



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Biológicas

Trabajo de tesis doctoral

Vacunación en neonatos contra la enfermedad resurgente pertussis: un desafío, una estrategia

Tesista: Pablo Martín Aispuro

Directora: Dra. Daniela Hozbor

Codirectora: Dra. Daniela Bottero

Año 2021

El presente trabajo de tesis para optar al 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 codirección de la Prof. Dra. Daniela Bottero.

Presentación personal y agradecimientos

Al presentar este trabajo de tesis para optar por el título de doctor, quiero hacerlo como un granito de arena que espero sume a la construcción de una ciencia soberana, popular y de calidad. Sin citar ni olvidar a Ramon Carrillo, no concibo los avances científicos alejados y ajenos a la realidad del pueblo que los rodea. Por todo esto, haber tenido la suerte de incorporarme a un laboratorio que combina excelencia académica en sus producciones científicas, docencia formal y de pasillo, un aporte directo y diario a la salud pública como es el diagnóstico laboratorial gratuito para hospitales públicos, y la energía puesta en el diseño de una vacuna nacional contra la tos convulsa, resultó un privilegio y una responsabilidad.

Ser becario doctoral, en primer momento de la ANPCyT y luego del CONICET, fue una experiencia de profundos cambios en mi manera de encarar la ciencia, la militancia y la vida en general. El trayecto que te desarma y reconstruye siempre es mejor en compañía, y el ambiente de trabajo en el que me encontré siempre fue el mejor. Sin dudas, el sistema científico adolece de falencias históricas, presupuestarias, conceptuales, estructurales e ideológicas. Pero también es una estructura dinámica, que se adapta y que esta ávida de mejorar todos los días. El compromiso con esos cambios está en la calle para defender y conquistar los derechos, y dentro de las aulas y laboratorios, cumpliendo la tarea dedicada de producción de conocimiento que avale nuestro afán de crecimiento y reestructuración. Este concepto fue madurado durante el tiempo que transcurrió en el Laboratorio VacSal, y hoy puedo asegurar que soy una mejor persona, mejor profesional y mejor militante de lo que era antes de llegar.

Y ahí van mis agradecimientos, y sin miedo a equivocarme, pero con miedo de olvidarme de alguien:

A Daniela Hozbor, por su compromiso profundo con la docencia, la extensión, la ciencia y la salud. Por enseñarme que el conocimiento científico se construye sobre bases sólidas, pero que hay que agregar ladrillos todos los días y jamás quedarse quieto. Por su perseverancia, su paciencia, y su militancia diaria. Por las horas de apoyo y guía, siempre con mate y pizarrón, gracias.

A Daniela Bottero, por todos los aportes, los consejos, las tardes de trabajo y el apoyo en los momentos difíciles de mi tesis. Sin dudas una mezcla óptima de investigadora, docente y compañera en el trabajo.

A Emilia Gaillard, el orden, la perseverancia y la palabra justa. Investigadora de calidad y excelente persona, que mil veces sufrió nuestro desorden, y mil y una nos perdonó, corrigió y ayudo.

A Eugenia Zurita, investigadora comprometida, y siempre dispuesta a ayudarnos. La compañera de trabajo que no te deja solo: entre sacrificios, citoquinas y células, una garantía.

A Celina Castuma, que, aunque ya no sea parte formal del laboratorio, sigue aportando sus ideas y su frescura, a pesar de haber recorrido toda una vida en la ciencia y la universidad.

A Nico y Eri, mis compañerxs becarixs de grupo, excelentes investigadorxs y sobre todo excelentes personas. Con ellxs que me animo a pasar una pandemia.

A Maga, la compañera de fierro de diagnóstico. Comprometida con su trabajo y con Vicente de manera ejemplar. Gracias por los consejos y el aguante de siempre.

A Anibal Lodeiro, por los consejos, las charlas, por prestarnos equipos y libros, y las manos invaluable que nos da siempre con la estadística.

A Fran, Eri B y Solcito, que dejaron su huella en el VacSal y que aportaron muchísimo a que pueda realizar mi trabajo de tesis.

A los CdG, Juli, Fede Sisti, Fede Zacca, Paz y Kei, por siempre aportar buena onda de trabajo y compañerismo.

A todo el IBBM, su director Antonio Iagares, investigadores, becarixs, administrativos y personal de apoyo. Gracias por recibirme y apoyarme durante este tiempo.

A la Facultad de Ciencias Exactas, en todas sus dependencias administrativas.

A los docentes de la Facultad, que me formaron académica y políticamente durante mi carrera de grado y en cursos de posgrado.

A los nodocentes de la Facultad y de la Universidad, por llevar bien en alto las banderas del trabajo y la solidaridad.

Al CONICET y a la ANPCyT, por financiar mi doctorado con las respectivas becas y por ser soporte económico de los proyectos de los cuales fui parte, que permitieron llevar a cabo mis experimentos.

A Mama y Papa, ambos luchadores y comprometidos, que dejaron jirones de su vida por darme amor, contención, libertad y educación. Ambos egresados de la Universidad Pública, que

me inculcaron que ser profesional es un compromiso con la patria y una responsabilidad ineludible, y que siempre hay que luchar contra las injusticias hasta cambiar todo lo que deba ser cambiado. Supongo que es una mirada parcial y sesgada, pero son los mejores del mundo.

A Daniela, Danielita y Lucio, los incondicionales que siempre me apoyaron y acompañaron. Los de la charla sincera y contenedora, las comidas, el abrazo, el anime, los jueguitos y la música de los 80.

A mis tíos y tías, Abel, Juan Manuel, Alicia, Marcela, Pablo, Colo, Vanesa y Mingo, que, entre comidas de domingo al mediodía, sábados de campo y corso en Brandsen, fútbol, política, vacaciones y juegos en D.O.S. me llevan de la mano hasta hoy en día.

A mis primxs, somos la generación que hace gala de su eterna adolescencia: Fede, Edur, Male, Magui, Oli, Agus, Martin, Marce, Santi y Julieta, y los domingos que se vienen con Martina, Ezequiel, Reni, el Torito y Nachito.

A mi abuelo Abel, por ser parte de este camino, con los viajes y las mil anécdotas.

A Euge, por su compromiso con la salud pública, su militancia, por la compañía y el apoyo ineludible, la paciencia, las noches sin dormir, estudiando, leyendo y corrigiendo, por los mil mates y los viajes.

A Oscar, el músico y veterano, que como hobby tiene la medicina. Siempre con operas y francés, es una persona que nunca te deja a gamba.

A mis hermanos de la vida, Mechi, Iván, Mai, Mati y Mauri. Esos que hicieron de cada rato libre una aventura, los que están en las buenas y en las malas.

A Juan y Sofi, de los amigos que da la militancia, y un dúo de compañerxs con un futuro hermoso.

A Suma Exactas, la agrupación de la irreverencia. Espacio del que fui parte durante mi etapa estudiantil, que me formo como militante y como persona, y que siempre llevo guardada en el corazón. Desde la banda que pinta verde, hasta el 2021, una agrupación que sin esperar nada a cambio se dedicó durante toda su historia a mejorar una facultad que, hoy, es modelo de conquistas y derechos para todos los claustros.

Al MPE, local, regional y nacional, por permitirme crecer como militante y entender que *“Mucha gente pequeña, en lugares pequeños, haciendo cosas pequeñas, puede cambiar el mundo”*.

A mis actuales compañerxs de militancia en el Centro Cultural Macacha Güemes, lugar donde pudimos encontrarnos y reencontrarnos para seguir construyendo juntos el sueño de una patria libre justa y soberana.

¡A todas las personas que me acompañaron durante este trayecto, Gracias!

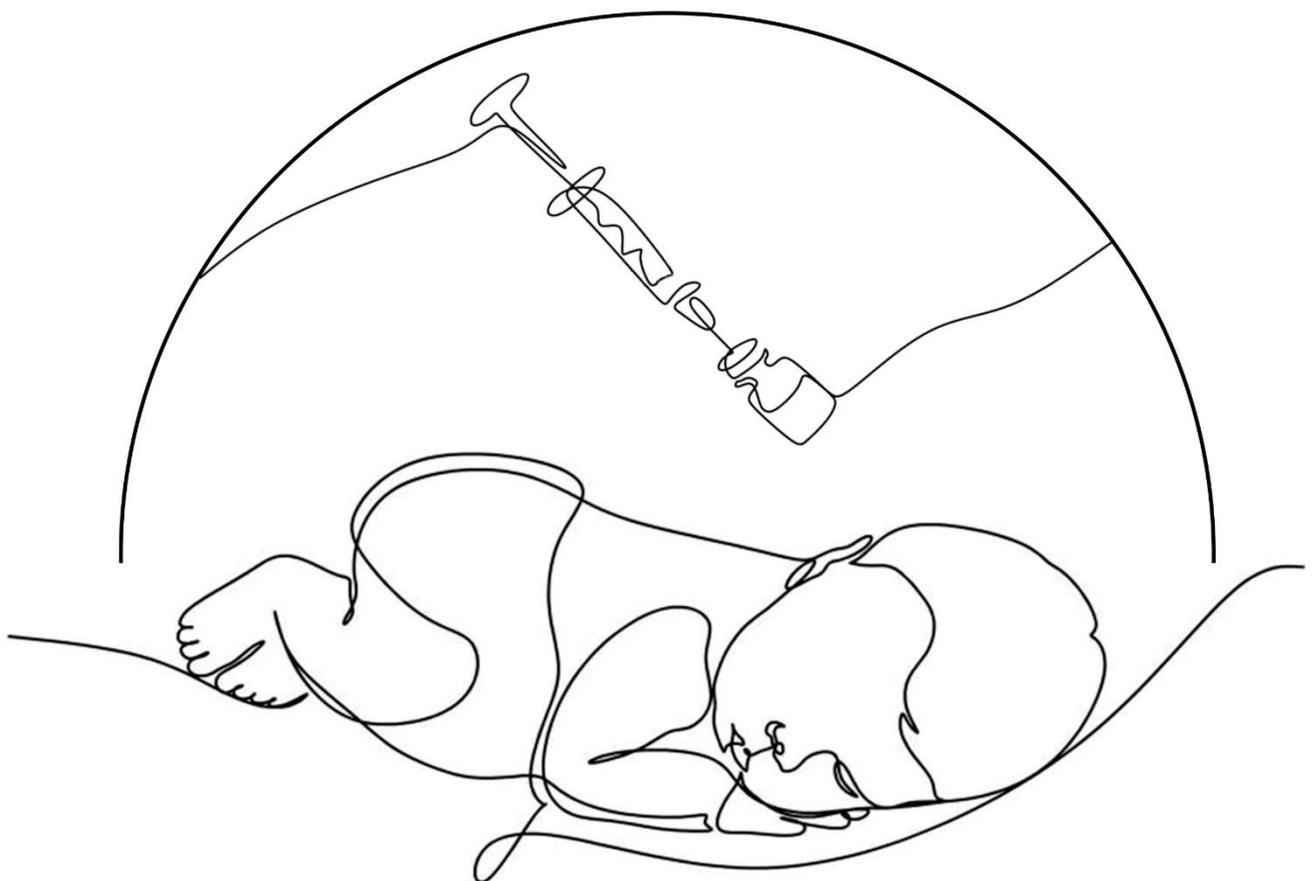
Índice

Introducción.....	8
Pertussis, la enfermedad.....	10
Algunos datos sobre la historia de la enfermedad	13
Agente causal y factores de virulencia.....	14
Transmisión y contagiosidad de pertussis	17
Tratamiento.....	17
Vacunación como estrategia preventiva para pertussis	19
Epidemiología.....	24
Capítulo I: Empleo del modelo murino en la evaluación de la inmunización neonatal contra pertussis.....	33
Introducción	34
Resultados	37
Modelo murino: producción de neonatos	37
Evaluación de la capacidad protectora inducida por esquemas de vacunación que incluyan una dosis durante el periodo neonatal	39
Impacto de la dosis neonatal en la capacidad protectora inducida por la primera dosis administrada en la infancia	41
Impacto en la protección contra pertussis de esquemas de inmunización heterólogos iniciados con una dosis al nacer.....	44
Caracterización de la respuesta inmune inducida por los esquemas que incluyen una dosis al nacer	46
Evaluación de los mecanismos efectores de la protección mediante experimentos de transferencia pasiva de la inmunidad.	49
Discusión	52
Capítulo 2: Inmunización neonatal en el contexto de la vacunación maternal: enseñanzas del modelo murino.....	56
Introducción	57
Resultados	58
Evaluación del impacto de la inmunización neonatal en crías nacidas de hembras que recibieron el esquema aP-aP-aP de vacunación.	59
Evaluación del impacto de la inmunización neonatal en crías nacidas de hembras que recibieron el esquema wP-wP-aP de vacunación.	64
Evaluación del impacto de la inmunización neonatal en crías nacidas de hembras que recibieron el esquema omvP-omvP-omvP de vacunación.....	66
Discusión	67

Capítulo 3: Inmunización neonatal frente a las cepas de <i>B.pertussis</i> circulantes	72
Introducción	73
Resultados	75
Análisis epidemiológico de la situación de pertussis en nuestro país, caracterización de los aislamientos clínicos de <i>B. pertussis</i> circulantes.....	75
Evaluación de la capacidad protectora de esquemas que incluyen la inmunización neonatal frente a aislamientos clínicos de <i>B. pertussis</i> circulantes.....	77
Discusión	84
Discusión final	87
Materiales y métodos	95
Medios y condiciones de cultivo para <i>B. pertussis</i>	96
Cepa de referencia y aislamientos clínicos de <i>B. pertussis</i>	96
Vacunas utilizadas	96
Obtención de vesículas de membrana externa de <i>B. pertussis</i>	97
Cuantificación de proteínas	97
Ensayos en animales	97
Apareamiento sincronizado para la producción de neonatos	97
Ensayos de protección utilizando el modelo desafío intranasal en ratones.....	98
Análisis estadístico.	99
Obtención de sueros para caracterización de la respuesta inmune humoral e inmunización pasiva.....	99
Obtención de esplenocitos para transferencia a receptores naive	99
Ensayos de transferencia pasiva de la inmunidad	100
Caracterización de la respuesta humoral mediante técnica de elisa.....	100
Caracterización de la respuesta humoral mediante la determinación de lisis bacteriana mediada por complemento.....	101
Obtención de proteínas totales para electroforesis en geles SDS-PAGE	101
Electroforesis en geles de poliacríamida (sds-page)	101
Inmunodetección de proteínas (Inmunoblot).....	102
Genotipificación de variantes alélicas de aislamientos de <i>B. pertussis</i>	102
Electroforesis en gel de agarosa.	104
Anexo: medios de cultivo, soluciones y buffers	105
Bibliografía.....	108

**VACUNACIÓN EN NEONATOS
CONTRA LA ENFERMEDAD
RESURGENTE PERTUSSIS: UN
DESAFÍO, UNA ESTRATEGIA**

Introducción



La Declaración del Milenio de las Naciones Unidas, firmada en septiembre de 2000, comprometió a los líderes mundiales a luchar contra la pobreza, el hambre, las enfermedades, el analfabetismo, la degradación medioambiental y la discriminación de la mujer. En dicha declaración se fijaron objetivos y metas a ser cumplidas para el año 2015. Varios de dichos objetivos y metas están directamente relacionados con la salud. Gracias al trabajo conjunto enmarcado en dicha declaración se logró reducir en un 53% la tasa de mortalidad en los menores de cinco años. Sin embargo todavía cada año se registran alrededor de 2 millones de muertes en lactantes menores de 6 meses debido a infecciones ¹. En el año 2015, un dato preocupante fue que el 45% de los fallecimientos ocurridos en el grupo de los niños menores de 5 años se detectó en el primer mes de vida ². Muchas de estas muertes fueron debidas a enfermedades que son prevenibles mediante la vacunación pero que por la corta edad de los niños no alcanzan a completar el esquema de vacunación que brinda protección. Para muchas enfermedades la vacunación comienza a las 6-8 semanas de edad, pero la primera dosis no brinda protección inmediata y en general se requieren de múltiples dosis, lo que lleva a la vulnerabilidad en los primeros 6 meses de vida.

En un esfuerzo por reducir la tasa de mortalidad en los menores de 5 años a menos de 25 por cada 1.000 nacidos vivos para fines de 2030, se están explorando e implementando una serie de estrategias que incluyen entre otras, la inmunización durante el embarazo ³. Esta estrategia aunque es muy prometedora para varios patógenos, incluidos aquellos que provocan enfermedades como pertussis e influenza, es relativamente reciente, y además tiene un valor limitado para los casi 2,6 millones de bebés que nacen prematuramente y que a lo sumo reciben una cantidad restringida de anticuerpos maternos ⁴. Los avances recientes en la comprensión de la respuesta inmunitaria en neonatos ^{5 6}, han renovado el interés en la inmunización neonatal como una estrategia prometedora y eficaz para reducir la morbilidad y la mortalidad en bebés pequeños. Esta estrategia ya ha sido recomendada y empleada de forma rutinaria al nacer para las vacunas contra la tuberculosis [Bacilo de Calmette-Guérin (BCG)], hepatitis B (VHB) y polio [vacuna oral antipoliomielítica (OPV) o vacuna antipoliomielítica inactivada (IPV)]. Estos antecedentes son claves para el diseño de vacunas y estrategias que impacten positivamente en la protección de los recién nacidos y durante el periodo neonatal, que en humanos se define como los primeros 28 días de vida. En este contexto, durante mi trabajo de tesis abordamos en el modelo murino el empleo de la estrategia de inmunización neonatal contra pertussis, una enfermedad respiratoria resurgente. Sustenta este objetivo el hecho de que: a) la enfermedad denominada pertussis o tos convulsa afecta gravemente a los recién nacidos y lactantes; (b) que el nacimiento es un punto práctico de contacto con la atención médica que permite asegurar

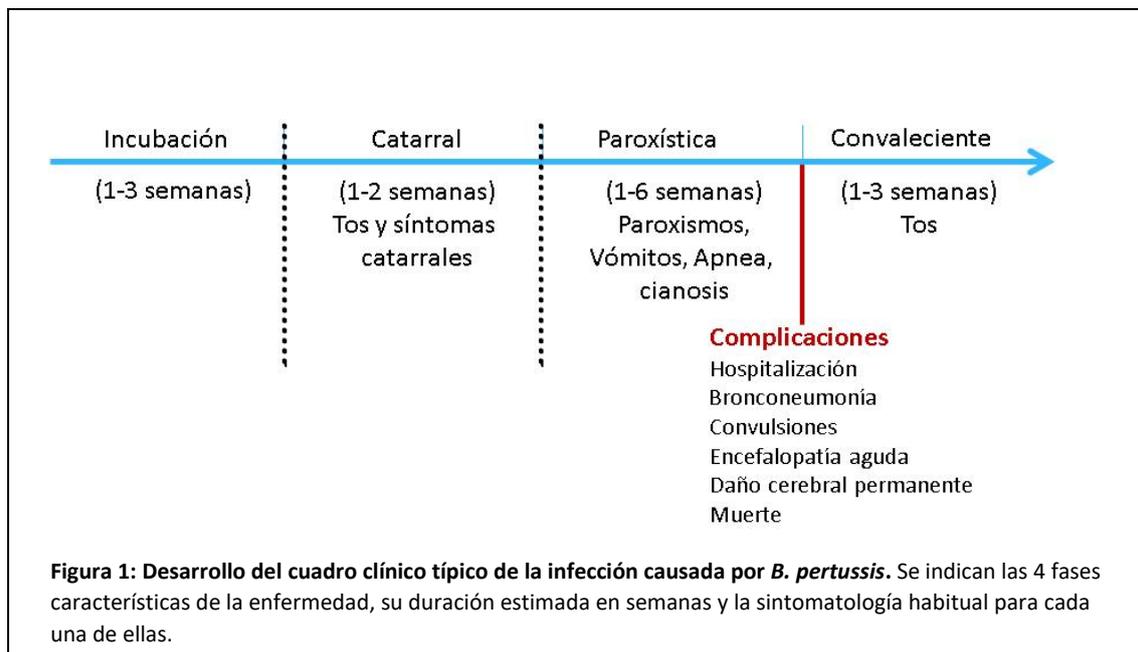
buenas coberturas de vacunación en el neonato, c) que la combinación de la inmunización maternal y la neonatal podría sinergizar los beneficios en la prevención en los recién nacidos; (d) el posible beneficio de la protección para los bebés prematuros para quienes la transferencia de anticuerpos maternos es limitada, con un mayor riesgo de infecciones graves durante la infancia ⁷.

