. Las vacunas aP inducen una respuesta Th2 y en menor medida Th17 que es menos eficaz que la fuerte respuesta Th1 inducida por la infección natural o por wP [150]. Lamentablemente, a esos países que se han volcado hacia el uso exclusivo de aP les resulta prácticamente imposible volver a usar las wP ya que las mismas han perdido aceptabilidad por parte de la población [151].

Desarrollo de una nueva vacuna contra

Teniendo en cuenta todo este contexto epidemiológico y la necesidad ya consensuada de contar con formulaciones que superen las debilidades de las actuales vacunas (reactogenicidad de las wP; muy corta duración de inmunidad y mayor presión de selección de las aP), nuestro laboratorio ha desarrollado una nueva vacuna acelular en el marco del Proyecto PAE VacSal (ANPCyT), PICT 2012-2719, PICT 2014-3617. Nuestra formulación comparte las propiedades benéficas de las vacunas acelulares actuales en cuanto a la bioseguridad y las de las vacunas celulares en cuanto a su respuesta inmune robusta y capacidad protectora (Patente internacional concedida en

EEUU y en trámite en Brasil, países de Europa y Australia, Application Number: PCT/IB2014/060143). Esta nueva formulación acelular se ha obtenido a partir de componentes de membrana de *B. pertussis* (vesículas de membrana externa, OMVs por su sigla en inglés) y ha resultado ser no sólo inmunogénica sino también protectora y biosegura en el modelo aceptado de desafío intranasal en ratones [9-11,16,152].

En particular, hemos obtenido las OMVs siguiendo la técnica previamente descrita por nosotros [11,153]. Verificamos identidad, pureza y composición. La identidad y la pureza de las muestras obtenidas fue evaluada mediante observaciones al microscopio electrónico y el cultivo en medios específicos. El tamaño medio de las vesículas es de 70 nm con un rango de 50 a 200 nm. Estas vesículas solo se obtienen cuando no hay lisis bacteriana. La presencia de componentes propios de la membrana de *B. pertussis* como el lipo-oligosacárido (LOS) y proteínas como los inmunógenos adenilato ciclasa - hemolisina (AC-Hly) y la PTx corroboraron la naturaleza de las vesículas.

Las proteínas que constituyen las vesículas de membrana fueron separadas y detectadas en corridas electroforéticas en dos dimensiones (2D electroforesis). Inicialmente identificamos 43 proteínas por espectrometría de masa asociada a la 2D electroforesis [11,154]. Más recientemente, mediante la técnica de Orbitrap, el número de proteínas identificadas en las OMVs fue extendido a casi 300.

Al momento se han realizado más de 50 obtenciones de estas vesículas con el procedimiento antes descrito y en todos los casos los tamaños, la morfología y la expresión de los inmunógenos de superficie fueron comparables. Las corridas electroforéticas en geles SDS-PAGE nos permitieron evidenciar que los perfiles proteicos de las OMVs de *B. pertussis* se mantienen lote a lote. Más aún, los inmunoblots mostraron que en todos los lotes de OMVs de *B. pertussis* están presentes inmunógenos relevantes en la protección como pertactina y fimbria.

Todos estos resultados muestran la robustez de los protocolos empleados en la obtención de las OMVs y la reproducibilidad de los mismos.

Para evaluar la seguridad del candidato vacunal basado en OMVs se emplearon dos tests, por un lado el test de ganancia de peso recomendado por la OMS, y el otro un ensayo recientemente reportado que emplea sangre entera humana (WB por su sigla en inglés) y que evalúa los niveles de IL-6 secretados [155]. El test de ganancia involucra el empleo de 8 ratones Balb/c de 15—20 g a los que luego de inmunizar se los evalúa en cuanto a la evolución de sus pesos corporales a lo largo de 7 días. Las vacunas se

consideran no tóxicas cuando pasan los siguientes requerimientos de la OMS: (a) el peso de los ratones a los tres días después del tratamiento tiene que ser igual o mayor al del día cero antes de ser tratados, (b) a los 7 días post-tratamiento el peso promedio de los ratones de cada grupo no debe ser menor del 60% del valor promedio del grupo control no inmunizado, (c) durante el período que dura el test no deben morir más del 5% de los animales. Los animales son observados durante 7 días registrando los pesos luego de las 16 h, 3 y 7 días post-inmunización. Los resultados que se obtuvieron de estos ensayos para la formulación conteniendo las OMVs fueron comparados con los correspondientes a la vacuna a base de células enteras y el grupo control tratado con PBS estéril. Para estos ensayos se emplearon cantidades de vesículas que variaron entre 1 y 10 μg de proteína. En todos los casos los resultados obtenidos mostraron que ambas formulaciones vacunales pasan los criterios de toxicidad para ser consideradas vacunas seguras. En la condición de 10 μg al día 3 post-inmunización se observó que los ratones vacunados ganaron más peso al ser vacunados con la vacuna basada en OMVs que los del grupo control. En este grupo la ganancia de peso fue $11 \pm 2\%$ de su peso inicial, mientras que para la vacuna celular comercial fue de $3 \pm 2\%$ y para la wP formulada en el laboratorio fue de $8 \pm 3\%$. Para el grupo control la ganancia de peso a los 3 días fue de $13 \pm 3\%$.

Los resultados de los ensayos de WB también mostraron que la wP exhibe una actividad endotóxica mayor (evaluada a través de los niveles de IL-6 en suero) en comparación con la vacuna a base de OMVs: TdapOMVsBp 100 ng/ml: $5,3 \pm 0,9$ ng/ml vs wP 100 ng/ml: $9,5 \pm 0,6$ ng/ml).

La evaluación de la capacidad protectora de nuestro candidato vacuna se realizó empleando el modelo murino de desafío intranasal. Para la inmunización activa empleamos ratones BALB/c hembras de 4 semanas de edad libres de patógenos (Biol SAIC, Argentina). Los ensayos se realizaron en forma comparativa con las formulaciones aP comerciales en uso.

Grupos de 10 ratones BALB/c se inmunizaron por vía sistémica i.p. con la vacuna aP o con la formulación a base de OMVs derivadas de la cepa *B. pertussis* Tohama fase I CIP 8132. En todos los casos el protocolo de inmunización comprende un esquema de dos dosis en un período de 2 semanas. Los ratones inmunizados fueron desafiados 14 días después de la última inmunización por vía intranasal tanto con la cepa de referencia de la OMS –*B. pertussis* 18323– como con la cepa Tohama fase I CIP8132. La

evaluación del poder protector de las formulaciones se realizó a través del recuento de bacterias que colonizaron los pulmones de los ratones inmunizados y desafiados. Los recuentos se realizaron al día 7 luego del desafío. Para ello, los pulmones fueron removidos de manera aséptica siguiendo normas adecuadas para el manejo de animales. Estos ensayos se han repetido al menos 6 veces y los resultados representativos se muestran en la Figura 10. En todos los casos se presentan la media y las desviaciones estándar calculadas a partir de los valores de las CFU transformados en Log₁₀. La significación de las diferencias entre las medias fue determinada mediante ANOVA y test Bonferroni con un nivel de significancia de $p < 0,001$.

Resultados obtenidos con formulaciones que contienen OMVs derivadas de *B. pertussis*

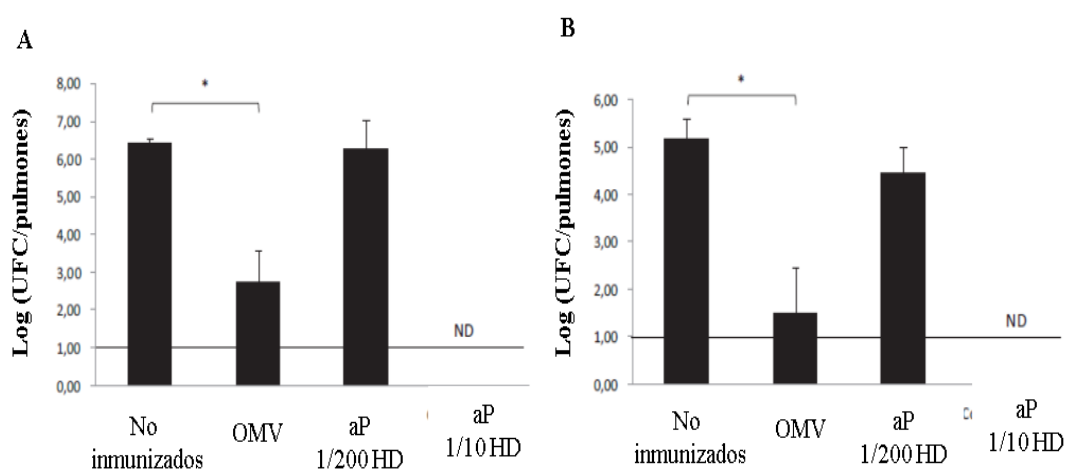
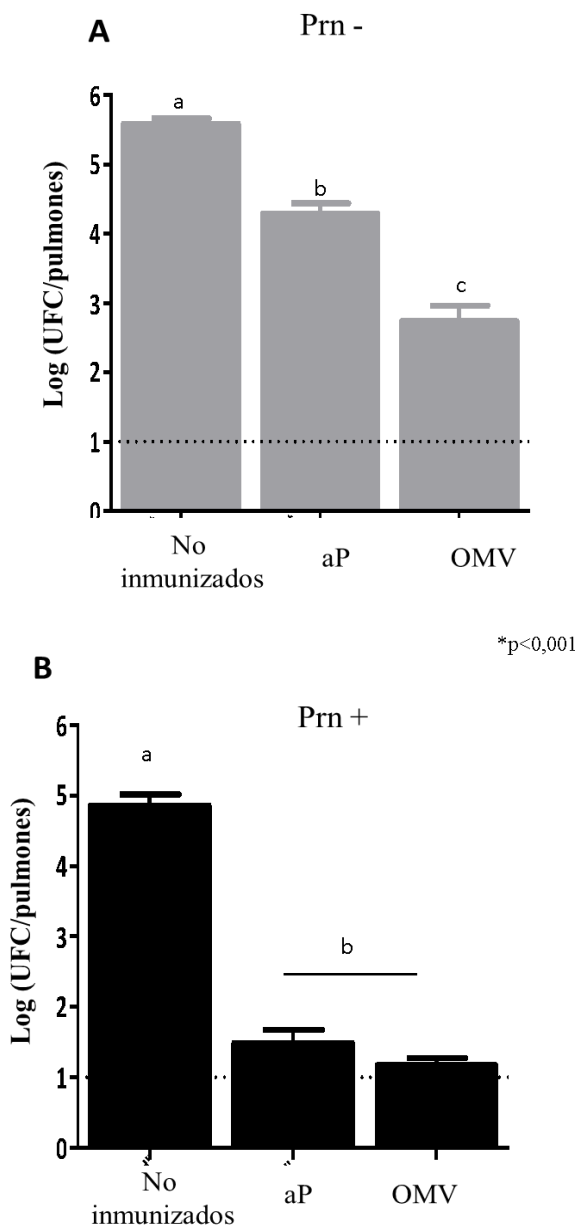


Figura 10. Efecto de la inmunización de la vacuna acelular formulada con OMVs de *B. pertussis*. Los ratones fueron desafiados con dosis subletales de la cepa de referencia de la OMS (Panel A); la cepa vacunal *B. pertussis* Tohama fase I (Panel B)). Los resultados que se muestran se corresponde a los obtenidos en un experimento representativo. Como controles se utilizaron animales sin inmunizar (Control) o inmunizados con altas (1/10 HD) y bajas dosis (1/200 HD) de la vacuna acelular comercial. El número de bacterias recuperadas se expresan como $\log \pm SD$. * $p < 0,001$. ND: No Detectado.

Estos ensayos mostraron una diferencia de protección significativa entre los animales que fueron inmunizados con las formulaciones antes descritas en comparación con el grupo control de ratones que fueron tratados solo con PBS estéril ($p < 0.001$) (control negativo). Una adecuada eliminación de bacterias ($p < 0.001$) se observó en los ratones inmunizados con la vacuna basadas en OMVs y con la aP, pero en alta dosis. Todos los resultados obtenidos aquí muestran que el poder protector de las OMVs frente a la infección causada por dos genotipos diferentes de *B. pertussis* y que corresponden a genotipos de cepas antiguas, es superior al de la aP comercial cuando ésta es empleada en una dosis homologada a la OMVs en cuanto a su contenido de PTx [16]. En los últimos años hemos comenzado a evaluar la protección conferida por las vacunas basadas en OMVs en una dosis robusta frente a un aislamiento circulante de nuestro país y los resultados muestran que las OMVs nuevamente superan a la aP comercial en su capacidad de protección. Nos resta profundizar este tipo de estudios incorporando ensayos dosis-respuesta que incluyan un panel más amplio de cepas que contengan distintos feno/genotipos (uno de los objetivos a abordar en este trabajo). En ensayos preliminares hemos detectado que nuestro candidato formulado a partir de cepas vacunales también supera la capacidad protectora de las vacunas comerciales acelulares actuales frente al desafío de bacterias deficientes en Prn (Figura 11A). Sin embargo, los niveles de protección alcanzados son algo

Figura 11: Test de protección empleando el modelo murino de desafío intranasal, utilizando cepas Prn - (Panel A) y cepas Prn + (Panel B)



inferiores a los que obtenemos cuando el desafío lo realizamos con bacterias Prn positiva (Figura 11 B). Respecto de la respuesta inmune inducida por la vacuna basada en las OMVs hemos podido demostrar que la misma presenta un perfil mixto Th1, Th2 y Th17. En particular hemos observado, en el modelo de ratones y en los ensayos de proliferación en bazo, que a los dos meses después de la inmunización, además de IFN- γ , se detectan niveles de IL-17 que resultan comparables a los detectados para la inmunización con wP. Las concentraciones más bajas tanto de IFN- γ e IL-17 fueron detectadas en ratones inmunizados con aP comercial [10].

Respecto de la respuesta humoral, hemos detectado títulos IgG total altos en los ratones inmunizados tanto con OMVs como con wP. En contraposición a la inmunidad inducida por la vacuna aP, nuestra formulación basada en OMVs fue capaz de inducir una respuesta de anticuerpos murinos con una relación IgG2a/IgG1 > 1. Como es esperable por la composición, los niveles de IgG específica contra PTx (IgG-PTx) en ratones inmunizados con aP resultaron ser más altos que los inducidos por nuestro candidato.

A través de ensayos de transferencia pasiva de sueros hemos podido corroborar que la respuesta humoral inducida por nuestro candidato vacunal contribuye a la protección. En dichos sueros y través de ensayos de inmunoproteómica hemos identificado anticuerpos específicos contra las proteínas GroEL, OmpC, PTxA, Fim2 y PRN [10].

Todos los resultados obtenidos hasta ahora muestran que las OMVs derivadas de *B. pertussis* pueden constituir un buen candidato vacunal, protector y bioseguro.

En los últimos dos años hemos comenzado a trabajar en el modelo murino de inmunización maternal y neonatal. Así, hemos puesto a punto las metodologías y avanzado en el estudio de aspectos desconocidos como la duración de la protección en neonatos inducida por la inmunidad maternal con vacunas aP. Además, evaluamos también la frecuencia de la vacunación maternal y su impacto en la protección en neonatos y la potencial interferencia de la inmunidad maternal en la vacunación primaria de los ratones. Los resultados obtenidos han sido objeto de un trabajo que fue publicado en *Frontiers Immunology* (2017). En la actualidad estamos realizando un estudio similar, pero empleando en las inmunizaciones a nuestro candidato vacunal basado en las OMVs derivadas de *B. pertussis*.

Nuestros hallazgos en su conjunto constituyen una prueba de concepto sólida a partir de la cual pueden realizarse nuevos estudios para su mejoramiento como vacuna contra esta enfermedad. La problemática de pertussis sobre la resurgencia y la selección de cepas más resistentes a la

vacunación como una de los principales motivos de la situación epidemiológica actual, plantea la necesidad de revisar y evaluar si la cepa elegida como parental de las vacunas resulta la más adecuada para obtener aquella vacuna universal capaz de conferir protección frente a la población bacteriana circulante.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis y Objetivos

La hipótesis para mi trabajo de tesis se basó en las siguientes observaciones fundamentales que ya fueron descritas en las secciones precedentes: resurgencia de pertussis en muchos países incluido el nuestro, deficiencia en la protección conferida por las vacunas en uso contra pertussis, en particular de las vacunas acelulares; evolución microbiana del agente causal y el efecto de las vacunas como factor de selección, y que nuestro candidato vacunal basado en OMVs supera deficiencias importantes de las actuales vacunas. En este trabajo de tesis nos propusimos posicionar más robustamente a nuestro candidato vacunal hacia la realización de ensayos clínicos en humanos. Por un lado, y pensando específicamente en el diseño de un ensayo clínico, nos encontramos con el problema de no poder contar con un grupo control no inmunizado ya sea por cuestiones éticas o por cuestiones reales pues la mayoría de la población está vacunada contra pertussis. En este contexto los ensayos de no inferioridad podrían darnos una respuesta sobre la importancia de emplear formulaciones que contengan OMVs derivadas de *B. pertussis*. Para estos ensayos sería necesario formular a las OMVs junto con la vacuna comercial aP de forma de utilizar como control a individuos vacunados con vacuna aP. Para llegar a este diseño debemos contar con datos que avalen que la combinación de estas 2 vacunas es factible en términos de no afectar la bioseguridad ni la capacidad protectora de las vacunas individuales que la conforman. Los ensayos preclínicos sobre la formulación combinada OMVs+aP constituyen uno de los grandes objetivos abordados en mi trabajo de tesis. Esta combinación no solo permitiría diseñar los ensayos clínicos de forma de comparar el efecto de la adición de nuestra OMV en la población respecto de una población que sólo haya recibido vacuna acelular, sino que además podríamos lograr que las OMVs redireccionen la respuesta de la aP hacia el perfil de respuesta inmune recomendado esto es Th1/Th17.

Otro objetivo que abordamos en pos de posicionar a nuestro candidato vacunal frente a los ensayos clínicos fue la búsqueda de condiciones culturales que permitan ampliar aún más la capacidad protectora de las OMVs frente a aislamientos clínicos de *B. pertussis* circulantes y prevalentes. Teniendo en cuenta las diferencias fenotípicas detectadas por nuestro grupo entre las

bacterias adaptadas a las condiciones culturales del laboratorio y las obtenidas de la infección en un huésped [17], y que en estos últimos la bacteria presenta la capacidad de formar biofilm [19,65], decidimos caracterizar a las OMVs derivadas de un cultivo en biofilm para acercarnos más al fenotipo de las bacterias durante la infección natural. Se ha observado además que en las proteínas provenientes de biofilm se encuentran antígenos con capacidad protectora [21]. Para ello no sólo tuvimos que establecer las condiciones adecuadas para la formación de biofilm para *B. pertussis*, sino también mejorar la obtención de OMVs para poder hacer los ensayos en el modelo animal. Tanto para estas OMVs como para la formulación combinada OMVs+aP que mencionamos más arriba, resulta esencial evaluar su capacidad protectora no solo frente a cepas de referencia sino también frente aislamientos clínicos representativos de la población bacteriana circulante.

Como parte de mi trabajo de tesis en una primera etapa me incorporé a la caracterización genotípica y fenotípica de los aislamientos clínicos de *B. pertussis* que realiza el laboratorio como Laboratorio de Referencia de forma de poder contar con información relevante para seleccionar luego los aislamientos clínicos que emplearíamos para el desafío en el modelo murino.

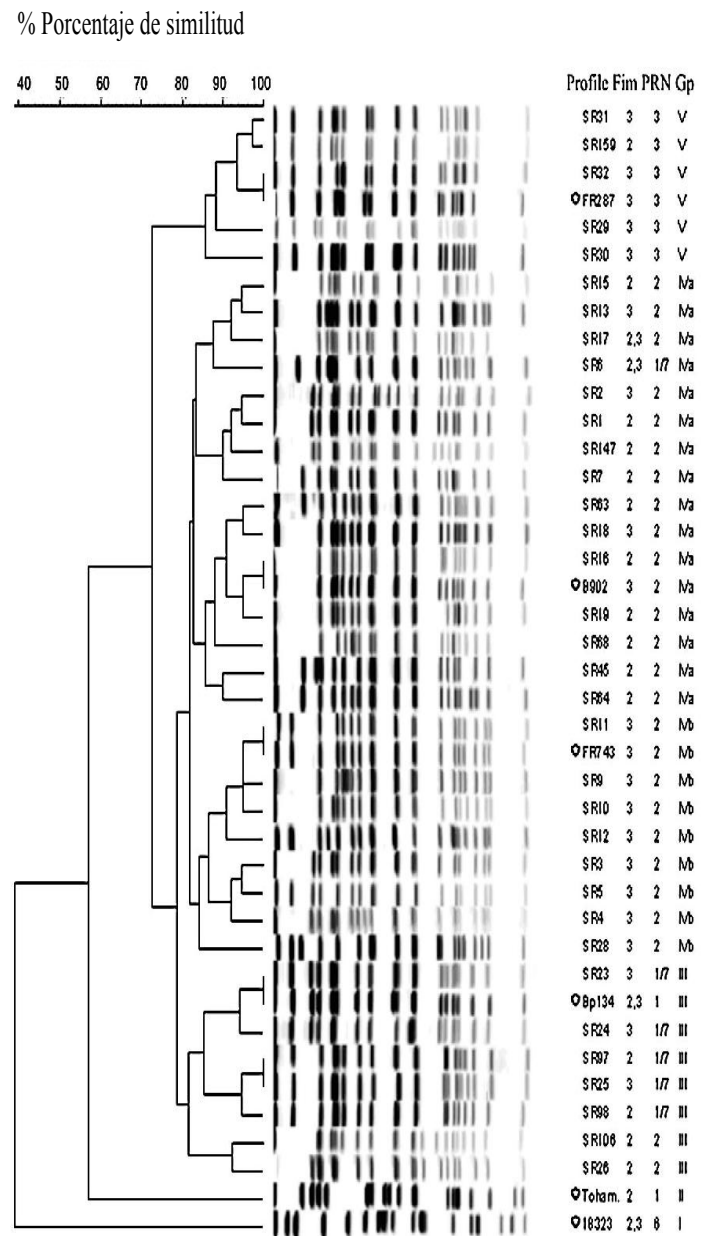
Es así que nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización genotípica y fenotípica de aislamientos clínicos de *B. pertussis*. Selección de aislamientos clínicos representativos
- Formulación de una vacuna combinada contra pertussis que incluye a las OMVs derivadas de *B. pertussis* y vacunas comerciales acelulares. Evaluación de la bioseguridad e inmunogenicidad de la vacuna combinada. Análisis comparativo de la respuesta humoral y celular inducido por la formulación combinada respecto de las formulaciones individuales. Evaluación de la capacidad protectora frente a cepas de referencia y aislamientos clínicos representativos de la población bacteriana circulante. Extensión de los resultados a formulaciones combinadas empleando vacunas acelulares comerciales de diferente fabricante.
- Obtención y caracterización de OMVs a partir de cultivos en biofilm de *B. pertussis*. Establecimiento de las condiciones de cultivo. Evaluación de la presencia de OMVs en cultivos en biofilm. Formulación de vacunas en base a OMVs derivadas de cultivo en biofilm. Evaluación de la bioseguridad e inmunogenicidad de dicha vacuna. Análisis comparativo de la respuesta humoral inducida por la formulación conteniendo a las OMVs derivadas del biofilm respecto de

las formulaciones control obtenidas de cultivos planctónicos. Evaluación de la capacidad protectora frente a cepas de referencia y aislamientos clínicos representativos de la población bacteriana circulante.

Capítulo I

Caracterización de la población bacteriana circulante local



Caracterización de la población bacteriana circulante local

La vacunación es una de las herramientas en salud pública más poderosas disponibles que proporcionan beneficios individuales a través de sus efectos protectores directos y beneficios para la población que van desde la inmunidad colectiva hasta la erradicación de algunas enfermedades [156]. Esta acción sobre la que no se tienen dudas respecto de su efecto benéfico en salud, luego de su uso sostenido, puede llevar a cambios en la ecología de los sistemas de enfermedades infecciosas e introducir nuevas presiones selectivas que impulsan la evolución de los patógenos. Esta consecuencia de la vacunación debe estudiarse de manera continua ya que potencialmente podría reducir o incluso anular los beneficios de la vacunación. Un ejemplo de ello es la hepatitis B. La actual vacuna está dirigida principalmente al antígeno de superficie del virus que causa la hepatitis y se introdujo en los Estados Unidos en 1989. Un año después, en un artículo publicado en *The Lancet*, los investigadores detectaron en Italia virus circulantes de hepatitis B en 44 sujetos vacunados, pero en algunos de ellos, al virus le faltaba parte del antígeno objetivo de la vacuna. Luego, en una serie de estudios realizados en Taiwán, los investigadores secuenciaron los virus que infectaron a los niños que dieron positivo para la hepatitis B. Informaron que la prevalencia de estos "mutantes de escape" virales, como los llamaban, carecían del antígeno de superficie [157]. Así la hepatitis B aumentó de 7.8 por ciento en 1984 a 23.1 por ciento en 1999. Sin embargo, otras investigaciones sugieren que estas cepas mutantes no son estables y que no representan un gran riesgo. Es por ello que hoy la importancia clínica de las mutaciones de escape del antígeno de superficie de la hepatitis B es al menos controvertida y debe seguir estudiándose. Otro ejemplo de presión de selección ejercido por las vacunas es justamente *B. pertussis* [158,159]. Los primeros reportes sobre la evolución de *B. pertussis* documentaron que se trata de un microorganismo monomórfico, pero con modificaciones en la secuencia de su genoma con impacto en la epidemiología [160]. Las primeras descripciones de esta evolución estaban referidas a polimorfismos en secuencias que codifican a varias de las proteínas incluidas en las vacunas como la pertactina (PRN) y la toxina pertussis (PTx), y más tarde en el promotor de toxina pertussis (*ptxP*) [161,162]. Más recientemente, se informó un aumento importante en el número de aislamientos de bacterias de *B. pertussis* que no expresan ciertos antígenos los cuales están incluidos en las formulaciones vacunales en uso [23,163,164]. Así en países que usan desde hace muchos años vacunas aP que contienen a la adhesina PRN en su composición como por ejemplo

los EE. UU., Canadá y Australia, la prevalencia de aislamientos deficientes en la expresión de PRN aumentaron sustancialmente en los últimos 4 años (10, 15, 16). La expansión de cepas deficientes en este antígeno en poblaciones vacunadas con vacunas aP que contienen PRN indica que tales cepas aparentemente tienen una ventaja selectiva en poblaciones vacunadas con aP [165].

Para el diseño de una nueva vacuna contra esta enfermedad resurgente este conocimiento sobre la evolución del patógeno es clave ya que las nuevas formulaciones deben tener la capacidad de proteger contra las infecciones causadas por la población bacteriana circulante actual. Es por ello que en los ensayos preclínicos que conduzcan a la prueba de concepto del candidato vacunal se deben incluir pruebas en animales que incluyan exposiciones o desafíos a representantes de esta población bacteriana moderna. Estos representantes deben ser seleccionados a partir de criterios que se establezcan como relevantes y de impacto en la epidemiología de la enfermedad. Nuestro laboratorio como Laboratorio de Referencia de Pertussis ha logrado instalar y transferir metodologías para el aislamiento del agente causal de la enfermedad. Gracias a este trabajo hoy contamos con una colección cepas de *B. pertussis* local que ha sido caracterizado molecularmente. Cuando me incorporé al laboratorio dirigido por la Dra. Daniela Hozbor comencé trabajando en completar la caracterización de los aislamientos locales de forma de poder seleccionar con criterio los aislamientos representativos que emplearíamos para las inoculaciones a lo largo de este trabajo de tesis.

A continuación, presento los resultados alcanzados en la caracterización de la población bacteriana circulante de Argentina.

Resultados

Los resultados que se presentan a continuación forman parte de un trabajo científico recientemente publicado por nuestro grupo en el cual coparticipo en una primera autoría. En este trabajo reportamos datos epidemiológicos y moleculares recabados durante los años 2000-2017.

En este periodo nuestro laboratorio recibió el 75% de todos los casos de pertussis notificados por la Provincia de Buenos Aires. De las 16.151 muestras clínicas recibidas, 2.870 arrojaron un resultado positivo en las metodologías diagnósticas moleculares basadas en PCR. Del total de positivos se lograron obtener 350 aislamientos de *B. pertussis* sobre los cuales completamos la caracterización genotípica. En particular completamos la identificación de los alelos del promotor de la toxina pertussis (*ptxP*), así como el gen de la subunidad enzimática A (*ptxA*) de dicha toxina, y el alelo de los genes que codifican para las adhesinas *prn* y *fim 3*. La mayoría de los aislamientos estudiados (99.7%) resultaron contener los alelos *ptxA1* y *prn2* (Figura 1.I). Como se observa en la figura el periodo más variable fue el comprendido entre los años 2000 y 2004, con 4 genotipos diferentes. Un aspecto interesante de remarcar es que las variantes *ptxP1* y *ptxP4* solo fueron detectados hasta el año 2004, luego de este año el alelo *ptxP3* predominó en la totalidad de aislamientos caracterizados.

Como se observa en la Figura 1.I, el genotipo predominante de los aislamientos obtenidos luego del 2004 fue *ptxP3-ptxA1-prn2-fim3-2*, equivalente a lo reportado en muchos otros países [5]. Es importante destacar que las cepas de referencia, las cepas vacunales, y las cepas más antiguas en general, presentan el genotipo *ptxP1/2-ptxA1-prn1/7-fim3-1*.