Con el fin de contextualizar mi trabajo de tesis a continuación brindaré información sobre los rasgos clínicos de pertussis, su epidemiología, la situación actual de resurgencia, causas y estrategias de vacunación.

Pertussis, la enfermedad

Pertussis, tos convulsa o coqueluche son sinónimos que se emplean para designar a una enfermedad respiratoria aguda altamente contagiosa causada principalmente por *Bordetella pertussis*, una bacteria Gram negativa con morfología coco-bacilar. *B. parapertussis*_{hu}, *B. bronchiseptica* y *B. holmesii* son otras especies del género *Bordetella* que son capaces de inducir síntomas similares a pertussis aunque *B. pertussis* sigue siendo la especie de mayor impacto epidemiológico⁸. El único reservorio de *B. pertussis* conocido es el hombre. Sin embargo, recientemente se ha descrito que los monos babuinos pueden desarrollar la enfermedad y por ello se lo ha tomado como modelo animal de la enfermedad, de esta manera en lugares donde este mono habita en cercanía de poblaciones podría representar un reservorio natural no humano ⁹. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad dependen de la edad del paciente, de su estado inmune, del uso de antibióticos, de coinfecciones y de su estado sanitario en general. El cuadro clínico típico se observa más comúnmente en pacientes pediátricos sin inmunidad previa contra la enfermedad en una primera infección. Este cuadro clínico comienza a manifestarse luego de un periodo de incubación asintomático que suele durar entre 7 a 12 días ¹⁰, a través de signos y síntomas cuya aparición y desaparición resultan progresivos en el tiempo. Se distinguen tres etapas sintomáticas secuenciales (Figura 1). La fase catarral, que suele extenderse hasta 14 días, se caracteriza por la presencia de una sintomatología similar a un resfrío común con rinitis y tos. De hecho, los signos clínicos en esta etapa son inespecíficos y difíciles de distinguir de otras enfermedades respiratorias. Sobre el final de esta etapa y en la etapa siguiente es frecuente la leucocitosis, con linfocitosis, que en general se detecta en casos graves y fatales de la enfermedad ¹¹. La siguiente etapa se la ha denominado paroxística debido a los ataques violentos de tos o paroxismos que van aumentando en frecuencia y en intensidad. Estos ataques de tos que se repiten varias veces terminan generalmente en una inspiración profunda que produce el silbido característico llamado estridor inspiratorio, también es

frecuente el vómito postusivo. Los ataques de tos 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 aparentar estar cursando una enfermedad respiratoria. En los recién nacidos y lactantes menores de 6 meses son frecuentes los síntomas de cianosis y apneas. Esta etapa provoca un gran deterioro físico del paciente con cansancio extremo, deshidratación, pérdida del apetito y descenso de peso. La fase paroxística es la más larga de la enfermedad y, a pesar de que suele durar entre 1 y 6 semanas, puede extenderse hasta 10 semanas. El agravamiento del cuadro clínico puede deberse en parte a la infiltración masiva de linfocitos en los pulmones ^{12, 13} provocado por una de las toxinas sintetizadas por el agente causal *B. pertussis*, la toxina pertussis (PTx). Esta toxina estaría involucrada en el egreso masivo de linfocitos del bazo e incluso de la médula ósea, a partir de su interacción con los receptores CCR7 y CXCR4, responsable de la retención linfocitaria en bazo ¹⁴ y médula¹⁵, respectivamente. En los neonatos y lactantes, los casos graves resultan ser más frecuentes probablemente como consecuencia de bajos niveles de anticuerpos neutralizantes contra la PTx ¹¹. Mientras que los pacientes con pertussis causadas por *B. parapertussis*, que no expresa PTx, no presentan leucocitosis, hecho que confirma el rol de la toxina en el incremento de éstas células ¹¹.



La severidad de los cuadros depende del estado inmunológico del huésped ^{16,17}, la edad del paciente, el tratamiento antibiótico ¹⁸ y de las posibles coinfecciones. Si no hay complicaciones los síntomas de a poco comienzan a desaparecer. Este período de convalecencia en general dura de 1 a 3 semanas hasta que el individuo se recupera completamente. Las complicaciones más importantes frecuentes en los menores de 6 meses y que requieren de

hospitalización (72,2% en niños menores de 6 meses, 3,9% para los mayores de 20 años de edad) son bronconeumonía (17,3 frente a 3,4% para adultos), convulsiones (2,1 versus 0,5%), encefalopatía aguda (0,5 frente a 0,1%), daño cerebral permanente y muerte¹⁶. En los neonatos que padecen las formas más severas de pertussis presentan las complicaciones más graves que obliga frecuentemente a su hospitalización. En ellos el período catarral es más corto y pueden estar ausentes los síntomas clásicos de la enfermedad como el estridor inspiratorio posterior a los accesos de tos y sus cuadros puede estar dominados por apneas, dificultad respiratoria y cianosis con ausencia de tos paroxística. El curso de la enfermedad es especialmente largo y complicado y se puede requerir soporte ventilatorio. Adicionalmente, con más frecuencia que en los grupos de mayor edad, se presentan complicaciones como convulsiones, neumonías, atelectasias, entre otras. Experimentan también dificultades para alimentarse, ahogamientos, bradicardia y taquipnea y alcanzan tasas de mortalidad de hasta 1,3%. Las causas de muerte en este grupo se relacionan con la leucocitosis, hipertensión pulmonar y neumonía^{19, 20}.

En general se estima que alrededor de 1 de cada 10 niños con pertussis desarrollan neumonía, alrededor de 1 cada 50 padecen convulsiones y cerca de 1 de cada 250 personas que se infectan desarrollarán encefalopatía. En los casos de peor evolución ocurrirá el fallecimiento del paciente¹⁹.

Los adultos y adolescentes con alguna inmunidad adquirida por vacunación o por infecciones previas con el patógeno, pueden presentar tanto síntomas leves como la típica tos paroxística prolongada. En todos los grupos etarios, la tos puede persistir durante meses.

En base a toda esta información y a la experiencia de años, la OMS define el caso clínico de pertussis como aquel que presenta una tos persistente de 2 o más semanas de duración con al menos uno de los siguientes síntomas: paroxismos de tos, apneas, cianosis, estridor inspiratorio, vómitos después de toser sin otra causa aparente (WHO-Pertussis Surveillance. WHO/V&B/01.19.). En la Argentina, desde el nivel sanitario central y basado en los criterios de la OMS y experiencias propias, se ha consensuado (2010) la definición de caso clínico estratificada por edad:

- 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.

Los criterios para la confirmación del caso de pertussis son por laboratorio: el aislamiento microbiológico del agente causal, la detección de secuencias genómicas específicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la serología positiva empleando sueros pareados.²¹, y por epidemiología: casos sintomáticos con contacto estrecho de un caso confirmado por laboratorio.

Algunos datos sobre la historia de la enfermedad

Sobre los orígenes de esta enfermedad existen manuscritos traducidos de un médico de la dinastía Sui en china, que abarcó la medicina entre el 581 y el 618 DC. En estos textos se describen pacientes con sintomatología semejante a la infección por pertussis, que en aquel entonces era llamada “la tos de los 100 días”. Existían predicciones que indicaban que si la tos no desaparecía dentro del primer mes, la probabilidad de supervivencia rondaba entre el 10 y el 20 %²². Otras observaciones tempranas compatibles 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 publicado en el siglo 15 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 pertussis²³. En 1578, el médico francés Guillaume De Baillou (1538-1616) describió una epidemia de pertussis en París²⁴. Respecto a la denominación antigua de “Quinta” para la enfermedad, se cree que fue debido a la periodicidad observada para los paroxismos (episodios agudos de enfermedad) los cuales ocurrían cada 5 horas pero también hay quienes sostienen que se debe al número de repeticiones de eventos de tos en un mismo ataque¹⁶.

La sintomatología y los brotes de la enfermedad se pudieron así describir y detectar muchos años antes de la identificación del agente causal. En sí más de trescientos años transcurrieron hasta que el científico alemán, Carl Burger detectara por primera vez (1883) 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 Gram negativos en el esputo obtenido de su hija de 5 meses quien sufría de violentos ataques de tos, lamentablemente en aquel momento Jules Bordet no pudo cultivarlos. Seis años después otro hijo de Bordet, sufrió también de pertussis y fue ahí que Jules Bordet

junto a Octave Gengou lograron exitosamente aislar al agente causal de la enfermedad. “La pululación, dijeron Jules Bordet y Octave 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”.

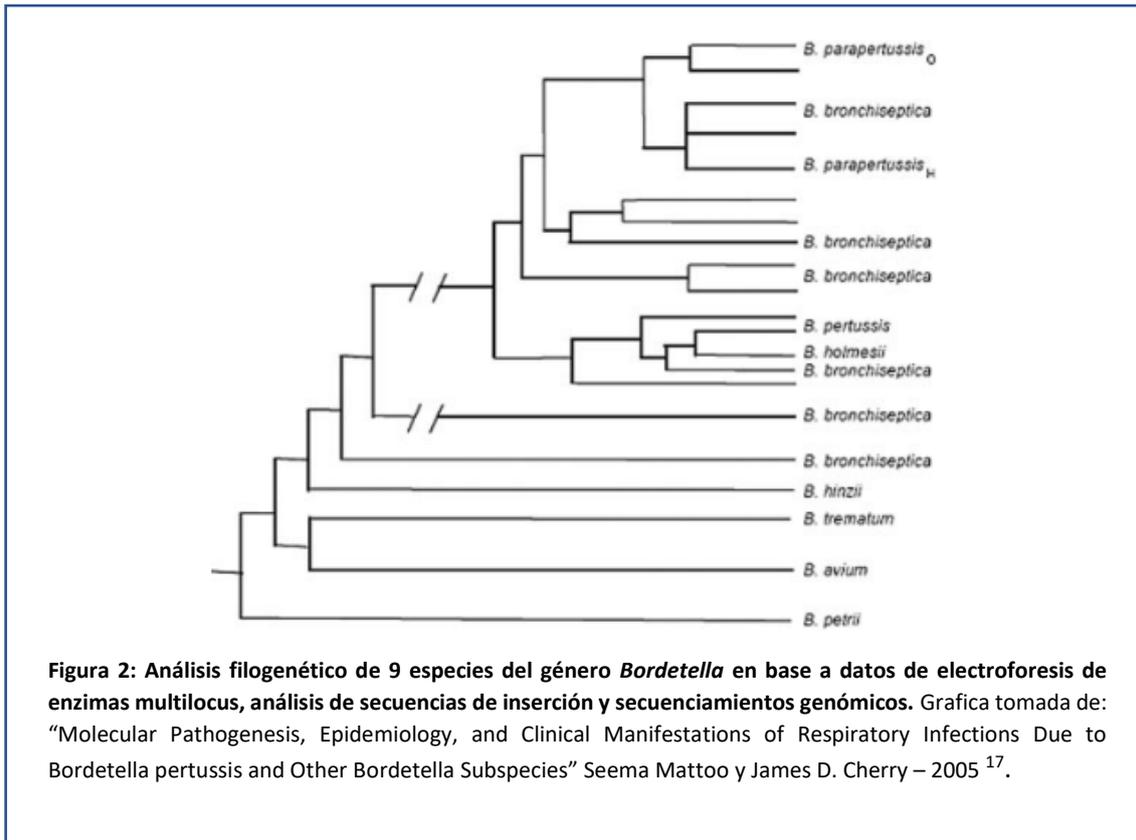
Los estudios sobre el agente causal de la enfermedad fueron continuados por estos investigadores quienes lograron diseñar un medio de cultivo para el desarrollo de aquel microorganismo fastidioso, sensible a muchos factores. Este medio de cultivo conocido como medio Bordet-Gengou se sigue empleando en la actualidad.

Agente causal y factores de virulencia

El principal agente causal de la enfermedad es *B. pertussis*. Esta bacteria pertenece al género *Bordetella* que incluye a 10 especies: *B. pertussis*, *B. parapertussis*_{hu} subespecie humana, *B. parapertussis*_{ov} subespecie ovina, *B. bronchiseptica*, *B. holmesii*, *B. avium*, *B. petrii*, *B. hinzii*, *B. tetratum* y *B. ansorpii*. *B. pertussis* es un cocobacilo Gram-negativo pleomórfico aerobio estricto no fermentador que puede desarrollarse en medios de cultivo como el agar Bordet Gengou o Regan Lowe, a una temperatura de entre 35 y 37 °C. Se trata de una bacteria no móvil, considerada fastidiosa por ser sensible a muchos componentes como detergentes, ácidos grasos insaturados o compuestos azufrados. Mediante pruebas bioquímicas que incluyen la evaluación de la actividad catalasa, ureasa y oxidasa se puede distinguir *B. pertussis* de las otras especies del género *Bordetella* que pueden ocasionar enfermedades en humanos ¹⁶.

B. pertussis, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*, denominadas tradicionalmente “especies clásicas”, comparten muchas características geno y fenotípicas. En el año 2003 Parkhill publicó una serie de análisis comparativos de los genomas de las cepas *B. bronchiseptica* RB50 (genoma de 5.338.400 pb, con 5.007 genes predichos), *B. parapertussis* cepa 12822 (4.773.551 pb, 4.404 genes) y la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I (4.086.186 pb, 3.816 genes). Este análisis de los genomas mostró que las 3 especies comparten más de 3.200 genes ²⁵ por lo que se las llegó a considerar subespecies dentro del género *Bordetella*. El mayor tamaño del genoma y los genes exclusivos del genoma de *B. bronchiseptica* la ubican como ancestro común de las otras dos especies. De hecho varios autores consideran a *B. pertussis* y *B. parapertussis* son linajes de *B. bronchiseptica* adaptadas al humano ¹⁷.

En el año 2005, S. Mattoo y J. Cherry reportaron el análisis filogenético de las 9 cepas caracterizadas hasta ese momento que se muestra en la Figura 2. Los autores describieron a *B. petrii* como el antecesor común de todas las demás especies de *Bordetella*. Este árbol filogenético plantea a *B. petrii* como el antecesor común de todas las especies conocidas en ese momento, y muestra a *B. bronchiseptica* como el antecesor particular de las especies *B. pertussis*, *B. parapertussis_{hu}* y *B. parapertussis_{ov}*, que inclusive en un momento fueron designadas como parte del “cluster de *B. bronchiseptica*”¹⁷.



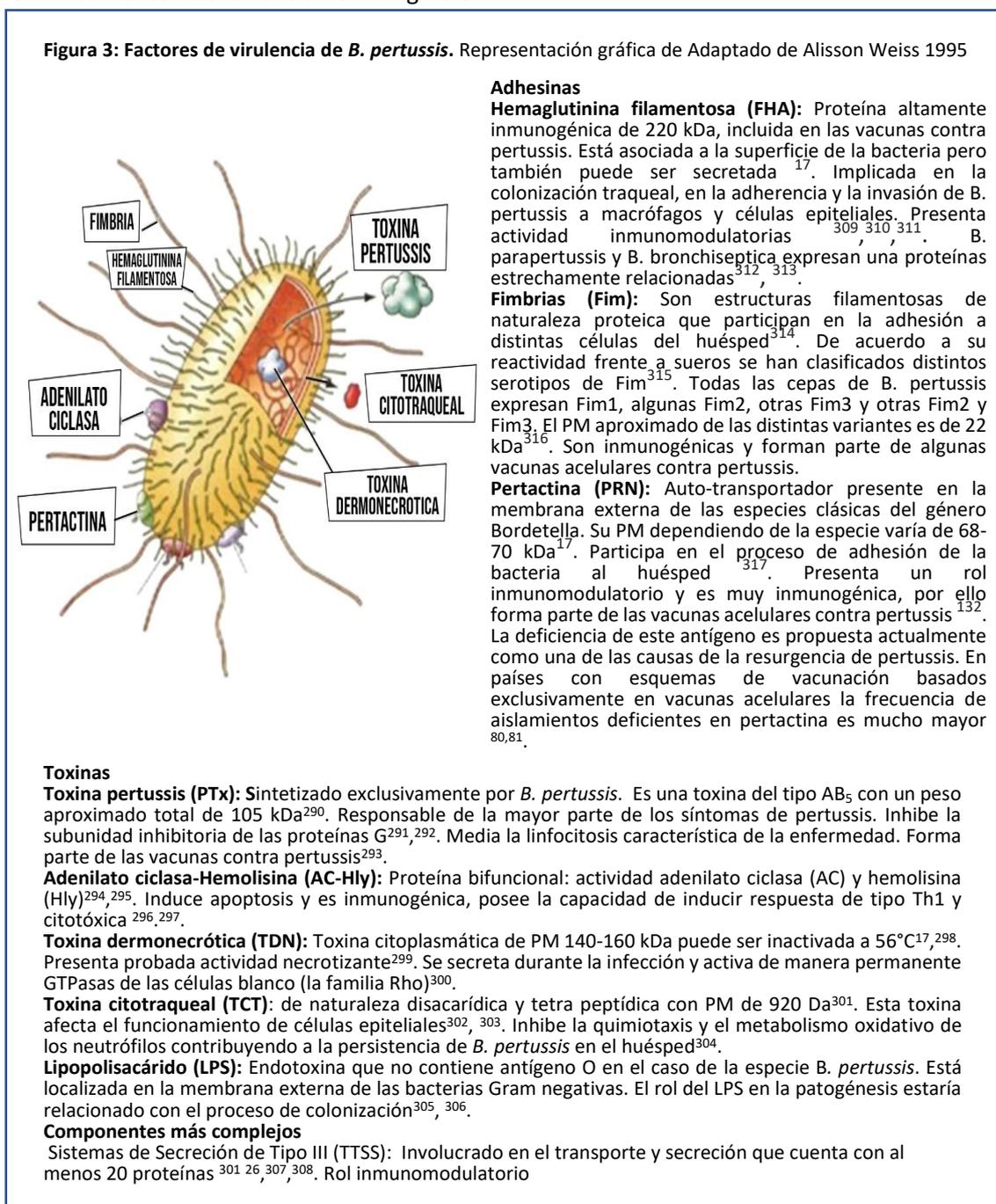
B. hinzii fue aislada del tracto respiratorio de aves, pero se cree que posee un potencial patogénico en humanos inmunocomprometidos. *B. tetratum* fue aislado en infecciones de oído y lastimaduras de humano, pero jamás ha sido asociada a infecciones respiratorias. *B. parapertussis_{ov}* subespecie ovina causa una infección crónica en el tracto respiratorio de las ovejas. *B. petrii* fue aislada del ambiente y es capaz de crecer en condiciones anaeróbicas.

Las distintas especies patógenas del género *Bordetella* expresan una serie de compuestos que se conocen en conjunto como factores de virulencia. Los mismos han sido clasificados en dos categorías funcionales diferenciales: **adhesinas** y **toxinas**, aunque también existen sistemas más complejos como el **sistema de secreción tipo III** que también juegan un rol clave en la patogénesis^{26,27}. Mientras que las adhesinas median la adhesión al epitelio ciliado, a macrófagos y a neutrófilos; las toxinas contribuyen a la patogénesis, las manifestaciones clínicas

características de pertussis y en muchos de los casos están involucradas en la evasión de la respuesta inmune montada por el huésped o en la inmunomodulación del mismo. Varios de estos factores de virulencia se utilizan para formular vacunas acelulares o de componentes que actualmente están licenciadas contra pertussis (Toxina pertussis, Pertactina, Hemaglutinina filamentosa y las fimbrias tipo Fim2 y Fim3).

La expresión de la mayoría de los factores de virulencia mencionados está regulada por un único locus que codifica para un sistema de dos componentes denominado BvgAS²⁸.

Las características más relevantes de los distintos factores de virulencia se describen resumidamente a continuación en la figura 3.



Transmisión y contagiosidad de pertussis

Como hemos descrito más arriba, pertussis se caracteriza por presentar tos y espasmos de tos paroxística los cuales sin dudas contribuyen a la transmisión de la enfermedad. Al comienzo de la infección, es decir durante la fase catarral, es posible aislar una gran cantidad del agente causal *B. pertussis* de las vías respiratorias altas. Cuando aparecen los paroxismos de tos los recuentos bacterianos comienzan a bajar, de manera que el periodo de mayor contagiosidad de la enfermedad se da desde el final de la fase catarral y las primeras dos semanas de la fase paroxística²⁹. Los primeros estudios epidemiológicos sobre la transmisión de la enfermedad sugerían el contacto directo con un individuo infectado³⁰. Las altas tasas de ataque reportadas para los niños no vacunados dentro del hogar que oscilan entre el 58 y el 100%³¹ y la de los entornos escolares que llega hasta un 36%, sugerían que la transmisión ocurría por vía aérea y no solo por contacto directo³². La primera evidencia documentada de que pertussis puede propagarse a través de microgotas y aerosoles expelidos por un individuo infectado ocurrió en 1916 a partir de la observación en una sala de cine. Los autores de esta hipótesis describieron que *“ el esputo de los niños infectados se transportaba en las corrientes de aire a un número ilimitado de individuos ”*³³. Pasarían casi 100 años antes de que la hipótesis de estos autores fuera validada en estudios bien controlados a partir de los cuales se pudiera descartar la transmisión por contacto como única causa de contagio³⁴. Los modelos animales y en particular el modelo babuino, han permitido estudiar de manera controlada la transmisión³⁵. A través de experimentaciones con el modelo de babuinos se logró evidenciar que los aerosoles generados por los animales infectados son los responsables del contagio de los animales susceptibles y que dicho contagio se reducía marcadamente al aumentar la distancia de las jaulas de los animales infectados y las de los animales sanos³⁴.

Más recientemente, se ha reportado que una persona cursando la infección puede contagiar la enfermedad al 90% de personas susceptibles que comparten un ambiente cerrado por al menos 1 hora. Más aún, se ha estimado que en una población sin inmunidad previa contra la enfermedad, un caso primario de pertussis puede causar un promedio de 17 casos secundarios (tasa de reproducción $R_0 = 17$)³⁶.

Tratamiento

Para reducir la transmisión y para lograr el control de la enfermedad protegiendo a los contactos cercanos de un caso de pertussis, se recomienda el tratamiento antimicrobiano temprano^{37, 20, 38, 39}. En caso de que los contactos no tengan contraindicaciones para su uso se recomienda la administración de un antimicrobiano como profilaxis a la exposición. Es

importante recordar aquí que los individuos con pertussis pueden contagiar desde el comienzo del período catarral hasta la segunda semana después del inicio de los paroxismos y hasta el día 5 después del inicio del tratamiento antimicrobiano eficaz. La administración de estos antibióticos durante la fase paroxística parece no cambiar significativamente la evolución clínica de la enfermedad.

El macrólido eritromicina ha sido el antimicrobiano de elección para el tratamiento o la profilaxis post-exposición de pertussis³⁷. Este macrólido usualmente se emplea en 4 dosis diarias (40-50 mg/kg por día) durante 10-14 días. Hace relativamente pocos años se ha demostrado que un tratamiento con eritromicina por 7 días puede ser tan eficaz como un curso de 14 días. Desafortunadamente, la eritromicina se acompaña de efectos secundarios desde incómodos a angustiantes y como consecuencia se observa una mala adherencia al tratamiento. En reemplazo de la eritromicina otros dos macrólidos, la azitromicina y la claritromicina son recomendados para el tratamiento contra pertussis. Estos macrólidos son más resistentes a los ácidos gástricos permitiendo el uso de mayores concentraciones en menor cantidad de dosis y por menos días de tratamiento³⁸. La recomendación para el uso de azitromicina es: para pacientes > 6 meses, 10 mg/kg el día 1, seguidos de 5 mg/kg por día durante el siguiente, se recomienda un tratamiento de 4 días. Para los adultos, 500 mg el día 1, seguidos de 250 mg por día durante los siguientes 4 a 5 días. El régimen recomendado de claritromicina para bebés y niños mayores de 1 mes es de 15 mg/kg por día en dos dosis divididas cada día durante 7 días. Para los adultos, se recomienda 1 g por día en dos dosis divididas durante 7 días. La claritromicina no es prescrito en lactantes <1 mes⁴⁰. Otra alternativa a la eritromicina es trimetoprina-sulfametoxazol (TMS), 60-10 mg/kg por día durante 14 días. Este antibiótico no es recomendado para menores de 2 meses de edad⁴¹.

La resistencia de *B. pertussis* a los macrólidos es rara. La primera evidencia sobre resistencia a macrólidos para *B. pertussis* (MRBP, Macrolide Resistance B. pertussis) se identificó en Arizona en los Estados Unidos en 1994, con una concentración inhibitoria mínima de > 64 µg/ml⁴². Durante los últimos 60 años de historia del uso de macrólidos para el tratamiento de pertussis en USA, se han detectado menos de 15 MRBP, lo que representa menos del 0,5% del total de los aislamientos de *B. pertussis* estudiados^{43,44, 45}. La incidencia de MRBP en otros países, excepto China, también parece ser muy baja^{46, 47, 48, 18}. En China la eritromicina se ha utilizado para el tratamiento de pertussis desde la década de 1980, y allí hasta el año 2008, se aislaron pocas MRBP⁴⁹. Sin embargo, desde entonces se ha observado un fuerte aumento de la resistencia a los macrólidos en los hospitales del este, norte y noroeste de China donde más del 50% de los aislamientos de *B. pertussis* son resistentes a los macrólidos^{50, 51}. En China no sólo

se ha detectado resistencia a la eritromicina sino también a la azitromicina ⁵². El aumento de MRBP se atribuye al uso excesivo de azitromicina en pediatría fundamentalmente porque el tratamiento empírico de enfermedades infecciosas bacterianas o incluso virales se ha basado extensamente en este agente antimicrobiano. Ante la elevada prevalencia de aislamientos clínicos de *B. pertussis* resistentes a macrólidos en China y en caso de falla de tratamiento con macrólidos ante un caso de pertussis, se recomienda el uso de trimetropima - sulfametoxazol⁴¹.

Dado que los datos sobre la eficacia clínica del tratamiento con antibióticos contra *B. parapertussis* y otras especies son limitados, las decisiones de tratamiento deben basarse en la respuesta clínica del paciente.

Vacunación como estrategia preventiva para pertussis

Dado que pertussis es una enfermedad con alta tasa de contagio (R_0 entre 15 y 17) y mortalidad, la medida de control más importante para prevenir la enfermedad es la vacunación. Los primeros desarrollos de vacunas contra este patógeno comenzaron con la identificación y el cultivo del agente etiológico, por parte de Jules Bordet y Octave Gengou en 1906. A partir del aislamiento del microorganismo se prepararon las primeras vacunas basadas en suspensiones de la bacteria muerta por calor y detoxificadas (vacunas celulares, wP sigla del inglés) y comenzaron a aplicarse en distintos países. Para 1933, Thorvald Madsen describió el uso de una vacuna celular a gran escala que sirvió para controlar 2 brotes en las Islas Faroe. Sin embargo, se registraron algunas muertes pasadas las 48 horas de la inmunización ⁵³. Para 1948, Louis Sauer describió reacciones adversas menores asociadas a la inmunización en los Estados Unidos con una formulación que contenía adyuvante en su composición. Sin embargo, como sucede para todas las vacunas, estos desarrollos comenzaron a mostrar sus efectos positivos en las campañas de vacunación masiva que mejoran las coberturas de vacunación. En el caso de pertussis, este hecho se logró cuando la vacuna se incluyó en el Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI), que comenzó sus actividades en el año 1974. La misión del PAI es desarrollar y expandir la inmunización en todo el mundo. En particular, en 1977, se estableció el objetivo de hacer que la inmunización contra la difteria, pertussis, tétanos, poliomielitis, sarampión y tuberculosis estuviera disponible para todos los niños en el mundo en 1990. La vacunación masiva logró así, descensos drásticos en los índices de morbi-mortalidad asociados a pertussis ⁵⁴. Sin embargo éste éxito comenzó a empañarse porque se reportaron efectos adversos que se asociaron con la vacunación contra pertussis ^{55, 56, 57, 58}. Estas reacciones que van desde mínimas como enrojecimiento e inflamación en el lugar de la inyección hasta llanto persistente, problemas

neurológicos y muerte llevaron al descredito de la vacuna por parte de la población en general y de los profesionales de la salud en particular. Los reportes sobre las reacciones adversas debidas a la vacunación contra pertussis con las vacunas celulares trajo aparejado en algunos países una reducción en la aceptación de las vacunas con la siguiente caída de las coberturas de vacunación. El consecuente aumento de casos marcó la necesidad de desarrollar nuevas formulaciones vacunales que resultaran más seguras y que renovaran la aceptación de la vacunación por parte de la población. Así, en los años 70 en Japón, Sato y Sato desarrollaron la primera vacuna contra pertussis a componentes (o vacuna acelular, aP sigla del inglés) ⁵⁹ que presentaba menor tasa de efectos adversos al compararla con la vacuna celular tradicional, y que fue utilizada para una campaña de vacunación en 1981 con un éxito rotundo a la hora de prevenir la enfermedad. La primera formulación contaba sólo con la toxina pertussis y luego se le sumó la hemaglutinina filamentosa. Para 1997, Olin y colaboradores demostrarían que la efectividad era dependiente de la cantidad de componentes presentes en la formulación, obteniendo los mejores resultados con una formulación de 5 componente (PTx, FHA, Pertactina, Fim 2 y Fim3) siendo menor el conferido por una formulación de 3 componentes y similar al de la vacuna celular ⁶⁰.

Estas vacunas acelulares o de componentes lograron así restituir la confianza en la vacunación por parte de la población y los países industrializados (Estados Unidos y los de la Unión Europea entre otros) comenzaron a incluir en sus calendarios nacionales estas formulaciones en reemplazo de las vacunas celulares. Gracias a esta nueva generación de vacunas, las coberturas de vacunación contra pertussis se restituyeron en muchos países y ello llevó a controlar, al menos por un tiempo, a la enfermedad.

La epidemiología de pertussis, sin embargo, se modificó con los años debido a la aparición de brotes de gran envergadura aún en países con altas coberturas de vacunación ⁶¹. Se detectó que los países con esquemas de vacuna celular lograban una inmunidad más duradera que las poblaciones que recibían a la vacuna de componentes ^{62, 63, 64}. La caída rápida de la inmunidad en poblaciones vacunadas con la vacuna aP parece deberse a que la respuesta inmune inducida por ellas ⁶⁵ es más débil, ya que esta signada por una respuesta del tipo Th2 ⁶⁶ mientras que las vacunas celulares inducen una respuesta robusta del tipo Th1 con la proliferación de células T CD4 de memoria residentes en tejido respiratorio ^{67, 68}.

En este contexto, en 2015 el Grupo Asesor Estratégico de Expertos en inmunización (SAGE) dependiente de la OMS expresó su preocupación por el resurgimiento pertussis en varios países industrializados a pesar de la alta cobertura de la vacuna acelular⁶⁹. El cambio de la vacuna celular por la vacuna de acelular para la inmunización infantil primaria se propuso como causa, al menos parcial, del incremento de casos detectados a partir de 1990. La OMS recomendó por

ello que el cambio de la vacuna celular por acelular solo se considere si en los programas nacionales de vacunación se puede garantizar un importante número de dosis requeridas para los refuerzos con vacunas acelulares. Los países que actualmente usan vacunas acelulares pueden seguir empleándolas, pero deben considerar la necesidad de introducir dosis de refuerzo adicionales y generar estrategias para prevenir la mortalidad en la primera infancia tras el resurgimiento de pertussis. De hecho, la OMS publicó un documento de posición⁷⁰ sobre este tema y escribió lo siguiente:

“Un cambio de las vacunas celulares a las vacunas acelulares para la inmunización infantil primaria solo debe considerarse si puede asegurarse y sostenerse la inclusión, de refuerzos periódicos adicionales y para la inmunización materna en los calendarios nacionales de inmunización.

Los programas nacionales que actualmente usan la vacuna acelular pueden seguir utilizándola, pero deben considerar la necesidad de proveerse de dosis de refuerzo adicionales e implementar estrategias para prevenir la mortalidad en la primera infancia, como la inmunización materna en caso de resurgimiento de la enfermedad.”

La comunidad científica y las farmacéuticas por su parte, se encuentran trabajando en el desarrollo de nuevas formulaciones que puedan generar una inmunidad duradera y efectiva contra las cepas de *B. pertussis* que están circulando en la actualidad. El diseño de una vacuna contra pertussis presenta la dificultad de no contar con un correlato de protección que sea único y fácil de medir. La nueva generación de vacunas debe inducir, una respuesta humoral robusta con una respuesta celular con perfil Th1 y Th17 y poblaciones CD4 de memoria residentes en tejido (T_{RM})⁷¹. A continuación, presento un breve resumen de algunos desarrollos de vacunas contra pertussis.

Vacunas celulares menos reactogénicas: La reactogenicidad asociada a la vacuna celular ha sido adjudicada principalmente a la presencia del Lipooligosacarido (LOS) que es un componente ubicuo de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Así, se ha propuesto la reducción del contenido del LOS⁷² a través de una extracción química sin afectar la integridad de la vacuna. Este desarrollo, sin embargo, plantea dudas porque con la extracción de LOS la capacidad adyuvante asociada a esta molécula también estaría disminuyendo. En la actualidad se están buscando otras estrategias alternativas a la eliminación de LOS, específicamente un consorcio de investigadores propuso trabajar en la generación de mutantes llevando cambios estructurales de la molécula (en el Lípido A) con el fin de retener los efectos beneficiosos inducidos por la molécula, pero eliminando su reactogenicidad. Los resultados de esta estrategia aún no se han divulgado.

Vacuna viva atenuada: La vacuna BPZE1 desarrollada por el grupo del Dr. Camille Locht refiere a un desarrollo de vacuna viva administrada por vía intranasal. Dicha formulación contiene una cepa atenuada de *B. pertussis* modificada genéticamente para eliminar funcionalidad de las principales toxinas y que ha mostrado ser inmunogénica. La formulación, a diferencia de otras vacunas induce la producción de inmunoglobulina A secretoria (sIgA) ⁷³ y la estimulación de la vía Th17 en modelos murinos y babuinos ^{74, 75}, ambos mecanismos se han propuesto como involucrados en la inducción de la protección por parte de la BPZE1 frente a la infección por pertussis ^{73, 76}. En ensayos clínicos en humanos, se ha evaluado no solo la seguridad sino el efecto de la vacunación en la colonización de la cavidad nasal hasta 6 meses post inmunización ⁷⁷. Actualmente esta formulación está siendo evaluada en la fase clínica 2.

Vacunas acelular formulada a partir de la toxina pertussis genéticamente detoxificada: La detoxificación química de la toxina PTx no solo genera el toxoide, sino que modifica su conformación tridimensional. Con el objetivo de abolir la actividad tóxica de PTx manteniendo sus epítopes en conformación nativa se modificó genéticamente a esta toxina ⁷⁸. La empresa BioNet-Asia generó una proteína recombinante (PTgen) con excelentes resultado de seguridad e inmunogenicidad ⁷⁹. Este toxoide PTgen se incluyó en una formulación junto a FHA y PRN que en los ensayos clínicos ha mostrado niveles similares de reactogenicidad y seguridad que las vacunas actualmente licenciadas. Estudios recientes sobre PTgen muestran que este toxoide presenta una mayor capacidad en inducir poblaciones celulares de memoria específicas⁸⁰. Estos hallazgos marcan una diferencia significativa con las vacunas acelulares actuales que incluyen componentes químicamente detoxificados en términos de protección a largo plazo. Específicamente, los autores informaron que el refuerzo de los adolescentes con formulaciones que contienen a la proteína recombinante indujo mayores respuestas anti-PTx con aumento de las células B de memoria específicas de PTx ⁸¹.

Estas nuevas vacunas acelulares pueden así superar una de las debilidades de las actuales aP: la pérdida rápida de inmunidad inducida. Sin embargo, queda por estudiar la capacidad de protección frente a la población bacteriana circulante de *Bp* y la presión de selección que este tipo de vacuna ejercería sobre dicha población. Este último aspecto, en principio, no se solucionaría con la vacuna acelular recombinante, ya que está constituida por los mismos pocos inmunógenos que las vacunas acelulares actuales.

Formulaciones acelulares con nuevos antígenos y adyuvantes: La incorporación de nuevos antígenos derivados de *B. pertussis* para mejorar las vacunas aP actuales también se ha explorado. La toxina adenilato ciclasa -hemolisina ⁸², la proteína autotransportadora BrkA ⁸³ y proteínas reguladas por la concentración del hierro ⁸⁴, se han propuesto como antígenos protectores con potencialidad de ser incluidos en nuevas formulaciones acelulares. La

combinación de todos estos inmunógenos con la vacuna acelular actual podría ser una propuesta atractiva para reducir la presión de selección que ejercen las vacunas acelulares actuales al ofrecer un mayor número de epítopes.

Las mejoras de las vacunas acelulares podrían también lograrse mediante el uso de nuevos adyuvantes. De hecho, distintos adyuvantes como el di-GMP cíclico, emulsiones de MF59 o la combinaciones de hidróxido de aluminio con agonistas de TLR4 han sido ensayado en modelos animales con excelente resultados en incrementar y direccionar la respuesta hacia el perfil Th1^{85, 86}. Recientemente se informó que el uso del c-di-GMP sinérgicamente con la lipoproteína BP1569, una agonista de TLR-2, induce la producción de IFN- β , IL-12 y IL-23 y la maduración de células dendríticas⁸⁶. La inmunización parenteral de ratones con una vacuna acelular experimental formulada con este adyuvante combinado promovió respuestas con perfil Th1 y Th17⁸⁶.