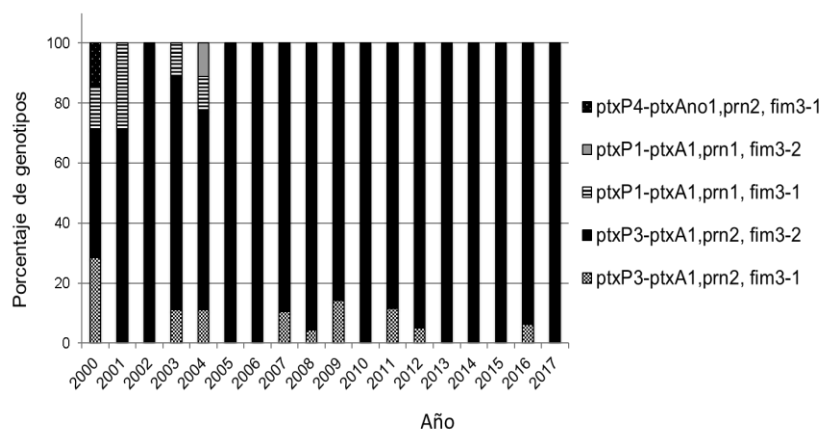


Figura 1.I: Genotipificación mediante la técnica MLST de aislamientos de *B. pertussis* recolectados en la provincia de Buenos Aires durante el periodo 2000-2017. *ptxP*: promotor toxina pertussis, *ptxA*: subunidad A de la toxina pertussis, *prn*: pertactina, *fim3*: fimbria serotipo 3.

De los 350 aislamientos recolectados durante el período analizado, solo 1 aislamiento (aislado en el año 2016) presentó el serotipo Fim 2. Todos los otros aislamientos presentaron serotipo Fim 3.

Para el análisis de la secuencia codificante de la PRN aplicamos técnicas moleculares y ensayos de inmunoblot empleando un anticuerpo específico obtenido por nuestro laboratorio luego de un esquema de inmunización de tres inmunizaciones con 2 μ g de la proteína purificada. Respecto de los análisis moleculares realizamos ensayos de PCR de punto final con primers específicos para detectar la inserción de la secuencia IS481 en un punto caliente ubicado en la posición 1613-1614 de la secuencia codificante para pertactina y otros primers para detectar deleciones en la región promotora de del gen de *prn*. Mediante el empleo de estas técnicas pudimos detectar solo 2 aislamientos deficientes en la expresión de PRN. Estos aislamientos fueron obtenidos de pacientes menores de 1 año con sintomatología típica de esta enfermedad. A pesar de que los 2 especímenes se aislaron en el 2016 en la provincia de Buenos Aires, no se pudo vincular geográfica ni epidemiológicamente ambos casos. Mientras la madre de uno de los pacientes infectados con estas cepas había sido vacunada durante el embarazo, según indica nuestro Calendario Nacional de Vacunación, la madre del otro paciente no. Estos hallazgos son por demás importantes ya que aportan información que sustenta la hipótesis sobre la prevalencia de aislamientos deficientes en la expresión de PRN sólo en países que emplea únicamente vacunas acelulares en sus calendarios.

En la Figura 2.I se muestran a modo de ejemplo los resultados del estudio de la expresión de la PRN en las cepas y aislamientos más empleados durante mi trabajo de tesis (BpAR106, BpAR1630, H935 y BpTohama fase I). En la Figura 2.I Panel A se muestran corridas electroforéticas en geles de agarosa de los productos de la amplificación por PCR de la región 1613-1614 del gen *prn* de los 4 aislamientos estudiados; como control negativo se incluyó una mezcla de reacción sin ningún molde de ADN, y como marcador se empleó un fragmento de ADN de 246pb debido a que es el tamaño esperado para el producto de amplificación por PCR. En la Figura 2.I, Panel B se muestra el resultado de uno de los inmunoblots realizados para detectar la presencia de PRN. Para estos ensayos empleamos un anticuerpo policlonal específico contra PRN obtenido en nuestro laboratorio en ratones Balb/C a partir de PRN purificada adquirida comercialmente (NHS Inglaterra). Para la realización de los inmunoblottings empleamos como control de cantidad de proteína a una chaperona GROEL de 66KDa presente en todas las

cepas/aislamientos de *B. pertussis*. Como puede observarse en el Panel B de la figura 2.I, mientras que para todas las cepas/aislamientos se detectó la expresión de la proteína GROEL, para la PRN sólo hubo reconocimiento en las cepas BpAR1630 y BpTohama fase I.

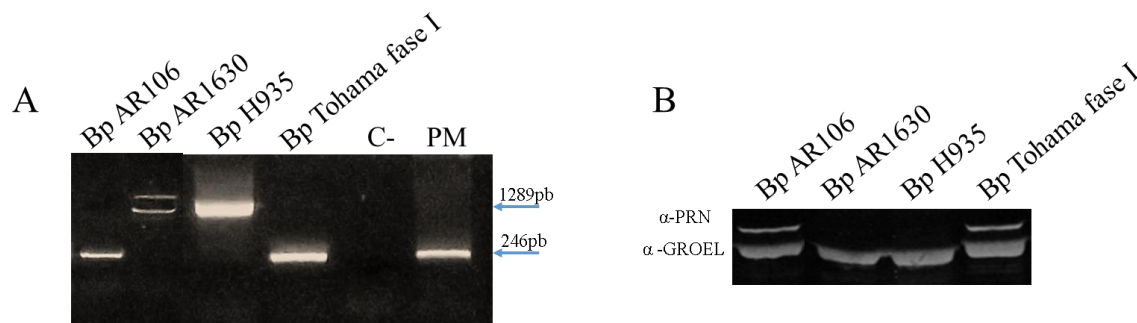


Figura 2.I: análisis de la expresión de la PRN. **A** Imagen representativa de un gel de agarosa (1,5%p/v) en el que se evaluaron los productos de amplificación por PCR que amplifica la región alrededor de la posición 1613-1614 del gen *prn*. Como molde se incluyeron ADN obtenidos de los 4 aislamientos de *B. pertussis* empleados en este trabajo. Como control negativo (C-), se empleó agua en lugar de ADN. Para la tinción del gel se empleó Sybr Safe siguiendo las recomendaciones del fabricante. **B** Imagen representativa de un immunoblotting obtenido luego de una separación en SDS-PAGE de 2×10^{10} UFC de cada aislamiento empleado en este trabajo de tesis; luego de la transferencia, la membrana de PVDF se incubó por una hora con una dilución 1/250 del suero policlonal específico (α -PRN o α -GROEL); como anticuerpo secundario se empleó un anticuerpo (dilución 1/3000) proveniente de cabra α -ratón conjugado a fosfatasa alcalina; el revelado se realizó por colorimetría con los reactivos NBT y BCIP.

Discusión

En el contexto actual de resurgencia de pertussis se ha vuelto imprescindible diseñar formulaciones vacunales de nueva generación que superen las debilidades de las actuales vacunas, incluidas las referidas a la presión de selección por ejercidas por las vacunas sobre la población bacteriana circulante y a la incapacidad de inducir protección frente a los aislamientos circulantes actuales en particular los deficientes en la expresión de PRN. Respecto de la presión de selección es esperable que nuestro candidato vacunal basado en las OMVs de *B. pertussis* ejerza una menor presión de selección sobre la población bacteriana circulante que las actuales vacunas acelulares ya que mientras nuestro candidato vacunal posee una composición multiepitope de más de 300 proteínas, las vacunas acelulares están constituidas por pocos inmunógenos en altas concentraciones. Respecto de su capacidad de proteger frente la infección causada por diferentes genotipos de *B. pertussis*, en un trabajo previo hemos podido corroborar que nuestro candidato vacunal es capaz de proteger a aislamientos que contienen el genotipo *ptxP3-ptxA1-prn2* de amplia circulación [16]. Hoy el desafío se centra en inducir protección contra los aislamientos de *B. pertussis* más modernos deficientes en la expresión PRN ya que se ha demostrado que las vacunas acelulares no resultan adecuadas para prevenir las infecciones causadas por estos aislamientos [15,165,166]. Como hemos comentado anteriormente, estos aislamientos y su alta prevalencia ha sido detectado hasta el momento sólo en países que emplean únicamente vacunas acelulares en sus calendarios [6,23,146]. Este hecho apoyaría la hipótesis de la mayor presión de selección que ejercen las vacunas acelulares respecto de las vacunas celulares multiepitopes. Para corroborar esta hipótesis resulta esencial analizar la presencia de estos aislamientos en los países que emplean vacuna celular en las dosis primarias. En este marco y teniendo en cuenta la necesidad de completar la caracterización de la población bacteriana circulante en nuestro país, como laboratorio de referencia completamos la caracterización de los aislamientos que logramos obtener a partir de las muestras clínicas derivadas durante el período 2000-2017. En particular completamos la caracterización genético molecular de 350 aislamientos obtenidos en su durante los brotes epidémicos detectados en 2007-2008 (n = 83); 2011-2012 (n = 145) y en 2016-2017 (n = 45). El 78% del total de los aislamientos se obtuvieron de pacientes con menos de 6 meses de edad, el 13,7% de pacientes con edades que oscilan entre 6 y 12 meses y el 8,3% de pacientes

con > 12 meses. Como era esperado, la mayoría de los aislamientos de *B. pertussis* se obtuvieron de individuos que por su edad no debían ser vacunados o de individuos con esquema de vacunación incompleta para la edad. Como se detectó en otros países, casi todos los aislamientos aquí caracterizados se clasificaron como serotipo Fim3 [167]. Las variantes *ptxP1* y *ptxP4* y el alelo *prn1* se detectaron en aislamientos obtenidos antes de 2004. Después de 2004, los aislamientos (n = 313) contenían los alelos *ptxP3-ptxA1-prn2* con *fim3-1* o *fim3-2*. Estos genotipos difieren de los detectados para las cepas de *B. pertussis* que se emplean en la producción de vacunas [168]. El predominio de *prn2* detectado en los aislamientos más recientes de la provincia de Buenos Aires concuerda con la hipótesis de que las cepas en la población vacunada con ese alelo son más aptas que las que llevan otros alelos *prn* [169].

En cuanto a una deficiencia en la expresión de PRN, detectamos solo dos aislados que contienen un IS481 en la secuencia codificante. Estos aislamientos se obtuvieron de pacientes con menos de 1 año de edad obtenidos ambos en el mismo año (2016) pero en distintas localidades no relacionadas uno con el otro. Estos hallazgos que son los primeros que se publicaron en el tema [25] acuerda con la hipótesis sobre la presión de selección ejercida por las vacunas acelulares sobre la población bacteriana circulante. Polonia, el único país de Europa que aún usa la wP pero también la vacuna aP para series primarias, ha informado recientemente la detección de aislamientos clínicos deficientes en PRN [170]. El porcentaje de estos aislamientos detectados en dicho país fue más bajo (15%) que el hallado en los países que sólo usan vacunas acelulares (EE. UU, Canadá o Australia) donde la prevalencia de aislamientos deficientes en la expresión de PRN superan el 65% [23,171,172]. Los autores del artículo sugirieron que la detección de esos los aislamientos podrían ser una consecuencia del aumento en el uso de vacunas aP en dicho país. Todos estos hallazgos que hemos publicado recientemente son de importancia ya que respaldan la hipótesis propuesta de que los aislamientos clínicos deficientes en PRN presentan una ventaja en una inmunidad preparada con vacuna aP [144].

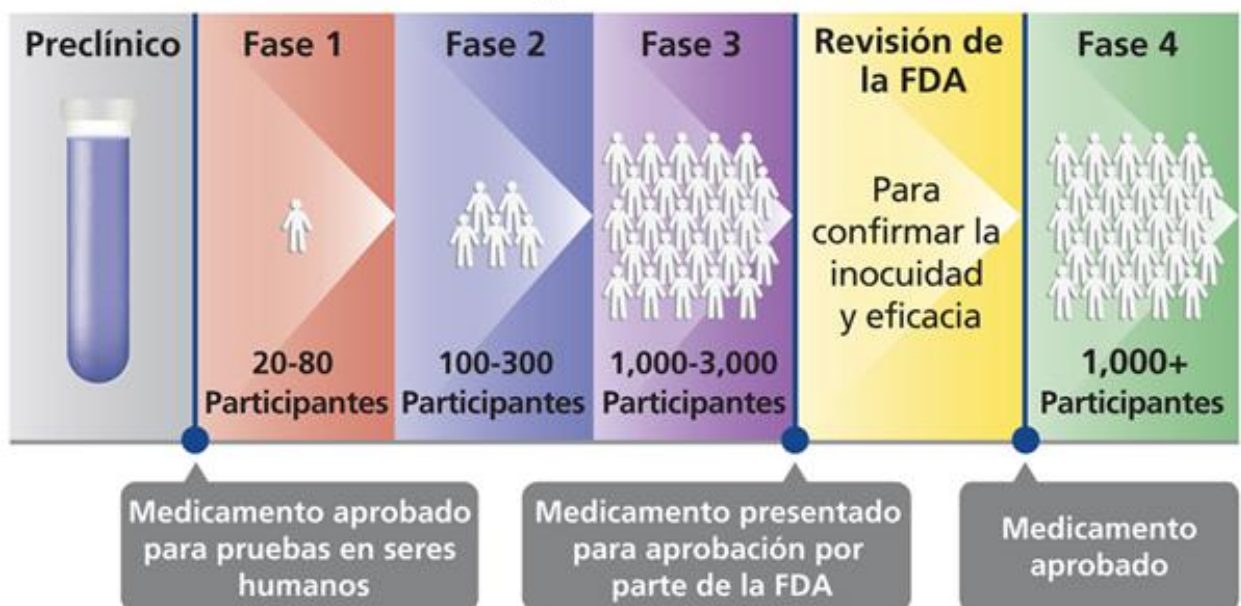
Gracias a este trabajo de caracterización de cepas y a un trabajo sistemático de rutina que realiza nuestro laboratorio desde hace varios años [17,41,142,168,173,174] contamos con una colección de cepas/aislamientos a partir de la cual elegimos un set de cepas/aislamientos a emplar durante este trabajo de tesis. Seleccionamos a la cepa de referencia Tohama fase I aislada en 1954 cuyo genotipo es el detectado para las cepas antiguas: *ptxP1*, *ptxA2*, *fim3-1* y *prn1*. Esta cepa fue elegida ya que nos permite hacer comparaciones con resultados reportados previamente por

nosotros y por otros autores. Elegimos también al aislamiento local BpAR106, obtenido en el año 2001 ya que lleva el genotipo moderno *ptxP3*, *ptxA1*, *fim3-2* y *prn2* y expresa PRN y al aislamiento BpAR1630 obtenido en el año 2016 con el mismo genotipo que BpAR106, pero deficiente en la expresión de PRN. Teniendo en cuenta la relevancia de los aislamientos PRN defectivos sumamos para algunos ensayos al aislamiento CDC H935 representativo del brote de Estados Unidos del 2012 y deficiente en PRN [146]). Este último aislamiento también contiene el genotipo *ptxP3*, *ptxA1*, *fim3-2*, y *prn2*.

Capítulo II

Vesículas de membrana externa derivada de *Bordetella pertussis* como modulador de la respuesta inmune inducida por vacunas comerciales

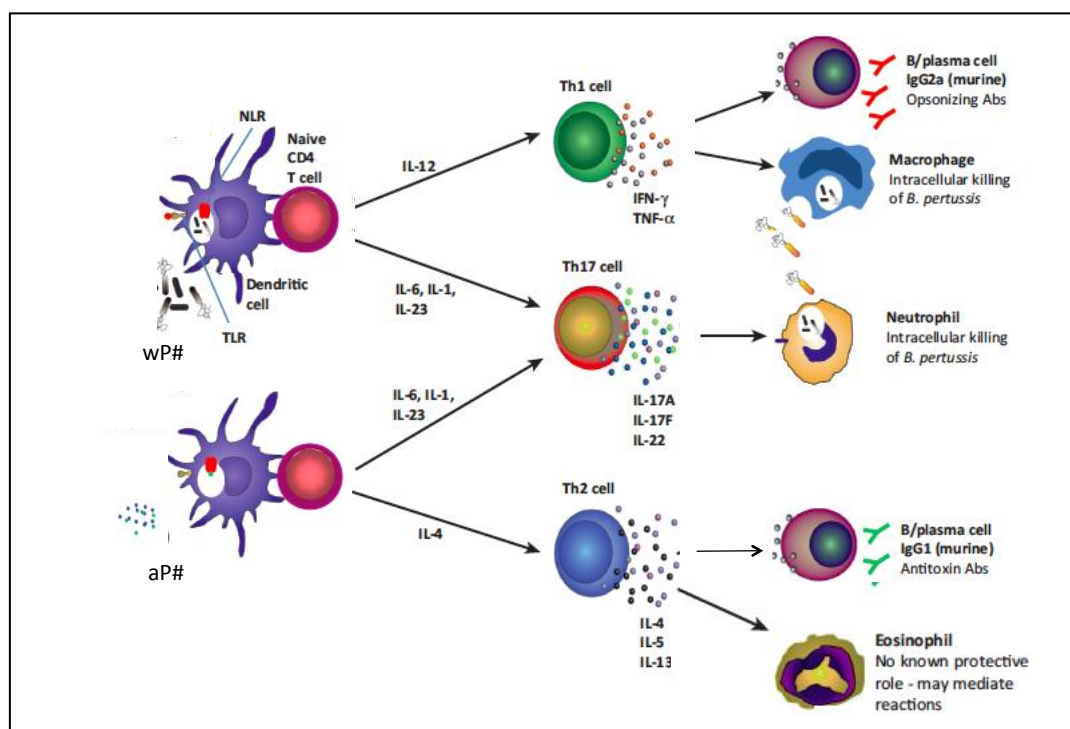
Ensayos Clínicos



Vesículas de membrana externa derivada de *Bordetella pertussis* como modulador de la respuesta inmune inducida por vacunas comerciales

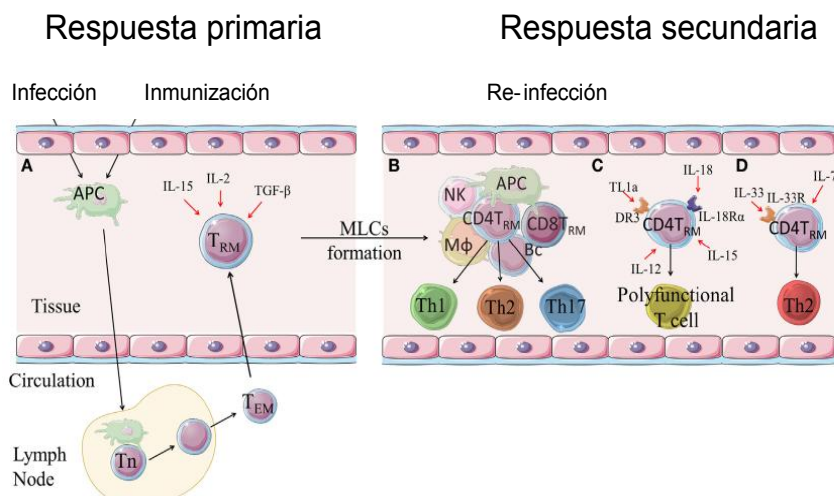
La resurgencia de pertussis en muchos países se ha constituido en un tema de debate y preocupación en el área de salud [5,158,175,176]. Uno de los aspectos que aún se discuten son las posibles causas de dicha resurgencia, las cuales en su mayoría parecen estar asociadas a debilidades de las vacunas disponibles, tanto de las clásicas vacunas celulares (wP, por las siglas en inglés) como de las vacunas acelulares (aP, por las siglas en inglés) más modernas [5]. Dentro de las posibles causas que pueden haber llevado al incremento de casos, se ha propuesto entre otros a coberturas de vacunación inadecuadas para una enfermedad tan contagiosa como pertussis para la que existen vacunas cuya efectividad no supera el 85%. Los datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la tercera dosis de la vacuna contra pertussis designada como DTP3 por los toxoides Diftérico y Tetánico y por el componente Pertussis incluido en la formulación, es de 86% para los años 2017 y 2018 (<https://www.who.int/gho/immunization/dtp3/en/>). Este valor está por debajo del 90%, recomendado por la OMS para mantener un correcto control de la enfermedad [177]. Otras posibles causas propuestas para el incremento de casos detectados en muchos países son: la pérdida de la inmunidad inducida por vacunación [178,179] y la evolución del agente causal de la enfermedad hacia fenotipos más resistentes a la inmunidad conferida por las vacunas [179-181]. En el caso de las vacunas acelulares el fenómeno de pérdida de la inmunidad y la presión de selección ejercida por ellas sobre la población bacteriana circulante parecen ser más acuciantes ya que en los últimos años se ha demostrado que la inmunidad inducida por estas vacunas no dura más de los 3,5 años mientras que la de las vacunas celulares entre 10-15 años [125,148]. Más aún, como hemos descrito en el capítulo anterior, en los países con más tradición en el uso de las vacunas acelulares se han recuperado aislamientos de *B. pertussis* que no expresan el antígeno vacunal pertactina que resultan ser más resistentes a la inmunidad inducida por la vacunación [23,146]. Así, el cambio de la vacuna celular wP por las vacunas acelulares aP para las dosis primarias (tres dosis de la infancia) parece haber complicado la situación de la enfermedad, debido probablemente a que la respuesta inmune inducida por las vacunas aP es menos robusta y menos amplia que la inducida por las vacunas wP [7]. Esto pudo evidenciarse no sólo en el modelo no-

humano de primates recientemente desarrollado [182], sino también en un estudio clínico de caso y control, diseñado para evaluar el riesgo de contraer pertussis entre los jóvenes de 10 – 17 años durante el brote de California 2010 reveló que los adolescentes que habían recibido cuatro dosis de wP presentaron una probabilidad de contraer la enfermedad 6 veces menor que los que habían recibido todas las dosis con aP; y casi cuatro veces menos probabilidad de contraerla que de los jóvenes que habían recibido una combinación de vacunas (algunas dosis con wP y otras con aP) [183]. En otro estudio también se evidenció que el riesgo de contraer la enfermedad se ve incrementado en escolares y adolescentes cuyas dosis vacunales sólo habían sido realizadas con vacunas aP en comparación con los sujetos que recibieron igual número de dosis pero con vacunas a célula entera [184]. Estos hallazgos son consistentes con el conocimiento de que las vacunas aP inducen mayormente un perfil de respuesta inmune del tipo Th2 y en menor medida Th17 (Esquema 1.II) los cuales se han mostrado con menor capacidad protectora que el perfil Th1 inducido por la infección natural o por wP [150].



Esquema 1.II. Mecanismos de inmunidad a *Bordetella pertussis* inducidos por la vacunación con aP y con wP. La sigla TLR refiere Toll-like receptores y NLR a Nod-like receptor, ambos intervienen en la activación de las células dendríticas (DC) y promueven que las células T naïve se diferencien en células Th1 secretoras de IFN- γ o Th17 que secretan IL-17. Las células Th1 y Th17 son necesarias para una protección óptima contra *B. pertussis* mediada por el reclutamiento y la activación de neutrófilos. Los macrófagos, que con la ayuda de la opsonización de los anticuerpos IgG2a (Abs), absorben y destruyen *B. pertussis*. Las DC activadas con aP promueven la inducción de células Th17, que recluta y activa neutrófilos, y células Th2 que secretan IL-4 y promueven la activación de eosinófilos y la inducción de anticuerpos IgG1 neutralizantes de toxinas. La vacunación con wP activa células Th1 y Th17, activando neutrófilos, macrófagos y estimulando anticuerpos de isotipo IgG2a.

Las vacunas celulares a diferencia de las vacunas acelulares son capaces de inducir además una respuesta celular de memoria residente en tejidos [8] (Esquema 2.II). Las observaciones sobre las mayores deficiencias de las vacunas aP respecto de las vacunas wP han sido confirmadas en el modelo de los monos babuinos muy reconocido en la comunidad que estudia pertussis porque se trata de un modelo *in vivo* capaz de reproducir no sólo la sintomatología de la enfermedad detectada en humanos sino también el contagio típico de la enfermedad [185-187]. Empleando este modelo se pudo evidenciar que, si bien la vacunación con aP o con wP resultaron ser efectivas en la prevención del desarrollo de la enfermedad, la vacuna aP resultó ser incapaz de evitar el curso típico de infección. En particular se detectó que mientras en los monos vacunados con la vacuna aP la carga bacteriana de *B. pertussis* en vías respiratorias fue muy alta, en los monos vacunados con wP las bacterias eran eliminadas más tempranamente [182]. Más aún, se constató que los animales vacunados con aP, a pesar de no mostrar síntomas, eran capaces de transmitir la enfermedad a animales sanos no inmunizados [182]. Estos resultados que son por demás preocupantes sobre todo para los países que mantienen un esquema de vacunación con aP, resultan de fundamental importancia en la comprensión de la dinámica de los brotes epidémicos de *B. pertussis*.



Esquema 2. II. Inducción, expansión y función de las células CD4 TRM.

(A) Después de la infección o la inmunización se inducen respuestas de células T de memoria en los ganglios linfáticos. Las células T con memoria efectora pueden migrar al tejido donde se retienen como células CD4 de memoria residente en tejidos (TRM) a través de la expresión de integrinas y moléculas de adhesión, como CD44, CD69 y / o CD103. Su inducción está influenciada por IL-2, IL-15 y TGF-β. (B) Las células CD4 TRM se retienen en los tejidos y pueden reactivarse localmente en MLC durante las respuestas secundarias después de la re-infección o después de la infección en un huésped inmunizado. Las células CD4 TRM se expanden y pueden convertirse en células efectoras Th1, Th17 o Th2 que median la eliminación rápida de la infección. (C) Hay evidencia emergente de que las células CD4 TRM pueden activarse de forma no específica en los tejidos por las citoquinas, como IL-18, IL-12, IL-15 y TL1a, y convertirse en células T polifuncionales que tienen potentes propiedades anti- actividad patógena. (D) También se ha sugerido que IL-7 e IL-33 pueden activar de forma no específica las células CD4 TRM para convertirse en células efectoras Th2.

Además de la pérdida de la inmunidad inducida por la vacunación como consecuencia de la respuesta inmune inducida, se está describiendo como posible causal de la resurgencia a los cambios en las características antigénicas y genotípicas de las cepas de *B. pertussis* circulantes [188]. La mayor prevalencia de aislamientos bacterianos divergentes a las cepas contenidos en las vacunas frente a los cuales las vacunas actuales no resultarían tan efectivas sin dudas contribuye a una menor duración de la inmunidad inducida por las vacunas. Más aún, la clara prevalencia de aislamientos bacterianos que no expresan uno o más componentes antigénicos que están contenidos en las formulaciones vacunales contra pertussis en países que sólo emplean a las vacunas aP en sus calendarios [23,146] y nuestros hallazgos descriptos en el capítulo anterior sobre la baja prevalencia de cepas deficientes en pertactina en nuestro país que emplea solo a la vacuna wP en la serie primaria de vacunación, apoyan la hipótesis sobre la mayor presión de selección que están ejerciendo las vacunas aP respecto de la wP [25].

En todo este contexto, es evidente que para mejorar el control de la enfermedad se necesita una nueva generación de vacunas capaces de superar las deficiencias asociadas con las vacunas actuales. Varias son las alternativas que pueden explorarse. Una posibilidad consiste en promover el desarrollo y el uso de nuevas vacunas de células enteras que sean menos reactogénicas y mejoradas en términos de las condiciones de producción. Sin embargo, retornar al uso de la vacuna basada en célula entera parecería ser difícil para aquellos países que cambiaron hacia el uso de las vacunas aP debido a las reacciones adversas asociadas a las vacunas celulares. Otra posibilidad es mejorar la vacuna aP a través de la inclusión de nuevos factores de virulencia de *B. pertussis* tales como adenilato ciclasa toxina o las proteínas reguladas por hierro [189,190]. Otra opción sería incluir un adyuvante capaz de conducir una fuerte respuesta de Th1, como por ejemplo la utilización de agonistas de los receptores de tipo Toll, los cuales se han propuesto recientemente en el ámbito de la vacunología [191]. Afortunadamente hay varios candidatos vacunales propuestos que podrían contribuir a resolver el problema de la reaparición de pertussis. Una de ella consiste en una cepa de *B. pertussis* atenuada administrable por vía intranasal [192]. Los resultados alcanzados con esta vacuna han sido exitosos en modelos animales y por ello los investigadores que la desarrollaron ya han realizado los ensayos clínicos correspondientes a Fase I y II [193-195]. Aunque esta es una aplicación prometedora que ha mostrado algunas ventajas, comparte los potenciales problemas de seguridad relacionados con el uso de patógenos atenuados. Una alternativa interesante por estar constituido por componentes bacterianos conocidos como

PAMPS y numerosos inmunógenos cuya conformación es próxima al patógeno infeccioso, son las vesículas de membrana externa (OMVs) derivadas de *B. pertussis*, también llamadas nanopartículas. En la actualidad existen dos vacunas contra la meningitis que contienen componentes derivados de la membrana externa y periplasma de *Neisseria meningitidis* serogrupo B [196]. Los datos sobre seguridad y eficacia de estas vacunas y el conocimiento de que la mayoría de las bacterias Gram-negativas secretan vesículas hace que la estrategia de vacunación con estas vesículas o nanopartículas sea factible para otras enfermedades [197]. En este contexto y como he descrito en la introducción de este trabajo, el grupo de investigación del que formo parte, ha diseñado y caracterizado con mucho detalle una vacuna acelular basada en las OMVs derivadas de *B. pertussis* cuya tecnología la hemos extendido a *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*, con excelente capacidad protectora evaluada en el modelo murino frente a diferentes genotipos de las 3 especies [9,11,15,16,152,154,198]. La formulación vacunal anti pertussis tiene un perfil de seguridad en ratones que es comparable a la de la vacuna aP comercial y mucho mejor que la de la wP. Además, nuestra formulación induce una respuesta inmune protectora con un perfil de Th1/Th2/Th17 mixto, y también induce una respuesta humoral y una respuesta celular de memoria residente en tejidos [15,16]. Hemos caracterizado la composición de estas nanopartículas y hemos identificado a más 250 componentes proteicos que en su mayoría están referidas a proteínas unidas a membrana [11,154]. La presencia de este alto número de inmunógenos es de importancia porque reduciría la presión de selección que en la actualidad ejercen las vacunas acelulares formuladas con pocos inmunógenos. Esta formulación cuya patente ha sido otorgada en Estados Unidos también es atractiva económicamente, hecho que resulta crítico para su uso en países en desarrollo. Se estima que el costo final por dosis de nuestra formulación será menor que el de las formulaciones aP existentes ya que para este último caso se requiere de tantos procesos de purificación como componentes tenga, lo que sin dudas repercute en el costo final de la vacuna. En nuestro caso el procedimiento de obtención de las vesículas de membrana externa solo requiere de centrifugaciones.