El desarrollo de nuevos adyuvantes también se ha focalizado para la vacunación en neonatos que requiere sobrellevar la inmadurez del sistema inmunológico^{87, 88}. En este contexto, Vono y colaboradores evaluaron como adyuvantes en formulaciones neonatales a los agonistas de TLR4, TLR9 y activadores de la vía de las lectinas. Todos estos adyuvantes mostraron tener capacidad para inducir la formación de centros germinales y generaron buenos niveles de anticuerpos en adultos. Sin embargo, solo el agonista de la vía de las lectinas (CAF01) demostró tener efecto en los neonatos cuando fue incorporado a una formulación junto a una proteína del agente causal de la gripe estacional⁸⁹. El empleo de Curdlan, otro agonista de la vía de las lectinas con afinidad por la Dectina-1, mostró ser más efectivo en la inducción de títulos de anticuerpos que el CAF01, además de inducir el desarrollo de centros germinales y de células B con alto nivel de afinidad por los nichos de la médula ósea^{89, 90}. Otro adyuvante neonatal que se está estudiando es el CTA1-DD (subunidad CTA1 enzimáticamente activa de la toxina del cólera (CT) y un dímero del dominio D de la proteína A de *Staphylococcus aureus*). Schussek y colaboradores demostraron que este adyuvante es capaz de inducir la maduración de las células dendríticas foliculares en el modelo murino en etapas neonatales⁹¹.

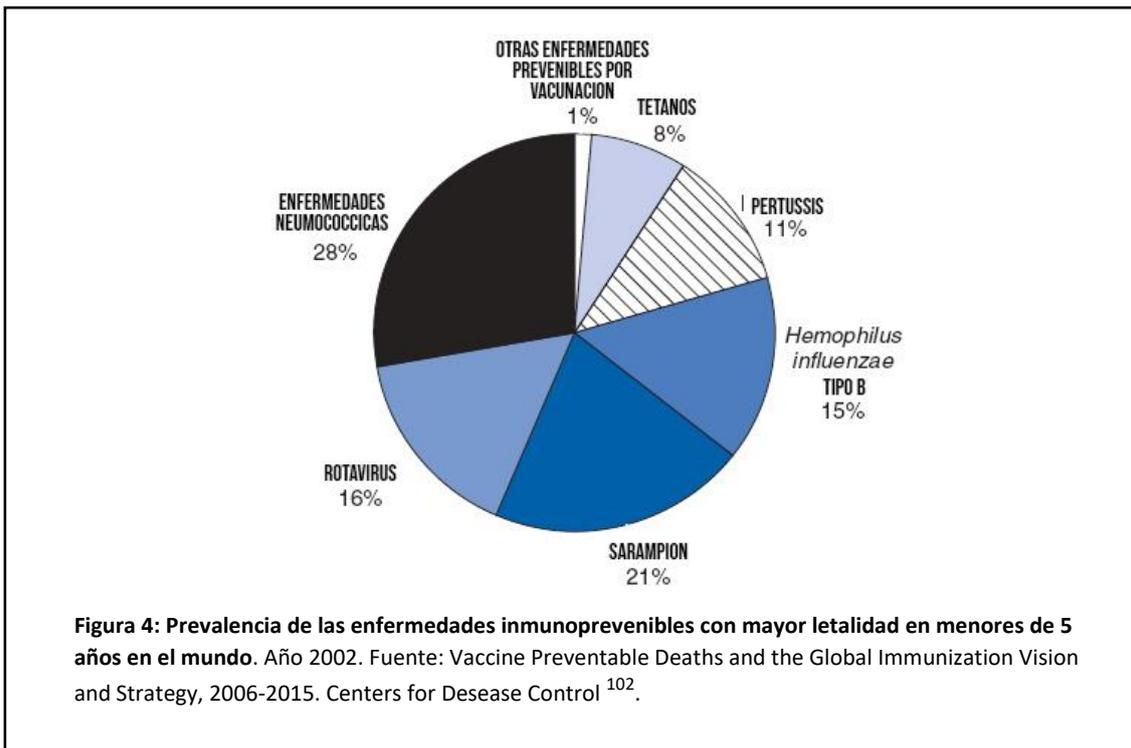
Formulaciones basadas en vesículas de membrana externa: Todas las bacterias Gram negativas que se han investigado hasta ahora son capaces de liberar de forma natural estructuras esféricas originadas en la membrana externa (OMV por las siglas en inglés). Aunque la formación de OMV parece ser una característica común de estas bacterias, el conocimiento de su biogénesis y funciones biológicas sigue siendo limitado. Las OMVs contienen de forma natural varios antígenos nativos expuestos en la superficie proteínas, periplasmáticas y pocas citosólicas, así como moléculas inmunoestimuladoras. Basado en esta capacidad inmunogénica y en ejemplos positivos de vacunas derivadas de OMVs contra *Neisseria meningitidis* serogrupo

B, nuestro grupo inició varios estudios en los últimos años para analizar el potencial de las OMVs derivadas de *B. pertussis* como candidatas a una vacuna anti pertussis^{92,93}. Hemos caracterizado estas formulaciones detectando más de 200 proteínas presentes incluyendo a PTx, FHA, PRN, fimbrias y adenilato ciclasa⁹⁴. La presencia de un gran número de inmunógenos en la formulación de la vacuna es esencial, ya que pueden evitar la alta presión de selección conferida por las vacunas de pocos antígenos. Hasta la fecha, hemos obtenido más de 60 lotes de OMVs derivadas de *B. pertussis* con resultados robustos. Nuestra vacuna basada en OMV es segura y exhibe una capacidad de protección adecuada contra diferentes genotipos de *B. pertussis*, incluidos los que no expresan el antígeno de la vacuna PRN⁹⁵. Las OMVs derivadas de *B. pertussis* representan un candidato atractivo como vacuna acelular contra pertussis^{93,94,96,97}, no solo por su seguridad y capacidad para inducir los perfiles Th1, Th17 recomendados para inducir protección^{98,99} y respuesta de memoria residente en tejido⁹⁴, sino porque contienen un mayor número de inmunógenos en conformaciones cercanas a las encontradas en el patógeno, en comparación con las actuales vacunas acelulares^{94,100}.

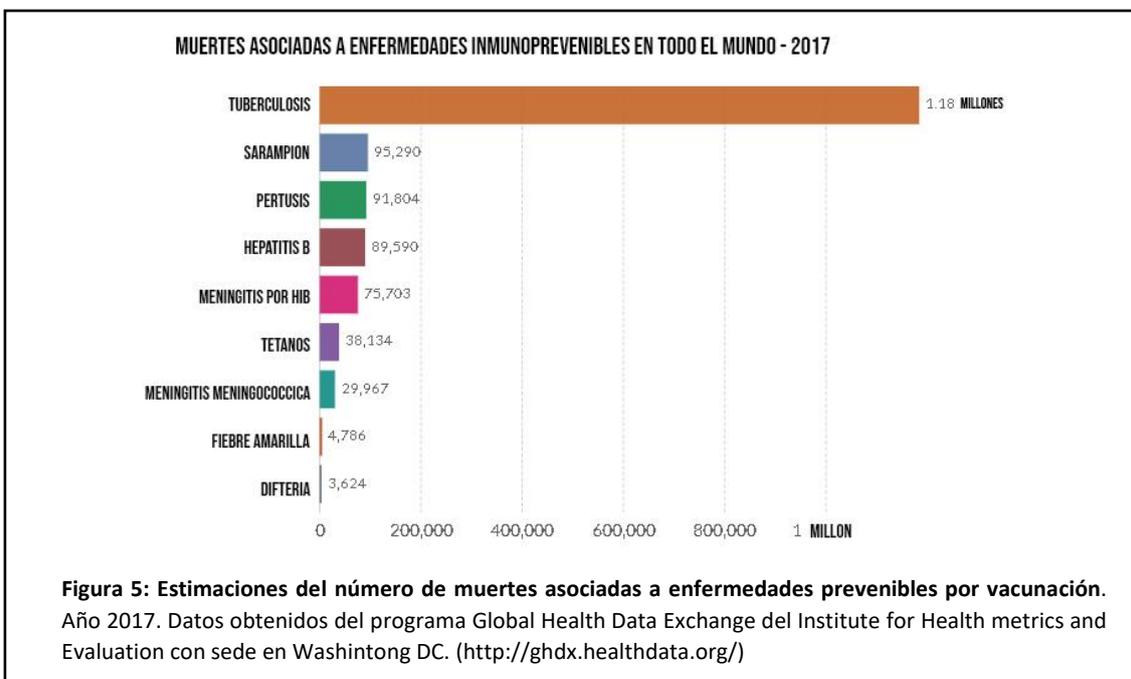
Las limitaciones de la actual vacuna acelular que son la fuerte presión de selección que ejerce sobre la población bacteriana circulante y su incapacidad para inducir inmunidad duradera, posicionan positivamente a la vacuna basada en OMV, que contiene una gran cantidad de antígenos y que induce células T_{RM} secretoras de INF- γ e IL-17 y con muy buena capacidad protectora incluso contra cepas circulantes deficientes en PRN¹⁰¹.

Epidemiología

Dentro de las enfermedades infecto contagiosas que han resultado ser responsables de las mayores tasas de mortalidad durante el 2002, se encuentran la neumonía causadas por neumococo, el sarampión, las diarreas por rotavirus, meningitis por *Haemophilus influenzae* tipo b y en quinto lugar pertussis, con un 11% de las muertes totales por enfermedades¹⁰² (Figura 4). Si bien este ranking se ha modificado en los años posteriores, pertussis sigue ubicándose entre las patologías inmunoprevenibles con mayor tasa de muerte¹⁰³.



Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, en el año 2014 pertussis produjo en el mundo más de 89.000 muertes ¹⁰⁴. Para ese año el total de casos de pertussis en el mundo fue de 24,1 millones. Las estimaciones más recientes recopiladas por la universidad de Oxford ¹⁰⁵, indican que para el año 2017 las muertes asociadas a pertussis se ubicaron en el tercer lugar de las prevenibles por vacunas con más de 91.000 muertes (Figura 5)



En la actualidad, pertussis se describe como una enfermedad endémica que presenta brotes epidémicos cada 3 a 5 años ⁵⁴. Este comportamiento epidemiológico se mantiene desde

la era prevacunal, ya que a pesar de haber registrado drásticos descensos en las tasas de incidencia, el lapso entre picos de casos se mantiene ⁵⁴. Estos brotes se cree que son consecuencia de la acumulación de susceptibles, en parte como consecuencia de que la efectividad de las vacunas no resulta del 100% ^{106,107} y que la inmunidad inducidas por ellas no dura toda la vida ^{108,54,109,110,111,112,67}. Así, cada brote de la infección contribuye a la inmunidad, pero cada 3 a 5 años un nuevo grupo de susceptibles se acumula y nuevamente se genera un brote.

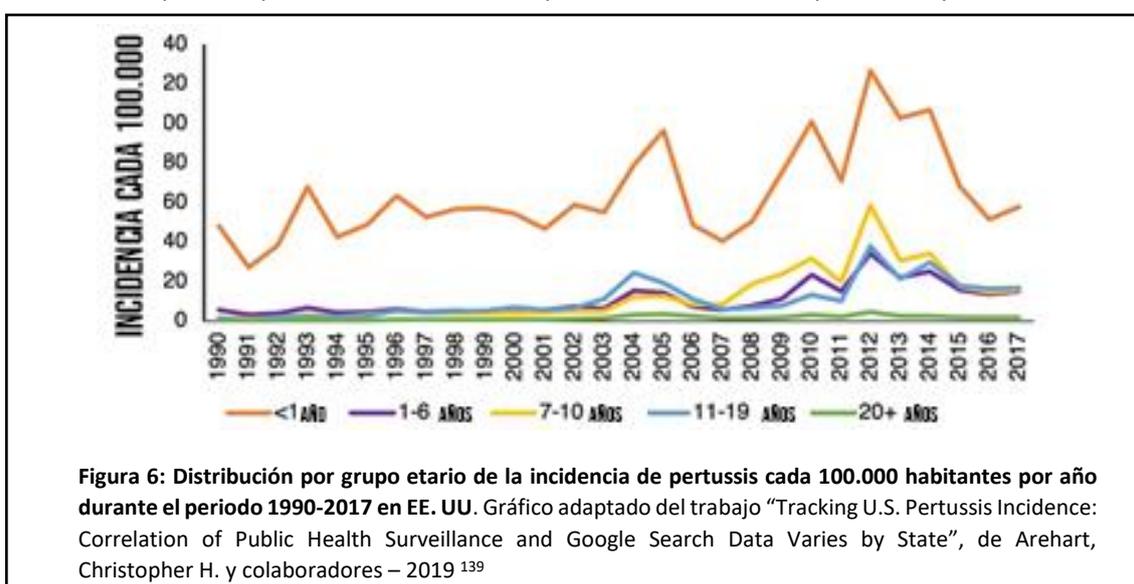
Las vacunas contra pertussis que fueron introducidas en los años 50 efectivamente redujeron la morbi-mortalidad asociada a la patología ^{113,54,114,39,115} pero también condujeron a cambios en la circulación del patógeno y en la susceptibilidad de diferentes grupos etarios. En la era prevacunal la enfermedad afectaba principalmente a los niños de más de 5 años ^{116,20,54} ya que la inmunidad protectora generada por la infección en los adolescentes y adultos se trasladaba de manera vertical a los recién nacidos mediante el tránsito transplacentario de anticuerpos ^{117,20,118,119}. A partir de la introducción de la vacunación masiva en la población pediátrica, el grupo de susceptibles se trasladó a los recién nacidos y a la población adolescente y adulta. Así por ejemplo, en los Estados Unidos más del 53% de los casos de pertussis se registra en mayores de 11 años, mientras que en Europa los mayores de 15 años representan el 62% de los casos de pertussis reportados ^{120,121}. Sin embargo, las mayores tasas de hospitalización y muerte se siguen observando en los lactantes no inmunizados o con esquemas de inmunización incompleto¹²¹.

La introducción de la vacunación masiva contra pertussis, modificó para bien las tasas de incidencia de la enfermedad, aunque en los últimos años se registró un aumento sostenido de casos. Por ejemplo, Canadá pasó de tener una incidencia aproximada en la era prevacunal de 180 por cada 100.000 habitantes, hasta alcanzar luego de implementar la campaña de vacunación su mínimo 4,3/100.000 en 1988. A partir de ese año comenzó a detectarse un aumento de casos y la incidencia alcanzó valores entre 9,5 y 35 cada 100.000 habitantes entre los años 1991 y 2002¹¹⁴. En Estados Unidos, la inmunización contra pertussis redujo de manera drástica la tasa promedio de casos reportados de 157 cada 1.000.000 a menos de 1 cada 1.000.000 en la era vacunal. A partir de 1990 comienza a detectarse en este país un aumento sostenido de casos pertussis con un brote en el año 2002 con una tasa de incidencia a 3,4/100.000 habitantes ⁵⁴. En Europa la situación no fue distinta, por ejemplo, en Alemania las tasas de incidencia rondaban los 160 a 180 casos cada 100.000 habitantes al momento de comenzar con las campañas de inmunización contra pertussis que comenzaron a partir del año

1964. Para el año 1991, el éxito de estas campañas consiguió disminuir las tasas de incidencia a $<1/100.000$ sin embargo a partir de ese año el aumento sostenido de casos llevó a que en el año 2007 la tasa fuera nuevamente de 39,3/100.000 habitantes ¹²².

Estos datos muestran sin dudas el impacto de la vacunación en la reducción de la morbilidad y con ello la mortalidad asociada a la enfermedad y por un periodo la enfermedad dejó de ser un problema para la salud pública. Lamentablemente esta situación sanitaria se modificó ya que se comenzó a detectar un aumento sostenido de casos. En Estados Unidos, un país para el que los datos epidemiológicos son de fácil acceso, se pudo evidenciar 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 (Figura 6) ¹²³.

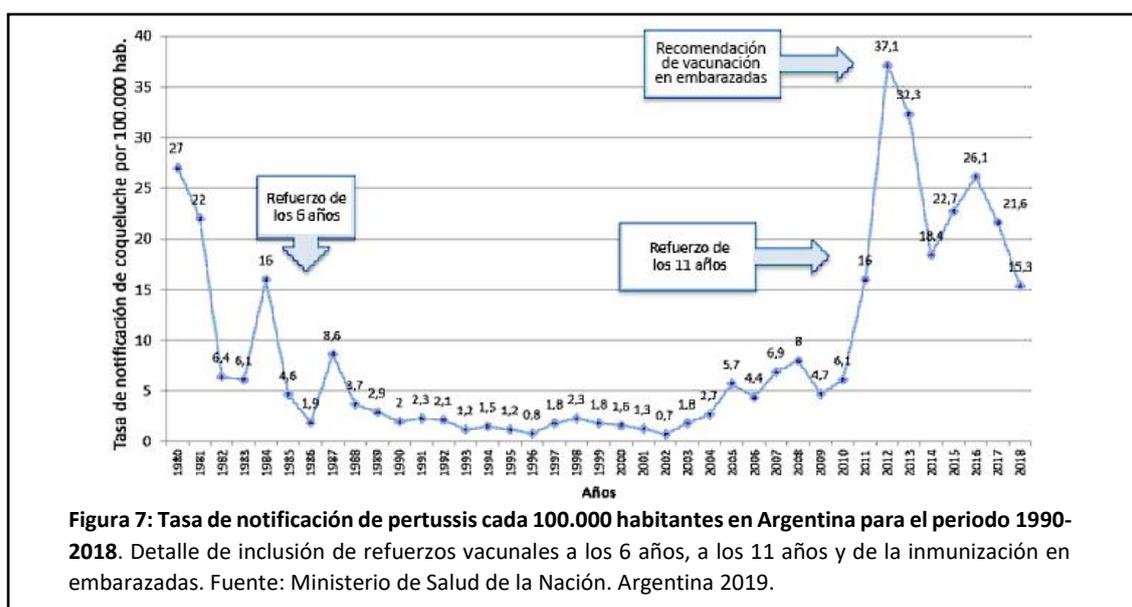
Este país empleaba vacuna celular para cubrir las dosis primarias y desde 1996 al



presente emplea vacuna acelular para todas las dosis del calendario nacional de vacunación. En el año 2012 ocurrieron 20 fallecimientos de bebés de menos de 3 meses debidos a pertussis. Para ese año la tasa de incidencia de la enfermedad en bebés, la de los niños de 7 a 10 años y en adolescentes de 13 y 14 resultaron ser las más altas y las más altas comparadas con otros 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 registró 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 casos cada 100.000 habitantes. Una situación epidemiológica similar y por demás preocupante se detectó también en Australia ^{124, 125, 126}. Hasta 2007 la vacunación contra pertussis era exclusivamente con vacuna celular y la incidencia era de 23,1 casos cada 100.000 habitantes ¹²⁷. A partir del año 2007, año en que se reemplaza la vacuna celular por la vacuna

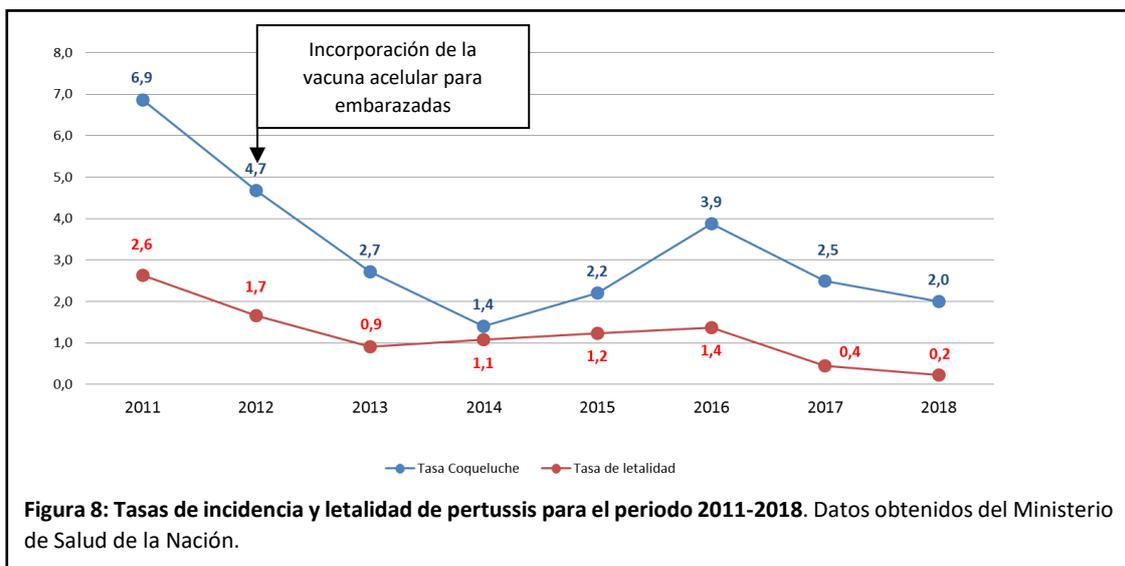
acelular, se comienzan a detectar brotes epidémicos de magnitud en los años 2009, 2011 y 2012, alcanzando una incidencia de 173,3 infectados cada 100.000 habitantes en 2011¹²⁷.

En nuestro país la inmunización contra pertussis que comenzó en los años 70 redujo drásticamente la incidencia de la enfermedad llevando la tasa de incidencia a 1,8 por 100.000 habitantes en el año 2003 pero a partir de ese año comenzó a incrementarse. En el año 2005, se detectó un brote con una tasa de notificación de 5,7 por 100.000 habitantes. Otro brote pero de mayor envergadura se detectó en el año 2011 alcanzando un valor de 16/100.000 habitantes y en el 2012 la incidencia llegó a 37,1 (Figura 7).

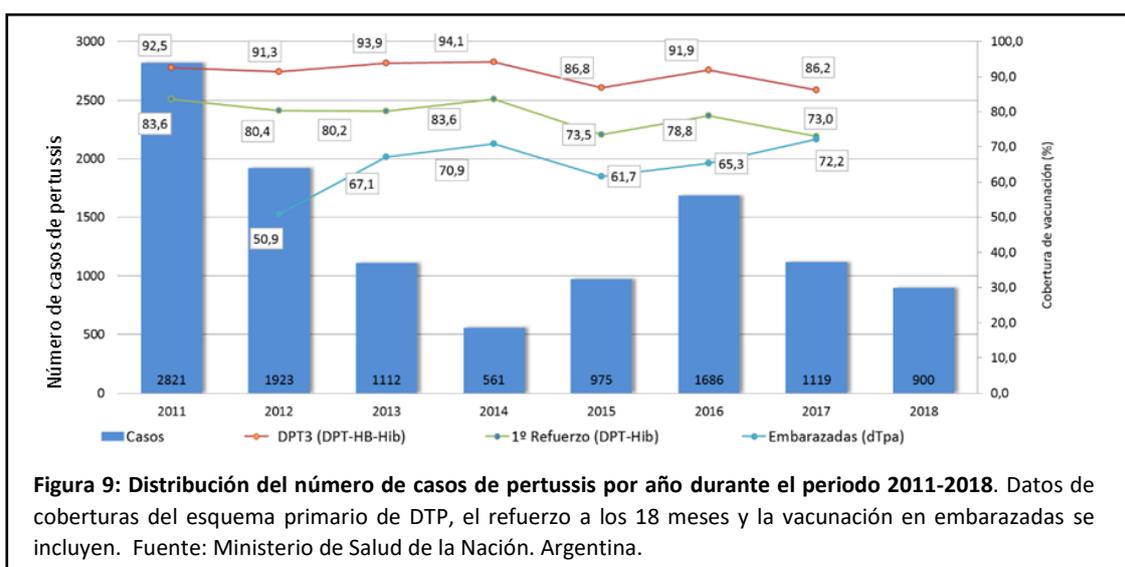


En este brote se registró el mayor número de fallecimientos (n=76) asociados a la enfermedad. Todas las muertes ocurrieron en el grupo de menores de 1 año, excepto cinco casos que ocurrieron en el grupo de 1-4 años (n= 3), 25 a 34 años (n= 1) y mayor de 75 años (n= 1). Entre los años 2002 y 2011, las coberturas de vacunación anti-pertussis a nivel nacional para la tercera dosis de la serie primaria (2, 4 y 6 meses) y para la correspondiente al ingreso escolar estuvieron por encima del 90%, mientras que el reforzamiento de los 18 meses presentó coberturas entre 80 y 90%. El reforzamiento de los 11 años, incluido en el Calendario Nacional en 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 reforzamiento 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 1,4%, respectivamente (Figura 8). Estos datos son sustancialmente menores a los detectados en 2011: incidencia de 6,9/100.000 habitantes con una letalidad de 2,6/100.000¹²⁸ (Figura 8). Si bien la estrategia de la inmunización durante el embarazo logró reducir las tasas de letalidad, con una marcada diferencia en la era

previa y posterior a la incorporación de este refuerzo (2012), el comportamiento cíclico asociado a pertussis se mantuvo detectándose brotes en los años 2011 y 2016 (Figura 8).



Para contextualizar los datos vale la pena recordar a que 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 acelular 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) (Figura 9).



Causas para el incremento de casos de pertussis

Distintas hipótesis se han propuesto para intentar explicar la resurgencia de pertussis. Algunos autores discuten el rol de la mayor vigilancia activa y las nuevas metodologías diagnósticas como causales del incremento en los reportes de pertussis ^{54, 129, 130, 131}. Si bien resulta inobjetable el avance tecnológico y de vigilancia, otras variables pueden explicar la resurgencia de esta patología, tales como debilidades en la inducción de la respuesta inmune de largo plazo debida a la vacunación ⁵⁴, ineficacia de las vacunas particularmente la vacuna acelular en prevenir transmisión ^{106, 107} y/o adaptación del agente causal a la inmunidad conferida por la vacunación ^{132, 133, 134, 135}.

Respecto de las mejoras en la vigilancia y nuevas metodologías diagnósticas, la incorporación de las técnicas moleculares basadas en PCR permitió detectar casos de pertussis que antes no lo permitía ni la metodología microbiológica por su baja sensibilidad ni la serológica por la dificultad de la tomar la segunda muestra cuando el paciente se había recuperado ¹³⁶. La técnica de PCR, que cumple con criterios de alta especificidad y sensibilidad, permite dar en pocas horas un resultado que debe interpretarse teniendo en cuenta la clínica del paciente y la epidemiología de la enfermedad en el entorno cercano y de la comunidad. Las dianas o secuencias blanco más comunes de esta metodología, en su versión PCR convencional, son la amplificación de una secuencia de inserción altamente repetida en el genoma de *B. pertussis* (IS481) y una región del promotor de la toxina pertussis (*ptxA*). Los ensayos en plataformas PCR-Real Time multiplex permiten la detección de distintas especies del género *Bordetella* como *B. parapertussis* y *B. holmesii* que pueden causar cuadros similares, aunque sean menos frecuentes. La introducción de la PCR al diagnóstico fue ganando espacio en el mundo a medida que los equipos y reactivos se volvieron más accesibles.

La disponibilidad de los métodos diagnósticos actuales, la vigilancia mejorada y *aggiornada* dispuesta a buscar los casos sospechosos en adolescentes y adultos permiten explicar al menos parcialmente la resurgencia de esta enfermedad ¹²⁹. Así, la notificación en mayores de 10 años, que a principios de los 80 comprendía el 11,9% de los casos reportados, alcanza en la actualidad el 49,8% ¹²⁹. Según estimaciones, cerca de 1 millón de casos en adolescentes y adultos ocurren anualmente en los Estados Unidos y un 13% de los eventos catarrales prolongados serían asociables a pertussis⁵⁴. Rohani y colaboradores por su parte, utilizando también datos de los Estados Unidos, concluye sin embargo que, si los aumentos de casos se debieran solo a las mejoras de la vigilancia y en los tests diagnóstico estos deberían verse por igual en todos los estados y regiones del país y esto no es así ¹³⁰. Deduce entonces que

las causas se ubican mayormente en la evolución del patógeno y la corta duración de la inmunidad ya sea inducida por la infección natural como por la inmunización¹³⁰. Rohani también trabaja esta hipótesis a través de modelos matemáticos, y concluye que el factor principal causante de la resurgencia de la enfermedad es la introducción de la vacuna acelular y las coberturas subóptimas¹³¹.

En cuanto a la evolución de *B. pertussis*, los primeros informes se relacionaron al polimorfismo en genes que codifican proteínas incluidas en la vacuna [pertactina (PRN) y toxina pertussis (PTx) entre otras] y posteriormente en el promotor de la toxina pertussis (ptxP)^{100,137}. Recientemente ha habido un aumento en los aislamientos de *B. pertussis* que no producen algunos de los antígenos de la vacuna^{138,139,133}. En particular en EE. UU., Canadá y Australia se informó que los aislamientos deficientes en PRN [PRN (-)] aumentaron sustancialmente en los últimos años^{133,140,141}. Estos aislamientos podrían ser resistentes a la fagocitosis mediada por anticuerpos anti-pertactina¹⁴². De hecho, se ha propuesto que la pérdida de este antígeno vacunal probablemente proporcione una ventaja selectiva para la supervivencia bacteriana en poblaciones inmunizadas con vacunas acelulares. Se ha evidenciado que las vacunas comerciales acelulares que contienen PTx, PRN y hemaglutinina filamentosa (FHA), no son tan efectivas como se esperaba en el control de la infección causada por la reciente circulación bacterias que no expresan PRN¹⁴³. Recientemente se demostró en un modelo de ratón con infección mixta de *B. pertussis*, que los aislamientos PRN (-) colonizan más eficientemente el tracto respiratorio de ratones inmunizados con vacuna acelular superando a las cepas que expresan PRN¹⁴⁴.

Con respecto a la pérdida de la inmunidad, es bien sabido que mientras las vacuna contra pertussis a célula entera inducen una respuesta inmune caracterizada por un perfil Th1 y Th17, la actuales vacunas acelulares lo hacen hacia un perfil Th2 y en menor medida Th17^{145,67}. Más aún las vacunas celulares pero no las acelular son capaces de inducir poblaciones celulares T CD4 de memoria residente en tejidos^{86,146}. Estas células T CD4 de memoria residente en tejido respiratorio que expresan CD44 + CD62LlowCD69 + confieren inmunidad protectora a largo plazo contra *B. pertussis*. Estas diferencias de la respuesta inmunológica inducida por las distintas vacunas sin dudas son parte de la explicación del resurgimiento de la enfermedad sobre todo en los países que han reemplazado a las vacunas celulares por las vacunas acelulares.

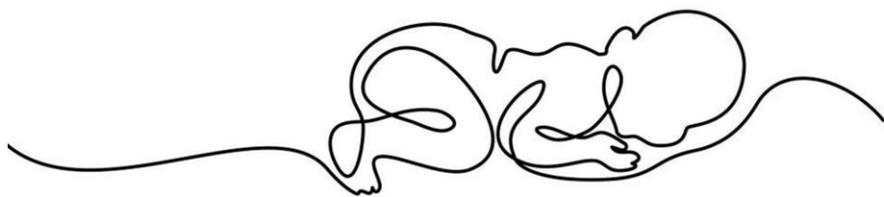
El peso de las posibles causas de la resurgencia de la enfermedad varía de país en país pero más allá de cuál sea el peso lo real es que en muchos países pertussis continua siendo un problema grave para la salud y un tema por demás preocupante para los más susceptibles de la enfermedad que son los recién nacidos y los lactantes no inmunizados^{147,148,61,115}.

Objetivos de trabajo de tesis

El plan de trabajo de tesis propuesto busca dar respuestas a un problema científico-tecnológico complejo como lo es el diseño de una nueva estrategia de vacunación que permita mejorar el control de pertussis en el grupo más vulnerable a la enfermedad representado por los neonatos y los lactantes no inmunizados. Como hemos descrito, la vacunación de las embarazadas representa una excelente estrategia para alcanzar dicho objetivo y de hecho ha mostrado ser capaz de reducir la letalidad en este grupo etario ^{149, 150, 151}. Sin embargo, la vacunación durante el embarazo tiene un valor limitado para los ~ 2.6 millones de bebés prematuros que nacen antes de la transferencia de la inmunidad materna. Es discutido también que la vacunación durante el embarazo puede interferir en la inducción de la respuesta inmune de las vacunas que se aplican durante la infancia ^{152, 153, 154, 155}. Estas limitaciones de la estrategia de la vacunación durante el embarazo marcan la necesidad de buscar otras alternativas de vacunación que quizás no impliquen sustituir dicha estrategia, sino complementarla. En este contexto nos propusimos estudiar en el modelo murino la potencialidad de la vacunación neonatal. Ensayamos para ello diferentes esquemas de vacunación y distintas vacunas que difieren no sólo en su composición sino respecto del perfil de respuesta inmune que son capaces de inducir. Específicamente empleamos a la vacuna comercial a componentes (aP) que induce principalmente el perfil del tipo Th2, a la vacuna celular (de las siglas en inglés, wP) que induce principalmente la respuesta inmune Th1 y poblaciones de memoria residentes en tejido (Trm) o la vacuna diseñada por nosotros basada en vesículas de membrana externa (OMVP) que induce un perfil mixto Th1 / Th17 y Th2 y una respuesta Trm.

Como objetivos específicos nos planteamos

- 1- Poner a punto la inmunización neonatal en el modelo murino.
- 2- Evaluar la capacidad protectora de diferentes esquemas de vacunación neonatal en ratones nacidos de madres no inmunizadas.
- 3- Caracterizar la respuesta inmunológica inducida por los esquemas que contienen al menos una dosis neonatal.
- 4- Evaluar la capacidad protectora de diferentes esquemas de vacunación neonatal en ratones nacidos de madres inmunizadas contra pertussis en la preñez.
- 5- Evaluar la capacidad protectora de las estrategias vacunación neonatal estudiadas en los incisos anteriores frente a las infecciones causadas por aislamientos clínicos de *B. pertussis* circulantes.



Capítulo 1

**EMPLEO DEL MODELO MURINO
EN LA EVALUACIÓN DE LA
INMUNIZACIÓN NEONATAL
CONTRA PERTUSSIS**



Introducción

Como hemos descrito en la introducción de este trabajo de tesis, en las últimas décadas se ha producido un resurgimiento de pertussis que afecta principalmente a los lactantes y a niños pequeños^{156,157,158}. Aunque pertussis es más severa durante el periodo neonatal definido como los primeros 28 días de vida¹⁵⁹, existe un importante subregistro de la enfermedad en este grupo porque los signos y síntomas en esta etapa de la vida no responden al cuadro clínico típico de la enfermedad ya que por ejemplo los paroxismos de tos están ausentes¹⁶⁰. Sin embargo, la alta tasa de letalidad en este grupo etario^{159,161,162,163}⁴¹, ha marcado la importancia de las investigaciones tendientes a buscar terapias y medidas preventivas. Respecto de la estrategia de vacunación neonatal es importante destacar que el programa ampliado de inmunizaciones ya incluye dosis para las primeras semanas de vida para otras patologías como tuberculosis (BCG), hepatitis B (HBV) y polio (OPV/IPV). A estas dosis se las llaman también "dosis al nacer" aunque se administran durante el primer mes de vida. Aunque la eficacia de estas dosis no se discute para estas patologías, la vacunación neonatal aún no se ha universalizado ya que faltan estudios sistemáticos, que las sustenten. Así, el esquema de vacunación actual contra pertussis comienza entre las 6 y 8 semanas de vida (vacunas infantiles) e incluye 3 dosis (esquema primario) antes del año de vida. En Latinoamérica estas 3 dosis se dan a los 2, 4 y 6 meses de edad (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016). Es sabido que mientras que con la primera dosis contra pertussis se logra una efectividad del 50% frente a las manifestaciones más severas de la enfermedad, con la segunda dosis se alcanzan niveles de efectividad del 80-85% dependiendo de la formulación vacunal empleada y de la definición de caso utilizada. En muchos países incluido el nuestro se administra un primer refuerzo (cuarta dosis) a los 15-18 meses de edad y el segundo entre los 4 y 7 años de edad. En Argentina y varios países de Latinoamérica estas dosis son cubiertas con las vacunas celulares (<https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2020-10/calendario-nacional-vacunacion-2020.pdf>). México, Costa Rica y Chile han reemplazado recientemente la vacuna celular por la vacuna de componentes o acelular combinada DTaP-Hib-IPV. Con estos esquemas que no incluyen ninguna dosis al nacer se ha logrado por años controlar la enfermedad. Es fundamental para ello mantener las coberturas vacunales por encima del 95%. Lamentablemente, según los datos de la OMS la cobertura de la tercera dosis contra pertussis (DTP3) en el mundo es de 86%. Los esfuerzos por mejorar los niveles de cobertura son una preocupación constante sobre todo considerando que anualmente ocurren más de 60.000 muertes por pertussis en menores de 5 años¹⁶⁴. La pandemia actual de COVID-19 causada por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 ha complicado aún más las metas de mejorar coberturas de vacunación. De hecho, el año 2020

resultó ser el primer año después de 28 años que el mundo registró una clara reducción en la cobertura de DTP3 que se emplea como marcador de la cobertura de inmunización dentro y entre países.

“Las vacunas son una de las herramientas más poderosas en la historia de la salud pública, y ahora se inmuniza a más niños que nunca” “pero la pandemia ha puesto en grave riesgo estos logros.” dijo el Dr. Tedros Adhanom Ghebreyesus, Director General de la OMS hacia fines del 2020.

El sufrimiento y las muertes evitables causados en los niños por no recibir las vacunas de rutina podrían ser mucho mayores que el propio COVID-19. Pero esto no debería ser así ya que en pandemia la vacunas se pueden administrar de forma segura y sin riesgos. Según una encuesta impulsada por UNICEF, OMS y Gavi, y realizada en colaboración con los Centros para el Control de Enfermedades de EE. UU., el Instituto de Vacunas Sabin y la Escuela de Salud Pública Johns Hopkins Bloomberg, tres cuartas partes de los 82 países que respondieron en una encuesta de salud informaron interrupciones relacionadas a la pandemia COVID-19 en sus programas de inmunización a partir de mayo de 2020. Sin dudas en la post pandemia la calidad sanitaria de la población continuará siendo una preocupación y lo que refiere a la incidencia de pertussis en neonatos se agrave aún más ^{159, 161, 163} .