En resumen, la formulación a base de OMVs o nanopartículas de *B. pertussis* parece ser una buena alternativa a las formulaciones actuales ya que contienen un mayor número de inmunógenos que las vacunas acelulares actuales y en conformaciones cercanas a las encontrados en las bacterias, hechos que favorecerían la capacidad de protección otorgada por las vesículas. Durante el desarrollo de mi tesis nos hemos propuesto utilizar a las OMVs en combinación con la

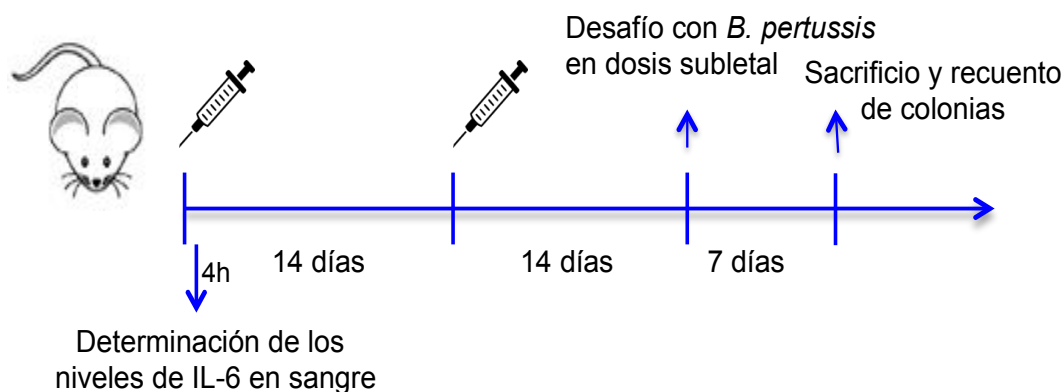
vacuna acelular comercial de forma de evaluar, por un lado, la capacidad de las OMVs de modular la respuesta inmune de la vacuna aP hacia el perfil Th1 recomendado para inducir niveles de protección robustos. Por otro lado, y en caso de que la combinación de vacunas resulte superadora, estos experimentos podrían facilitar el diseño de protocolos de ensayos clínicos en humanos ya que esta estrategia de formulación vacuna nos permitiría realizar un diseño de no inferioridad. Este protocolo es el que se busca realizar porque se trata de una vacuna novedosa contra una enfermedad para la que no existe un correlato de protección fácil de determinar y para la que ya se cuenta con vacunas comerciales. Otro tipo de ensayo llevaría a conflictos éticos porque deberíamos negarle el derecho a la vacunación para incluir el grupo de no inmunizados. Además, deberían realizarse muchas determinaciones inmunológicas para asegurar que la nueva vacuna induzca protección.

Los resultados alcanzados en el análisis de la combinación de vacunas se presentan a continuación.

Resultados

Análisis de la posible interferencia como resultado de combinar las OMVs derivadas de *B. pertussis* con la vacuna acelular comercial

Aunque resulta sencillo pensar que la combinación de vacunas puede llevar a beneficios claros tanto para el individuo que la recibe como para los sistemas de salud, las formulaciones que incluyen una combinación de vacunas deben superar obstáculos que en principio no pueden anticiparse, incluso para combinaciones de vacunas de efectividad conocida. Las interacciones inmunológicas, físicas y/o químicas entre los componentes combinados pueden alterar la respuesta del huésped. Así, el principal desafío en el desarrollo de una combinación de vacunas es el riesgo de que la eficacia o la seguridad de la vacuna combinada sea menor que la detectada para las vacunas individuales. La combinación de vacunas claramente no puede ser menos inmunogénica, menos efectivas o más reactogénicas que las vacunas individuales. Es por ello que el primer experimento que planteamos tuvo como objetivo evaluar en el modelo murino de protección con desafío intranasal del agente causal, la seguridad y la capacidad protectora de la combinación de la vacuna comercial acelular con las OMVs derivadas de *B. pertussis* (de aquí en más designada como OMVP_{3μg}+aP). En estos primeros ensayos se combinaron dosis para las que cada vacuna se presentó como segura y de probada capacidad inmunogénica en el mismo modelo de manera individual. Estos ensayos, al igual que los que se describirán a lo largo de todo el trabajo de tesis, consisten en inmunizar a grupos de ratones BALB/c por vía sistémica (vía i.p) siguiendo un plan de inmunización de 2 dosis con un intervalo de 14 días entre la primera y segunda dosis (Esquema 1. II). A los 14 días de recibida la última dosis, los animales son desafiados con una suspensión de *B. pertussis* Tohama fase I en una dosis subletal ($10^7 - 10^8$ UFC/40 μl). La seguridad de la vacuna en el modelo murino se evaluó analizando los niveles de la interleuquina proinflamatoria IL-6 en sangre a las 4 h post administración de la primera dosis de vacuna. La capacidad protectora de las formulaciones se evaluó a los 7 días del desafío mediante recuento de bacterias viables en los pulmones de los ratones inmunizados. Los resultados se compararon con los obtenidos de grupo de ratones no inmunizados. En este caso además se emplearon como controles a grupos de ratones inmunizados con la vacuna acelular comercial en una dosis 1/10 de la dosis humana y con vacuna basada en OMVs (OMVP_{3μg}).



Esquema 1.II: Protocolo de inmunización en el modelo murino de desafío intranasal con dosis subletales del agente causal *B. pertussis*. Se emplearon grupos de hembras BALB/c de 3-4 semanas de edad (n=4-5). Para el desafío se empleó una suspensión bacteriana de *B. pertussis* Tohama fase I en una concentración de $10^7 - 10^8$ UFC/40 μ l.

En la Figura 1.II se muestran los resultados obtenidos para cada una de las formulaciones vacunales. En el Panel A de la Figura 1.II se muestran los valores de IL-6 expresados en pg/mL detectados en los sueros de los ratones de todos los grupos incluidos en el ensayo. En este caso incluimos un grupo de ratones inmunizados con la vacuna comercial celular (wP) porque al igual que la OMVP es multiepitope y contiene lipopolisacáridos (LPS) en su composición. Los ensayos se repitieron de forma independiente por triplicado. Como puede observarse para todas las vacunas acelulares ensayadas inclusive para la combinación de vacunas acelulares, los niveles de IL-6 detectados fueron significativamente menores que los observados para la vacuna comercial en uso wP ($p < 0,001$). La diferencia detectada entre las vacunas aP y OMVP vs wP coincidió con nuestros resultados reportados previamente [10]. En el panel B de la Figura 1.II se muestran los recuentos de las bacterias recuperadas de los pulmones de los ratones incluidos en cada uno de los grupos experimentales. Las unidades formadoras de colonias (UFC) de *B. pertussis* se graficaron como logaritmo en base 10. Los ensayos se repitieron de forma independiente al menos tres veces. Como puede observarse en la Figura 1.II, en los pulmones provenientes de ratones inmunizados con la formulación novel OMVP_{3 μ g} + aP el recuento bacteriano se encuentra aproxima al límite de detección de la técnica (10 UFC/pulmones murino). No se detectaron diferencias significativas con niveles de protección inducidos por las vacunas aP y OMVP muchas veces ensayadas por nuestro grupo [10,16,199]. Además, observamos que en los pulmones de los ratones inmunizados

independientemente del tipo de formulación vacunal utilizado, los recuentos bacterianos fueron significativamente menores que los detectados en los pulmones de los ratones empleados como control negativo de protección (No inmunizado) ($p < 0,001$). Todos estos resultados muestran que la combinación de las vacunas no solo no altera la seguridad de las vacunas individuales que la componen, sino que tampoco interfiere en la capacidad protectora por ellas inducidas.

Para establecer la dosis de OMVs a utilizar como candidato vacunal, en el grupo que dirige la Dra Hozbor y antes

de mi incorporación al mismo, se realizaron ensayos dosis-respuesta en donde se pudo determinar que cuando se emplea a las OMVs como vacuna individual en una dosis de $1\mu\text{g}$ (medido como proteínas totales) la capacidad protectora inducida por la misma se reduce significativamente. En cuanto a la dependencia de concentración de OMVs y la toxicidad durante este trabajo de tesis pudimos

realizar ensayos dosis respuesta sin la necesidad de emplear animales gracias a una metodología

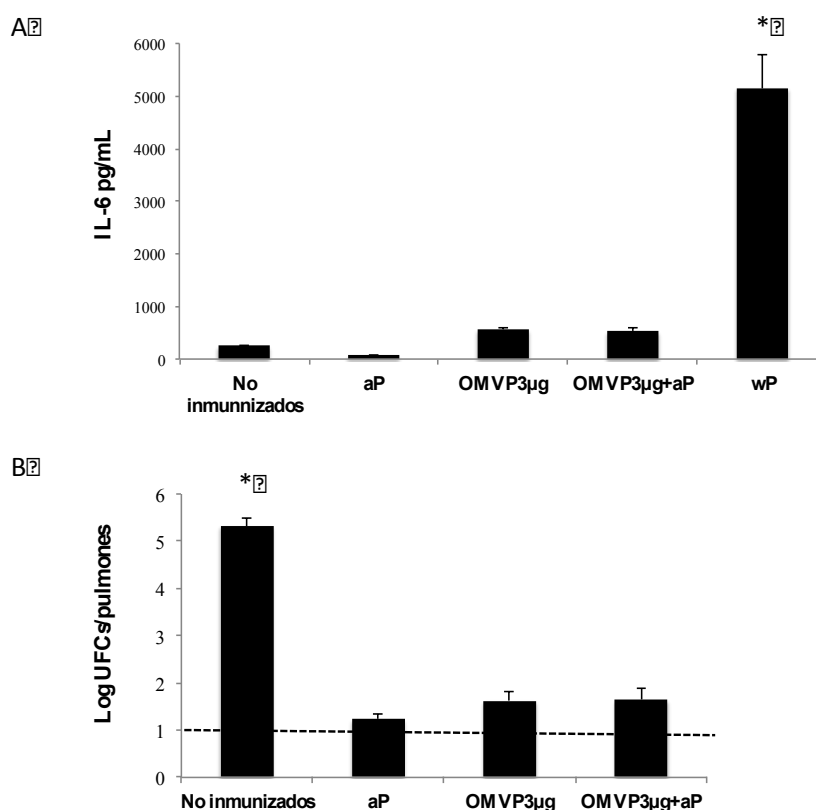


Figura 1.II: Seguridad y capacidad protectora inducida por la vacuna acelular combinada OMVP3μg + aP contra pertussis. Panel A): Niveles de IL-6 (pg/mL) medidos en suero de ratones inmunizados y no inmunizados a 4 h del tratamiento. Como control de una vacuna multiepitope se incluyó además a la vacuna celular comercial utilizada en una dosis 1/10 de la dosis humana (wP). * $p < 0,001$ niveles de IL-6 detectados en los animales inmunizados con la vacuna wP versus los detectados para todos los tratamientos incluidos en la figura. Panel B) Capacidad protectora inducida por las vacunas testeadas. Los ratones BALB/c fueron inmunizados y desafiados con dosis subletales de la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama fase I según el esquema 1 antes presentado. El número de bacterias recuperadas de los pulmones de los ratones de cada grupo expresado como el \log_{10} de UFC por pulmón \pm SEM, se representó en la ordenada al origen de la gráfica. Como controles se utilizaron animales sin inmunizar (No inmunizados) o inmunizados con vacuna acelular comercial (aP 1/10 HD) o con la vacuna a base de OMVP ($3\mu\text{g}$). Los resultados que se muestran se corresponden a los obtenidos en un experimento representativo. La línea horizontal punteada indica el límite de detección. * $p < 0,001$ ratones no inmunizados versus todos los tratamientos incluidos en la figura.

recientemente publicada para vacuna basada en OMVs contra *Neisseria meningitidis* [155] y puesta a punto en el laboratorio. Esta metodología consiste en medir a la interleuquina proinflamatoria IL-6 en sangre entera de dadores humanos sanos. Con esta metodología evaluamos los niveles de IL-6 inducidos por formulaciones combinadas en las que la dosis en μg de OMV fue variable y la dosis de aP se mantuvo constante en un valor de 1/10 de la dosis humana. Para estos ensayos incluimos como controles a las vacunas individuales comerciales aP y wP en dosis 1/10 de la dosis humana. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados obtenidos presentados en la Figura 2.II muestran que aún para la formulación que combina a las OMVs en mayor cantidad, los niveles de IL-6 detectados resultan significativamente menores que los detectado con la vacuna a células entera en uso en la población.

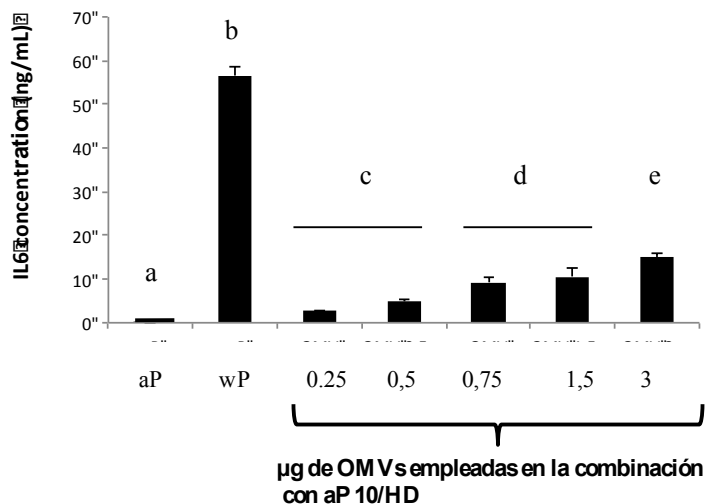


Figura 2.II: Detección de niveles de IL-6 inducida por formulaciones vacunales contra pertussis mediante un ensayo *in vitro* empleando sangre entera humana. Para la realización de estos ensayos para todas las formulaciones testeados se empleó una concentración de 200ng/mL. Como controles se emplearon a las vacunas aP y wP comerciales en uso. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. $p < 0,001$.

En base a estos resultados, a los de los ensayos de protección dosis-respuesta realizados previamente por nuestro grupo de investigación y en el marco de las 3R para los ensayos que involucran animales, decidimos verificar en ensayos *in vivo* que la formulación combinada que contiene 0,75 μg de OMVs induce niveles de IL-6 significativamente menores a los que se detecta cuando se emplea 3 μg de forma de OMVs en la formulación combinada. Los resultados alcanzados que se presentan en la Figura 3.II, muestran que los niveles de IL-6 detectados en el modelo murino efectivamente depende de la cantidad de OMVs incluidas en la formulación vacunal combinada, siendo los niveles de IL-6 significativamente menores para la formulación OMVP_{0,75 μg} +aP en comparación con los detectados para OMVP_{3 μg} +aP.

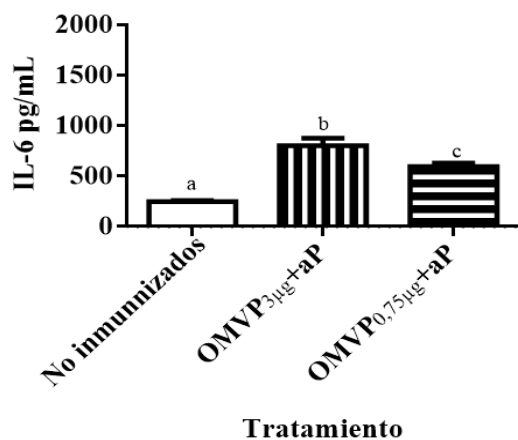


Figura 3.II: Niveles de IL-6 inducidos por formulaciones combinadas de vacunas detectadas en el modelo murino. Las determinaciones de IL-6 se realizaron empleando el modelo murino del Esquema 1. Los niveles de IL-6 detectados en suero de los ratones a 4h de recibir la primera dosis de vacuna están expresados en pg/mL. Como control se empleó un grupo de ratones no inmunizados (control negativo). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. $p < 0,05$

Una vez confirmado que la combinación de vacunas no altera ni la capacidad protectora individual de cada vacuna ni la bioseguridad, decidimos analizar entonces si la combinación resulta benéfica en términos de la inmunogenicidad y la capacidad protectora. Para ello realizamos ensayos de protección empleando el modelo murino con un protocolo de dos dosis similares al presentado en el Esquema 1 pero en condiciones en las que la inducción de la capacidad protectora de vacuna individual en base a OMVs. Es así que no sólo empleamos una formulación combinada con concentraciones de OMVs menores que $1\mu\text{g}$, específicamente $0,75\mu\text{g}$ (seleccionada por los valores de IL-6 inducidos), sino que además analizamos su capacidad protectora a un plazo de tiempo post inmunización en el que se espera que la respuesta inmune se vea afectada (desafío de las dosis subletales de *B. pertussis* a 4 meses de la última dosis vacunal). Para estos experimentos además del control negativo de protección (animales no inmunizados) incluimos un grupo inmunizado con la formulación vacunal combinada de probada capacidad protectora en el corto plazo, es decir la formulación para OMVP_{3µg}+aP de vacunas no interfiere, sino que la misma resulta beneficiosa en términos de protección. Más aún, en términos de bioseguridad esta formulación es aún más segura que la formulación OMVP_{3µg}+aP que de por sí supera a las formulaciones vacunales multiepitopes (wP). Los resultados alcanzados se muestran en la Figura 4 Cap. II. Como puede observarse en dicha figura, los valores de UFCs de *B. pertussis* recuperados de los pulmones de los ratones inmunizados aún para la formulación que contiene $0,75\mu\text{g}$ de OMVs resultaron ser al menos 4,5 ordenes más bajos que los detectados en los ratones no inmunes ($p < 0,05$). Los valores detectados de UFCs estuvieron cercanos al límite de detección (10 UFC/pulmones). Estos resultados de protección detectados para la formulación OMVP_{0,75µg}+aP son por demás relevantes para nosotros ya que no solo muestran que la combinación

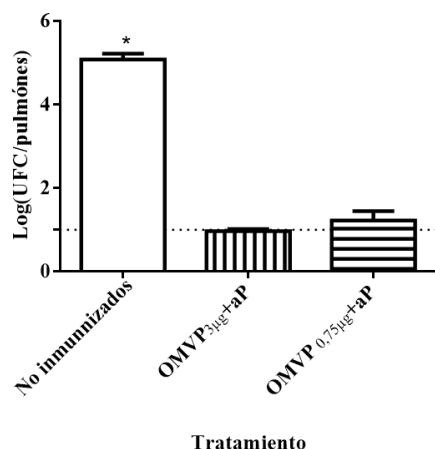
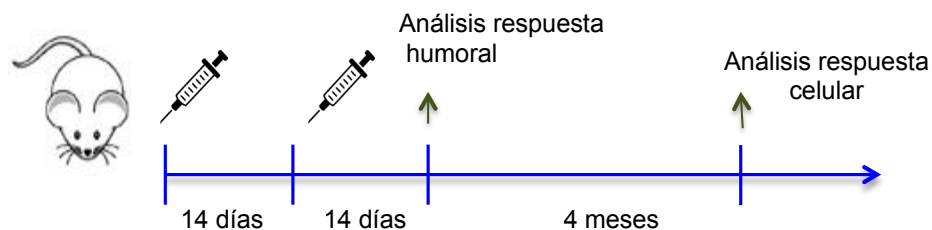


Figura 4.II: Capacidad protectora a largo plazo inducida por formulaciones vacunales combinadas. Los ratones BALB/c fueron inmunizados según el esquema 1 y desafiados a 4 meses de la segunda dosis vacunal con una suspensión de la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama fase I en concentraciones subletales ($10^7 - 10^8$ UFC/40 μ l). El número de bacterias recuperadas de los pulmones de los ratones de cada grupo expresado como el log₁₀ de UFC por pulmón \pm SEM, se representó en la ordenada al origen de la gráfica. Como controles se utilizaron animales sin inmunizar (No inmunizados) o inmunizados con vacuna acelular OMVP3 μ g+aP 1/10 HD. Los resultados que se muestran se corresponden a los obtenidos en un experimento representativo. La línea horizontal punteada indica el límite de detección. * $p < 0,05$ ratones no inmunizados versus todos los tratamientos incluidos en la figura.

Caracterización de la respuesta inmune inducida por las formulaciones combinadas OMVP+aP

Si bien no existe un correlato sencillo de medir para pertussis, existe suficiente información extraída del empleo de modelos animales e incluso de estudios en humanos que muestra que, aunque los anticuerpos pueden mediar la protección [7,200], las respuestas celulares Th1 y Th17 y la respuesta de memoria residente en tejidos (TRM) son responsables de la protección duradera [7,201,202]. Más aún, existe consenso en la recomendación para las nuevas generaciones de vacunas contra pertussis sobre la inducción de un perfil de respuesta Th1 [7]. En este contexto en nuestro grupo nos preguntamos si la adición de OMVs de *B. pertussis* a la vacuna comercial acelular aP es capaz de direccionar la respuesta inmune inducida por la vacuna comercial aP hacia los perfiles de respuesta inmune recomendados para las nuevas generaciones de vacunas contra pertussis. Para ello realizamos un plan de inmunización de dosis como el seguido en el esquema 1.II, pero en lugar de hacer el desafío con una suspensión de *B. pertussis*, extrajimos muestras para evaluar tanto la respuesta humoral inducida como para realizar ensayos de proliferación celular en bazos (Esquema 2. II).



Esquema 2.II: Esquema experimental empleando el modelo murino para el análisis de la respuesta inmune inducida por la vacuna combinada. Grupos de ratones hembras BALB/c (n=4-5) de 3-4 semanas de edad fueron inmunizados con dos dosis vacunales con un lapso de 14 días entre la primera y segunda dosis. Luego de 2 semanas de la última inmunización todos los ratones fueron sangrados para la obtención de sueros para realizar los análisis de la respuesta humoral. A los 4 meses después de la última inmunización todos los ratones fueron sacrificados para extraer los bazo para los ensayos de proliferación celular.

Para la evaluación del potencial direccionamiento de la respuesta inmune ensayamos las dos concentraciones de OMVs que resultaron ser protectoras contra pertussis sin afectar la seguridad de las vacunas, es decir ensayamos OMVP_{0,75µg} y OMVP_{3µg} combinadas con aP en la dosis 1/10 HD. En estos experimentos no solo incluimos un grupo de ratones no inmunizados (control negativo) sino también un grupo inmunizado con la vacuna aP comercial 1/10 HD tomado como base para analizar el efecto inmunológico de la adición de las OMVs. Los experimentos aquí realizados por triplicado evidenciaron que las formulaciones combinadas inducen una respuesta de anticuerpos robusta (Tabla 1.II). En particular, detectamos altos títulos de anticuerpos IgG contra un lisado de células enteras de *B. pertussis* tanto en los sueros provenientes de ratones inmunizados con OMVP_{0,75µg}+aP como en los inmunizados con OMVP_{3µg}+aP, aunque en este último caso los niveles fueron significativamente mayores ($p < 0,001$). En contraposición y en acuerdo con resultados previamente publicados por nuestro grupo [16], los niveles de IgG detectados en los ratones inmunizados con la vacuna comercial aP fueron menores que los niveles logrados con las formulaciones combinadas (Tabla 1.II). Para los ratones no inmunizados, como esperábamos, los niveles de IgG resultaron muy inferiores.

Resulta de interés la detección una relación de isotipos $IgG2a/IgG1 > 1$ (Tabla 1.II) para las formulaciones combinadas y en particular la formulación OMVP_{3µg}+aP, lo que sugeriría la inducción de una respuesta inmune con perfil Th1.

Tabla 1.II: Títulos de anticuerpos específicos contra un lisado de *B. pertussis* (IgG e Isotipos) inducidos por las distintas formulaciones vacunales combinadas.

Tipo de vacuna	IgG totales	IgG1	IgG2a	Relación IgG2a/IgG1
No inmunizado	5,6±7,92	ND	ND	ND
aP	30,29±7,32	30,23±20,94	26,14±13,42	0,86
OMVP _{0,75µg} +aP	145,55±34,81*	59,12±19,94	54,69±20,86	0,92
OMVP _{3µg} +aP	1403,75±303**	278,06±146,06*	396,37±140,88*	1,42

Las titulaciones se realizaron mediante ensayos de ELISA a partir de los sueros obtenidos de los ratones inmunes a los 14 días de la última inmunización según el Esquema 2 Cap. II. Como control negativo se empleó un grupo de ratones sin inmunizar. Se realizaron al menos tres ensayos independientes. Los resultados presentados corresponden a un ensayo representativo. *p<0, 05

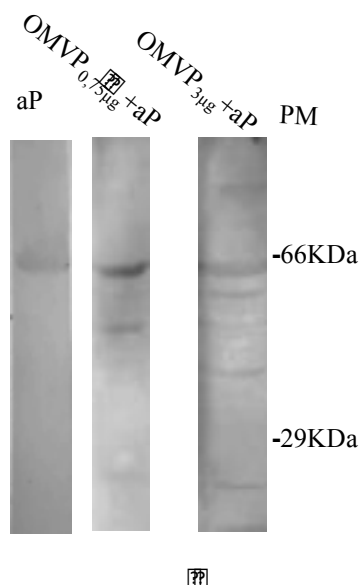


Figura 5.II: Inmunoblotting frente a proteínas totales de *B. pertussis* empleando sueros de ratones inmunizados con formulaciones combinadas. Los sueros de los ratones inmunizados con las vacunas que se indican en la parte superior de la figura se obtuvieron a 14 días de la última inmunización. Los sueros de ratones inmunizados con aP fueron empleados con fines comparativos.

Cuando analizamos el perfil de reconocimiento de los sueros inmunes frente a proteínas totales de *B. pertussis* separadas en geles SDS-PAGE, observamos que los patrones de reconocimiento resultaron ser algo más complejos para los sueros provenientes de las formulaciones combinadas en comparación con los obtenidos con los sueros de animales inmunizados con la formulación comercial aP (Figura 5.II). Para los sueros no inmunes utilizados como controles negativos no se detectó ninguna banda de reconocimiento específico para las proteínas de *B. pertussis* (no mostrado). Estos resultados indican que la adición de las OMVs a la formulación comercial aP no sólo no interfiere en el perfil de reconocimiento de aP, sino que amplía dicho perfil. Este aspecto resulta importante en la búsqueda de disminuir la presión de

selección ejercida sobre la población bacteriana circulante por formulaciones con pocos epitopes como los es la formulación aP individual.

A continuación, analizamos la capacidad de las OMVs de modular la respuesta inmune de las formulaciones combinadas hacia el perfil Th1 recomendado para las nuevas formulaciones. Para ello realizamos ensayos de estimulación de esplenocitos de ratones inmunes y no inmunes. Como estímulo empleamos a una suspensión de OMVs en una concentración de 2,5µg/mL. Luego del tiempo de incubación, evaluamos los niveles de IFN-γ utilizado como marcador del perfil Th1. Evaluamos además los niveles de IL-17 (marcador del perfil Th17) e IL5 (marcador del perfil Th2) para profundizar la caracterización de la respuesta inmune inducida por las formulaciones combinadas testeadas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6. II.