Más allá de este contexto de pandemia que ha complicado la situación sanitaria, y en un esfuerzo para revertir el grave problema de salud que representa pertussis desde antes de la pandemia de COVID-19, la inmunización durante el embarazo fue recomendada como posible solución sobre todo para los más pequeños que por su edad no pueden recibir dosis vacunales ^{165, 166, 167}. Esta estrategia se sustenta en el hecho de que las madres son la principal fuente de infección para sus bebés que aún no han comenzado su esquema de inmunización por de la edad ^{168, 41} y porque se ha demostrado además la transferencia transplacentaria y por lactancia de anticuerpos específicos contra pertussis ^{169, 170}. De hecho, empleando los modelos de primates, cerdos y murinos e incluso a partir de datos en humanos, se logró evidenciar que los recién nacidos de madres que habían sido vacunadas durante embarazo tienen inmunidad contra pertussis ^{171, 172, 173}. En el modelo de los monos babuinos se observó que la vacunación durante el embarazo induce en los recién nacidos una protección completa contra los síntomas graves de pertussis ¹⁷³. En el modelo porcino, Elahi *et al.* ¹⁷² demostraron que la inmunización de cerdas gestantes indujo protección contra pertussis en sus crías como consecuencia de la transferencia pasiva de una amplia gama de citoquinas además de anticuerpos específicos contra pertussis. En un trabajo previo de nuestro grupo empleando el modelo murino,

detectamos que la inmunización con la vacuna acelular contra pertussis en las hembras preñadas confería inmunidad protectora a las crías a través de la inmunidad transferida por vía transplacentaria y la lactancia sin comprometer la protección inducida por la vacunación infantil posterior ¹¹⁸. En humanos, se han obtenido los siguientes datos que sin dudas avalan la utilización de la estrategia: (1) la seguridad de la misma para mujeres y fetos, (2) su capacidad para transferir protección en sus bebés los primeros 2 meses de vida pero también hasta el primer año y (3) su capacidad de disminuir las tasas de letalidad en bebés ^{128, 174}. Más aún, se ha observado que la primera dosis de la vacuna contra pertussis en los lactantes es más efectiva si los mismos nacieron de madres que fueron inmunizadas durante la gestación ¹⁷⁵. Nuestro país junto con Inglaterra fueron pioneros en la implementación de esta estrategia con muy buenos resultados ^{128, 176, 177}. Sin embargo, mientras esta estrategia se sigue implementando y más países la siguen adoptando quedan todavía interrogantes por responder para lograr su universalización ¹²⁸. Uno de ellos refiere a la posible interferencia de la inmunidad materna sobre las siguientes inmunizaciones contra pertussis durante la infancia. Este efecto, en inglés se designa como *blunting* e implica la interferencia de los anticuerpos maternos en el reconocimiento, procesamiento y desarrollo de la respuesta frente a la vacunación activa no sólo contra pertussis sino contra otras patologías ^{178, 152, 179}. Otro aspecto en donde la vacunación materna podría verse cuestionada en términos de su efectividad es en los recién nacidos prematuros porque aún si la madre está inmunizada su inmunidad podría no alcanzar a transferirse a su bebé que nació anticipadamente. En este contexto y con el objetivo mejorar la epidemiología de pertussis en los recién nacidos la inmunización neonatal vuelve a plantearse como una estrategia posible y quizás complementaria a la inmunización materna.

Según la OMS, el parto es considerado uno de los eventos sanitarios de mayor cobertura a nivel mundial, aún si se consideran las brechas entre los países industrializados y en vías de desarrollo ¹⁸⁰. Este nexo entre las mujeres embarazadas y el sistema sanitario hace factible pensar en la inmunización activa contra pertussis en el recién nacido con buenas coberturas. Los ejemplos exitosos que hemos mencionado sobre la vacunación neonatal y lo ensayado en distintos modelos animales inclusive en ensayos en humanos ¹⁸¹ también sustentan la estrategia ^{173, 182}. Wood y colaboradores estudiaron el efecto de 1 dosis de vacuna acelular contra pertussis (sin tétanos ni difteria) administrada dentro de los 5 días de nacimiento y pudieron observar que un 93% de los neonatos del grupo que recibieron la vacuna lograron una seroconversión positiva para inmunoglobulinas anti-toxina pertussis y pertactina a las 10 semanas de vida (4 semanas después de recibir la dosis correspondiente a las 6 semanas de vida), mientras que el grupo control que no recibió la vacuna neonatal pero si la dosis de las 6 semanas de vida, solo logro la seroconversión en el 53% de los casos para la misma fecha ¹⁸¹. Asimismo, Roduit y colaboradores

estudiaron en el modelo murino el efecto de la inmunización neonatal, a los 7 días de vida, con un esquema que también incluye una vacuna a los 21 días de vida y un refuerzo 3 semanas después. Allí pudieron detectar una producción diferencial de anticuerpos y protección mayor en los grupos que recibieron una dosis neonatal¹⁸². Warfel y colaboradores estudiaron también la inmunización neonatal, su factibilidad en el modelo de babuinos y la interacción con la inmunización materna demostrando que ambas estrategias si bien no previenen la colonización de *B. pertussis*, si evitan el desarrollo de signos graves de pertussis en el recién nacido¹⁷³.

En el diseño de la estrategia de la vacunación neonatal, las formulaciones vacunales que se empleen deben tener la capacidad de superar la posible deficiente respuesta inmunológica del neonato¹⁸³, su respuesta inmune sesgada hacia una inmunidad dominada por Th2¹⁸⁴ y el desarrollo de hiporrespuesta a un mismo antígeno y / o antígenos concomitantes administrados al nacer y en los meses siguientes^{155,154}. El contexto epidemiológico de pertussis y el éxito de las otras vacunas para otras patologías que hoy se emplean en el período neonatal muestran a la vacunación al nacer como un camino necesario de ser evaluado y posible¹⁸⁵. En mi trabajo de tesis hemos abordado la evaluación de esta estrategia en el modelo murino de protección contra pertussis. En este capítulo presentamos los resultados alcanzados al ensayar distintas estrategias de vacunación que incluyen al menos una dosis al nacer (indistintamente la designaremos también dosis neonatal) y distintas formulaciones vacunales. Se presentan datos sobre el impacto de dichas estrategias en la inmunogenicidad y la protección contra la infección causada por *B. pertussis* en el primer mes de vida.

Resultados

Modelo murino: producción de neonatos

El modelo murino se ha empleado por diversos autores para evaluar la respuesta inmune generada por la inmunización durante el período neonatal para otros patógenos e incluso existen algunos datos para *B. pertussis*^{178,186,187,152}. Siegrist y colaboradores han observado en el modelo murino que la inmunización con antígenos proteicos antes de los 7 días de edad resulta muy deficiente comparada con lo que ocurre en humanos durante la etapa neonatal¹⁷⁸. Más aún, la expresión de la ADN-polimerasa (deoxinucleotidil transferasa) que interviene en la formación y diferenciación de los receptores de los linfocitos B y T (BCR y TCR) es menor durante los primeros 7 días de vida del ratón que en la etapa neonatal humana¹⁷⁸. Estos datos permiten definir que la edad neonatal en ratones comparable al humano se corresponde a 7 días de edad y no más pequeños. Neonatos de 7 días han sido exitosamente empleado por la Dra. Feunou y colaboradores¹⁵² en ensayos

diseñados para evaluar la posible interferencia de anticuerpos maternos en la inducción de la respuesta inmune neonatal. Más aún, neonatos murinos de 7 días de edad se han empleado en el estudio de vacunas al nacer formuladas con adyuvantes liposomales (CAF01) contra micobacterias¹⁸⁶ o con vacunas contra el pneumococco ¹⁸⁷ detectando una respuesta inmunológica que pudo ser modulada hacia perfiles protectores. En suma, estos resultados sostienen que los ensayos para que sean comparables con neonatos humanos deben realizarse en neonatos murinos de 7 días de vida, ¹⁸⁸.

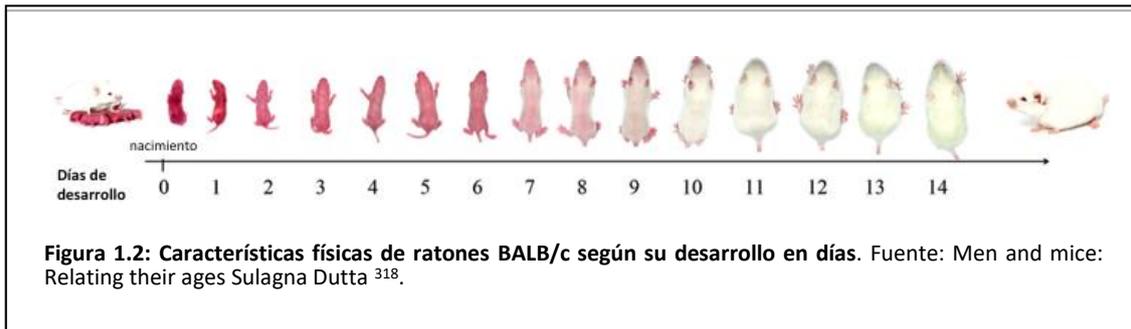
Para realizar los experimentos en neonatos, nuestro primer desafío fue lograr la disponibilidad en número suficiente de ratones de 7 días de edad para poder obtener datos que permitan arribar a conclusiones estadísticamente significativas. Es importante además tener en cuenta que los neonatos deben permanecer en contacto con las madres hasta el destete a los 18-21 días de vida para no afectar el desarrollo de crecimiento ni provocar alteraciones de comportamiento ^{189, 190}. Para ello empleamos varias parejas que fueron sincronizadas para el apareamiento. Esto es, las hembras y los machos que se van a sincronizar son mantenidos en jaulas separadas, luego se procede a la estimulación del celo de la hembra mediante la introducción de feromonas masculinas presentes en viruta proveniente de la jaula de los machos. Transcurrido 48 -72 h de estimulación se introducen los machos en las jaulas de las hembras y a partir de allí se realiza la revisión del área genital en las hembras, para determinar presencia de tapón mucoso vaginal. La evidencia de tapón mucoso en el introito vaginal de la hembra se consideró como como parámetro decisivo para un apareamiento exitoso (Figura 1.1).



Figura 1.1: Tapón vaginal en una hembra Balb/C luego de algunas horas de la copulación. La presencia de este tapón se considera indicativo de coito y por tanto de la posible preñez.

Para la confirmación de la preñez además evaluamos cambios en el comportamiento como la nidación a partir del día seis, y cambios físicos, como abultamientos laterales en la región abdominal y palpación fetal, caracteres que se hacían evidentes aproximadamente al día doce de la gestación. Una vez que se confirmó la preñez se realizó un seguimiento individualizado de cada hembra, para poder identificar con precisión el día del parto, que representa el día cero para nuestros ensayos. Las intervenciones durante el período neonatal deben realizarse con mucho cuidado dada su pequeño tamaño (Figura. 1.2) y extrema fragilidad

tratando incluso de no alterar los patrones de comportamiento dependientes de la relación con la madre en los primeros días de vida.



Evaluación de la capacidad protectora inducida por esquemas de vacunación que incluyan una dosis durante el periodo neonatal

Una vez puesta en práctica la producción de ratones neonatos, nuestra primera etapa de trabajo consistió en analizar el efecto de un única dosis de vacuna en términos de inmunogenicidad y de la capacidad protectora en la etapa temprana de la vida frente a un desafío subletal de *B. pertussis* en fase virulenta. Para esto empleamos tres vacunas diferentes no sólo en términos de su composición sino respecto del perfil de respuesta inmune que son capaces de inducir: La vacuna comercial a componentes (aP) que induce principalmente el perfil del tipo Th2, la vacuna celular (de las siglas en inglés, wP) que induce principalmente la respuesta inmune Th1 y poblaciones de memoria residentes en tejido (Trm) o la vacuna diseñada por nosotros basada en vesículas de membrana externa (omvP) que induce un perfil mixto Th1 / Th17 y Th2 y una respuesta Trm. Un grupo de animales que no fue inmunizado fue tomado como grupo control. Para evaluar la capacidad protectora de esta “dosis al nacer” se expuso a los animales a un desafío intranasal con una dosis subletal de 1×10^6 UFC (40 μ l) de *B. pertussis* Tohama Fase I a los 14 días después de recibir el tratamiento (21 días de edad) (Figura. 1.3 Panel A). Para la analizar de la capacidad protectora de las distintas vacunas evaluamos los recuentos bacterianos (Unidades Formadoras de Colonias, UFC) recuperados de los pulmones de ratones inmunizados con 1 dosis de vacuna y los del grupo de control (Figura. 1.3 Panel B; $p < 0,05$). Los resultados presentados en la Figura 1.3 corresponden a la media de 3 experimentos independientes. En el Panel B de dicha figura puede observarse que la mayor capacidad protectora se detectó en los animales inmunizados con aP. Específicamente, detectamos que los valores de UFC se redujeron al menos 2 órdenes en comparación con los ratones no inmunizados ($p < 0,001$). Por su parte, la inmunización con nuestro candidato vacunal basado omvP (Th1/Th2/Th17) fue capaz de reducir la colonización en los pulmones de los ratones en

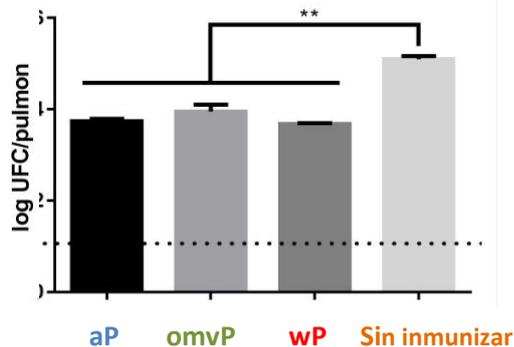


Figura 1.4: Evaluación de protección a mediano plazo (35 días de vida) conferida por la inmunización neonatal. El esquema de inmunización seguido en estos ensayos es el del esquema de la figura 1.3 A. La vía de administración de cada una de las vacunas ensayadas fue subcutánea en la región dorsal inferior. El día cero del experimento corresponde al día del nacimiento de la camada. El desafío intranasal se realizó a los 35 días de vida con una dosis subletal de 1×10^6 UFC en $40 \mu\text{l}$ de *B. pertussis* Tohama Fase I. El sacrificio se realizó a los 42 ddd. El grupo de ratones no inmunizados de la misma edad que los ratones inmunizados fue también desafiado a los 35 días. En la gráfica se representa el número de bacterias recuperadas de los pulmones de los ratones, expresado como el \log_{10} de unidades formadoras de colonias (UFC) por pulmón. Están representados las medias \pm ECM obtenidos de 2 ensayos realizados de manera independiente ($n= 4-5$ por grupo por ensayo). La línea horizontal punteada indica el límite inferior de detección. ** $p < 0,005$

Respecto de la respuesta humoral, evaluamos mediante técnicas de ELISA los niveles de IgG específicos contra la subunidad más inmunogénica de la toxina pertussis (PTx) y contra las proteínas totales de *B. pertussis*. En ningún caso y para ningún tratamiento detectamos niveles de IgG diferenciales de los observados en los ratones no inmunizados.

Impacto de la dosis neonatal en la capacidad protectora inducida por la primera dosis administrada en la infancia

La vacunación infantil en el humano requiere de al menos 3 dosis primarias contra pertussis durante la infancia (primer año de vida) de forma de lograr protección contra las formas graves de la enfermedad. La primera dosis de este esquema se aplica luego de las 6 semanas de vida y en la mayoría de los países incluido Argentina a las 8 semanas. Se ha registrado que esta primera dosis aunque no previene eficientemente la enfermedad, sí reduce la hospitalización y en alguna medida la letalidad^{191,192}.

En este contexto decidimos evaluar el impacto de la dosis al nacer en la capacidad protectora inducida por primera dosis de la infancia administrada a los 21 días de vida del ratón (dosis infantil). Ensayamos esquemas de dos dosis según se diagramó en la Figura 1.5. Panel A con las tres vacunas estudiadas en el trabajo de tesis. Primeramente, evaluamos esquemas de dos dosis en los que se empleó el mismo tipo de vacuna para la dosis al nacer que para la dosis infantil. Los datos de colonización bacteriana en los pulmones de los ratones inmunizados fueron comparados con los obtenidos en ratones inmunizados únicamente con la dosis infantil. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 1. 5 Panel B.

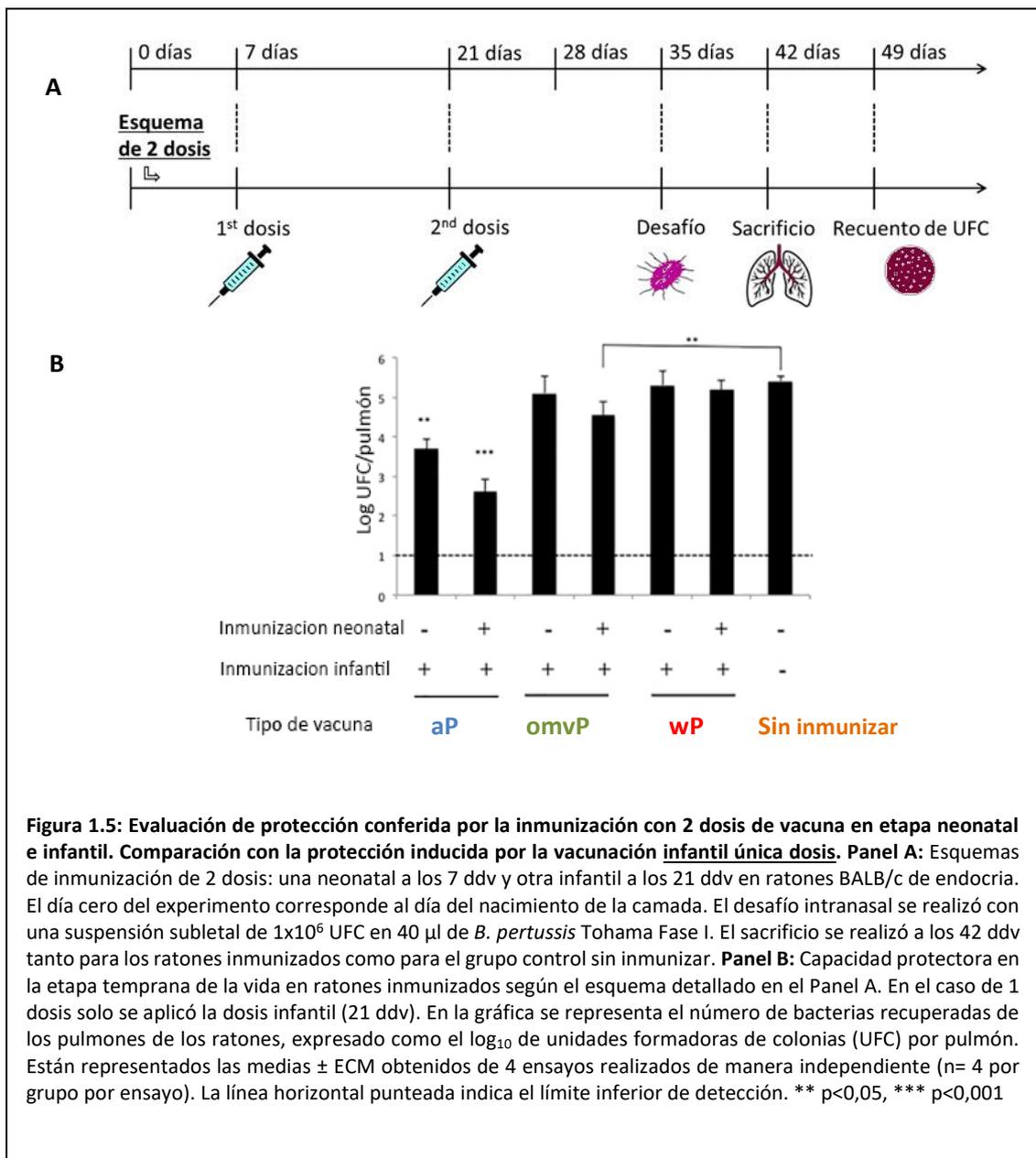
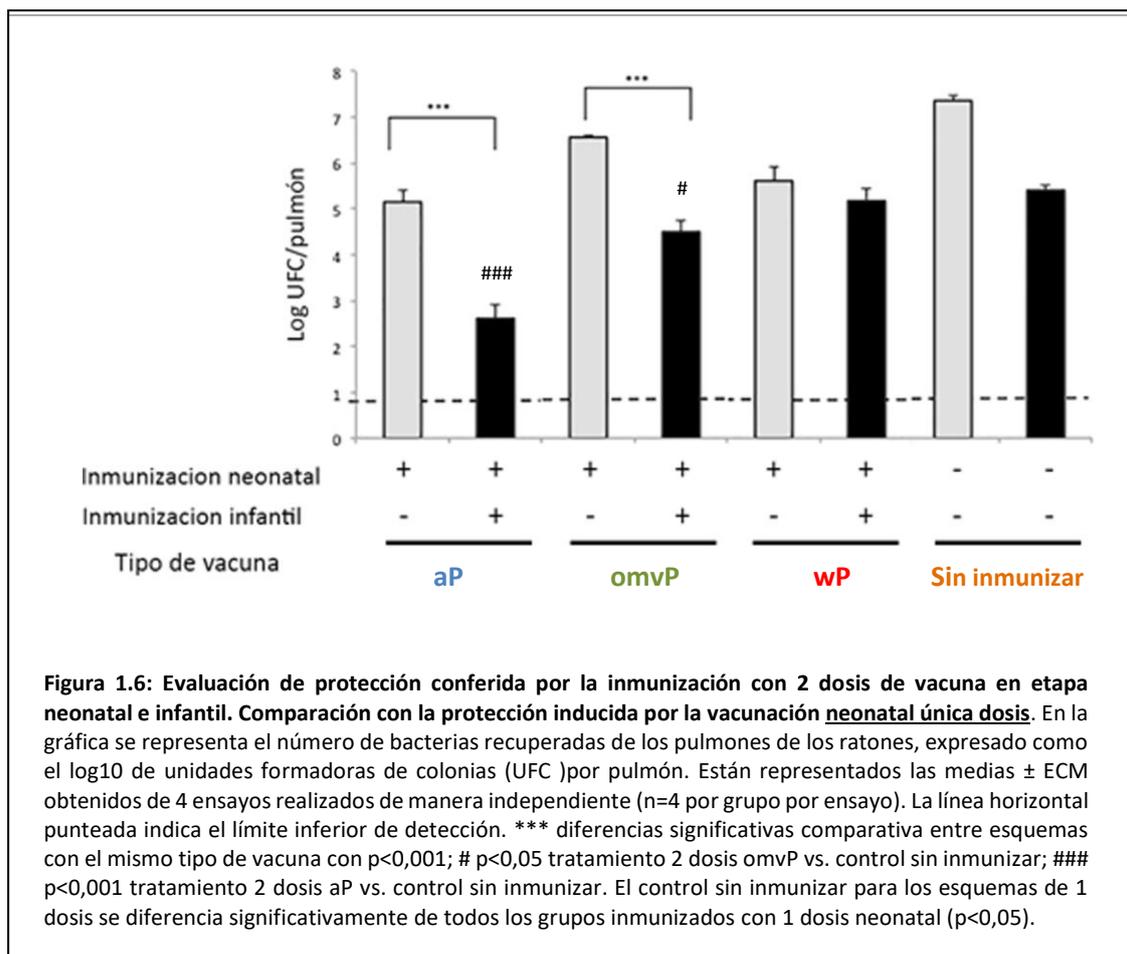