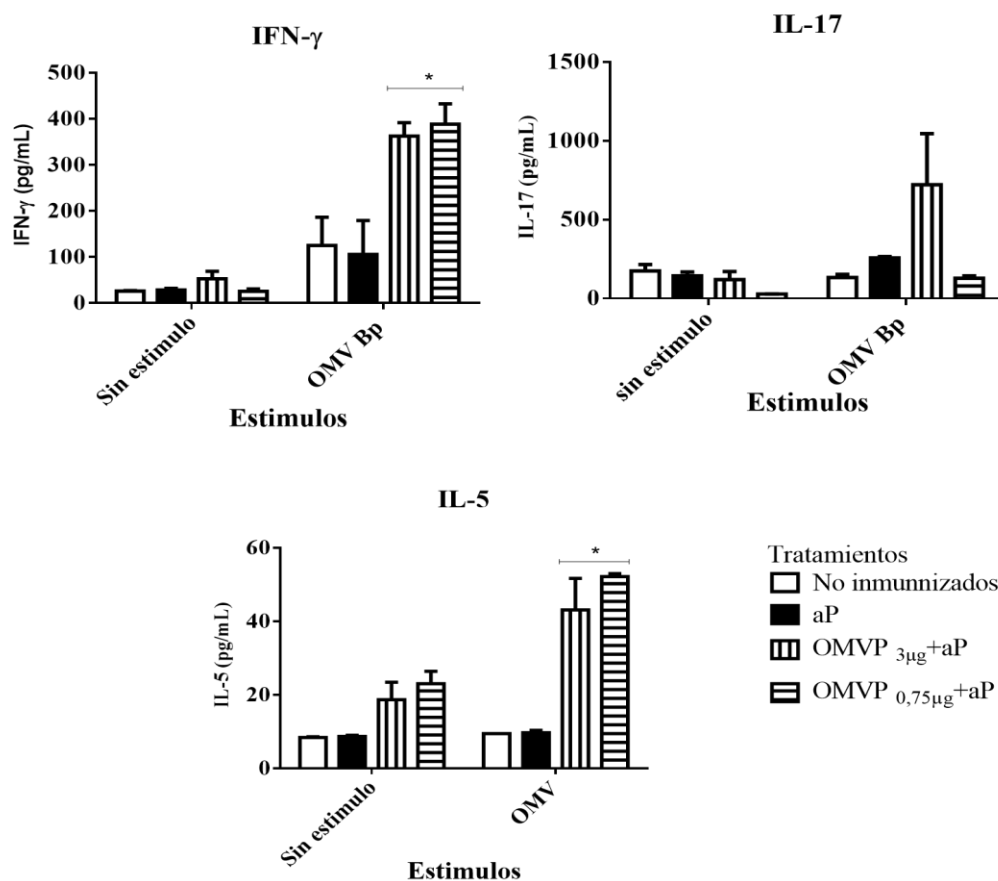


Figura 6.II: Niveles de IFN-γ, IL-17 e IL-5 inducidos por las distintas vacunas medidos en pg/mL. Células de bazo de ratones inmunizados según el Esquema 2 Cap. II fueron estimulados por 72h con una suspensión de OMVs [2,5 µg /mL]. Como controles se emplearon esplenocitos de ratones no inmunes. También se incluyeron esplenocitos que no fueron sometidos a ningún estímulo. Las medidas de las interleuquinas se realizaron mediante ensayos de ELISA a partir de los sobrenadantes de cultivo. * p < 0,05

La Figura 6.II muestra que para las dos concentraciones de OMVs empleadas para formular las vacunas combinadas se detectan niveles de IFN- γ que resultaron ser significativamente mayores a los detectados para la formulación aP ($p < 0,05$). Más aún, los niveles de IL-5 detectados para las dos formulaciones combinadas aquí testeadas también resultaron significativamente superiores a los detectados para la formulación aP comercial. Respecto de la IL-17, sólo se pudieron detectar valores elevados respecto de los no inmunizados en los sobrenadantes de los esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con formulaciones combinadas conteniendo la concentración más alta de OMVs. En todos los casos y como era esperable para los controles negativos los niveles de las interleuquinas fueron bajos o indetectables. Todos los resultados presentados en esta sección muestran que la adición de OMVs en las formulaciones vacunales combinadas resultan benéficas respecto de la formulación individual aP, en términos no sólo del perfil de respuesta inmune, sino además en la multiplicidad de epitopes inmunogénicos, dos aspectos que son marcados por la comunidad científica como debilidades de las vacunas acelulares comercial actualmente en uso [7,203].

Capacidad protectora de las formulaciones combinadas OMVP+aP frente a aislamientos clínicos de *B. pertussis* actualmente circulantes

Hasta aquí hemos demostrado que la adición de OMVs derivadas de *B. pertussis* Tohama fase I a las vacunas comerciales aP para formular una vacuna combinada no sólo no interfiere en la bioseguridad y en la inmunogenicidad, sino que por el contrario ha resultado ser benéfica en cuanto a la superación de las debilidades reportadas para las vacunas acelulares comerciales. En esta sección de mi trabajo de tesis presentaré los resultados que obtuvimos al evaluar la capacidad protectora de la formulación vacunal combinada frente a aislamientos clínicos de *B. pertussis* actualmente en circulación, en particular aquellos aislamientos deficientes en la expresión del antígeno vacunal pertactina (PRN). Este tema cobra relevancia ya que como he mencionado en la Introducción de este trabajo y en el capítulo anterior en los últimos años se ha detectado un aumento en la prevalencia de estos aislamientos de *B. pertussis* en países que sólo incluyen a las vacunas acelulares en sus calendarios. En particular en USA, Canadá y Australia, se informó que

la prevalencia de los aislamientos deficientes en la expresión de PRN [PRN (-)] aumentó sustancialmente en los últimos años [23,146,204]. Se ha propuesto que la pérdida de este antígeno vacunal probablemente proporcione una ventaja selectiva para la supervivencia bacteriana en poblaciones vacunadas con vacunas aP. De hecho se ha demostrado que las vacunas comerciales aP que contienen PTx, PRN y hemaglutinina filamentosa (FHA) en su composición no son tan efectivas como se esperaba para controlar la infección causada por las bacterias circulantes recientes que no expresan PRN [205]. En el modelo murino de infección, se demostró incluso que frente a una infección mixta con bacterias que expresan PRN y con bacterias deficientes en la expresión de dicho antígeno, la cepa PRN(-) coloniza el tracto respiratorio de ratones inmunizados con aP de manera más efectiva que la cepa PRN (+) [165].

Para evaluar la capacidad protectora de las formulaciones combinadas frente a aislamientos circulantes deficientes en PRN, seleccionamos dos aislamientos clínicos de nuestra colección la cual contiene cepas locales y cepas importadas como hemos descrito en el capítulo anterior. Dentro de las cepas locales, seleccionamos al aislamiento BPAR1630 y como cepa representativa de un país que emplea sólo vacuna aP en su calendario, seleccionamos al aislamiento CDC H935 obtenido durante el brote de pertussis detectado en el 2012 en la ciudad de Washington (USA) [146]. Este último aislamiento fue gentilmente cedido a nuestro laboratorio por la Dra. Lucía Tondella y su grupo pertenecientes a Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, (CDC) de Atlanta, USA, con quienes venimos trabajando en colaboración hace ya 10 años. Estos aislamientos comparten el mismo genotipo respecto de PTx y PRN, es decir ambos contienen el genotipo *ptxP3*, *ptxA1*, *prn2* que es el que mayormente circula en todos los países [5].

Sobre el aislamiento CDC H935 nuestro grupo ya había ensayado la capacidad protectora de las vacunas individuales aP y OMV 3µg. Los resultados obtenidos recientemente publicados [15] mostraron que mientras para la vacuna aP la protección contra el desafío subletal de *B. pertussis* CDC H935 en el modelo murino fue inadecuado, la vacuna basada en OMVs la protección fue satisfactoria, logrando reducir al menos 4 órdenes de magnitud el número de UFCs recuperados de los pulmones de los ratones inmunizados respecto del grupo control no inmunizado. Durante mi trabajo de tesis utilizando el protocolo del Esquema 1 Cap. II extendimos los análisis de protección frente a este aislamiento de las vacunas combinadas que contienen las dos concentraciones de OMVs estudiadas a lo largo de mi trabajo, es decir 3µg y 0,75µg de OMVs. Como controles se emplearon grupos de ratones no inmunizados (control negativo de

protección), grupo de ratones inmunizados con las vacunas individuales aP y OMVP en las dos concentraciones: 3 μ g y 0,75 μ g. Los resultados se presentan en la Figura 7. II.

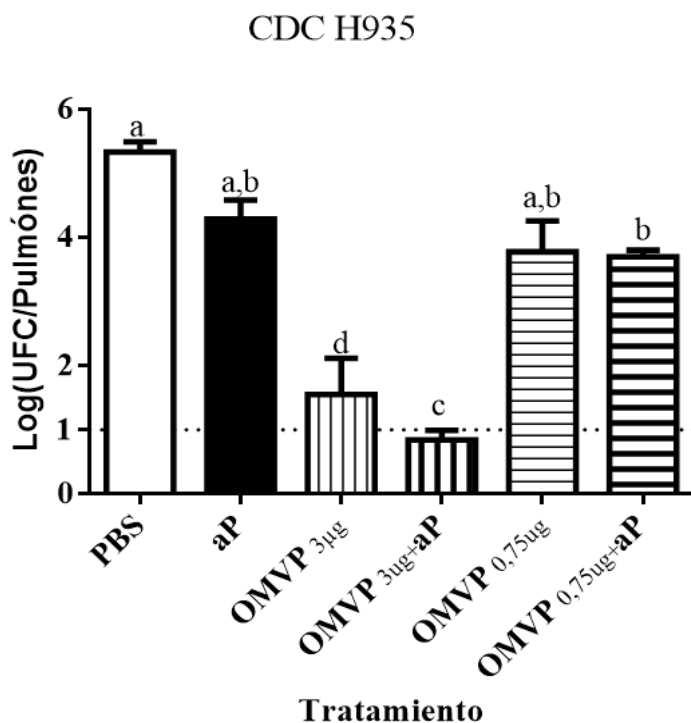


Figura 7.II: Capacidad protectora inducida por la vacuna combinada OMVs+aP, ensayada en 2 dosis de OMVs distintas (OMV_{3 μ g}+aP y OMV_{0,75 μ g}+aP) frente al aislamiento clínico deficiente en PRN CDC H935. Los ratones BALB/c fueron inmunizados según el Esquema 1 Cap. II y desafiados con dosis subletales del aislamiento CDC H935. El número de bacterias recuperadas de los pulmones de los ratones de cada grupo expresado como el log₁₀ de UFC por pulmón \pm SEM, se representó en la ordenada al origen de la gráfica. Como controles se empleó un grupo de ratones inmunizados con: la vacuna acelular comercial (aP 1/10 HD) y con la vacuna basada en OMVs en dos concentraciones OMVP_{3 μ g} y OMVP_{0,75 μ g}. Como control negativo se empleó un grupo de ratones sin inmunizar. Los resultados que se muestran se corresponden a los obtenidos en un experimento representativo. La línea horizontal punteada indica el límite de detección. Letras diferentes indican recuentos bacterianos significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Como puede observarse en la Fig. 7.II, las vacunas individuales aP y OMVP en la concentración 0,75 μ g no son capaces de proteger contra la colonización pulmonar del aislamiento CDC H935. Los valores de UFCs recuperado de los pulmones de los ratones inmunizados con estas vacunas no se diferenciaron de los hallados para el grupo control no inmunizado. Por el contrario, para las vacunas OMVP 3 μ g y para la formulación vacunal OMVP_{3 μ g}+aP, la reducción en la colonización pulmonar fue de al menos 4 órdenes de magnitud respecto del control no inmunizado ($p < 0,05$), detectando el valor más alto para la formulación combinada.

Estos ensayos luego los repetimos para el aislamiento BpAR1630 y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8 Cap. II. Como puede observarse, a diferencia de los hallazgos para el aislamiento CDC H935, la capacidad protectora de todas las formulaciones individuales resultaron inadecuadas ya que los niveles de UFCs detectados en todos estos casos fue similar al hallado para el grupo control no inmunizado. Interesantemente, para este aislamiento la protección inducida por las vacunas combinadas en ambas concentraciones resultó por demás

satisfactoria (Fig. 8. II). Los niveles detectados de UFCs en los pulmones de los ratones inmunizados con estas vacunas resultaron ser al menos 4 órdenes inferiores a los detectados en el grupo control no inmunizado ($p < 0,05$).

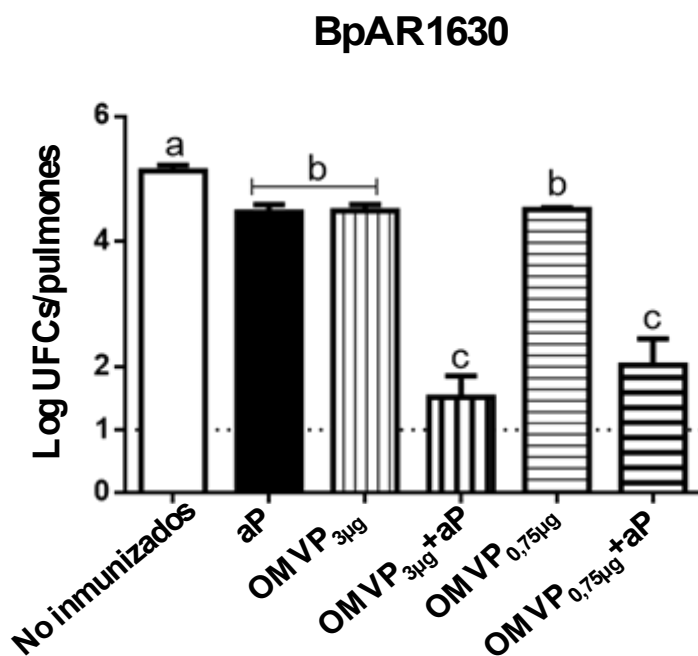


Figura 8.II: Capacidad protectora inducida por la vacuna combinada OMVs+aP, ensayada en 2 dosis de OMVs distintas (OMV_{3µg}+aP y OMV_{0,75µg}+aP) frente al aislamiento clínico deficiente en PRN BpAR1630. Los ratones BALB/c fueron inmunizados según el Esquema 1 Cap. II y desafiados con dosis subletales del aislamiento BpAR1630. El número de bacterias recuperadas de los pulmones de los ratones de cada grupo expresado como el log₁₀ de UFC por pulmón ± SEM, se representó en la ordenada al origen de la gráfica. Como controles se empleó un grupo de ratones inmunizados con: la vacuna acelular comercial (aP 1/10 HD) y con la vacuna basada en OMVs en dos concentraciones OMVP_{3µg} y OMVP_{0,75µg}. Como control negativo se empleó un grupo de ratones sin inmunizar. Los resultados que se muestran se corresponden a los obtenidos en un experimento representativo. La línea horizontal punteada indica el límite de detección. Letras diferentes indican recuentos bacterianos significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Todos los resultados presentados aquí muestran que la combinación de OMVP y aP resulta benéfica en términos de protección contra aislamientos clínicos de *B. pertussis* que hoy representan un problema grave para los países que solo emplean vacunas acelulares en sus calendarios. La formulación combinada que contiene la mayor concentración de OMVs se muestra con un espectro más amplio de protección por lo que sería el candidato propuesto como superador de las debilidades detectadas para las vacunas acelulares comerciales.

Finalmente nos preguntamos si los resultados benéficos respecto del espectro de protección son dependientes del tipo de vacuna acelular comercial empleada. En la actualidad existen dos farmacéuticas que suplen las demandas de vacunas acelulares de la mayoría de los países. Estas empresas son Glaxo Simith Kline y SANOFI. La vacuna Adacel comercializada por la empresa SANOFI posee la siguiente composición: PT (2,5µg), PRN (3µg), FHA (5µg), Fim 2 y 3 (5µg). Mientras que la formulación Boostrix de Glaxo contiene PT (8µg), PRN (2,5µg), FHA (8µg).

Teniendo en cuenta esta diferencia en la composición y que nosotros en todos los experimentos anteriormente descritos empleamos la vacuna Adacel, decidimos evaluar si los hallazgos sobre protección contra aislamientos deficientes en pertactina era extensible a combinaciones en las que la vacuna aP utilizada fuera Boostrix (aP_b). En este caso analizó la respuesta de la vacuna combinada basada en 3µg OMVs (OMVP_{3µg}+aP_b) ya que resultó ser la más versátil frente al aislamiento BpAR1630. Los resultados alcanzados se muestran en la Figura 9. II.

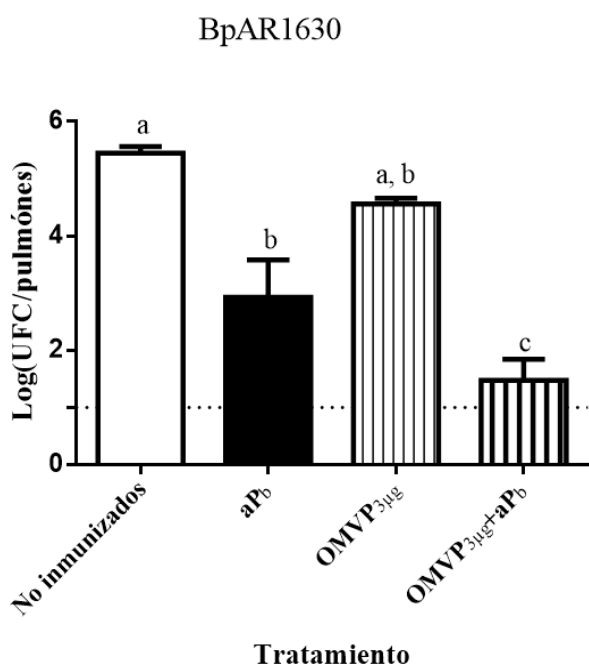


Figura 9.II: Capacidad protectora inducida por la vacuna combinada OMV_{3µg}+aP_b. Los ratones BALB/c fueron inmunizados según el Esquema 1 Cap. II y desafiados con dosis subletales del aislamiento clínico Bp AR1630. El número de bacterias recuperadas de los pulmones de los ratones de cada grupo expresado como el log₁₀ de UFC por pulmón ± SEM, se representó en la ordenada al origen de la gráfica. Como controles se utilizaron animales sin inmunizar (No inmunizados) o inmunizados con vacuna acelular comercial (aP 1/10 HD) o con la vacuna a base de OMVP (3µg) individual. Los resultados que se muestran se corresponden a los obtenidos en un experimento representativo. La línea horizontal punteada indica el límite de detección. Letras diferentes indican recuentos bacterianos significativamente diferentes (p <0,05).

Como se puede observar en la Figura 9.II, las vacunas individuales presentan dificultades en inducir una protección adecuada frente a la colonización del aislamiento BpAR1630. Sin embargo, para la formulación OMVP_{3µg}+ aP_b el recuento UFCs recuperadas de los pulmones de los ratones inmunes resultó ser significativamente menor al detectado para el grupo control no inmunizado y para las vacunas individuales. Estos resultados son por demás interesantes ya que mostrarían que la adición de OMVs resulta benéfica independiente de la vacuna acelular empleada.

Discusión

La combinación de vacunas desde siempre ha sido una estrategia atractiva ya que facilita completar esquemas de vacunación con un menor número de inyecciones y una mayor aceptación por parte del personal sanitario y de la población permitiendo obtener mejores coberturas vacunales. Las vacunas combinadas se conocen hace ya 72 años, desde que en 1948 se autorizó la vacuna DTP [206-208]. La vacuna triple viral (sarampión, rubéola y parotiditis) fue la segunda combinada comercializada. El aumento creciente del número de vacunas en los calendarios de inmunizaciones en los últimos años ha hecho progresar la investigación y el desarrollo de vacunas combinadas. A partir de la vacuna trivalente DTP, en las formas celular y acelular, se han desarrollado varias vacunas combinadas, y en la actualidad se dispone de tetravalentes, pentavalentes y una hexavalente con DTP. Sin embargo, estos desarrollos se ven limitados ya que la combinación de vacunas puede llevar a una interferencia antigénica entre algunos de sus componentes, lo que da lugar a una disminución de la respuesta inmune. La reactogenicidad es otra propiedad que puede modificarse al combinar vacunas. Una de las interferencias antigénicas más constantes y relevantes en las vacunas combinadas es la menor inmunogenicidad del componente Hib cuando se combina con la vacuna triple bacteriana acelular. Los títulos de anticuerpos anti-PRP resultan inferiores a las que se obtienen con la administración de las vacunas por separado, aunque son superiores a la concentración que se considera protectora. Esta interferencia afortunadamente no tiene repercusión clínica pero muchos estudios se requirieron para llegar a esa conclusión. La combinación de antígenos es un procedimiento complejo que requiere grandes esfuerzos investigación para determinar los efectos sobre la inmunogenicidad, la reactogenicidad y la seguridad: la nueva vacuna combinada debe evaluarse aún para combinaciones de vacunas individuales exitosas. Se han observado fenómenos de interferencia por competencia entre los antígenos en algunos casos, fenómenos de supresión cuando se utiliza la misma proteína transportadora en vacunas conjugadas y fenómenos de inducción de respuesta entre vacunas de virus vivos, y uno inhibe la replicación del otro. También hay fenómenos de interferencia química con los conservantes y adyuvantes que afectan la inmunogenicidad y la estabilidad vacunal [209]. Por estas razones, se requieren ensayos preclínicos y clínicos que comparen la inmunogenicidad, la reactogenicidad, y la seguridad de las vacunas combinadas antes de ser utilizadas masivamente.

En este trabajo analizamos la factibilidad de combinar a nuestro candidato vacunal basado en las OMVs derivadas de *B. pertussis* a la vacuna aP comercial de amplio uso en la población de forma de lograr una nueva vacuna acelular que cumpla con los requisitos de una nueva y mejorada generación de vacunas contra pertussis factible de ser analizada más fácilmente en los ensayos clínicos en humanos. Los resultados sobre la bioseguridad obtenidos tanto en los ensayos *in vitro* con sangre entera de humanos como en los ensayos *in vivo* obtenidos en el modelo murino muestran la factibilidad de la combinación en un rango de al menos 0,25 a 3µg de OMVs con 1/10 de la dosis humana de la vacuna aP (dosis empleada ampliamente en ensayos preclínicos) (Figura 1 Panel A Cap. II, Figura 2 Cap. II). En los primeros ensayos que realizamos para abordar este tema combinamos a las OMVs y a la vacuna aP comercial en dosis de comprobada capacidad protectora en el modelo murino de desafío intranasal en ratones. Estos ensayos permitieron evidenciar que para el componente pertussis esta combinación de vacunas no afecta la capacidad protectora de las vacunas individuales. Todos estos resultados por demás alentadores nos llevaron a preguntarnos si la combinación de estas vacunas resulta virtuosa en términos de mejorar debilidades de cada vacuna. Para respondernos a esta pregunta formulamos la vacuna combinada con una dosis de OMVP de 0,75µg sobre la tenemos información de su menor capacidad protectora respecto de la muy caracterizada dosis de 3µg. Los ensayos aquí realizados mostraron que esta vacuna combinada (OMV_{0,75}P+aP) supera la capacidad protectora frente a la infección causada por la cepa *B. pertussis* Tohama fase I de la vacuna individual OMV_{0,75}P. Más aún, la vacuna OMV_{0,75}P+aP supera a la vacuna aP en términos del tipo de perfil de respuesta inmune inducido. La adición de las OMVs logra direccionar la respuesta inmune hacia el perfil mixto Th1-Th2-Th17 recomendado para protección contra pertussis [150] superando la debilidad de las vacunas acelulares comerciales que inducen mayormente un perfil de respuesta del tipo Th2 [7]. El tamaño de las OMVs y su composición conteniendo una amplia variedad de PAMPs sin dudas responsables de este direccionamiento de la respuesta inmune. De hecho se ha demostrado que la adición a la formulación de las vacunas aP comerciales de agonistas de los receptores del tipo toll, en particular de TLR7 o TLR2 inducen una respuesta Th1 y Th17 [210,211]. En relación al agonista del TLR7 adsorbido al hidróxido de aluminio se detectó también un aumento de anticuerpos IgG2a/b con mayor funcionalidad antipertussis que la respuesta humoral inducida por la vacuna aP formulada solamente con aluminio. Nuestra formulación consistente en una

combinación de vacunas también indujo un aumento significativo en el título de anticuerpos totales respecto la vacuna aP individual con una relación $IgG2a/IgG1 \geq 1$ (Tabla 1.II).

Una característica superadora de nuestra vacuna acelular combinada respecto de los candidatos propuestos por otros autores que involucran nuevos adyuvantes o la adición de nuevas proteínas a las actuales vacunas acelulares, es su composición multiepitope de numerosas proteínas [199] en conformaciones muy próximas a las presentadas por el agente causal de la enfermedad. En el contexto de resurgencia actual de la enfermedad este hecho es de relevancia ya que existe evidencia sobre la mayor presión que estarían ejerciendo las vacunas acelulares que están compuestas por pocos inmunógenos (no más de cinco proteínas) en altas concentraciones sobre la población bacteriana circulante permitiendo la prevalencia de bacterias que son más resistentes a la inmunidad conferida por las vacunas [23,146,212,213].

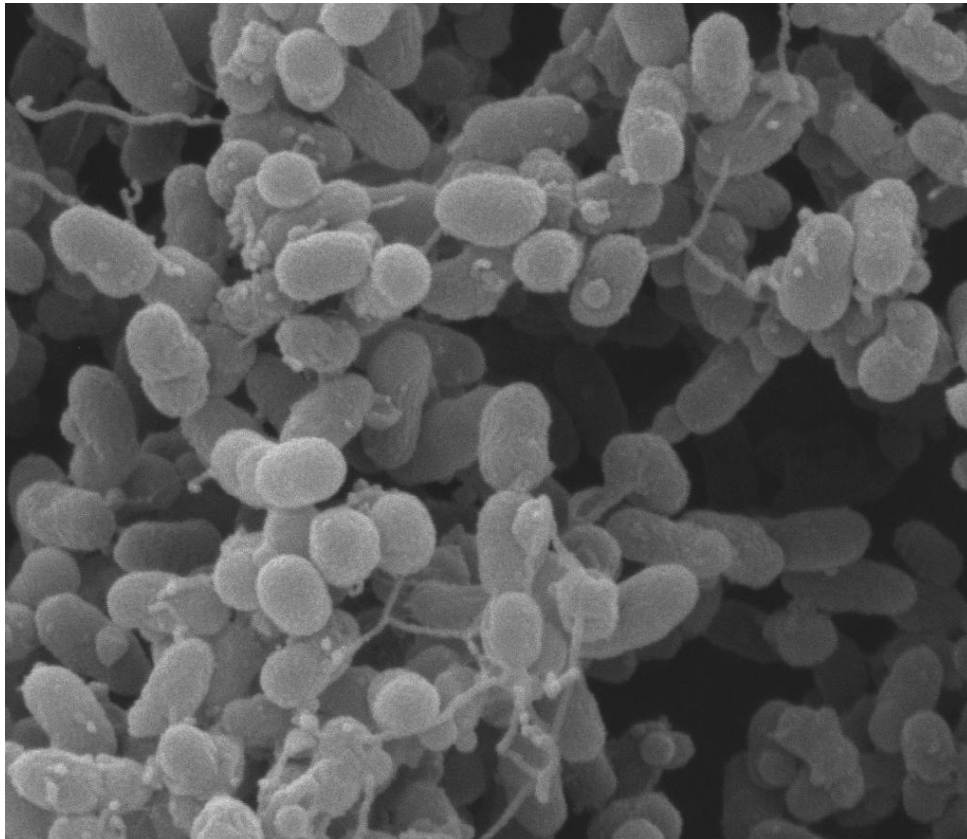
La combinación de las vacunas aquí ensayada permitió sortear una debilidad de las actuales vacunas que en general es poco analizada en las propuestas de nuevos candidatos vacunales. Esta debilidad refiere a la protección frente a aislamientos de *B. pertussis* representativos de la población bacteriana circulante. El mayor desafío a este respecto es inducir protección contra los aislamientos pertactina deficientes que hoy son prevalentes en las poblaciones vacunadas con vacuna aP comercial. En este trabajo hemos evidenciado que nuestra vacuna combinada tiene la capacidad de proteger contra la infección causada por aislamientos PRN deficientes contra los cuales ni la formulación aP individual ni la basada solo en OMVs en la dosis de $3\mu g$ logran inducir protección en el modelo animal. El empleo de una dosis de $3\mu g$ de OMVs en la vacuna combinada llevó a inducir protección contra el aislamiento local BpAR1630 deficiente en la expresión en PRN levemente mejor que lo detectado cuando se empleó una contracción de $0,75\mu g$ de OMVs. Esta pequeña diferencia entre las dos concentraciones no se observó para la cepa H 935, representativa del brote estadounidense del año 2012. Estos datos sugieren que la divergencia entre las cepas va más allá de la deficiencia en PRN. De hecho recientemente se ha reportado que los aislamientos clínicos modernos presentan una mayor capacidad de formación de biofilm respecto de las cepas de *B. pertussis* antiguos [110]. Sin embargo, resta realizar comparaciones entre los aislamientos modernos, aspecto que estamos abordando en nuestro laboratorio como así también la caracterización de otros aspectos fenotípicos como la actividad hemolítica entre otros.

Los hallazgos anteriormente descriptos para la combinación de vacunas aquí propuesto fueron obtenidos con la vacuna aP comercial de la farmacéutica Sanofi Pasteur. Esta formulación está constituida por cinco inmunógenos en las siguientes concentraciones PT (2,5µg), PRN (3µg), FHA (5µg), Fim 2 y 3 (5µg). En este trabajo nos preguntamos si estos hallazgos son extendibles a otras formulaciones aP comerciales. Es así que repetimos algunos ensayos con la vacuna aP Boostrix de Glaxo que contiene PT (8µg), PRN (2,5µg), FHA (8µg). Un dato importante que obtuvimos fue que la vacuna Boostrix individual en la dosis de 1/10 de la dosis humana, la capacidad protectora frente al aislamiento BpAr1630 fue significativamente mejor que la observada para la vacuna individual Adacel. Otro dato aún más importante aún fue la vacuna combinada mejora significativamente la protección contra el aislamiento BpAR1630, aislamiento que se muestra como un poco más resistente a la inmunidad inducida por vacunación que la cepa H935.

En suma, todos los resultados aquí presentados muestran que la formulación OMVP +aP que podríamos designar (OMV+a)P induce la respuesta inmune recomendada para hacer frente a las infecciones contra pertussis. Más aún, esta nueva formulación tiene la capacidad de hacer frente a las infecciones que las actuales formulaciones no pueden controlar, y lo logra manteniendo niveles de bioseguridad aceptados por los entes reguladores para las vacunas comerciales. La formulación (OMV+a)P se posiciona así por encima de las actuales formulaciones y de cara a la realización de los ensayos clínicos de no inferioridad.