Figura 1.5: Evaluación de protección conferida por la inmunización con 2 dosis de vacuna en etapa neonatal e infantil. Comparación con la protección inducida por la vacunación infantil única dosis. Panel A: Esquemas de inmunización de 2 dosis: una neonatal a los 7 ddv y otra infantil a los 21 ddv en ratones BALB/c de endocria. El día cero del experimento corresponde al día del nacimiento de la camada. El desafío intranasal se realizó con una suspensión subletal de 1×10^6 UFC en $40 \mu\text{l}$ de *B. pertussis* Tohama Fase I. El sacrificio se realizó a los 42 ddv tanto para los ratones inmunizados como para el grupo control sin inmunizar. **Panel B:** Capacidad protectora en la etapa temprana de la vida en ratones inmunizados según el esquema detallado en el Panel A. En el caso de 1 dosis solo se aplicó la dosis infantil (21 ddv). En la gráfica se representa el número de bacterias recuperadas de los pulmones de los ratones, expresado como el \log_{10} de unidades formadoras de colonias (UFC) por pulmón. Están representados las medias \pm ECM obtenidos de 4 ensayos realizados de manera independiente ($n=4$ por grupo por ensayo). La línea horizontal punteada indica el límite inferior de detección. ** $p<0,05$, *** $p<0,001$

En comparación con esquemas que incluyen una dosis única en la infancia, lo que primero observamos fue que la vacunación neonatal no interfirió con la protección inducida por

la dosis infantil (Figura 1.5.B). Más aún, en el caso de la vacuna aP, se detectó una mayor capacidad protectora en los esquemas de dos dosis en comparación tanto con el esquema de dosis única de aP al nacer (Figura 1. 6) como el de única dosis infantil (Figura 1.5 Panel B). En comparación con ratones no inmunizados, los esquemas de dos dosis aP-aP redujeron casi 3 órdenes el recuento bacteriano en pulmón, respecto de 1 dosis al nacer 2,5 órdenes (Figura 1. 6) y respecto de la dosis infantil 1,5 (Figura 1.5 Panel B). En el caso del esquema omvP-omvP se detectó una reducción significativa de 0,7 órdenes en la colonización bacteriana en los pulmones de los animales inmunizados respecto de la detectada en el grupo control sin inmunizar ($p < 0,05$). Para el esquema wP-wP no se detectaron diferencias con el grupo control sin inmunizar.

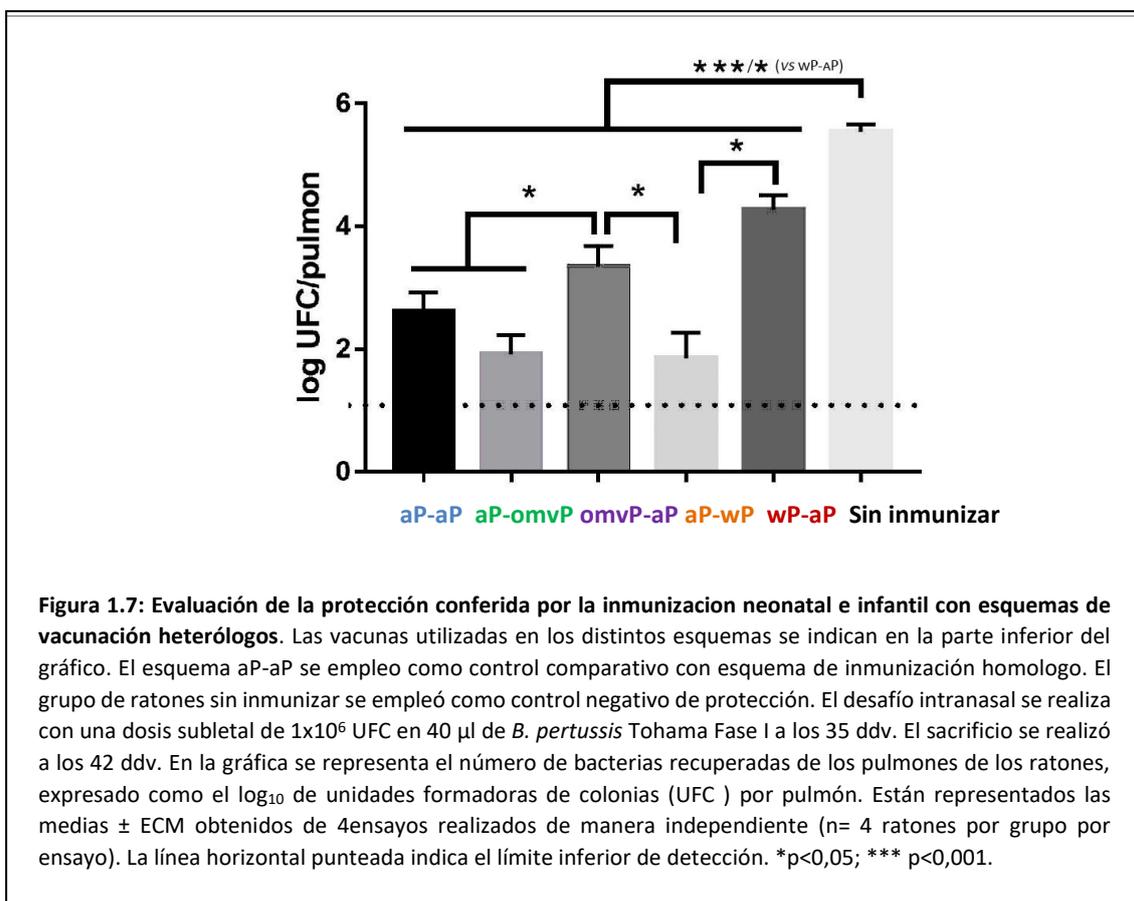
Si comparamos estos resultados con los obtenidos con una única dosis neonatal (Figura 1.6) podemos ver que la dosis infantil mejora el rendimiento en protección de la vacuna aplicada a los 7 días de vida, tanto para la vacuna aP como para la vacuna omvP ($p < 0,001$, Figura 1.6). Como puede observarse en la figura, para 1 dosis neonatal de la vacuna wP la capacidad protectora, si bien es diferencial con respecto del grupo control no inmunizado, no se evidenció diferencia entre esquemas de 1 y dos dosis.



Impacto en la protección contra pertussis de esquemas de inmunización heterólogos iniciados con una dosis al nacer.

En base a los resultados anteriores y teniendo en cuenta que en los neonatos la respuesta inmune está dirigida mayormente al perfil Th2, decidimos evaluar esquemas de inmunización del tipo *prime boost* heterólogo comenzando el esquema de inmunización con la formulación aP (con perfil Th2) para la dosis al nacer. El fundamento de esta elección es la creciente evidencia sobre la mayor inmunogenicidad de los esquemas de vacunación heterólogos respecto de los esquemas que emplean el mismo tipo de vacuna en todas sus dosis^{193, 194, 195}. Como controles se emplearon esquemas aP-aP y también esquemas omvP-aP y wP-aP además del control negativo de protección. Los resultados alcanzados se muestran en la Figura 1.7. En dicha figura se puede observar que los esquemas que incluyen una dosis al nacer de aP son los que inducen mayor capacidad protectora sin presentar diferencias significativas entre los grupos aP-aP, aP-omvP y aP-wP.

Para todos estos esquemas ensayados, la reducción en el número de UFC recuperadas de los pulmones provenientes de los ratones inmunizados fue de al menos 3 órdenes de magnitud con respecto de los datos hallados para los ratones sin inmunizar ($p < 0,001$). Para el



esquema omvP-aP se detectó una reducción de 2,3 órdenes de magnitud en las UFC recuperadas de los pulmones de los ratones inmunizados con respecto a de los detectados en el grupo control sin inmunizar ($p < 0,001$), mientras que el esquema wP-aP redujo la colonización en 1,5 órdenes de magnitud ($p < 0,05$).

En base a los resultados hallados y teniendo en cuenta la necesidad de lograr esquemas que induzcan inmunidad protectora duradera, decidimos evaluar la capacidad protectora de esquemas heterólogos que incluyan una dosis de la vacuna a base de omvP. Como ya mencionamos, las formulaciones conteniendo OMVs tienen la capacidad de inducir poblaciones T de memoria residentes en tejido responsables de la inmunidad protectora de largo plazo ¹⁹⁶. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 1.8.

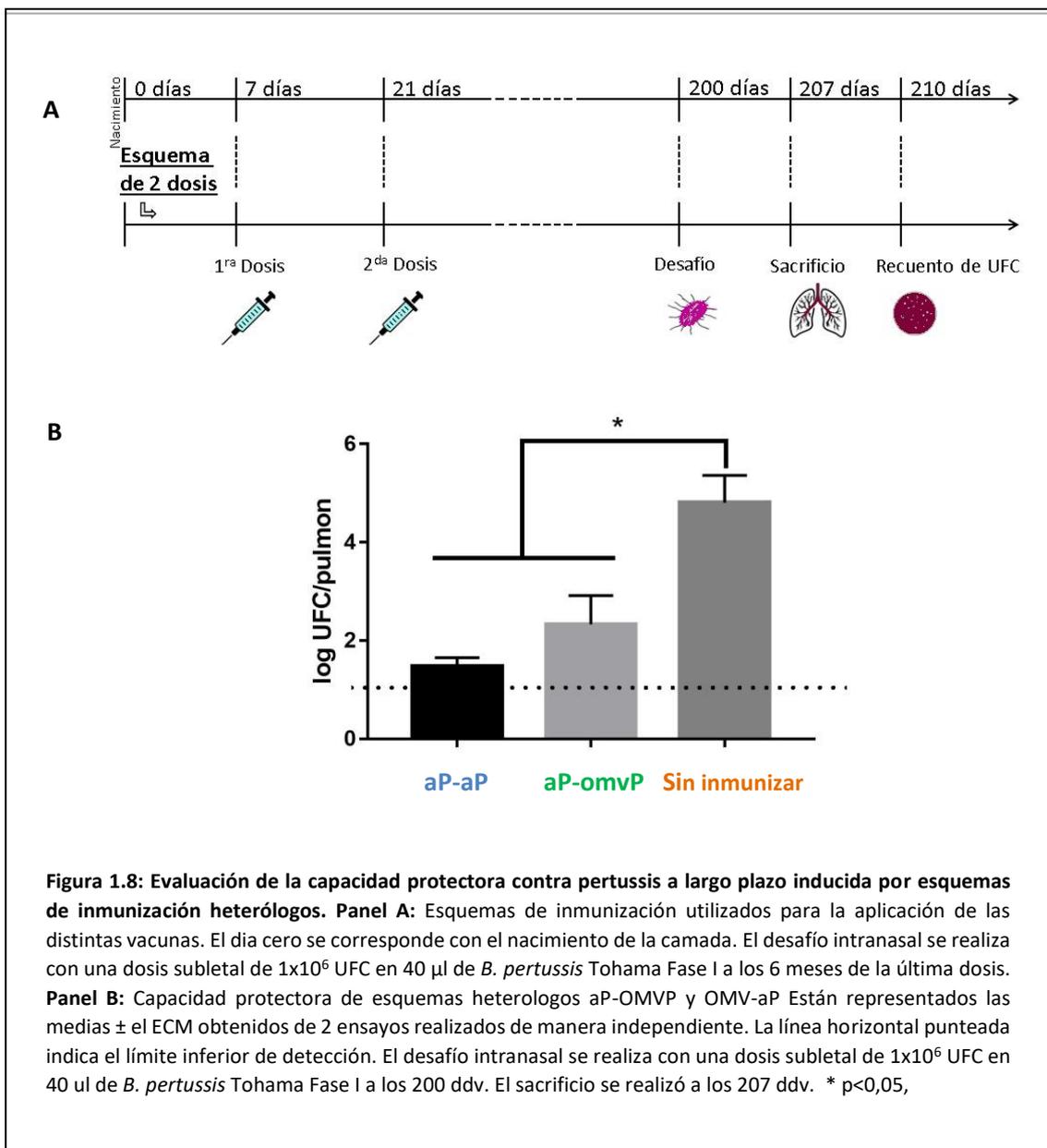


Figura 1.8: Evaluación de la capacidad protectora contra pertussis a largo plazo inducida por esquemas de inmunización heterólogos. Panel A: Esquemas de inmunización utilizados para la aplicación de las distintas vacunas. El día cero se corresponde con el nacimiento de la camada. El desafío intranasal se realiza con una dosis subletal de 1×10^6 UFC en 40 μ l de *B. pertussis* Tohama Fase I a los 6 meses de la última dosis. Panel B: Capacidad protectora de esquemas heterólogos aP-OMVP y OMV-aP. Están representados las medias \pm el ECM obtenidos de 2 ensayos realizados de manera independiente. La línea horizontal punteada indica el límite inferior de detección. El desafío intranasal se realiza con una dosis subletal de 1×10^6 UFC en 40 μ l de *B. pertussis* Tohama Fase I a los 200 ddv. * $p < 0,05$,

En dicha figura se puede observar que el esquema que inicia con vacuna aP es capaz de montar una respuesta protectora que se extiende en el tiempo, con una disminución de al menos 3 órdenes de magnitud en los recuentos de colonias provenientes de los pulmones respecto de los detectados en el grupo control sin inmunizar ($p < 0,05$). El esquema omvP-aP redujo aproximadamente en 2 órdenes de magnitud la colonización bacteriana en los pulmones de los ratones inmunizados comparados con los detectados en el grupo control ($p < 0,05$). Estos datos muestran que ambos esquemas pueden emplearse indistintamente ya que la protección en el largo plazo no se reduce.