Capítulo III

El cultivo en biofilm de *Bordetella pertussis* como fuente para la obtención de OMVs



El cultivo en biofilm de *Bordetella pertussis* como fuente para la obtención de OMVs

El diseño de un candidato vacunal novel contra pertussis se enfrenta al desafío de superar las debilidades de las vacunas existentes. Es así que la nueva generación de vacunas debe: ser más segura que las vacunas celulares; inducir un perfil de respuesta que sea mayormente Th1 y Th17, con proliferación de la población celular de memoria residente en tejidos; estar constituida por epítopes múltiples para minimizar la presión de selección que pueda ejercer sobre la población bacteriana circulante; tener capacidad de proteger contra la población bacteriana circulante; y ser biotecnológicamente fácil de producir para asegurar la accesibilidad de las mismas a toda la población. La Organización Mundial de la Salud además recomienda en el Anexo 6 de producción de vacunas contra pertussis que la cepa empleada para la obtención de vacunas debe estar caracterizada y debe tener un historial conocido(https://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/whole_cell_pertussis/Anexo%206%20whole%20cell%20pertussis.pdf?ua=1). En este marco, cuando estudiamos la posibilidad de emplear a las OMVs como candidato vacunal acelular novel decidimos producirlo a partir de una cepa de referencia *B. pertussis* Tohama fase I de la Colección de Instituto Pasteur de París (Francia), cuyo genoma estaba secuenciado y cuyas características geno y fenotípicas estaban muy estudiadas por distintos laboratorios. Esta cepa fue aislada en 1954 en Japón y ha sido empleada incluso para producir vacunas celulares y en la actualidad para obtener inmunógenos que constituyen las vacunas acelulares. De esta forma partíamos de un material cuya composición respondía a las premisas de multiepitope, de obtención relativamente sencilla y derivada de una cepa conocida. La pregunta que nos debíamos contestar entonces era si nuestro candidato era capaz de inducir el perfil de respuesta recomendado y de proteger contra la infección de *B. pertussis* en el modelo murino de desafío intranasal. Más aun debíamos demostrar que la formulación era biosegura. Como hemos comentado en este trabajo y publicado en otros [10,11,15,199] todos estos aspectos fueron superados por nuestro candidato vacunal logrando la prueba de concepto necesaria para seguir avanzando hacia etapas clínicas de desarrollo.

Respecto de la premisa sobre la capacidad de proteger frente a la población bacteriana circulante, nuestro grupo ha realizado experimentos que han mostrado que nuestro candidato

vacunal presenta la capacidad de proteger frente a aislamientos modernos con genotipo *ptxP3*, *prn2* y *ptxA1* [16]. Sin embargo, el desafío hoy se centra en generar protección contra los aislamientos que no expresan al antígeno vacunal pertactina. Nuestros hallazgos obtenidos hasta el momento han mostrado que, si bien la OMVs mejora la capacidad protectora respecto de la vacuna acelular comercial frente a estos aislamientos, dicha capacidad no llega a ser cercana a la observada para los aislamientos que expresan pertactina. En esta instancia de nuestro trabajo y como una estrategia alternativa a la presentada en el capítulo anterior nos preguntamos si para mejorar la capacidad protectora de las OMVs sería necesario producir las OMVs a partir de un aislamiento clínico incluso un aislamiento deficiente en la expresión de PRN y en caso de que la respuesta fuera afirmativa, la siguiente pregunta sería a partir de qué aislamiento lo haríamos. Ante este planteo nos surge inmediatamente la pregunta si esta selección de la cepa deberá hacerse frecuentemente ya que las bacterias siguen evolucionando con un cuello de botella representado por la vacunación [214,215]. En este contexto nos planteamos una estrategia alternativa que soslaye esta dificultad tratando de buscar características comunes entre los aislamientos clínicos y diferenciales a las cepas de referencia las cuales presentaron la debilidad en la protección. Una de estas características es su reciente contacto con el huésped. No hace muchos años nuestro grupo y el del Dr. Mills reportamos independientemente que las cepas de referencia son capaces de expresar ciertas proteínas detectadas en los aislamientos clínicos sólo cuando están vuelven a estar en contacto con el huésped [17,18]. Más aún, estas proteínas dejan de expresarse luego de varios repiques de la bacteria en condiciones laborales de cultivo. Podríamos entonces acercarnos al fenotipo propio de los aislamientos clínicos emulando el crecimiento de las bacterias *in vivo*. Una posibilidad sería el cultivo en biofilm recientemente detectado en el desarrollo *in vivo* de *B. pertussis* [20]. Esta condición de cultivo es además tentadora ya que se ha detectado que en esta condición se expresan proteínas que han sido propuestas como potenciales componentes de nuevas vacunas acelulares [22]. En este contexto, nos propusimos obtener y caracterizar a las OMVs derivadas de cultivos de *B. pertussis* en biofilm. Los resultados alcanzados se detallan a continuación.

Resultados

Evaluación de la presencia de vesículas de membrana en cultivos biofilm de *B. pertussis*

Como primera etapa de nuestro trabajo evaluamos la capacidad de formar biofilm bajo condiciones reproducidas en nuestro laboratorio. Teniendo en cuenta lo reportado por Arnal y colaboradores sobre la mayor producción de biofilm en aislamientos clínicos Argentinos [110] decidimos emplear un aislamiento clínico con genotipo *ptxP3*, *ptxA1*, *prn2* que expresa pertactina y que fue secuenciado y caracterizado por nuestro grupo [5]. A partir de este aislamiento, denominado BpAR106 evaluamos la capacidad de formar biofilm. Para determinar visualmente la capacidad de formación de biopelícula se utilizó el método descrito por Weiss-Muszkat et al. (2010) [216] con algunas modificaciones. Las bacterias desarrolladas en el medio de Bordet y Gengou fueron inoculadas en el medio líquido de Stainer Scholte suplementado con casaminoácidos el cual fue incubado con agitación hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento (20 h). La biomasa proveniente de este cultivo fue diluida hasta una $DO_{650nm}=0,6$ e inoculada en placas de petri. La formación de biofilm se detectó por la capacidad de formar una película en la interfaz aire-líquido. Se registró en forma fotográfica la formación de una película en la interfase aire-líquido, siendo más notoria a las 96 h de incubación (Figura 1 Cap. III). Se utilizaron como placas de control medio de cultivo sin inocular en todas las observaciones. Realizamos también observaciones al microscopio electrónico de barrido (Figura 1.III). Como puede observarse en la Figura 1 mientras que a las 24 h de incubación en las placas de Petri las bacterias se encuentran dispersas sobre la superficie (a las 96 h de cultivo se observan bacterias adheridas entre si formando una compleja arquitectura interna característica propia del crecimiento biofilm. A las 96 h se observan regiones donde las bacterias se apilan formando torres tridimensionales, separadas por surcos libres de bacterias (Figura 1.III).

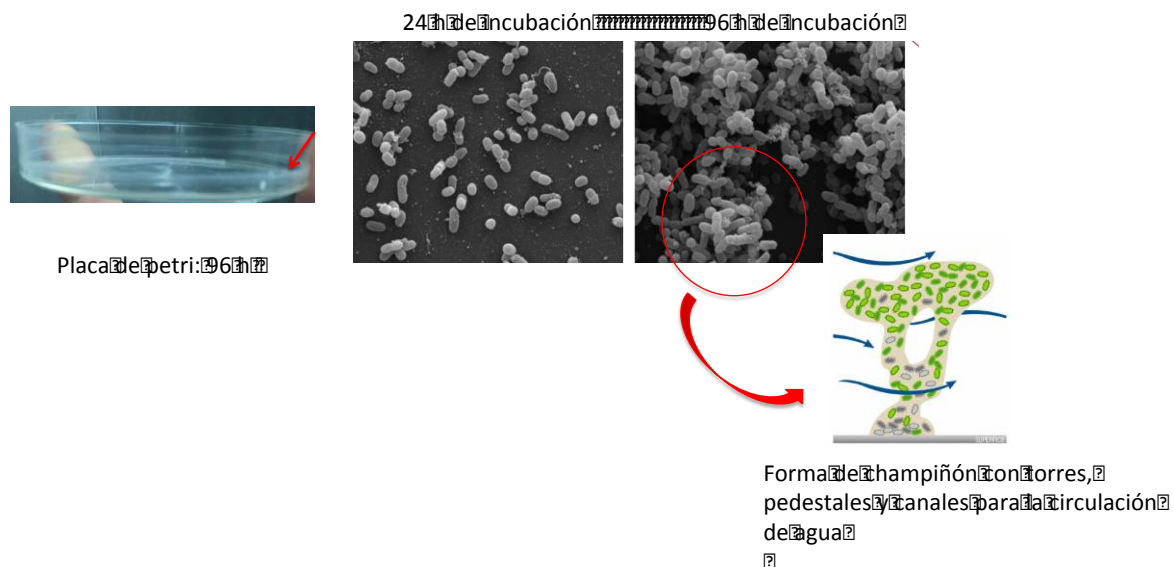


Figura 1.III: Crecimiento estático de *B. pertussis* BpAR106 en placas, microscopio de barrido con un aumento 24.000x y esquema de agregados bacterianos en forma de champiñón con torres.

Una vez que logramos evidenciar en nuestro laboratorio la formación de biofilm, nuestro siguiente objetivo fue detectar si en esta condición de cultivo, *B. pertussis* es capaz de liberar OMVs. Este aspecto nos pareció importante de ser evaluado ya que nos permitiría sumar características que muestran que estamos emulando condiciones de cultivo *in vivo* ya que se reportó que *B. pertussis* produce OMVs *in vivo* [217]. Si bien existen reportes sobre la presencia de vesículas de membranas en el biofilm de otras bacterias gram negativas [218,219], al momento nunca se estudió la producción de OMVs en biofilms de *B. pertussis*. Se ha reportado que en el contexto de biofilm para algunas bacterias, las OMVs ayudan a liberar componentes de la matriz extracelular, factores de crecimiento y exopolisacáridos, lo que permite reclutar bacterias y favorece la adhesión célula-célula [218,220]. En la Figura 2.III se muestra una foto de la microscopía de barrido y una ampliación donde se pueden visualizar claramente las vesículas de membrana externa.

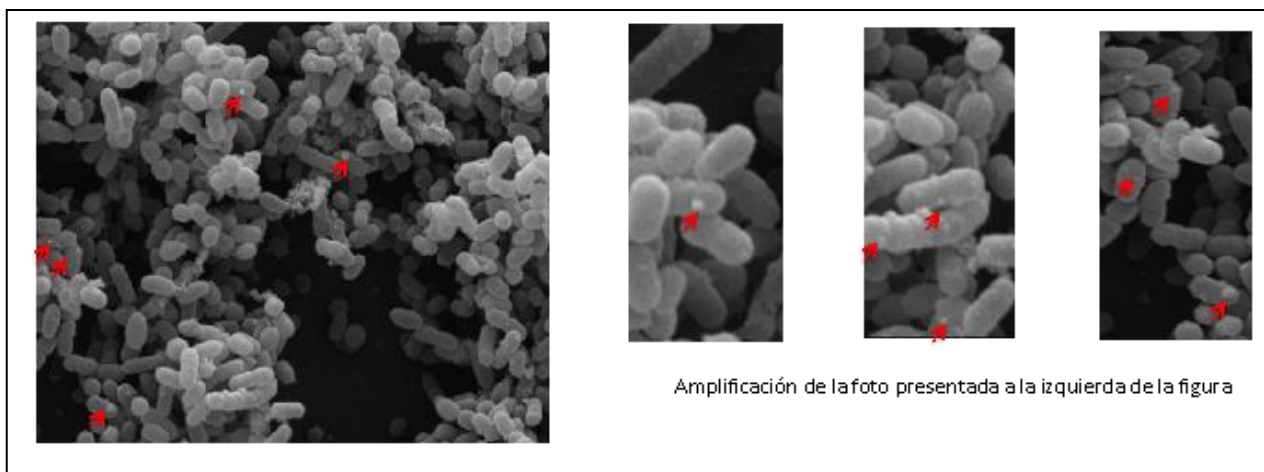


Figura 2.III. Microscopia de barrido de un cultivo en biofilm de *B. pertussis* BpAR106. Aumento 24.000 x. Las flechas rojas se utilizaron para marcar la presencia de OMVs

Realizamos luego un estudio de proteómica comparativa entre las proteínas totales de bacterias en biofilm vs las provenientes de un cultivo planctónico. Las muestras se obtuvieron a partir de 3 réplicas independientes. Las muestras de proteínas primeramente se redujeron con ditiotretitol (10mM en bicarbonato de amonio 50 mM) a 56 ° C durante 60 min y luego se alquilaron con iodoacetamida (20mM en bicarbonato de amonio 50 mM) a temperatura ambiente en la oscuridad. Las proteínas se precipitaron con 0,2 volúmenes de ácido tricloroacético a -20 ° C durante 2 h y luego se centrifugaron a 14 000 g durante 10 min. Los precipitados se lavaron tres veces con acetona a -20 ° C y a momento de pasarlos por el espectrómetro de masas se resuspendieron en bicarbonato de amonio 50mM y se digirieron con tripsina (Promega V5111). Los péptidos obtenidos se desalaron con columnas Zip-Tip C18 (Millipore) y finalmente las muestras de proteínas se analizaron mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento nanoflow (Thermo Scientific, modelo EASY-nLC 1000) con una columna EASY-Spray (P / N ES801, C18, 2µm, 100 Å, 50µm × 15 cm, número de serie: 10433446, temperatura 50 ° C, Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas Orbitrap cuadrupolo (Thermo Scientific, modelo Q-Exactive). El umbral para la selección de iones precursores fue de 10 000. El número de precursores seleccionados para la espectrometría de masas en tándem en cada ciclo de exploración fue de 15. Todo este procedimiento fue realizado por el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masas (CEQUIBIEM) de Universidad Nacional de Buenos Aires. Se empleó el software Andromeda MaxQuant (versión 1.5.3.30) para procesar los espectros

de masas e identificar los péptidos. Se realizaron búsquedas en toda la base para *Bordetella pertussis* (<https://www.uniprot.org/proteomes/UP000002676>, UniProt). La identificación de los péptidos se realizó con una tasa de descubrimiento falso (FDR) del 1%, y los péptidos también se asignaron a proteínas con un FDR del 1%. Para la primera búsqueda, se usó una tolerancia de masa de iones precursores de 20 ppm que permitió la recalibración de tiempo de retención m/z de iones precursores que luego se sometieron a una búsqueda principal en una tolerancia de masa de iones precursores de 4,5 ppm y un producto de tolerancia de masa iónica de 0.02 Da. Los parámetros de búsqueda incluyeron la oxidación de metionina como una modificación dinámica. Se usó un mínimo de dos péptidos únicos para identificar a una proteína. La cuantificación libre de marcas se realizó a través del módulo correspondiente que también se encuentra en MaxQuant (versión 1.5.3.30). Para el análisis estadístico y la visualización de las proteínas diferencias y comunes se empleó el software Perseus (versión 1.5.6.0, Instituto Max Planck, Alemania). La significación estadística de los cambios cuantitativos relativos entre las condiciones de crecimiento en biofilm vs cultivo planctónico se determinó mediante la prueba t de Student a un valor p de <0.05. El servicio de CEQUIBIEM incluye la presentación de los datos arrojados por el software Perseus. Para asignar una ubicación a cada proteína en las rutas respectivas se emplearon la Enciclopedia de Genes y Genomas (KEGG) y la versión 9.1 de STRING además de búsquedas proteína por proteína. En total se pudieron detectar 1144 proteínas de las cuales 402 resultaron ser diferenciales entre las dos condiciones de cultivo analizadas. De estas 402 proteínas, 316 estaban sobreexpresadas en la condición de cultivo en biofilm, y 86 sobreexpresadas en la condición de cultivo planctónico (Figura 3.III).

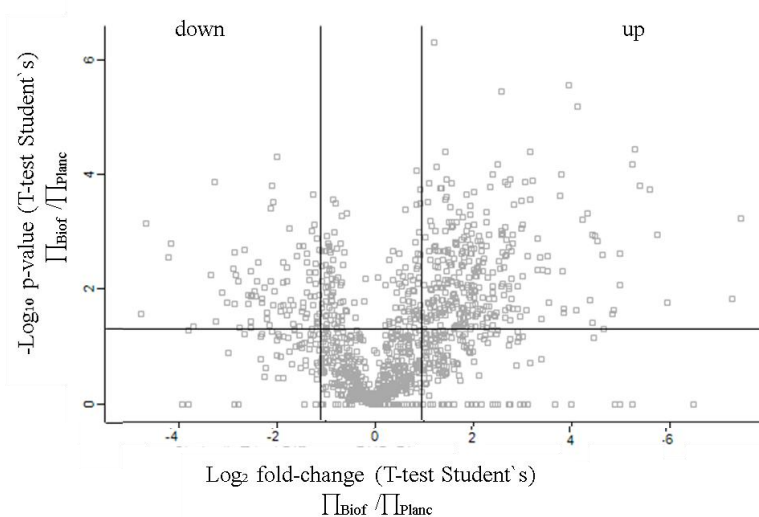


Figura 3.III: Volcano plot de las muestras proteicas provenientes de un cultivo biofilm y un cultivo planctónico del aislamiento Bp AR106. El $-\text{Log}_{10}$ del p -value asociado a la intensidad en el cambio de expresión de una determinada proteína entre el cultivo biofilm y planctónico se grafica en la ordenada al origen como función del \log_2 de dicho cambio (fold change). Las proteínas localizadas0 corresponden a las proteínas que mostraron igual expresión en ambas condiciones, ya que no tienen un p -value asociado.

Dentro de la lista de proteínas sobreexpresadas hemos detectado a BipA, Fimbria y otras adhesinas que fueron reportadas por otros autores como típicas de la condición de cultivo en biofilm [98,221], validando así nuestra metodología. La clasificación funcional de las proteínas utilizando base de datos de *B. pertussis* mostró que las proteínas involucradas en la envoltura celular, el metabolismo energético y síntesis de proteínas se up-regulan significativamente en las células de biofilm en comparación con las células planctónicas (Figura 4.III). Datos similares fueron reportados por de Gouw y colaboradores [21] y Dorji y colaboradores [222].

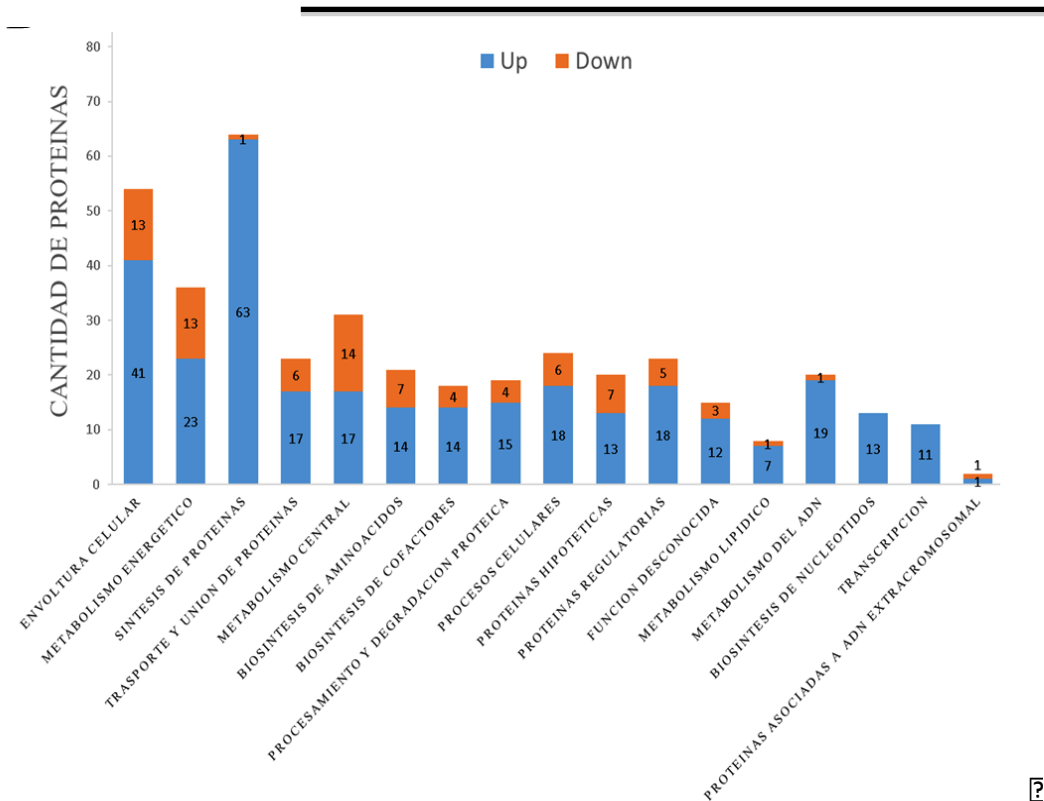


Figura 4.III: Resultados comparativo del análisis proteómico de muestras de proteínas totales del aislamiento Bp Ar106 cultivadas en biofilm sobre las cultivas en medio líquido (planctónico). Se incluyó un gráfico de barras comparando la cantidad de proteínas que se sobreexpresan (up, azul) y las que se expresan en menor medida (down, en naranja) en cultivo biofilm respecto el planctónico. El número de en las barras corresponde al número de proteínas que se agruparon en cada clasificación funcional.

Obtención y caracterización inmunogénica de las OMVs derivadas de *B. pertussis* AR106 cultivadas en biofilm

Habiendo logrado obtener biomasa de *B. pertussis* AR106 a partir de un cultivo en biofilm decidimos obtener OMVs a partir de la misma siguiendo el mismo protocolo que empleamos para obtener OMVs a partir de células obtenidas de un cultivo planctónico (Figura 5.III). De hecho, nuestro objetivo en esta etapa del trabajo de tesis fue obtener OMVs de ambas condiciones de cultivo de forma de realizar estudios comparativos.

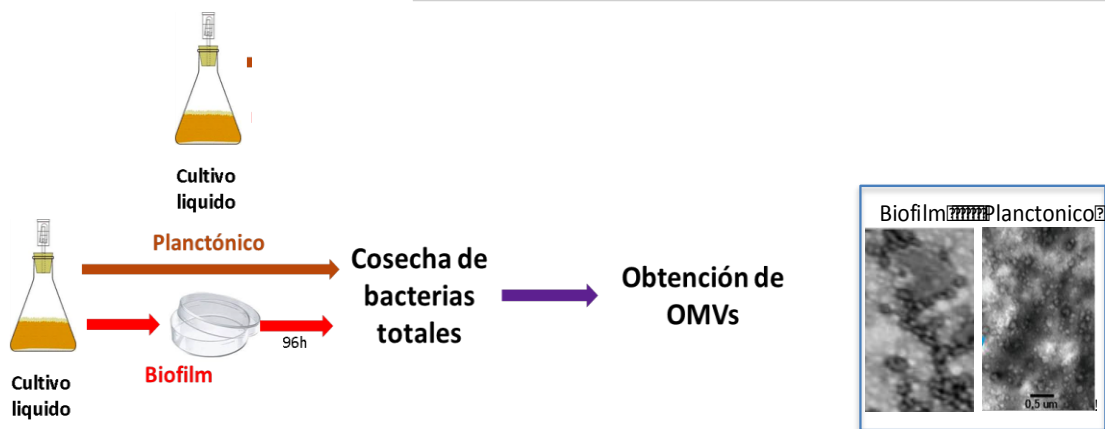
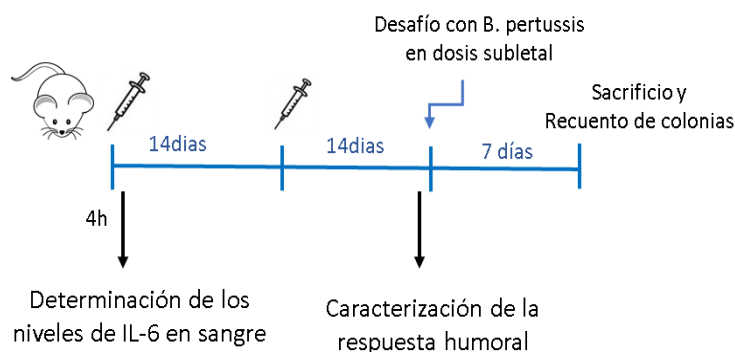


Figura 5.III: Esquema de obtención de biomasa de *B. pertussis* AR106 a partir de un cultivo en biofilm y planctónico. Obtención de OMVs y microscopía electrónica de transmisión. Las OMVs se visualizaron por tinción negativa.

Como puede observarse en la Figura 5.III los tamaños de las OMVs obtenidas de ambas condiciones de cultivos son similares. El tamaño varía entre 50 y 250nm. A partir de las OMVs aisladas procedimos a formularlas con adyuvante y con los toxoides tetánico y diftérico de la misma manera que lo hicimos para los ensayos del capítulo anterior. A partir de estas formulaciones realizamos el plan de inmunización que se muestra en el Esquema 1.III



Esquema 1.III: Protocolo de inmunización en el modelo murino de desafío intranasal con dosis subletales del agente causal *B. pertussis*. Se emplearon grupos de 4-5 hembras BALB/c de 3-4 semanas de edad (n=4-5). Para el desafío se empleó una suspensión bacteriana de *B. pertussis* en una concentración de $10^7 - 10^8$ UFC/40 μ l

Como nuestro objetivo era analizar si las OMVs obtenidas a partir de la biomasa obtenido de cultivo en biofilm (OMV_{BiofP}) superan la capacidad protectora de las formulaciones

conteniendo a las OMVs derivadas de bacterias obtenidas de cultivos planctónicos (OMV_{PlancP}) utilizamos la concentración de 0,75 µg ya que es una dosis en la que las estas últimas presentan una capacidad protectora debilitada. Como describimos en el capítulo anterior, para analizar la seguridad de la formulación OMV_{BiofP} evaluamos los niveles de la interleuquina proinflamatoria IL-6 en suero de los ratones inmunizados a 4 h de recibir la primera dosis. Con fines comparativos se incluyó un grupo de ratones inmunizados con la vacuna celular comercial (wP). También se empleó un grupo de ratones no inmunizados, los cuales fueron utilizados como control negativo. Los niveles de IL-6 (pg/mL) detectados se presentan en la Figura 5.III. Como puede observarse en esta figura, los niveles de IL-6 inducidos por la formulación OMV_{BiofP} resultaron levemente superiores a la OMV_{PlancP}, sin embargo, estos no son significativamente diferentes entre sí. Todos estos valores fueron además significativamente menores a los inducidos por la vacuna comercial wP ($p < 0,05$).

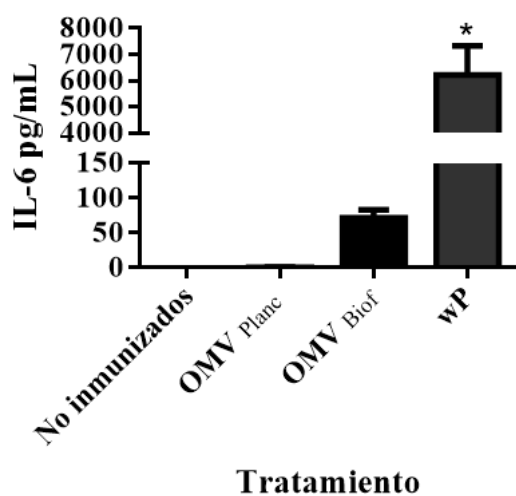


Figura 5.III. Niveles de IL-6 inducidos por formulaciones basadas en OMVs. Las determinaciones de IL-6 se realizaron en los sueros de los ratones a 4h de recibir la primera dosis de vacuna. Los niveles de IL-6 están expresados en pg/mL. Como control se empleó un grupo de ratones no inmunizados (control negativo). También se incluyó un grupo de ratones inmunizados con vacuna celular comercial (wP). * $p < 0,05$

La capacidad inmunogénica de las formulaciones se evaluó a través de determinaciones de los niveles de IgG anti *B. pertussis* inducidos luego de la segunda inmunización. También se evaluaron los niveles de IgG2a e IgG1. Los resultados alcanzados se presentan en la Tabla 1.III. Como puede observarse en la tabla el título de IgGtotales frente a un lisado de células enteras de BpAR106 para sueros de animales inmunizados con cualquiera de las formulaciones basadas en OMVs es superior al suero de animales sin inmunizar; sin embargo, sorprendentemente el suero

OMV_{Biof} es significativamente más alto que el obtenido en con la vacuna basada OMV_{planc}. (p<0,05).

Tabla 1.III: Título de IgG totales e isotipos inducidos por las formulaciones basadas en OMVs.

Tratamiento	IgG totales	IgG2a	IgG1	IgG2a/IgG1
OMV _{Biof} P	377,14± 14,55	272,2±12,09	249,4±83,7	1,10
OMV _{planc} P	175,2± 12,52	137,1±11,12	111,7±61,7	1,23
No inmunizados	18,5± 29,9	ND	ND	_____

Las titulaciones se realizaron mediante ensayos de ELISA a partir de los sueros obtenidos de los ratones inmunes a los 14 días de la última inmunización según el Esquema 2. II. Como control negativo se empleó un grupo de ratones sin inmunizar. Se realizaron al menos tres ensayos independientes. Los resultados presentados corresponden a un ensayo representativo. *p<0,05

Para avanzar en la caracterización de la respuesta inmune generada por estas vacunas estudiamos la avidéz de los sueros inmunes. Para ello realizamos titulaciones de IgG totales en presencia y ausencia de distintas concentraciones del agente caotrópico NH₄SCN. Como se muestra en la Figura 6.III tanto a bajas como altas concentraciones del agente caotrópico, los anticuerpos específicos inducidos OMV_{biof}P presentaron una mayor afinidad al antígeno. Las diferencias entre ambas formulaciones resultaron ser significativa para las concentraciones más altas ensayadas para el agente caotrópico (66,6%±7,1 vs 52,3%±6,6, respectivamente, p<0,05).

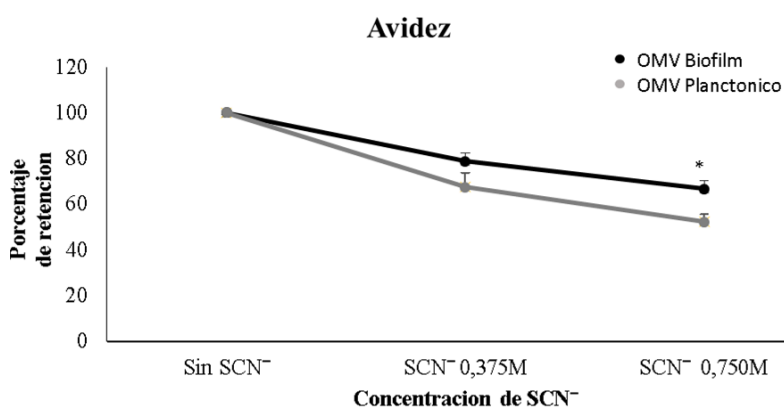


Figura 6.III: Medida de la avidéz de los sueros provenientes de la inmunización de las vacunas basadas en OMVs. Grupos de 4 ratones Balb/c fueron inmunizados con OMV_{Biof} P o OMV_{planc}P. Las determinaciones se realizaron a 14 días luego de la última inmunización. Se representa como porcentajes de anticuerpos específicos retenido después del tratamiento con concentraciones crecientes de tiocianato de amonio (NH₄SCN).

Al analizar el perfil de reconocimiento de los sueros inmunes frente a un lisado de proteínas de BpAr106 separadas en geles SDS-PAGE, observamos que los patrones de reconocimiento inducidos por ambos sueros son diferentes (Figura 7.III). Cuando se enfrenta el suero inducido por las OMV_{biof}P

a un lisado de esta bacteria proveniente de un cultivo biofilm o de un cultivo planctónico, se detecta un perfil de reconocimiento más complejo más complejo que el detectado cuando dichos lisados proteicos son enfrentados a sueros inducidos por las OMV_{plancP}. Como se esperaba, el reconocimiento de los sueros de animales naive fue nulo (dato nos mostrado). Estos resultados indicarían una presentación antigénica más eficiente por parte de las OMVs derivadas de las bacterias cultivadas en biofilm.

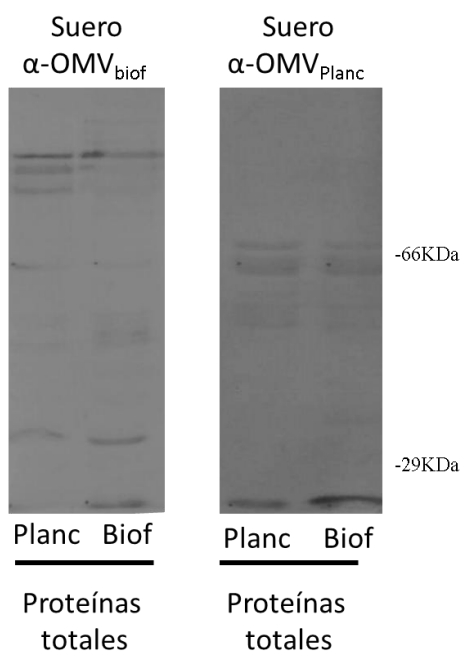


Figura 7.III: Immunoblotting frente a proteínas totales de *Bordetella pertussis* BpAr106 empleando sueros inmunes. Las proteínas provenientes de bacterias cultivadas en biofilm y condiciones planctónicas fueron separadas en geles desnaturalizantes SDS-PAGE 12,5% p/v. Las proteínas transferidas a membranas PVDF fueron incubadas con sueros obtenidos de los ratones inmunizados OMV_{Biof}P o OMV_{Planc}P.

Evaluación de la capacidad protectora de las formulaciones basadas en OMVs provenientes del cultivo en biofilm de BpAR106

Habiendo verificado que las formulaciones basadas en OMVs derivadas de cultivos de *B. pertussis* en biofilm resultó ser biosegura e inmunogénica procedimos a evaluar la capacidad protectora de las misma. Para ello aplicamos el protocolo de inmunización descrito más arriba (Esquema 1.III). En este ensayo que se repitió al menos 3 veces de manera independiente incluyó un grupo de ratones inmunizados OMV_{biof}P. Como control negativo de protección se incluyó un grupo de ratones no inmunizados. Con fines comparativos se incluyó un grupo de ratones

inmunizados con OMV_{plancP} . Para el desafío se empleó la cepa Bp AR 106. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8.III.

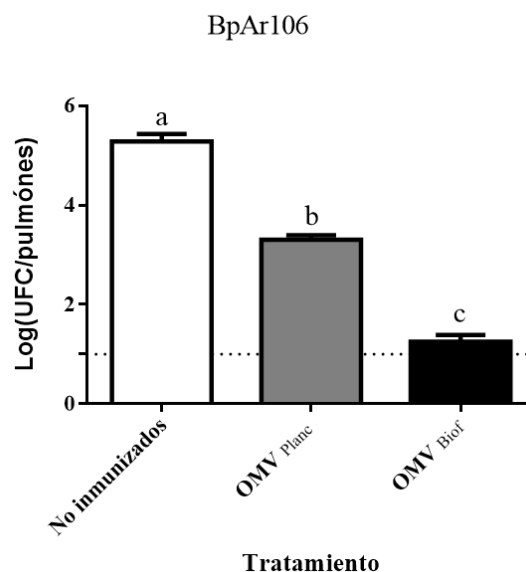


Figura 8.III: Capacidad protectora inducida por la vacuna basada en OMVs provenientes de *B. pertussis* cultivadas en biofilm. Grupos de 4 ratones BALB/c fueron inmunizados según el Esquema de trabajo 1.III con OMVs provenientes de un cultivo Biofilm (OMV_{biofP}), y otro grupo con OMVs provenientes de un cultivo planctónico (OMV_{plancP}). Para el desafío se empleó una dosis subletal del aislamiento BpAr106 (10^7 - 10^8 UFC). El número de bacterias recuperadas de los pulmones de los ratones de cada grupo expresado como el \log_{10} de UFC por pulmón \pm SEM, se representó en la ordenada al origen de la gráfica. Como control negativo se empleó un grupo de ratones sin inmunizar. Los resultados que se muestran se corresponden a los obtenidos en un experimento representativo. La línea horizontal punteada indica el límite de detección. Letras diferentes indican recuentos bacterianos significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Como se puede observar en la Figura 8.III, la cantidad de UFCs de BpAR106 recuperados de los pulmones de los ratones inmunizados son mucho menores que los recuperados de los pulmones no inmunizados ($p < 0,05$). Interesante para nosotros resultó la observación de que mientras para las OMVs derivadas del cultivo planctónico los niveles de UFCs recuperadas de los ratones inmunes se redujo en dos órdenes de magnitud respecto del grupo control no inmunes, los niveles de UFC para los ratones inmunizados con la formulación basada en OMVs obtenidas de bacterias cultivadas en biofilm resultó ser igual al límite de detección. Estos datos están de acuerdo con la hipótesis que nos planteamos respecto de mejorar la capacidad protectora de las OMVs emulando una condición de cultivo próxima a lo que ocurre *in vivo*. En base a estos resultados decidimos desafiar a nuestra formulación frente a infecciones causadas por bacterias deficientes en la expresión de PRN ya que como hemos descrito es una de las potenciales causas

del incremento de casos de pertussis. En particular realizamos experimentos de protección empleando a la cepa H935 ya que es el aislamiento deficiente en la expresión de PRN más caracterizado en el laboratorio por ser el primero con que contamos. Los resultados alcanzados se muestran en la Figura 9.III. Como puede observarse en dicha figura, las dos formulaciones basadas en OMVs aquí testeadas fueron capaces de disminuir la carga bacteriana en los pulmones de los ratones respecto de los niveles detectados para los ratones no inmunizados ($p < 0,05$). Sin embargo, la formulación basada en $OMV_{S_{biof}P}$ logra reducir la carga bacteriana hasta casi el límite de detección (10 UFC/pulmones).

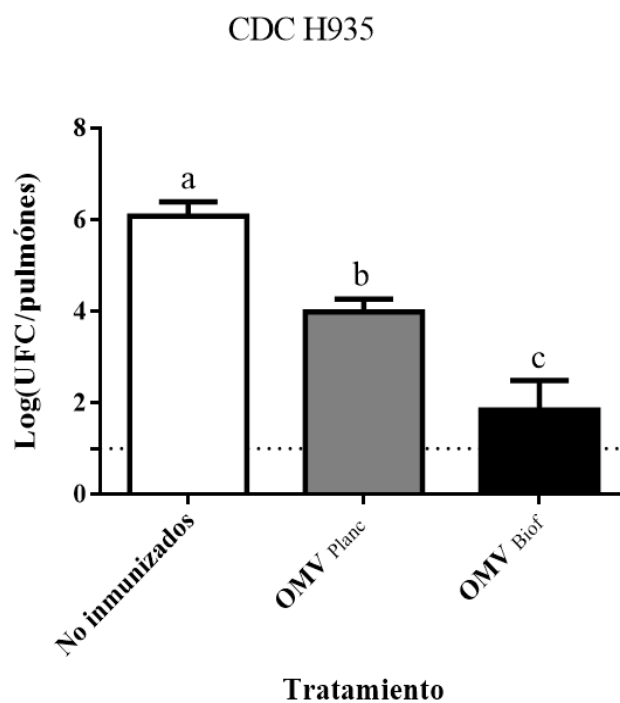


Figura 9.III: Capacidad protectora inducida por la vacuna basada en OMVs provenientes de un cultivo biofilm frente al aislamiento clínico deficiente en PRN BpH935. Grupos de 4 ratones BALB/c fueron inmunizados según el Esquema de trabajo 1.III con OMVs provenientes de un cultivo Biofilm ($OMV_{biof}P$), y otro grupo con OMVs provenientes de un cultivo planctónico ($OMV_{planc}P$). Para el desafío se empleó una dosis subletal del aislamiento deficiente en PRN Bp 935 (10^7 - 10^8 UFC). El número de bacterias recuperadas de los pulmones de los ratones de cada grupo expresado como el \log_{10} de UFC por pulmón \pm SEM, se representó en la ordenada al origen de la gráfica. Como control negativo se empleó un grupo de ratones sin inmunizar. Los resultados que se muestran se corresponden a los obtenidos en un experimento representativo. La línea horizontal punteada indica el límite de detección. Letras diferentes indican recuentos bacterianos significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Discusión

En este capítulo abordamos un tópico no estudiado en *Bordetella*. El mismo refiere a la detección y obtención de OMVs a partir de cultivos en biofilm de *B. pertussis*. Si bien la presencia de OMVs pudo ser detectada en la matriz extracelular de biofilms de distintas bacterias como *Helicobacter pylori* y *Pseudomonas aeruginosa* [218,219] en *B. pertussis* no fue investigado. Más aún el estudio de la formación de biofilm y su rol *in vivo* es relativamente reciente para *B. pertussis*. Los primeros estudios fueron realizado sobre la especie *B. bronchiseptica* [19,223] y luego los mismos se extendieron a *B. pertussis* [65,98]. El contexto global de resurgencia de coqueluche ha llevado a revalorizar este modo de vida bacteriano y se ha comenzado a estudiar su vinculación con la epidemiología actual. *In vivo* muchos patógenos adoptan esta forma de vida que les permite resistir al tratamiento con antibiótico y a las defensas del huésped, y así sobrevivir dentro del mismo [224]. Esta hipótesis no es ajena a *B. pertussis* [20,96,225].

Las evidencias sobre la formación de biofilm durante el transcurso de la infección de *B. pertussis* [19] y los datos sobre la divergencia fenotípica entre las bacterias recientemente aisladas del huésped respecto de las adaptadas al crecimiento en condiciones de laboratorio [17], nos llevó a plantearnos la posibilidad de mejorar la capacidad protectora de nuestro candidato vacunal frente a los aislamientos circulantes a través de la obtención del mismo en condiciones culturales que emulen condiciones de crecimiento *in vivo*. Nuestro planteo también fue sustentado por el hecho de que durante el cultivo en biofilm *B. pertussis* se expresan proteínas con potencialidad a ser incluidas en formulaciones vacunales [21,22].

Los experimentos aquí realizados permitieron detectar por primera vez OMVs en cultivos en biofilms de *B. pertussis*. Este hallazgo abre interrogantes sobre su mecanismo de formación y su rol dentro del mismo biofilm y dentro de la formación de biofilm *in vivo*. Aunque interesantes estos tópicos, los mismos no fueron abordados durante mi trabajo de tesis ya que como he comentado más arriba, nuestro objetivo estaba focalizado a obtener OMVs para mejorar su capacidad protectora. Los estudios de proteómica comparativa nos indicaron que las bacterias a partir de las cuales íbamos a obtener las OMVs contenían las proteínas típicas de esta condición de cultivo [21,221,226]. Fue a partir de estas OMVs que realizamos ensayos comparativos con las OMVs obtenidas a partir de bacterias crecidas en condiciones planctónicas. Interesantemente las

OMVs derivadas de cultivos en biofilm se mostraron más inmunogénicas no sólo en términos de títulos de anticuerpos específicos sino a la calidad de los mismos. Más aún la formulación en base a estas OMVs mostro mantener la inducción de un perfil Th1 y Th2 mixto según la relación IgG2a/IgG1 detectada. Este dato estaría en acuerdo con los reportados por de Gouw *et al* (2014) [21] quienes ensayaron formulaciones vacunales conteniendo proteínas propios del cultivo en biofilm.

Más interesantes aún fueron los resultados de protección detectados para la formulación OMV_{biofP}, los cuales se acercaron al límite de detección no sólo para la cepa BpAR106 sino también para la cepa deficiente en la expresión de PRN BpH935. Estos hallazgos son por demás alentadores en términos de lograr superar el efecto en la protección que ocasiona la divergencia entre aislamientos y cepas vacunales, e incluso entre las mismas bacterias circulantes. Hemos formulado una vacuna no recae en una suma de inmunógenos diferentes que abarquen muchos aislamientos, sino que nos aprovechamos una característica *in vivo* que es común a todos los aislamientos, esto es el crecimiento en biofilm. Sin dudas todos estos datos posicionan a las OMV_{biofP} para superar a las debilidades de las actuales vacunas comerciales, todas ellas hoy formuladas a partir inmunógenos provenientes de cultivos planctónicos los cuales no necesariamente reflejan la composición del patógeno durante la infección *in vivo*.

Discusión final y Conclusiones

Discusión final y Conclusiones

Las vacunas se consideran una de las historias de éxito más impresionantes de la medicina. El uso masivo de las mismas ha permitido reducir notablemente y en algunos casos eliminar (polio, tétanos neonatal, rubeola congénita en la región de las Américas) o erradicar enfermedades (viruela, dos de los tres virus de la polio) de gran impacto sobre la salud de la población. El éxito de muchas de las vacunas disponibles en la actualidad se basa en su capacidad para inducir anticuerpos que bloquean o neutralizan a los agentes infecciosos o sus productos (Plotkin's Vaccines Séptima edición, <https://www.elsevier.com/books/T/A/9780323357616>). Sin embargo, para varias enfermedades infecciosas la protección mediada por anticuerpos no resulta suficiente, sino que también se requiere la inducción de la inmunidad celular. Los avances han sido muy significativos en vacunología, pero todavía quedan patologías con impacto epidemiológico para las cuales no existen desarrollos efectivos (HIV, Ebola, Malaria y ahora COVID-19). También existen patologías para las que existen vacunas, pero las mismas deben ser mejoradas ya que la enfermedad ha resurgido. Un ejemplo ello es justamente pertussis, enfermedad respiratoria aguda inmunoprevenible que ha incrementado su número de casos en muchos países incluidos los industrializados con alta cobertura de vacunación [1,227]. Diseñar una nueva vacuna contra pertussis se enfrenta no sólo a los obstáculos que tiene todo nuevo desarrollo sino también a la necesidad de superar a las actuales vacunas en uso y a diseñar ensayos clínicos en poblaciones para los que la vacunación ya está indicada.

El grupo de investigación al que me incorporé para realizar mi trabajo de tesis doctoral es justamente uno de los grupos que ha tomado como línea de investigación el desarrollo de una nueva vacuna contra pertussis. Luego de varios años de investigación y experimentación el grupo que dirige la Dra Hozbor logró superar con éxito la primera etapa del desarrollo de vacunas. De hecho los resultados alcanzados sobre el candidato vacunal propuesto basado en vesículas de membrana externa derivadas de *B. pertussis* ha sido sujeto de una presentación de una patente que fue otorgada en Estados Unidos (<https://patents.google.com/patent/US9623102B2/en>) y la publicación de varios artículos científicos en revistas de la especialidad [9-11,15,16,228]. En esta etapa del desarrollo nos planteamos diseñar diferentes estrategias para posicionar más sólidamente a nuestro candidato vacunal de cara a los ensayos clínicos. Estas estrategias buscaron por un lado

sortear las debilidades de las actuales vacunas acelulares comerciales en lo que refiere a: 1- su composición de pocos inmunógenos en altas concentraciones que estaría ejerciendo una fuerte presión de selección en la población bacteriana circulante haciendo prevalecer bacterias más resistentes a la inmunidad conferidas por las vacunas; 2- la inducción de la respuesta inmune con un perfil mayormente del tipo Th2 de corta duración que lleva más rápidamente al estado de susceptible favoreciendo la circulación de la enfermedad; y 3- su reducida capacidad para inducir protección contra las infecciones producidas por cepas de *B. pertussis* deficientes en la expresión del antígeno vacunal pertactina. Por otro y de cara a posibles ensayos clínicos nos propusimos trabajar con formulaciones que permitan sortear aspectos éticos que surgirían al emplear un grupo control que recibiría un placebo negándoles su derecho a vacunarse. Es por ello que pensamos sobre diseños de ensayos clínicos de no inferioridad para contrastar resultados sobre una población que reciba vacunación sin negarle su derecho. Es así que decidimos analizar la posibilidad de combinar a las OMVs derivadas de *B. pertussis* Tohama fase I con las vacunas acelulares comerciales de forma de poder incluir en los ensayos clínicos grupos que serían vacunados con la vacuna acelular utilizada como base de la formulación. El grupo problema se inmunizaría con la nueva formulación que incluye la combinación de vacunas antes mencionada. Esta idea de formular una vacuna combinada nos resultó interesante además porque estaría superando las debilidades mencionadas en el punto 1 y quizás las del punto 2. Los experimentos que aquí presentamos mostraron que la combinación de vacunas fue exitosa ya que no llevó a pérdidas de las propiedades positivas de las vacunas individuales. Más aún, la combinación de vacunas resultó benéfica en términos de direccionar la respuesta de la vacuna acelular comercial hacia el perfil recomendado para inducir protección es decir un perfil Th1 y Th17 además de Th2 [7]. El resultado inesperado y afortunado que obtuvimos fue el referido a la alta capacidad protectora detectada frente a infecciones causadas por aislamientos clínicos locales y extranjeros deficientes en la expresión del antígeno vacunal PRN. La capacidad protectora de la vacuna combinada superó al de las vacunas individuales. Este análisis que pudimos realizar gracias a contar con una colección de aislamientos de *B. pertussis* propia, nos permite posicionar de manera robusta a este candidato vacunal acelular multiepitope combinado de cara a los ensayos clínicos.

La problemática del potencial efecto en la resurgencia de la enfermedad de la divergencia de la población bacteriana de *B. pertussis* circulante con las cepas empleadas en la producción de vacunas e incluso entre los mismos aislamientos actuales nos planteó la necesidad de diseñar una

estrategia que supere dicha divergencia para no caer en la selección de cepas representativas buscando una característica que sea común a todas ellas y que en lo posible presente características inmunogénicas superadoras. Una de las características que comparten todos los aislamientos de *B. pertussis* es el contacto del patógeno con el huésped. En este sentido recientemente se ha demostrado que en el huésped *B. pertussis* tiene la capacidad de formar biofilm [96,229]. Más interesante aún son datos que se han publicado sobre la expresión de proteínas propias del biofilm con capacidad inmunogénica [21,22]. Con estos antecedentes decidimos obtener vesículas de membrana externa de bacterias cultivadas en biofilm. Para ello empleamos un aislamiento clínico de *B. pertussis* local ya que se ha reportado que estos presentan mayor capacidad de formar biofilm [110]. Utilizando la plataforma de obtención y caracterización de OMVs de nuestro laboratorio logramos evidenciar que las OMVs provenientes de un cultivo en biofilm resultan más inmunogénicas y con mayor capacidad protectora que las obtenidas en de un cultivo planctónico de *B. pertussis*. Las OMVs derivadas de *B. pertussis* en biofilm logran inducir protección contra los aislamientos de *B. pertussis* deficientes en PRN a niveles próximos al límite de detección de la metodología empleada aún para una dosis de OMVs que resultó ser muy poco eficaz cuando se la obtuvo de cultivos planctónicos y se la empleó en el modelo de protección en ratones frente a cepas de *B. pertussis* PRN+ (trabajo anterior de mi grupo y Capítulo II de este trabajo de tesis). Los resultados alcanzados muestran por primera vez que una vacuna anti-pertussis formulada con componentes obtenidos de condiciones que emulan el proceso infeccioso *in vivo* generan una respuesta inmune superior a otra vacuna proveniente del cultivo planctónico, incluidas las vacunas comerciales. Estos resultados permiten suponer que las fallas en las vacunas actualmente en uso puedan deberse, al menos en parte, a que las mismas no contienen componentes de biofilm.

En suma, entendemos que los resultados aquí alcanzados logran posicionar al uso de las OMVs de *B. pertussis* en diferentes formatos ya sea en combinación con la vacuna acelular comercial como de forma individual obtenida a partir de un cultivo de *B. pertussis* en biofilm. Cualquiera de estas estrategias supera a las debilidades de las vacunas acelulares enunciadas al comienzo de esta sección. Podríamos incluso pensar en una formulación aún más superadora consistente en la combinación de OMVs derivada de cultivo en biofilm y las vacunas acelulares comerciales. No es menor resaltar aquí que los efectos benéficos detectados para la vacuna combinada son independientes de la formulación de vacuna acelular comercial empleada. Los

diseños sin dudas pueden continuar y de hecho estamos trabajando en ello pero queda claro que si no existen políticas de estado que impulsen activa y eficazmente la vinculación de los actores académicos con organismos de producción pública, estos diseños quedarán en las heladeras de las Universidades.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

Cepas y aislamientos clínicos de *B. pertussis* utilizados en este trabajo.

Las cepas y aislamientos clínicos de *Bordetella pertussis*, así como sus características genotípicas, se incluyen en la Tabla 1 Materiales y métodos.

Tabla 1: genotipos de los aislamientos utilizados en este trabajo

Aislamiento	Genotipo	Referencia
Bp Tohama fase I	<i>ptxP1, ptxA2, prn1</i>	[230]
Bp Ar106	<i>ptxP3, ptxA1, prn2</i>	[17]
Bp Ar1630	<i>ptxP3, ptxA1, prn2</i>	[25]
Bp H935	<i>ptxP3, ptxA1, prn2</i>	[146]

Genotipificación de los aislamientos clínicos de *B. pertussis*

La genotipificación de los alelos del promotor de la toxina pertussis (*ptxP*), el gen de la subunidad enzimática A (*ptxA*) de la toxina pertussis, y el alelo de los genes que codifican para las adhesinas *prn* y *fim 3* se realizaron según se describió previamente [173,231-238]. En resumen, los ADN molde requeridos para los ensayos de PCR se obtuvieron por centrifugación luego de una lisis bacteriana por calentamiento. La mezcla de reacción para todos los ensayos de PCR se prepararon para un volumen final de 20µl, y una concentración final de reactivos: Buffer 1X, dNTPs 0,5mM, Mg²⁺ 0,5mM primer 0,5mM. Para los diferentes ensayos de PCR se utilizaron distintos ciclos donde las condiciones de hibridación variaron entre 50°C y 60°C y los tiempos de elongación entre 30 segundos – 1 min dependiendo de los primers utilizados y de los tamaños de los fragmentos a amplificar. La temperatura de desnaturalización en todos los casos fue de 94°C. El número de ciclos empleados fue de 35, con excepción del ciclado utilizado para la genotipificación de la *ptxA* que solamente se realizaron 12 ciclos. Para detectar los fragmentos amplificados en los distintos ensayos de PCR se realizaron corridas electroforéticas en geles de agarosa al (1,5-2% p/v). En todos los casos la visualización de los productos amplificados se realizó con SyberSafe (Life technology 10.000X) utilizando un transiluminador, que permite contrastar el color del gel con el color de los fragmentos. En la Tabla 2 Materiales y métodos se encuentran los distintos primers empleados en cada caso.

Tabla 2 Materiales y métodos: primers empleados en los ensayos PCR para la genotipificación de los aislamientos de *Bordetella pertussis* recolectados en el periodo 2000-2017 en nuestra provincia.

Gen ⁺	Secuencia del primer 5' a 3'*	Referencias
<i>ptxP</i>	F: AATCGTCCTGCTCAACCGCC R: GGTATACGGTGGCGGGAGGA	[234,235]
<i>ptxA</i>	F: CCCCTGCCATGGTGTGATC R: TCAATTACCGGAGTTGGGCG	[236]
<i>prn</i>	F: CAATGTCACGGTCCAA R: GCAAGGTGATCGACAGGG	[233]
Inserción IS 481 en el gen <i>prn</i>	F: GGGCTGTTCCGCATGA R: CTGCGCATTGCCGTTGC	[25]
<i>fim3</i>	F: GACCTGATATTCTGATGCCG R: AAGGCTTGCCGGTTTTTTTTGG	[237]

⁺*ptxP*: promotor de la toxina pertussis; *ptxA*: subunidad A de la toxina pertussis; *prn*: pertactina; *fim3*: fimbria 3. * F: forward; R: reverse

Medios y condiciones de cultivo para *B. pertussis*

Los stocks bacterianos de *B. pertussis* se conservan como una suspensión en el medio sintético de Stainer-Scholte (SS) a – 20°C en presencia de glicerol 50 % v/v. A partir de estos stocks las cepas de *B. pertussis* utilizados se cultivaron a 37°C durante 72h en placas de Petri conteniendo el medio Bordet Gengou suplementado con sangre desfibrinada de carnero al 10% v/v (BGAS). Transcurridas las 72 horas del primer cultivo se efectúa un subcultivo en el mismo medio durante 24 horas. Para realizar el cultivo plantónico de *B. pertussis* la biomasa obtenida luego del repique de 24h fue utilizada como inóculo para el medio SS suplementado con casaminoácidos al 1%. Este

medio inoculado se incubó a 37°C con agitación a 160rpm hasta alcanzar una $DO_{650nm}=1,2$. Para los cultivos en biofilm se utilizó como biomasa el cultivo planctónico y como soporte abiótico placas de Petri. Estas placas de Petri fueron incubadas a 37°C en condiciones estáticas por 96h. La biomasa tanto de cultivo planctónico como en cultivo biofilm fue empleada para la obtención de vesículas de membrana externa (OMVs) como se describe a continuación.

Aislamiento OMVs

Para obtener las OMVs de las bacterias se siguió la metodología descrita en [152]. Brevemente la biomasa de *B. pertussis* obtenida tanto de cultivo planctónico como en biofilm fue resuspendida en una solución en una solución 20mM Tris-HCl, 2mM EDTA pH 8.5 (buffer TE). Esta suspensión es sonicada en un baño en agua fría por 15 minutos, transcurrido este tiempo las mismas son sometidas a varias centrifugaciones con el fin de eliminar restos bacterianos. Finalmente, el sobrenadante obtenido es ultracentrifugado a 100000xg a 4°C por 2h. El sedimento así obtenido se resuspende en buffer 20mM Tris-HCl.

Microscopia electrónica de transmisión – Tinción negativa

La microscopia electrónica de transmisión se lleva a cabo con una suspensión de OMVs en 0.1mM de Acetato de Amonio (pH7.0). Una gota de esta suspensión se coloca en una grilla cubierta de un film de carbono reforzado. Después de 30 segundos se remueve el exceso de líquido con un papel de filtro y la grilla es teñida con una solución del 2% (p/v) de Ácido Fosfotungstico pH 5.2 (con KOH). La observación se realiza con un Microscopio Jeol JEM 1200EX.

Microscopia electrónica de barrido

La biomasa obtenida en el cultivo biofilm fue fijada en el soporte abiótica mediante la adición de glutaraldehído 2,5%. Para la deshidratación se emplearon soluciones crecientes de alcohol que van desde el 20 al 100%. Para la observación, la muestra fue secada por la técnica de punto crítico y recubierta en oro. Este procedimiento fue realizado por el servicio de microscopia del Laboratorio de Investigaciones en Metalúrgica Física “Ing. Gregorio Cusminsky” (LIMF) de la Facultad de Ingeniería de la UNLP, el equipo utilizado para la observación fue el FEI Quanta 200.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford con el reactivo comercial (BioRad) según indicaciones del fabricante. Se utilizó sero-albúmina bovina (BSA por sus siglas en inglés) como proteína estándar.

Formulación de vacunas

La formulación de la vacuna se realizó como fue descrita por Asensio [9]. Como vacunas acelulares se emplearon la de la farmacéutica Sanofi cuya composición se destaca a composición: PT (2,5µg), FHA (5µg), PRN (3µg) y Fimbrias serotipo 2 y 3 (5µg) y fosfato de Aluminio como adyuvante (1, 5mg); sumado a esto esta vacuna contiene 2Lf del toxoide diftérico y 5Lf del tetánico. También se utilizó la vacuna acelular proveniente de la farmacéutica Glaxo Smith Kline cuya composición es PT (8µg), FHA (5µg) y PRN (2, 5µg), y una mezcla de hidróxido de aluminio (0,3mg) y fosfato de aluminio (0,2mg) como adyuvante; además posee 2,5Lf del toxoide diftérico y 5Lf del tetánico. Para algunos ensayos se empleó la vacuna celular proveniente del Serum institute of India LTD cuya composición es: 16UO del componente anti-pertussis (bacteria muerta por calor), 25Lf del toxoide diftérico y 5Lf de la toxina tetánica. Como adyuvante esta vacuna contiene 1,25mg de fosfato de aluminio.

Determinación de los niveles de Il-6 empleando sangre fresca humana

Para evaluar la bioseguridad de las formulaciones aquí testeadas se determinaron los niveles de la citoquina pro-inflamatoria IL-6 en ensayos que emplean sangre entera humana según el protocolo descrito en [155]. Brevemente este protocolo consiste en incubar 200ng de proteínas totales con sangre proveniente de dadores sanos. Los niveles de Il-6 se midieron en los sobrenadantes de las mezclas antes mencionadas empleando un kit comercial de ELISA y un equipo BD OptiEIA (BD Biosciences).

Ensayos en animales

Ensayos de protección utilizando el modelo desafío intranasal en ratones

Grupos de ratones Balb/c hembras de 3 a 4 semanas de edad provenientes de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP. Los protocolos empleados fueron aprobados por el comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL). Estos protocolos

consistieron en un plan de inmunización de 2 dosis por vía sistémica con un intervalo de 14 días entre ambas dosis. A los 14 días o 4 meses luego de la segunda inmunización los ratones fueron desafiados por vía intranasal con una suspensión subletal de *B. pertussis* (5×10^7 - 10^8 UFC/40 μ l). Para la evaluación de la capacidad protectora de las formulaciones a los 7 días después del desafío se realizaron recuentos de UFC de *B. pertussis* recuperadas de los pulmones de los ratones incluidos en cada ensayo. Los homogenados de pulmón fueron diluidos usando diluciones seriadas 1/10, las cuales fueron plaqueadas en medio BGAS por duplicado. Los recuentos se realizaron después de 3-4 días de incubación a 37°C. Con fines comparativos se incluyeron grupos de ratones inmunizados con las vacunas comerciales aP o wP. Como control negativo de protección se incluyeron grupo de ratones no inmunizados.

Estudio de la respuesta celular mediante la estimulación *ex-vivo* de esplenocitos

Los bazos de ratones provenientes de ratones inmunizados fueron utilizados para realizar los ensayos de estimulación *ex vivo*. Los bazos obtenidos fueron disgregados y homogenizados y las células que se obtuvieron fueron incubadas en placas 48 wells en un volumen final de 500 μ l/well de RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen) y 100 IU/ml de penicilina y 100 g/ml de estreptomina. Todas las muestras fueron estimuladas con 2,5 μ g/ml de OMVs provenientes de *B. pertussis* Tohama durante 72hs a 37°C y en una atmosfera de 5% CO₂. Como control negativo se emplearon células incubadas solas con medio de cultivo. Luego de transcurrido el tiempo, los sobrenadantes se recolectaron para la medida por ELISA de IFN- γ , IL-17 e IL-5 (BD Biosciences, San Diego, USA) según recomendaciones del fabricante.

Obtención de antisueros policlonales en ratones

Para los ensayos de inmunoblot y ELISA todos los ratones inmunizados en los estudios de protección o de respuesta celular fueron sangrados por la vena submandibular siguiendo protocolos aprobados por el CICUAL.

Cuantificación de anticuerpos en sueros policlonales por ELISA

Se sensibilizaron placas de ELISA fondo plano (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) con un lisado de *B. pertussis* Tohama fase I o BP AR106 en una concentración final de 3g/mL en buffer carbonato (pH: 9,5) a 4°C ON. Luego de la incubación las placas se bloquearon por 1h a 37°C con

una solución al 3% de leche descremada. Luego del lavado se incubo con la dilución seriada de las muestras de suero correspondiente por 1h a 37°C. El revelado se realizó incubando por 1h a 37°C un anticuerpo 2° proveniente de cabra anti ratón conjugado a peroxidasa de rabanito (HRP). Para la medida de IgG totales se utilizó una dilución 1/8000 (Invitrogen, USA), para IgG1 1/8000 y para IgG2a 1/1000 (ambos de Sigma, Aldrich). La densidad óptica fue medida a 492nm en un lector Titertek Multiskan de 340 wells (ICN, USA). El título de los sueros se obtuvo graficando la curva DO vs log de la recíproca de la dilución en el programa GraphPad Prism. Los títulos se expresan como la inversa de la dilución del punto de inflexión de la curva. Para los ensayos de Avidéz previo al revelado se realizó una incubación de 10 minutos a 37°C con el agente caotrópico tiocianato de amonio en 2 concentraciones distintas: 0,75M y 0,375M; la afinidad medida se expresa como porcentaje de retención en relación al tratamiento control (sin incubación con el agente caotrópico). Cada uno de estos ensayos se realizaron en al menos 3 réplicas independientes.

Determinación de perfil de reconocimiento de sueros inmunes

Obtención de proteínas totales

Las bacterias crecidas en medio sólido se resuspendieron de forma de obtener una suspensión de $DO_{650nm}=10$. Estas suspensiones bacterianas fueron luego tratadas con Buffer de Laemmli (Dodecil sulfato de sodio (SDS) 8% p/v, Glicerol 20% v/v, EDTA 0.004 M, Tris-HCl 0.2 M, PH6.8, 0.01 % de azul de bromofenol) con 5 % v/v β -mercaptoetanol. Antes de someterlas a corridas electroforética las muestras fueron calentadas a ebullición durante 15 minutos, centrifugadas y sonicadas en baño para una mejor resolución de las mismas en los geles.

Electroforesis unidimensionales en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las corridas electroforéticas se realizaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli. El gel de apilamiento o stacking se preparó en una concentración de 4 % de poliacrilamida (acrilamida: bisacrilamida 30:0.8) en buffer Tris-HCl 1M a pH 6.8 y SDS 10 % p/v, mientras que el gel de separación se preparó en una concentración de 10, 12.5 ó 15 % de poliacrilamida (acrilamida: bisacrilamida 30:0.8), con Tris-HCl 1M a pH 8.8 y SDS 10 %p/v. Las corridas se realizaron en equipos Miniprotean II (BioRad) durante 40 a 60 minutos a 110 volts utilizando como buffer de corrida Glicina 0.37 M, SDS 10 % p/v, Tris-HCl 0.05 M pH 8.3.

Inmunodetecciones de proteínas (Inmunoblot)

Las muestras de proteínas sometidas previamente a corridas electroforéticas fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinildieno (PVDF) (Immobilon, Millipore) utilizando el equipo Mini Trans-Blot transfer Cell (BioRad) según las indicaciones del fabricante. Las membranas transferidas fueron bloqueadas en sus sitios inespecíficos con las proteínas de leche descremada (San Regim) 5 % p/v en buffer TBS (Tris-HCl 12 mM, NaCl 4mM). Seguidamente la membrana se trató con el primer anticuerpo (suero policlonal obtenido en ratones inmunizados como se explica a continuación) en una dilución 1/500 en buffer TBS - leche 5 % p/v. Luego de esto la membrana con el anticuerpo se incubó ON a 4°C y con agitación suave. Se retiró la solución con el anticuerpo y se realizaron 6 lavados con buffer TBS- leche 5 % p/v. Posteriormente se agregó el segundo anticuerpo específico para IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) disuelto en TBS-leche en una dilución 1/3000; se incubó durante 2.5 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Se retiró la solución del segundo anticuerpo y se realizaron tres lavados con TBS y un lavado en buffer para fosfatasa alcalina (PA: 50 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 9.5). Finalmente, en el momento del revelado se preparó una solución con el sustrato de la fosfatasa alcalina que consistió en 4,4 l de NBT (Nitroblue Tetrazolium Chloride) y 3,3 l de BCIP (5-Bromo-4- Chloro-3-indolylphosphate p-toluidine) en 1ml de buffer PA. Una vez que se desarrolló color se detuvo la reacción con agua bidestilada.

Tinción Coomassie Blue R-250

Una vez finalizada la transferencia, los geles se tiñeron con Coomassie Blue R-250 para control de carga proteica. Para esta tinción el gel se incubó en solución de tinción (0.2% Coomassie Blue R-250 disuelto en agua bidestilada/metanol/ácido acético 45/45/10) por al menos 1 hora. Para la visualización de las bandas el gel se destiñó en una solución 50% agua bidestilada, 40% metanol y 10 % ácido acético, hasta lograr la coloración deseada.

Estudio de proteomica comparativa entre muestras obtenidas de cultivo planctónico y biofilm

Para este estudio se siguió la metodología descrita en [239]. Resumidamente, se emplearon de 3 réplicas biológicas de un lisado bacteriano proveniente de un cultivo en biofilm del aislamiento

BpAR106, y otras 3 de un cultivo planctónico. Para la obtención de las muestras se partió de una suspensión bacteriana de $DO_{605nm}=20$ que luego fue sometida a una ruptura empleando un equipo de Rybolizer Precellys. Luego de eliminar los restos celulares se procedió a una precipitación con Ácido tricloro acético al 100% 4°C ON. Los sedimentos obtenidos de esta precipitación fueron resuspendidos en bicarbonato de amonio 50 mM y tratados con tripsina (Promega V5111). Las muestras tripsinizadas fueron desalinizadas con columnas Zip-Tip C18 (Millipore) e inyectadas en un Nanoflow Ultrahigh-performance Liquid Chromatography (Thermo Scientific, modelo EASYnLC 1000) con una columna Easy-spray (P/N ES801, C18, 2 μ m, 100 Å, 50 μ m \times 15 cm, número de serie: 10433446, temperatura 50 °C, Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas Orbitrap cuádruple (Thermo Scientific, model Q-Exactive). El umbral para la selección de precursores de iones fue 10.000. El número de precursores elegido en cada ciclo de scaneo fue de 15, y la ventana de masa aceptada para esta selección fue de 1.6 m/z. La energía de colisión se normalizó en 27. Estos análisis se realizaron en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM), de la Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA).

Para el análisis de los espectros de masas y la identificación de los péptidos se utilizó el software Max Quant (versión 1.5.3.30). La búsqueda se realizó empleando la información sobre las secuencias genómicas de *B. pertussis* presentes en la base de datos Uni-Prot. La identificación de los péptidos se realizó con un rango de falsedad (FDR del inglés) del 1% y los péptidos así seleccionados fueron vinculados a una proteína con un FDR también del 1%. Los parámetros de búsqueda admitían hasta 2 cortes erróneos con tripsina/P en la secuencia y oxidación de la metionina. En la identificación de las proteínas se usó un mínimo de 2 péptidos; la cuantificación de proteínas sin marca se realizó según lo hallado con el software MaxQuant (versión 1.5.3.30). Todas las réplicas biológicas de ambas condiciones de cultivo se incluyeron en el diseño experimental de la cuantificación del nivel de proteínas libres de marca (LFQ) y la normalización se realizó con filtros de FDR 0,01 y 0,05 para péptidos y proteínas respectivamente. Para el análisis estadístico se empleó el programa Perseus (versión 1.5.6.0, del instituto Max Planck de Alemania). La significancia de los cambios entre el crecimiento en biofilm y planctónico se determinó con el test de Student con un valor p de <0.05 .

Análisis estadístico

Los datos correspondientes a la media y desviaciones estándares de los recuentos de UFC/pulmón de ratón, de los distintos tratamientos, fueron transformados a Log10 (UFC). Las diferencias entre Log10(UFC) de las medias entre los distintos grupos fueron analizadas mediante Test de ONE WAY ANOVA. Se realizaron comparaciones a posteriori en las que se efectuaron comparaciones múltiples y se establecieron diferencias entre grupos mediante el test Bonferroni's Multiple Comparison. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Para la gráfica de resultados y el análisis estadístico de los datos se utilizó el software GraphPad Prism.

Referencias

Referencias

1. Tan T, Dalby T, Forsyth K, Halperin SA, Heininger U, et al. (2015) Pertussis Across the Globe: Recent Epidemiologic Trends From 2000 to 2013. *Pediatr Infect Dis J* 34: e222-232.
2. Falleiros Arlant LH, de Colsa A, Flores D, Brea J, Avila Agüero ML, et al. (2014) Pertussis in Latin America: epidemiology and control strategies. *Expert Rev Anti Infect Ther* 12: 1265-1275.
3. Abu-Raya B, Bettinger JA, Vanderkooi OG, Vaudry W, Halperin SA, et al. (2018) Burden of Children Hospitalized With Pertussis in Canada in the Acellular Pertussis Vaccine Era, 1999-2015. *J Pediatric Infect Dis Soc*.
4. Bertilone C, Wallace T, Selvey LA (2014) Finding the 'who' in whooping cough: vaccinated siblings are important pertussis sources in infants 6 months of age and under. *Commun Dis Intell Q Rep* 38: E195-200.
5. Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, et al. (2014) Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *MBio* 5: e01074.
6. Barkoff AM, Mertsola J, Pierard D, Dalby T, Hoegh SV, et al. (2019) Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates: evidence of increased circulation in Europe, 1998 to 2015. *Euro Surveill* 24.
7. Brummelman J, Wilk MM, Han WG, van Els CA, Mills KH (2015) Roads to the development of improved pertussis vaccines paved by immunology. *Pathog Dis* 73: ftv067.
8. Wilk MM, Borkner L, Misiak A, Curham L, Allen AC, et al. (2019) Immunization with whole cell but not acellular pertussis vaccines primes CD4 TRM cells that sustain protective immunity against nasal colonization with *Bordetella pertussis*. *Emerg Microbes Infect* 8: 169-185.
9. Asensio CJ, Gaillard ME, Moreno G, Bottero D, Zurita E, et al. (2011) Outer membrane vesicles obtained from *Bordetella pertussis* Tohama expressing the lipid A deacylase PagL as a novel acellular vaccine candidate. *Vaccine* 29: 1649-1656.
10. Bottero D, Gaillard ME, Zurita E, Moreno G, Martinez DS, et al. (2016) Characterization of the immune response induced by pertussis OMVs-based vaccine. *Vaccine* 34: 3303-3309.
11. Roberts R, Moreno G, Bottero D, Gaillard ME, Fingerhann M, et al. (2008) Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. *Vaccine* 26: 4639-4646.
12. Hozbor D (2019) New Pertussis Vaccines: A Need and a Challenge. *Adv Exp Med Biol* 1183: 115-126.
13. Ormazabal M, Bartel E, Gaillard ME, Bottero D, Errea A, et al. (2014) Characterization of the key antigenic components of pertussis vaccine based on outer membrane vesicles. *Vaccine* 32: 6084-6090.
14. Rumbo M, Hozbor D (2014) Development of improved pertussis vaccine. *Hum Vaccin Immunother* 10: 2450-2453.
15. Zurita ME, Wilk MM, Carriquiriborde F, Bartel E, Moreno G, et al. (2019) A Pertussis Outer Membrane Vesicle-Based Vaccine Induces Lung-Resident Memory CD4 T Cells and Protection Against *Bordetella pertussis*, Including Pertactin Deficient Strains. *Front Cell Infect Microbiol* 9: 125.

16. Gaillard ME, Bottero D, Errea A, Ormazabal M, Zurita ME, et al. (2014) Acellular pertussis vaccine based on outer membrane vesicles capable of conferring both long-lasting immunity and protection against different strain genotypes. *Vaccine* 32: 931-937.
17. Gaillard ME, Bottero D, Castuma CE, Basile LA, Hozbor D (2011) Laboratory adaptation of *Bordetella pertussis* is associated with the loss of type three secretion system functionality. *Infect Immun* 79: 3677-3682.
18. Fennelly NK, Sisti F, Higgins SC, Ross PJ, van der Heide H, et al. (2008) *Bordetella pertussis* expresses a functional type III secretion system that subverts protective innate and adaptive immune responses. *Infect Immun* 76: 1257-1266.
19. Cattelan N, Dubey P, Arnal L, Yantorno OM, Deora R (2016) *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog Dis* 74: ftv108.
20. Conover MS, Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Deora R (2010) The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Mol Microbiol* 77: 1439-1455.
21. de Gouw D, Serra DO, de Jonge MI, Hermans PW, Wessels HJ, et al. (2014) The vaccine potential of *Bordetella pertussis* biofilm-derived membrane proteins. *Emerg Microbes Infect* 3: e58.
22. Dorji D, Graham RM, Singh AK, Ramsay JP, Price P, et al. (2019) Immunogenicity and protective potential of *Bordetella pertussis* biofilm and its associated antigens in a murine model. *Cell Immunol* 337: 42-47.
23. Lam C, Octavia S, Ricafort L, Sintchenko V, Gilbert GL, et al. (2014) Rapid increase in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Australia. *Emerg Infect Dis* 20: 626-633.
24. Zeddeman A, van Gent M, Heuvelman CJ, van der Heide HG, Bart MJ, et al. (2014) Investigations into the emergence of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in six European countries, 1996 to 2012. *Euro Surveill* 19.
25. Carriquiriborde F, Regidor V, Aispuro PM, Magali G, Bartel E, et al. (2019) Rare Detection of *Bordetella pertussis* Pertactin-Deficient Strains in Argentina. *Emerg Infect Dis* 25: 2048-2054.
26. Cherry JD, Seaton BL (2012) Patterns of *Bordetella parapertussis* respiratory illnesses: 2008-2010. *Clin Infect Dis* 54: 534-537.
27. team CDIE (2019) Erratum: Who gives pertussis to infants? Source of infection for laboratory confirmed cases less than 12 months of age during an epidemic, Sydney, 2009. (Article originally published in *Commun Dis Intell Q Rep* 2010;34(2):116-21). *Commun Dis Intell* (2018) 43: 116.
28. Crowcroft NS, Pebody RG (2006) Recent developments in pertussis. *Lancet* 367: 1926-1936.
29. CDC: Amanda Faulkner MTS, MS; Pam Cassiday, MS; Maria Lucia Tondella, PhD, Jennifer Liang, DVM, MPVM (2010) Manual for the Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases 5th Edition. Chapter 10: Pertussis.
30. Mattoo S, Cherry JD (2005) Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* 18: 326-382.
31. Cherry JD (2005) The epidemiology of pertussis: a comparison of the epidemiology of the disease pertussis with the epidemiology of *Bordetella pertussis* infection. *Pediatrics* 115: 1422-1427.
32. Gilberg S, Njamkepo E, Du Chatelet IP, Partouche H, Gueirard P, et al. (2002) Evidence of *Bordetella pertussis* infection in adults presenting with persistent cough in a french area with very high whole-cell vaccine coverage. *J Infect Dis* 186: 415-418.

33. Craig R, Kunkel E, Crowcroft NS, Fitzpatrick MC, de Melker H, et al. (2020) Asymptomatic Infection and Transmission of Pertussis in Households: A Systematic Review. *Clin Infect Dis* 70: 152-161.
34. James D. Cherry PAB, Gerald S. Golden and David T. Karzon (1988) Report of the Task Force on Pertussis and Pertussis Immunization—1988. *American Academy of Pediatrics* 81.
35. Liang Y, Salim AM, Wu W, Kilgore PE (2016) Chao Yuanfang: Imperial Physician of the Sui Dynasty and an Early Pertussis Observer? *Open Forum Infect Dis* 3: ofw017.
36. Somerville RL, Grant CC, Grimwood K, Murdoch D, Graham D, et al. (2007) Infants hospitalised with pertussis: estimating the true disease burden. *J Paediatr Child Health* 43: 617-622.
37. Kuchar E, Karlikowska-Skwarnik M, Han S, Nitsch-Osuch A (2016) Pertussis: History of the Disease and Current Prevention Failure. *Adv Exp Med Biol* 934: 77-82.
38. Patrick G. Guilfoile HB (2010) Whooping Cough. Chelsea House Publications.
39. CDC: Atkinson W HJ, McIntyre L, Wolfe S, eds., 2008. (2008) *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. 10th ed. 2nd printing, ed Washington DC: Public Health Foundation.
40. Dauer CC *Public Health Reports* (1896-1970). Reported Whooping Cough Morbidity and Mortality in the United States Vol. 58, No. 17 pp.661-676.
41. Bottero D, Griffith MM, Lara C, Flores D, Pianciola L, et al. (2013) *Bordetella holmesii* in children suspected of pertussis in Argentina. *Epidemiol Infect* 141: 714-717.
42. Yih WK, Silva EA, Ida J, Harrington N, Lett SM, et al. (1999) *Bordetella holmesii*-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. *Emerg Infect Dis* 5: 441-443.
43. Tazato N, Handa Y, Nishijima M, Kigawa R, Sano C, et al. (2015) Three novel environmental *Bordetella* species isolated from the plaster wall surface of mural paintings in the Takamatsuzuka Tumulus, Nara, Japan: *Bordetella muralis* sp. nov., *Bordetella tumulicola* sp. nov. and *Bordetella tumbae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*.
44. Gerlach G, von Wintzingerode F, Middendorf B, Gross R (2001) Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Microbes Infect* 3: 61-72.
45. Altschul SF (1989) Evolutionary trees for the genus *Bordetella*. *J Bacteriol* 171: 1211-1213.
46. Arico B, Gross R, Smida J, Rappuoli R (1987) Evolutionary relationships in the genus *Bordetella*. *Mol Microbiol* 1: 301-308.
47. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, et al. (2003) Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet* 35: 32-40.
48. Musser JM, Hewlett EL, Pepler MS, Selander RK (1986) Genetic diversity and relationships in populations of *Bordetella* spp. *J Bacteriol* 166: 230-237.
49. Diavatopoulos DA, Cummings CA, Schouls LM, Brinig MM, Relman DA, et al. (2005) *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. *PLoS Pathog* 1: e45.
50. Diavatopoulos DA, Cummings CA, van der Heide HG, van Gent M, Liew S, et al. (2006) Characterization of a highly conserved island in the otherwise divergent *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* genomes. *J Bacteriol* 188: 8385-8394.
51. Lindquist SW, Weber DJ, Mangum ME, Hollis DG, Jordan J (1995) *Bordetella holmesii* sepsis in an asplenic adolescent. *Pediatr Infect Dis J* 14: 813-815.

52. Russell FM, Davis JM, Whipp MJ, Janssen PH, Ward PB, et al. (2001) Severe *Bordetella holmesii* infection in a previously healthy adolescent confirmed by gene sequence analysis. *Clin Infect Dis* 33: 129-130.
53. Shepard CW, Daneshvar MI, Kaiser RM, Ashford DA, Lonsway D, et al. (2004) *Bordetella holmesii* bacteremia: a newly recognized clinical entity among asplenic patients. *Clin Infect Dis* 38: 799-804.
54. Kersters K HK, Hertle A, Segers P, Lievens A, Siegmann O, De Ley J. (1984) *Bordetella avium* sp. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. *Int J Syst Bacteriol* 34: 56-70.
55. Vandamme P, Heyndrickx M, Vancanneyt M, Hoste B, De Vos P, et al. (1996) *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983. *Int J Syst Bacteriol* 46: 849-858.
56. Funke G, Hess T, von Graevenitz A, Vandamme P (1996) Characteristics of *Bordetella hinzii* strains isolated from a cystic fibrosis patient over a 3-year period. *J Clin Microbiol* 34: 966-969.
57. Arvand M, Feldhues R, Mieth M, Kraus T, Vandamme P (2004) Chronic cholangitis caused by *Bordetella hinzii* in a liver transplant recipient. *J Clin Microbiol* 42: 2335-2337.
58. Cookson BT, Vandamme P, Carlson LC, Larson AM, Sheffield JV, et al. (1994) Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, "*B. hinzii*". *J Clin Microbiol* 32: 2569-2571.
59. Coenye T, Goris J, Spilker T, Vandamme P, LiPuma JJ (2002) Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. *J Clin Microbiol* 40: 2062-2069.
60. von Wintzingerode F, Schattke A, Siddiqui RA, Rosick U, Gobel UB, et al. (2001) *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1257-1265.
61. Fry NK, Duncan J, Malnick H, Warner M, Smith AJ, et al. (2005) *Bordetella petrii* clinical isolate. *Emerg Infect Dis* 11: 1131-1133.
62. Ko KS, Peck KR, Oh WS, Lee NY, Lee JH, et al. (2005) New species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii* sp. nov., isolated from the purulent exudate of an epidermal cyst. *J Clin Microbiol* 43: 2516-2519.
63. Buboltz AM, Nicholson TL, Weyrich LS, Harvill ET (2009) Role of the type III secretion system in a hypervirulent lineage of *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* 77: 3969-3977.
64. Kozak NA, Mattoo S, Foreman-Wykert AK, Whitelegge JP, Miller JF (2005) Interactions between partner switcher orthologs BtrW and BtrV regulate type III secretion in *Bordetella*. *J Bacteriol* 187: 5665-5676.
65. Cattelan N, Yantorno OM, Deora R (2018) Structural Analysis of *Bordetella pertussis* Biofilms by Confocal Laser Scanning Microscopy. *Bio Protoc* 8.
66. Abramson T, Kedem H, Relman DA (2008) Modulation of the NF-kappaB pathway by *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *PLoS One* 3: e3825.
67. Inatsuka CS, Julio SM, Cotter PA (2005) *Bordetella* filamentous hemagglutinin plays a critical role in immunomodulation, suggesting a mechanism for host specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18578-18583.
68. Mills KH (2001) Immunity to *Bordetella pertussis*. *Microbes Infect* 3: 655-677.
69. van den Akker WM (1998) The filamentous hemagglutinin of *Bordetella parapertussis* is the major adhesin in the phase-dependent interaction with NCI-H292 human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 252: 128-133.

70. Albitar-Nehme S, Basheer SM, Njamkepo E, Brisson JR, Guiso N, et al. (2013) Comparison of lipopolysaccharide structures of *Bordetella pertussis* clinical isolates from pre- and post-vaccine era. *Carbohydr Res* 378: 56-62.
71. Ashworth LA, Irons LI, Dowsett AB (1982) Antigenic relationship between serotype-specific agglutinin and fimbriae of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 37: 1278-1281.
72. Gorringer AR, Vaughan TE (2014) *Bordetella pertussis* fimbriae (Fim): relevance for vaccines. *Expert Rev Vaccines* 13: 1205-1214.
73. Bassinet L, Gueirard P, Maitre B, Housset B, Gounon P, et al. (2000) Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 68: 1934-1941.
74. Cherry JD, Chang SJ, Klein D, Lee M, Barenkamp S, et al. (2004) Prevalence of antibody to *Bordetella pertussis* antigens in serum specimens obtained from 1793 adolescents and adults. *Clin Infect Dis* 39: 1715-1718.
75. Finn TM, Stevens LA (1995) Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol Microbiol* 16: 625-634.
76. van Gent M, Pierard D, Lauwers S, van der Heide HG, King AJ, et al. (2007) Characterization of *Bordetella pertussis* clinical isolates that do not express the tracheal colonization factor. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51: 149-154.
77. Askelof P, Rodmalm K, Wrangsell G, Larsson U, Svenson SB, et al. (1990) Protective immunogenicity of two synthetic peptides selected from the amino acid sequence of *Bordetella pertussis* toxin subunit S1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1347-1351.
78. Barry EM, Weiss AA, Ehrmann IE, Gray MC, Hewlett EL, et al. (1991) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *J Bacteriol* 173: 720-726.
79. Mattoo S, Foreman-Wykert AK, Cotter PA, Miller JF (2001) Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis. *Front Biosci* 6: E168-186.
80. Khelef N, Danve B, Quentin-Millet MJ, Guiso N (1993) *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*: two immunologically distinct species. *Infect Immun* 61: 486-490.
81. Pishko EJ, Betting DJ, Hutter CS, Harvill ET (2003) *Bordetella pertussis* acquires resistance to complement-mediated killing in vivo. *Infect Immun* 71: 4936-4942.
82. Brockmeier SL, Register KB, Magyar T, Lax AJ, Pullinger GD, et al. (2002) Role of the dermonecrotic toxin of *Bordetella bronchiseptica* in the pathogenesis of respiratory disease in swine. *Infect Immun* 70: 481-490.
83. Cundell DR, Kanthakumar K, Taylor GW, Goldman WE, Flak T, et al. (1994) Effect of tracheal cytotoxin from *Bordetella pertussis* on human neutrophil function in vitro. *Infect Immun* 62: 639-643.
84. Amano K, Fukushi K, Watanabe M (1990) Biochemical and immunological comparison of lipopolysaccharides from *Bordetella* species. *J Gen Microbiol* 136: 481-487.
85. Elder KD, Harvill ET (2004) Strain-dependent role of BrkA during *Bordetella pertussis* infection of the murine respiratory tract. *Infect Immun* 72: 5919-5924.
86. Stockbauer KE, Fuchslocher B, Miller JF, Cotter PA (2001) Identification and characterization of BipA, a *Bordetella Bvg*-intermediate phase protein. *Mol Microbiol* 39: 65-78.
87. Vergara-Irigaray N, Chavarri-Martinez A, Rodriguez-Cuesta J, Miller JF, Cotter PA, et al. (2005) Evaluation of the role of the *Bvg* intermediate phase in *Bordetella pertussis* during experimental respiratory infection. *Infect Immun* 73: 748-760.

88. Hot D, Antoine R, Renauld-Mongenie G, Caro V, Hennuy B, et al. (2003) Differential modulation of *Bordetella pertussis* virulence genes as evidenced by DNA microarray analysis. *Mol Genet Genomics* 269: 475-486.
89. Weiss AA, Melton AR, Walker KE, Andraos-Selim C, Meidl JJ (1989) Use of the promoter fusion transposon Tn5 lac to identify mutations in *Bordetella pertussis* vir-regulated genes. *Infect Immun* 57: 2674-2682.
90. Cotter PA, Miller JF (2000) Genetic analysis of the *Bordetella* infectious cycle. *Immunopharmacology* 48: 253-255.
91. Cotter PA, Jones AM (2003) Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol* 11: 367-373.
92. Merkel TJ, Boucher PE, Stibitz S, Grippe VK (2003) Analysis of bvgR expression in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 185: 6902-6912.
93. Vandebriel RJ, Hellwig SM, Vermeulen JP, Hoekman JH, Dormans JA, et al. (2003) Association of *Bordetella pertussis* with host immune cells in the mouse lung. *Microb Pathog* 35: 19-29.
94. Preston A (2005) *Bordetella pertussis*: the intersection of genomics and pathobiology. *CMAJ* 173: 55-62.
95. Irie Y, Mattoo S, Yuk MH (2004) The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol* 186: 5692-5698.
96. Serra DO, Conover MS, Arnal L, Sloan GP, Rodriguez ME, et al. (2011) FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One* 6: e28811.
97. Sugisaki K, Hanawa T, Yonezawa H, Osaki T, Fukutomi T, et al. (2013) Role of (p)ppGpp in biofilm formation and expression of filamentous structures in *Bordetella pertussis*. *Microbiology* 159: 1379-1389.
98. Cattelan N, Jennings-Gee J, Dubey P, Yantorno OM, Deora R (2017) Hyperbiofilm Formation by *Bordetella pertussis* Strains Correlates with Enhanced Virulence Traits. *Infect Immun* 85.
99. Cherry JD, Wendorf K, Bregman B, Lehman D, Nieves D, et al. (2018) An Observational Study of Severe Pertussis in 100 Infants \leq 120 Days of Age. *Pediatr Infect Dis J* 37: 202-205.
100. Mills KH, Gerdt V (2014) Mouse and pig models for studies of natural and vaccine-induced immunity to *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis* 209 Suppl 1: S16-19.
101. Saukkonen K, Cabellos C, Burroughs M, Prasad S, Tuomanen E (1991) Integrin-mediated localization of *Bordetella pertussis* within macrophages: role in pulmonary colonization. *J Exp Med* 173: 1143-1149.
102. Ishibashi Y, Relman DA, Nishikawa A (2001) Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and α 5 β 1 integrin. *Microb Pathog* 30: 279-288.
103. Everest P, Li J, Douce G, Charles I, De Azavedo J, et al. (1996) Role of the *Bordetella pertussis* P.69/pertactin protein and the P.69/pertactin RGD motif in the adherence to and invasion of mammalian cells. *Microbiology* 142 (Pt 11): 3261-3268.
104. Friedman RL, Nordensson K, Wilson L, Akporiaye ET, Yocum DE (1992) Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun* 60: 4578-4585.

105. Hellwig SM, Hazenbos WL, van de Winkel JG, Mooi FR (1999) Evidence for an intracellular niche for *Bordetella pertussis* in broncho-alveolar lavage cells of mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 26: 203-207.
106. Hazenbos WL, van den Berg BM, van't Wout JW, Mooi FR, van Furth R (1994) Virulence factors determine attachment and ingestion of nonopsonized and opsonized *Bordetella pertussis* by human monocytes. *Infect Immun* 62: 4818-4824.
107. Caffiero JH, Lamberti YA, Surmann K, Vecerek B, Rodriguez ME (2018) A *Bordetella pertussis* MgtC homolog plays a role in the intracellular survival. *PLoS One* 13: e0203204.
108. Valdez HA, Oviedo JM, Gorgojo JP, Lamberti Y, Rodriguez ME (2016) *Bordetella pertussis* modulates human macrophage defense gene expression. *Pathog Dis* 74.
109. Soane MC, Jackson A, Maskell D, Allen A, Keig P, et al. (2000) Interaction of *Bordetella pertussis* with human respiratory mucosa in vitro. *Respir Med* 94: 791-799.
110. Arnal L, Grunert T, Cattelan N, de Gouw D, Villalba MI, et al. (2015) *Bordetella pertussis* Isolates from Argentinean Whooping Cough Patients Display Enhanced Biofilm Formation Capacity Compared to Tohama I Reference Strain. *Front Microbiol* 6: 1352.
111. CDC: Tejpratap Tiwari MDTVMMDJMM (December 9, 2005) Recommended Antimicrobial Agents for the Treatment and Postexposure Prophylaxis of Pertussis, 2005 CDC Guidelines. 1-16.
112. Tozzi AE, Celentano LP, Ciofi degli Atti ML, Salmaso S (2005) Diagnosis and management of pertussis. *CMAJ* 172: 509-515.
113. Riffelmann M, Wirsing von Konig CH, Caro V, Guiso N, Pertussis PCRCG (2005) Nucleic Acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. *J Clin Microbiol* 43: 4925-4929.
114. Xing D, Wirsing von Konig CH, Newland P, Riffelmann M, Meade BD, et al. (2009) Characterization of reference materials for human antiserum to pertussis antigens by an international collaborative study. *Clin Vaccine Immunol* 16: 303-311.
115. Who (2014) Laboratory Manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis*/*Bordetella parapertussis* : update 2014
Immunization, Vaccines and Biologicals WHO/IVB/14.03.
116. Hoppe JE, Paulus T (1998) Comparison of three media for agar dilution susceptibility testing of *Bordetella pertussis* using six antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17: 391-393.
117. Tiwari T, Murphy TV, Moran J, National Immunization Program CDC (2005) Recommended antimicrobial agents for the treatment and postexposure prophylaxis of pertussis: 2005 CDC Guidelines. *MMWR Recomm Rep* 54: 1-16.
118. Bergquist SO, Bernander S, Dahnsjo H, Sundelof B (1987) Erythromycin in the treatment of pertussis: a study of bacteriologic and clinical effects. *Pediatr Infect Dis J* 6: 458-461.
119. Aoyama T, Sunakawa K, Iwata S, Takeuchi Y, Fujii R (1996) Efficacy of short-term treatment of pertussis with clarithromycin and azithromycin. *J Pediatr* 129: 761-764.
120. Sauer LW (1948) Simultaneous immunization against diphtheria, tetanus and pertussis; a preliminary report. *Q Bull Northwest Univ Med Sch* 22: 281-285.
121. Kendrick PL (1942) Use of Alum-Treated Pertussis Vaccine, and of Alum-Precipitated Combined Pertussis Vaccine and Diphtheria Toxoid, for Active Immunization. *Am J Public Health Nations Health* 32: 615-626.
122. Romanus V, Jonsell R, Bergquist SO (1987) Pertussis in Sweden after the cessation of general immunization in 1979. *Pediatr Infect Dis J* 6: 364-371.
123. Kulenkampff M, Schwartzman JS, Wilson J (1974) Neurological complications of pertussis inoculation. *Arch Dis Child* 49: 46-49.

124. Sato Y, Kimura M, Fukumi H (1984) Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet* 1: 122-126.
125. McGirr A, Fisman DN (2015) Duration of pertussis immunity after DTaP immunization: a meta-analysis. *Pediatrics* 135: 331-343.
126. (WHO) WHO (1974) Expanded Programme on Immunization.
127. Trollfors B (1984) Bordetella pertussis whole cell vaccines--efficacy and toxicity. *Acta Paediatr Scand* 73: 417-425.
128. Fine PE, Clarkson JA (1987) Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. *Rev Infect Dis* 9: 866-883.
129. Jefferson T, Rudin M, DiPietrantonj C (2003) Systematic review of the effects of pertussis vaccines in children. *Vaccine* 21: 2003-2014.
130. Pillsbury A, Quinn HE, McIntyre PB (2014) Australian vaccine preventable disease epidemiological review series: pertussis, 2006-2012. *Commun Dis Intell Q Rep* 38: E179-194.
131. de Figueiredo A, Johnston IG, Smith DM, Agarwal S, Larson HJ, et al. (2016) Forecasted trends in vaccination coverage and correlations with socioeconomic factors: a global time-series analysis over 30 years. *Lancet Glob Health* 4: e726-735.
132. Baxter R, Bartlett J, Fireman B, Lewis E, Klein NP (2017) Effectiveness of Vaccination During Pregnancy to Prevent Infant Pertussis. *Pediatrics* 139.
133. Machado MB, Passos SD (2019) Severe Pertussis in Childhood: Update and Controversy - Systematic Review. *Rev Paul Pediatr* 37: 351-362.
134. Locht C (2007) Bordetella: Molecular Microbiology. Horizon Bioscience.
135. He Q, Mertsola J (2008) Factors contributing to pertussis resurgence. *Future Microbiol* 3: 329-339.
136. Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, van der Heide HG, Gaastra W, et al. (1998) Polymorphism in the Bordetella pertussis virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect Immun* 66: 670-675.
137. Ntezayabo B, De Serres G, Duval B (2003) Pertussis resurgence in Canada largely caused by a cohort effect. *Pediatr Infect Dis J* 22: 22-27.
138. van der Zee A, Vernooij S, Peeters M, van Embden J, Mooi FR (1996) Dynamics of the population structure of Bordetella pertussis as measured by IS1002-associated RFLP: comparison of pre- and post-vaccination strains and global distribution. *Microbiology* 142 (Pt 12): 3479-3485.
139. Mooi FR, van Loo IH, King AJ (2001) Adaptation of Bordetella pertussis to vaccination: a cause for its reemergence? *Emerg Infect Dis* 7: 526-528.
140. de Melker HE, Conyn-van Spaendonck MA, Rumke HC, van Wijngaarden JK, Mooi FR, et al. (1997) Pertussis in The Netherlands: an outbreak despite high levels of immunization with whole-cell vaccine. *Emerg Infect Dis* 3: 175-178.
141. Gzyl A, Augustynowicz E, van Loo I, Slusarczyk J (2001) Temporal nucleotide changes in pertactin and pertussis toxin genes in Bordetella pertussis strains isolated from clinical cases in Poland. *Vaccine* 20: 299-303.
142. Fingermann M, Fernandez J, Sisti F, Rodriguez ME, Gatti B, et al. (2006) Differences of circulating Bordetella pertussis population in Argentina from the strain used in vaccine production. *Vaccine* 24: 3513-3521.

143. Tsang RS, Lau AK, Sill ML, Halperin SA, Van Caesele P, et al. (2004) Polymorphisms of the fimbria fim3 gene of *Bordetella pertussis* strains isolated in Canada. *J Clin Microbiol* 42: 5364-5367.
144. Martin SW, Pawloski L, Williams M, Weening K, DeBolt C, et al. (2015) Pertactin-negative *Bordetella pertussis* strains: evidence for a possible selective advantage. *Clin Infect Dis* 60: 223-227.
145. Hegerle N, Paris AS, Brun D, Dore G, Njamkepo E, et al. (2012) Evolution of French *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* isolates: increase of *Bordetellae* not expressing pertactin. *Clin Microbiol Infect* 18: E340-346.
146. Pawloski LC, Queenan AM, Cassiday PK, Lynch AS, Harrison MJ, et al. (2014) Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clin Vaccine Immunol* 21: 119-125.
147. Bowden KE, Weigand MR, Peng Y, Cassiday PK, Sammons S, et al. (2016) Genome Structural Diversity among 31 *Bordetella pertussis* Isolates from Two Recent U.S. Whooping Cough Statewide Epidemics. *mSphere* 1.
148. Koepke R, Eickhoff JC, Ayele RA, Petit AB, Schauer SL, et al. (2014) Estimating the Effectiveness of Tdap Vaccine for Preventing Pertussis: Evidence of Rapidly Waning Immunity and Differences in Effectiveness by Tdap Brand. *J Infect Dis*.
149. McGirr A, Fisman DN (2015) Duration of Pertussis Immunity After DTaP Immunization: A Meta-analysis. *Pediatrics*.
150. Ross PJ, Sutton CE, Higgins S, Allen AC, Walsh K, et al. (2013) Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to *Bordetella pertussis*: towards the rational design of an improved acellular pertussis vaccine. *PLoS Pathog* 9: e1003264.
151. Plotkin SA (2014) The pertussis problem. *Clin Infect Dis* 58: 830-833.
152. Hozbor D, Rodriguez ME, Fernandez J, Lagares A, Guiso N, et al. (1999) Release of outer membrane vesicles from *Bordetella pertussis*. *Curr Microbiol* 38: 273-278.
153. Hozbor D, Fouque F, Guiso N (1999) Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res Microbiol* 150: 333-341.
154. Bottero D, Gaillard ME, Errea A, Moreno G, Zurita E, et al. (2013) Outer membrane vesicles derived from *Bordetella parapertussis* as an acellular vaccine against *Bordetella parapertussis* and *Bordetella pertussis* infection. *Vaccine* 31: 5262-5268.
155. Stoddard MB, Pinto V, Keiser PB, Zollinger W (2010) Evaluation of a whole-blood cytokine release assay for use in measuring endotoxin activity of group B *Neisseria meningitidis* vaccines made from lipid A acylation mutants. *Clin Vaccine Immunol* 17: 98-107.
156. Stern AM, Markel H (2005) The history of vaccines and immunization: familiar patterns, new challenges. *Health Aff (Millwood)* 24: 611-621.
157. Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Chen HL (2004) Survey of hepatitis B surface variant infection in children 15 years after a nationwide vaccination programme in Taiwan. *Gut* 53: 1499-1503.
158. Preston A (2016) The role of *B. pertussis* vaccine antigen gene variants in pertussis resurgence and possible consequences for vaccine development. *Hum Vaccin Immunother* 12: 1274-1276.
159. Xu Y, Liu B, Grondahl-Yli-Hannuksila K, Tan Y, Feng L, et al. (2015) Whole-genome sequencing reveals the effect of vaccination on the evolution of *Bordetella pertussis*. *Sci Rep* 5: 12888.
160. Mooi FR (2010) *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol* 10: 36-49.

161. Advani A, Gustafsson L, Ahren C, Mooi FR, Hallander HO (2011) Appearance of Fim3 and ptxP3-Bordetella pertussis strains, in two regions of Sweden with different vaccination programs. *Vaccine* 29: 3438-3442.
162. Kallonen T, Mertsola J, Mooi FR, He Q (2012) Rapid detection of the recently emerged Bordetella pertussis strains with the ptxP3 pertussis toxin promoter allele by real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 18: E377-379.
163. Hegerle N, Guiso N (2014) Bordetella pertussis and pertactin-deficient clinical isolates: lessons for pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines* 13: 1135-1146.
164. Bodilis H, Guiso N (2013) Virulence of pertactin-negative Bordetella pertussis isolates from infants, France. *Emerg Infect Dis* 19: 471-474.
165. Safarchi A, Octavia S, Luu LD, Tay CY, Sintchenko V, et al. (2015) Pertactin negative Bordetella pertussis demonstrates higher fitness under vaccine selection pressure in a mixed infection model. *Vaccine* 33: 6277-6281.
166. Safarchi A, Octavia S, Luu LD, Tay CY, Sintchenko V, et al. (2016) Better colonisation of newly emerged Bordetella pertussis in the co-infection mouse model study. *Vaccine* 34: 3967-3971.
167. Barkoff AM, Mertsola J, Pierard D, Dalby T, Hoegh SV, et al. (2018) Surveillance of Circulating Bordetella pertussis Strains in Europe during 1998 to 2015. *J Clin Microbiol* 56.
168. Bottero D, Gaillard ME, Basile LA, Fritz M, Hozbor DF (2012) Genotypic and phenotypic characterization of Bordetella pertussis strains used in different vaccine formulations in Latin America. *J Appl Microbiol* 112: 1266-1276.
169. van Gent M, van Loo IH, Heuvelman KJ, de Neeling AJ, Teunis P, et al. (2011) Studies on Prn variation in the mouse model and comparison with epidemiological data. *PLoS One* 6: e18014.
170. Polak M, Zasada AA, Mosiej E, Krysztopa-Grzybowska K, Witkowski L, et al. (2018) Pertactin-deficient Bordetella pertussis isolates in Poland-a country with whole-cell pertussis primary vaccination. *Microbes Infect*.
171. Quinlan T, Musser KA, Currenti SA, Zansky SM, Halse TA (2014) Pertactin-negative variants of Bordetella pertussis in New York State: a retrospective analysis, 2004-2013. *Mol Cell Probes* 28: 138-140.
172. Queenan AM, Cassiday PK, Evangelista A (2013) Pertactin-negative variants of Bordetella pertussis in the United States. *N Engl J Med* 368: 583-584.
173. Bottero D, Gaillard ME, Fingermann M, Weltman G, Fernandez J, et al. (2007) Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms, and surfaceome analysis of vaccine and clinical Bordetella pertussis strains. *Clin Vaccine Immunol* 14: 1490-1498.
174. Hozbor D, Mooi F, Flores D, Weltman G, Bottero D, et al. (2009) Pertussis epidemiology in Argentina: trends over 2004-2007. *J Infect* 59: 225-231.
175. Burns DL, Meade BD, Messonnier NE (2014) Pertussis resurgence: perspectives from the Working Group Meeting on pertussis on the causes, possible paths forward, and gaps in our knowledge. *J Infect Dis* 209 Suppl 1: S32-35.
176. Jackson DW, Rohani P (2014) Perplexities of pertussis: recent global epidemiological trends and their potential causes. *Epidemiol Infect* 142: 672-684.
177. (2016) Pertussis vaccines: WHO position paper, August 2015--Recommendations. *Vaccine* 34: 1423-1425.

178. Domenech de Celles M, Rohani P, King AA (2019) Duration of Immunity and Effectiveness of Diphtheria-Tetanus-Acellular Pertussis Vaccines in Children. *JAMA Pediatr*.
179. Linz B, Ma L, Rivera I, Harvill ET (2019) Genotypic and phenotypic adaptation of pathogens: lesson from the genus *Bordetella*. *Curr Opin Infect Dis* 32: 223-230.
180. Loconsole D, De Robertis AL, Morea A, Metallo A, Lopalco PL, et al. (2018) Resurgence of Pertussis and Emergence of the Ptxp3 Toxin Promoter Allele in South Italy. *Pediatr Infect Dis J* 37: e126-e131.
181. Octavia S, Maharjan RP, Sintchenko V, Stevenson G, Reeves PR, et al. (2011) Insight into evolution of *Bordetella pertussis* from comparative genomic analysis: evidence of vaccine-driven selection. *Mol Biol Evol* 28: 707-715.
182. Warfel JM, Zimmerman LI, Merkel TJ (2014) Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 787-792.
183. Klein NP, Bartlett J, Fireman B, Rowhani-Rahbar A, Baxter R (2013) Comparative effectiveness of acellular versus whole-cell pertussis vaccines in teenagers. *Pediatrics* 131: e1716-1722.
184. Witt MA, Arias L, Katz PH, Truong ET, Witt DJ (2013) Reduced risk of pertussis among persons ever vaccinated with whole cell pertussis vaccine compared to recipients of acellular pertussis vaccines in a large US cohort. *Clin Infect Dis* 56: 1248-1254.
185. Warfel JM, Merkel TJ (2013) *Bordetella pertussis* infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates. *Mucosal Immunol* 6: 787-796.
186. Warfel JM, Beren J, Merkel TJ (2012) Airborne transmission of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis* 206: 902-906.
187. Warfel JM, Beren J, Kelly VK, Lee G, Merkel TJ (2012) Nonhuman primate model of pertussis. *Infect Immun* 80: 1530-1536.
188. Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, et al. (2014) Global Population Structure and Evolution of *Bordetella pertussis* and Their Relationship with Vaccination. *MBio* 5.
189. Dunne A, Ross PJ, Pospisilova E, Masin J, Meaney A, et al. (2010) Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against *Bordetella pertussis*. *J Immunol* 185: 1711-1719.
190. Alvarez Hayes J, Erben E, Lamberti Y, Ayala M, Maschi F, et al. (2011) Identification of a new protective antigen of *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 29: 8731-8739.
191. Mills KH, Ross PJ, Allen AC, Wilk MM (2014) Do we need a new vaccine to control the re-emergence of pertussis? *Trends Microbiol* 22: 49-52.
192. Mielcarek N, Debie AS, Raze D, Bertout J, Rouanet C, et al. (2006) Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS Pathog* 2: e65.
193. Kammoun H, Roux X, Raze D, Debie AS, De Filette M, et al. (2013) Immunogenicity of live attenuated *B. pertussis* BPZE1 producing the universal influenza vaccine candidate M2e. *PLoS One* 8: e59198.
194. Mielcarek N, Debie AS, Mahieux S, Loch C (2010) Dose response of attenuated *Bordetella pertussis* BPZE1-induced protection in mice. *Clin Vaccine Immunol* 17: 317-324.
195. Thorstensson R, Trollfors B, Al-Tawil N, Jahnmatz M, Bergstrom J, et al. (2014) A phase I clinical study of a live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine--BPZE1; a single centre, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of BPZE1 given intranasally to healthy adult male volunteers. *PLoS One* 9: e83449.

196. Holst J, Martin D, Arnold R, Huergo CC, Oster P, et al. (2009) Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 27 Suppl 2: B3-12.
197. Holst J, Oster P, Arnold R, Tatley MV, Naess LM, et al. (2013) Vaccines against meningococcal serogroup B disease containing outer membrane vesicles (OMV): lessons from past programs and implications for the future. *Hum Vaccin Immunother* 9: 1241-1253.
198. Bottero D, Zurita ME, Gaillard ME, Bartel E, Vercellini C, et al. (2018) Membrane Vesicles Derived from *Bordetella bronchiseptica*: Active Constituent of a New Vaccine against Infections Caused by This Pathogen. *Appl Environ Microbiol* 84.
199. Hozbor DF (2017) Outer membrane vesicles: an attractive candidate for pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines* 16: 193-196.
200. Fedele G, Cassone A, Ausiello CM (2015) T-cell immune responses to *Bordetella pertussis* infection and vaccination. *Pathog Dis* 73.
201. Allen AC, Wilk MM, Misiak A, Borkner L, Murphy D, et al. (2018) Sustained protective immunity against *Bordetella pertussis* nasal colonization by intranasal immunization with a vaccine-adjuvant combination that induces IL-17-secreting TRM cells. *Mucosal Immunol* 11: 1763-1776.
202. Wilk MM, Misiak A, McManus RM, Allen AC, Lynch MA, et al. (2017) Lung CD4 Tissue-Resident Memory T Cells Mediate Adaptive Immunity Induced by Previous Infection of Mice with *Bordetella pertussis*. *J Immunol* 199: 233-243.
203. Etskovitz H, Anastasio N, Green E, May M (2019) Role of Evolutionary Selection Acting on Vaccine Antigens in the Re-Emergence of *Bordetella Pertussis*. *Diseases* 7.
204. Tsang RS, Shuel M, Jamieson FB, Drews S, Hoang L, et al. (2014) Pertactin-negative *Bordetella pertussis* strains in Canada: characterization of a dozen isolates based on a survey of 224 samples collected in different parts of the country over the last 20 years. *Int J Infect Dis* 28: 65-69.
205. Hegerle N, Dore G, Guiso N (2014) Pertactin deficient *Bordetella pertussis* present a better fitness in mice immunized with an acellular pertussis vaccine. *Vaccine* 32: 6597-6600.
206. Kendrick P, Eldering G, Hornbeck C, Baker J (1955) A study of the stability of pertussis vaccine under different conditions of storage. *Am J Public Health Nations Health* 45: 1131-1137.
207. Kendrick PL, Eldering G, et al. (1947) Mouse protection tests in the study of pertussis vaccine; a comparative series using the intracerebral route for challenge. *Am J Public Health Nations Health* 37: 803-810.
208. Shapiro-Shapin CG (2010) Pearl Kendrick, Grace Eldering, and the pertussis vaccine. *Emerg Infect Dis* 16: 1273-1278.
209. Dey AK, Malyala P, Singh M (2014) Physicochemical and functional characterization of vaccine antigens and adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 13: 671-685.
210. Misiak A, Leuzzi R, Allen AC, Galletti B, Baudner BC, et al. (2017) Addition of a TLR7 agonist to an acellular pertussis vaccine enhances Th1 and Th17 responses and protective immunity in a mouse model. *Vaccine* 35: 5256-5263.
211. Dunne A, Mielke LA, Allen AC, Sutton CE, Higgs R, et al. (2015) A novel TLR2 agonist from *Bordetella pertussis* is a potent adjuvant that promotes protective immunity with an acellular pertussis vaccine. *Mucosal Immunol* 8: 607-617.

212. Weigand MR, Pawloski LC, Peng Y, Ju H, Burroughs M, et al. (2018) Screening and Genomic Characterization of Filamentous Hemagglutinin-Deficient *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 86.
213. Polak M, Lutynska A (2017) The importance of *Bordetella pertussis* strains which do not produce virulence factors in the epidemiology of pertussis. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 71: 367-379.
214. Diavatopoulos DA, Hijnen M, Mooi FR (2006) Adaptive evolution of the *Bordetella* autotransporter pertactin. *J Evol Biol* 19: 1931-1938.
215. Octavia S, Sintchenko V, Gilbert GL, Lawrence A, Keil AD, et al. (2012) Newly emerging clones of *Bordetella pertussis* carrying prn2 and ptxP3 alleles implicated in Australian pertussis epidemic in 2008-2010. *J Infect Dis* 205: 1220-1224.
216. Weiss-Muszkat M, Shakh D, Zhou Y, Pinto R, Belausov E, et al. (2010) Biofilm formation by and multicellular behavior of *Escherichia coli* O55:H7, an atypical enteropathogenic strain. *Appl Environ Microbiol* 76: 1545-1554.
217. Donato GM, Goldsmith CS, Paddock CD, Eby JC, Gray MC, et al. (2012) Delivery of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin to target cells via outer membrane vesicles. *FEBS Lett* 586: 459-465.
218. Schooling SR, Beveridge TJ (2006) Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol* 188: 5945-5957.
219. Yonezawa H, Osaki T, Kurata S, Fukuda M, Kawakami H, et al. (2009) Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol* 9: 197.
220. Klimentova J, Stulik J (2015) Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiol Res* 170: 1-9.
221. Serra DO, Lucking G, Weiland F, Schulz S, Gorg A, et al. (2008) Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. *Proteomics* 8: 4995-5010.
222. Dorji D, Graham RM, Richmond P, Keil A, Mukkur TK (2016) Biofilm forming potential and antimicrobial susceptibility of newly emerged Western Australian *Bordetella pertussis* clinical isolates. *Biofouling* 32: 1141-1152.
223. Nishikawa S, Shinzawa N, Nakamura K, Ishigaki K, Abe H, et al. (2016) The bvg-repressed gene brtA, encoding biofilm-associated surface adhesin, is expressed during host infection by *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Immunol* 60: 93-105.
224. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2: 95-108.
225. Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Mishra M, Deora R (2007) The *Bordetella* Bps polysaccharide is critical for biofilm development in the mouse respiratory tract. *J Bacteriol* 189: 8270-8276.
226. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 13: 34-40.
227. Clark TA (2014) Changing pertussis epidemiology: everything old is new again. *J Infect Dis* 209: 978-981.
228. Gaillard ME, Bottero D, Moreno G, Rumbo M, Hozbor D (2015) Strategies and new developments to control pertussis, an actual health problem. *Pathog Dis* 73: ftv059.
229. Conover MS, Mishra M, Deora R (2011) Extracellular DNA is essential for maintaining *Bordetella* biofilm integrity on abiotic surfaces and in the upper respiratory tract of mice. *PLoS One* 6: e16861.

230. Hoffman CL, Gonyar LA, Zacca F, Sisti F, Fernandez J, et al. (2019) *Bordetella pertussis* Can Be Motile and Express Flagellum-Like Structures. *MBio* 10.
231. Schouls LM, van der Heide HG, Vauterin L, Vauterin P, Mooi FR (2004) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Dutch *Bordetella pertussis* strains reveals rapid genetic changes with clonal expansion during the late 1990s. *J Bacteriol* 186: 5496-5505.
232. Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, He Q, Bart MJ, et al. (2009) *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis* 15: 1206-1213.
233. Fiett J, Letowska I, Gniadkowski M, Hryniewicz W (2003) The new strategy for allele identification of the genes coding for pertussis toxin subunit S1 (ptx S1) and pertactin (prn) in *Bordetella pertussis*. *J Microbiol Methods* 55: 651-666.
234. Mooi FR, Hallander H, Wirsing von Konig CH, Hoet B, Guiso N (2000) Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19: 174-181.
235. Borisova O, Kombarova SY, Zakharova NS, van Gent M, Aleshkin VA, et al. (2007) Antigenic divergence between *Bordetella pertussis* clinical isolates from Moscow, Russia, and vaccine strains. *Clin Vaccine Immunol* 14: 234-238.
236. Advani A, Donnelly D, Hallander H (2004) Reference system for characterization of *Bordetella pertussis* pulsed-field gel electrophoresis profiles. *J Clin Microbiol* 42: 2890-2897.
237. van Loo IH, Heuvelman KJ, King AJ, Mooi FR (2002) Multilocus sequence typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes. *J Clin Microbiol* 40: 1994-2001.
238. Hardwick TH, Plikaytis B, Cassidy PK, Cage G, Peppler MS, et al. (2002) Reproducibility of *Bordetella pertussis* genomic DNA fragments generated by XbaI restriction and resolved by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 40: 811-816.
239. Nilsson JF, Castellani LG, Draghi WO, Perez-Gimenez J, Torres Tejerizo GA, et al. (2019) Proteomic Analysis of *Rhizobium favelukesii* LPU83 in Response to Acid Stress. *J Proteome Res* 18: 3615-3629.