Caracterización de la respuesta inmune inducida por los esquemas que incluyen una dosis al nacer

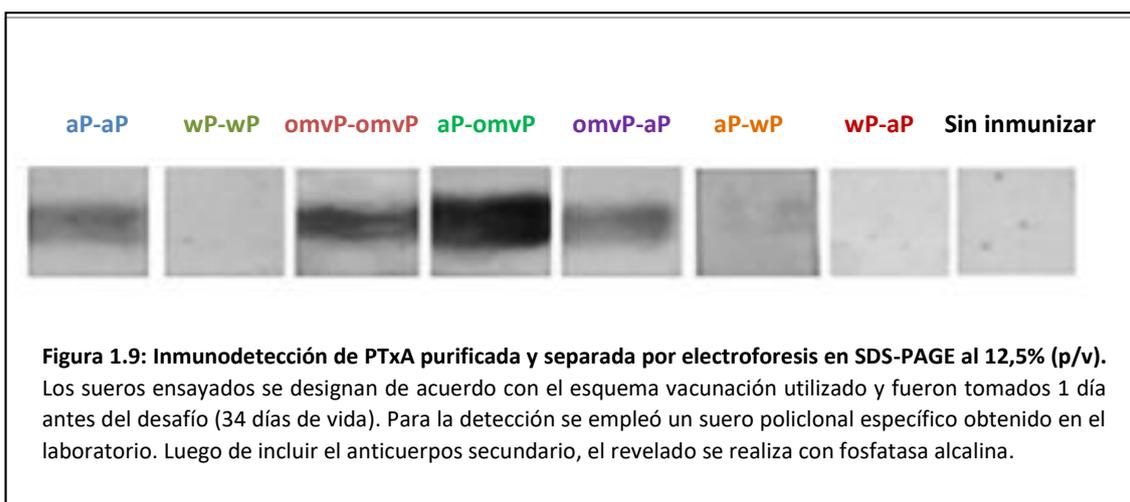
Teniendo en cuenta que los esquemas heterólogos que incluyen una dosis al nacer de aP muestran los mejores resultados en términos de protección decidimos evaluar la respuesta de humoral inducida. Evaluamos mediante ensayos de ELISA e inmunoblots los niveles de anticuerpos específicos contra la subunidad A de la toxina pertussis PTx. Evaluamos también la calidad de esos anticuerpos a través de ensayos de avididad que incluyen incubaciones con un agente caotrópico como lo es el NH_4SCN empleado en distintas concentraciones. Los resultados de avididad se expresaron como el porcentaje de anticuerpos eluidos por el tratamiento con NH_4SCN respecto del hallado en ausencia de este agente. Como control empleamos los sueros provenientes de esquemas de vacunación de dos dosis homólogos y también los obtenidos de esquemas heterólogos, pero en los que para la dosis al nacer se empleó una vacuna distinta de

Esquemas de vacunación	IgG anti-PTx	% eluido con NH_4SCN		IgG1	IgG2a	IgG2a/IgG1
		0,187 M	0,375 M			
aPaP	96,06±7,49	27,07±8,92	29,18±1,73	39,85±1,95	57,06±1,53	1,43
wPwP	38,90±0,96	0,37±1,56	1,01±1,72	10,04±2,21	40,23±0,1	4,01
omvPomvP	127,20±2,96	0,45±0,38	0,81±0,75	6,90±0,74	40,32±0,64	5,84
aPomvP	89,36±0,88	6,50±4,85	13,01±14,9	31,48±1,39	53,89±0,38	1,71
omvPaP	62,22±1,82	3,02±4,50	5,56±1,83	14,23±3,65	42,58±0,51	2,99
aPwP	60,06±2,02	12,87±2,76	27,38±0,36	9,52±4,43	42,13±0,38	4,42
wPaP	37,80±0,27	0,76±0,72	0,93±0,34	7,12±0,75	41,41±0,64	5,81

Tabla 1.1: Títulos de IgG totales e isotipos determinados mediante técnicas de ELISA utilizando como antígeno a la toxina pertussis. Las mediciones se realizaron a 14 días después de la segunda dosis de vacunación. Los títulos se expresan como la media geométrica de 2 determinaciones por técnicas de ELISA independientes de cada grupo. Los niveles de corte para los ensayos de IgG, IgG1 e IgG2a fueron 12,5 3,6, 1,9 0,9 y 5,8 2,7, respectivamente. No se detectaron valores en los animales control no inmunizados. Los valores detectados fueron significativamente diferentes a los de los ratones no inmunizados ($p < 0,05$). La avididad de los anticuerpos IgG también se midió mediante elución con tiocianato de amonio (NH_4SCN) a 14 días después de la segunda dosis y se expresa como el porcentaje de anticuerpos específicos de PTx eluidos con respecto al título sin tratamiento de NH_4SCN .

aP. Los resultados incluidos en la Tabla 1.1. muestran que de los esquemas que incluyen el mismo tipo de vacuna para la primera y segunda dosis, los esquemas de vacunación aP-aP y omvP-omvP indujeron los valores más altos de títulos de IgG anti-PTxA. Títulos altos de IgG también se detectaron en aquellos esquemas heterólogos que incluían a la vacuna aP en la inmunización neonatal. Los títulos IgG anti-PTxA más bajos se observaron con los esquemas de 2 dosis de vacuna wP. Una observación interesante fue la mayor proporción de IgG anti-PTxA con alta avidéz en los sueros de los ratones inmunizados con esquemas que incluyen una dosis neonatal de omvP o wP en comparación con los inducidos en ratones inmunizados con esquemas iniciados con aP como dosis al nacer. Todos estos resultados sugieren la presencia de un efecto prime-boost en la respuesta humoral.

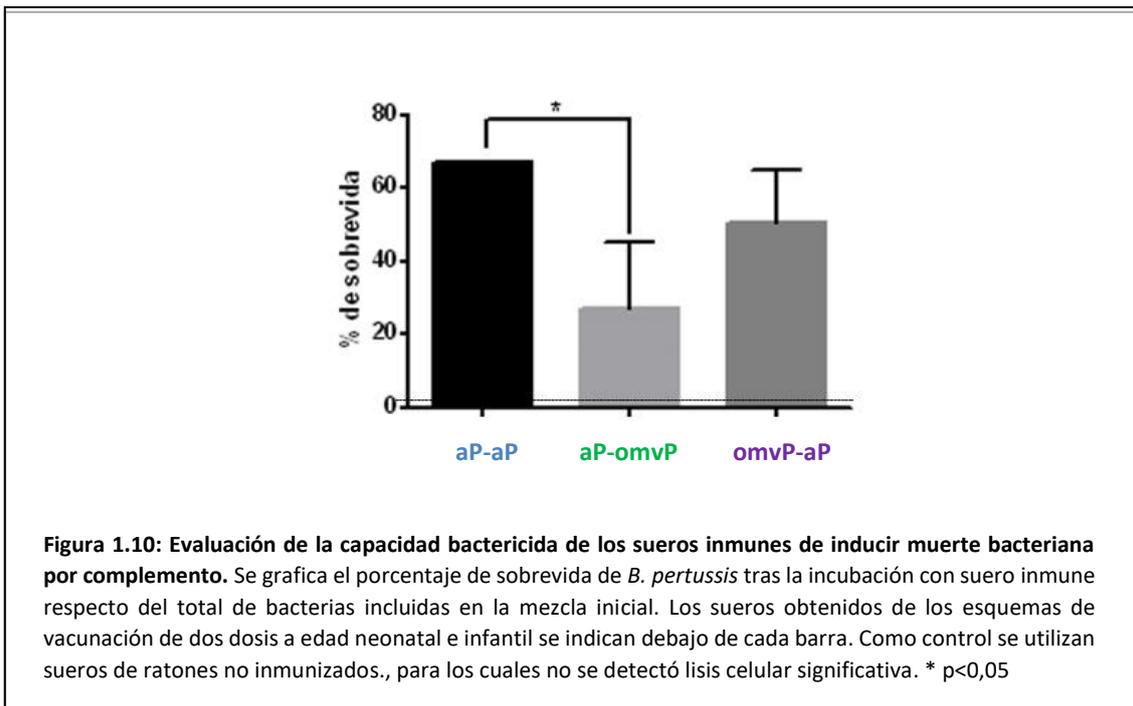
En acuerdo con los títulos de IgG anti-PTxA y los resultados de la avidéz, mediante la técnica de inmunoblot pudimos observar diferencias en el reconocimiento de los sueros estudiados frente a PTxA (Figura 1.9). Mediante estos ensayos pudimos observar que para los esquemas que incluyen diferentes tipos de vacuna para inmunizaciones neonatales e infantiles, el reconocimiento de PTxA fue más intenso en aquellos esquemas que comienzan con una dosis neonatal de aP. Para los esquemas en los que se utilizó a la vacuna wP como dosis neonatal, el reconocimiento de PTxA fue nulo. Así mientras que para el esquema wP-aP no se detecta reconocimiento para la toxina pertussis, para el esquema aP-wP se vislumbra una banda de reconocimiento. Estos resultados también son evidencia de la presencia de un efecto prime boost. También se observa que los sueros obtenidos de vacunados con wP en la dosis infantil y neonatal el reconocimiento de PTxA fue nulo.



Respecto de los isotipos de IgG, una observación importante para nosotros fue que los esquemas que comenzaban con omvP o wP desencadenaban respuestas de anticuerpos con una relación $IgG2a/IgG1 > 1,4$. La alta proporción de $IgG2a/IgG1$ observada en los esquemas que consisten en una dosis neonatal con omvP o wP y una dosis de aP para la infancia, no solo sugiere

que omvP o wP sesgó la respuesta inmune hacia un perfil Th1, sino que también proporciona evidencia de un efecto del *prime boost* heterólogo .

Teniendo en cuenta las diferencias detectadas en cuanto perfil y magnitud de la respuesta humoral conferida por la inmunización con esquemas heterólogos y que incluyen una dosis neonatal, avanzamos con la caracterización de los sueros a través de la evaluación de la capacidad bactericida de los mismos. En particular se evaluó la capacidad bactericida de sueros inactivados provenientes de ratones con los esquemas de dos dosis: aP-aP, aP-omvP y también para omvP-aP. Brevemente los ensayos consistieron en enfrentar una suspensión bacteriana de *B. pertussis* de 500 UFC con los sueros murinos inmunes inactivados a los que se les agrega una fuente exógena y estandarizada de complemento. Luego de una incubación de 1 hora a 37°C, determinamos la capacidad bactericida del suero como porcentaje de sobrevivencia bacteriana, con respecto de la cantidad de bacteria en la mezcla inicial. Como controles negativos utilizamos suero de ratones naive (dato no mostrado). En la figura 1.10 donde se presentan los resultados obtenidos se observa que el esquema aP-omvP induce una respuesta humoral con mayor capacidad bactericida, cuando se compara con los esquemas aP-aP y omvP-aP.



Evaluación de los mecanismos efectores de la protección mediante experimentos de transferencia pasiva de la inmunidad.

Con el objetivo de evaluar la contribución de la respuesta humoral y el de las poblaciones celulares activadas en el bazo proveniente de los ratones inmunizados en la protección observada para los esquemas de vacunación de interés, procedimos a realizar ensayos de transferencia pasiva de suero y de células del bazo provenientes de los ratones inmunes hacia animales naive. Específicamente, transferimos 100 μ l de sueros inmunes provenientes de esquemas aP-aP, aP- omvP y omvP-aP y un control sin inmunizar a los grupos de ratones naive. A las 24 h de haber recibido los sueros, estos grupos de ratones fueron desafiados con una dosis subletal de *B. pertussis* de forma de luego evaluar la protección conferida exclusivamente por el suero de un ratón inmunizado (Figura 1.11 Panel A). A través de estos ensayos pudimos observar

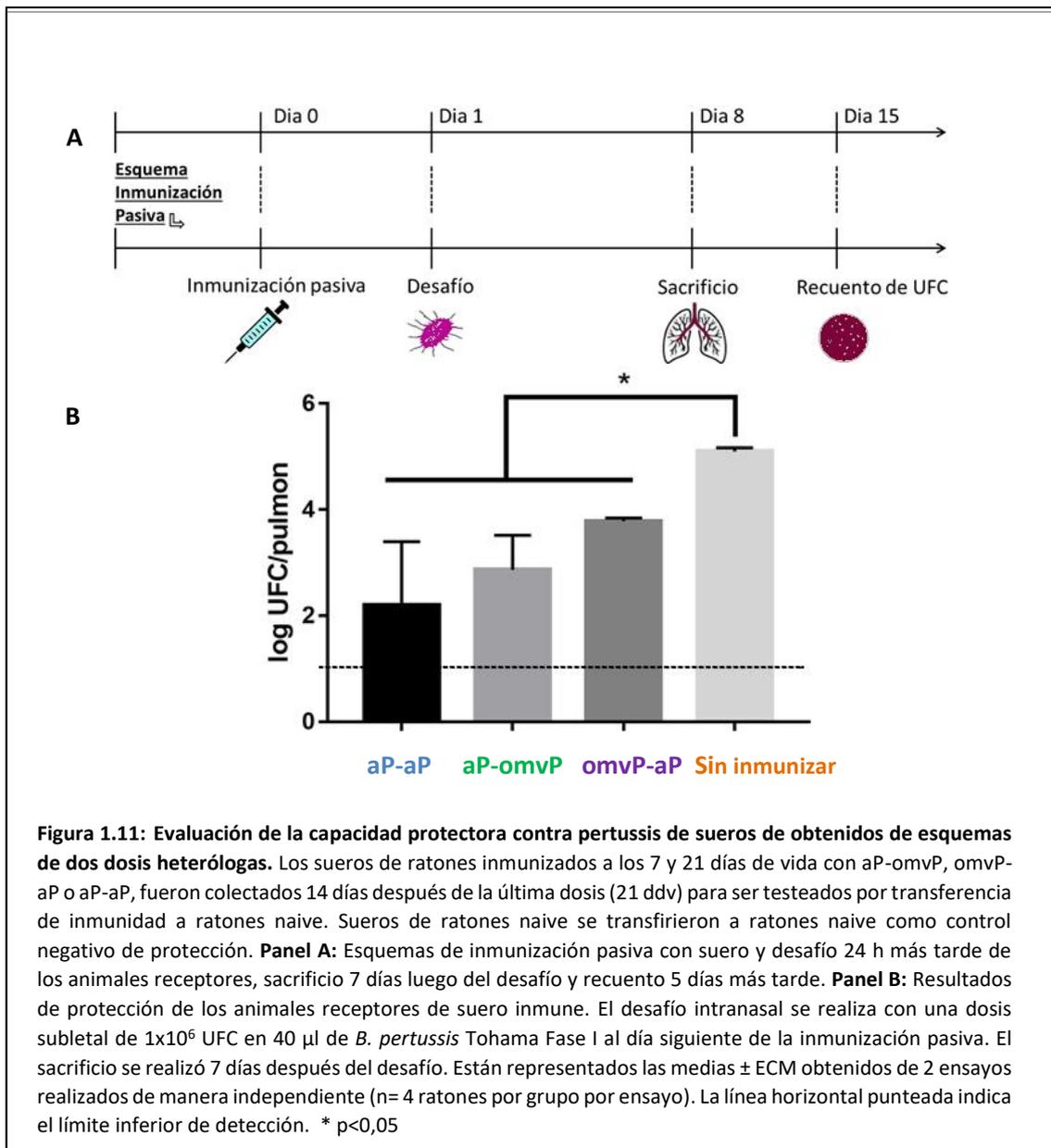
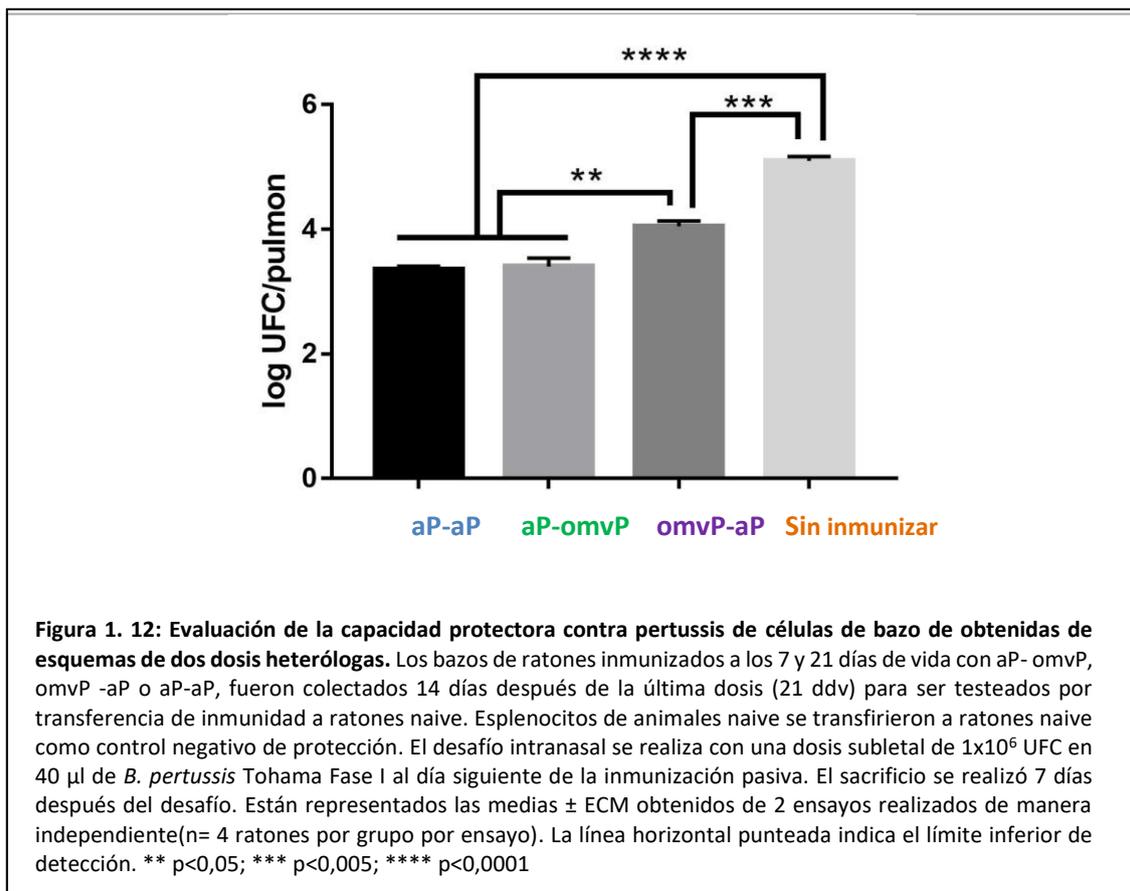


Figura 1.11: Evaluación de la capacidad protectora contra pertussis de sueros de obtenidos de esquemas de dos dosis heterólogas. Los sueros de ratones inmunizados a los 7 y 21 días de vida con aP-omvP, omvP-aP o aP-aP, fueron colectados 14 días después de la última dosis (21 ddv) para ser testeados por transferencia de inmunidad a ratones naive. Sueros de ratones naive se transfirieron a ratones naive como control negativo de protección. **Panel A:** Esquemas de inmunización pasiva con suero y desafío 24 h más tarde de los animales receptores, sacrificio 7 días luego del desafío y recuento 5 días más tarde. **Panel B:** Resultados de protección de los animales receptores de suero inmune. El desafío intranasal se realiza con una dosis subletal de 1×10^6 UFC en 40 μ l de *B. pertussis* Tohama Fase I al día siguiente de la inmunización pasiva. El sacrificio se realizó 7 días después del desafío. Están representados las medias \pm ECM obtenidos de 2 ensayos realizados de manera independiente (n= 4 ratones por grupo por ensayo). La línea horizontal punteada indica el límite inferior de detección. * p<0,05

que todos los sueros inmunes testeados tienen la capacidad de reducir de manera significativa la colonización bacteriana en los pulmones de los ratones receptores respecto al control sin inmunizar, reduciendo entre 3 órdenes de magnitud para el esquema aP-aP, 2,3 órdenes para el esquema aP-omvP y 1,4 para omvP-aP el recuento bacteriano en pulmón en relación a los ratones no vacunados ($p < 0,05$).

Para evaluar el rol de las poblaciones celulares del bazo en la protección, se realizaron experimentos de transferencia pasiva de esplenocitos desde ratones inmunes hacia animales naive. Para ello se extrajeron quirúrgicamente los bazos de animales inmunizados con los esquemas de 2 dosis aP- aP, aP- omvP y omvP- aP, y se transfirieron por inyección intraperitoneal a ratones naive. A través de estos ensayos pudimos observar que las células de los bazos de los animales inmunizados con los esquemas que comienzan con aP reducen los recuentos de UFC en 1,7 órdenes de magnitud respecto de las halladas para el control sin inmunizar (Figura 1.12, $p < 0,0001$). Para el esquema omvP-aP la reducción de la colonización bacteriana en los pulmones fue de 1,1 órdenes respecto del control negativo de protección (Figura 1.12, $p < 0,001$).



A los ratones que fueron donantes del bazo se le administraron calmantes y fueron puestos en cuarentena hasta su completa recuperación. Una vez constatada su recuperación estos animales fueron desafiados con una suspensión subletal de *B. pertussis* para evaluar la

capacidad protectora del esquema de inmunización recibido. En la Figura 1.13 donde se presentan los resultados obtenidos de un único ensayo podemos observar que independientemente del esquema de inmunización empleado los ratones inmunes esplenectomizados conservaron la capacidad protectora. En estos animales el recuento de UFC en los pulmones descendió en al menos 5 órdenes de magnitud respecto de los detectados en los animales esplenectomizados sin inmunizar. Estos resultados indican que la protección conferida por los esquemas que incluyen una dosis neonatal y una infantil está signada por la presencia de anticuerpos circulantes, y en menor medida por la respuesta inmune mediada por los esplenocitos.

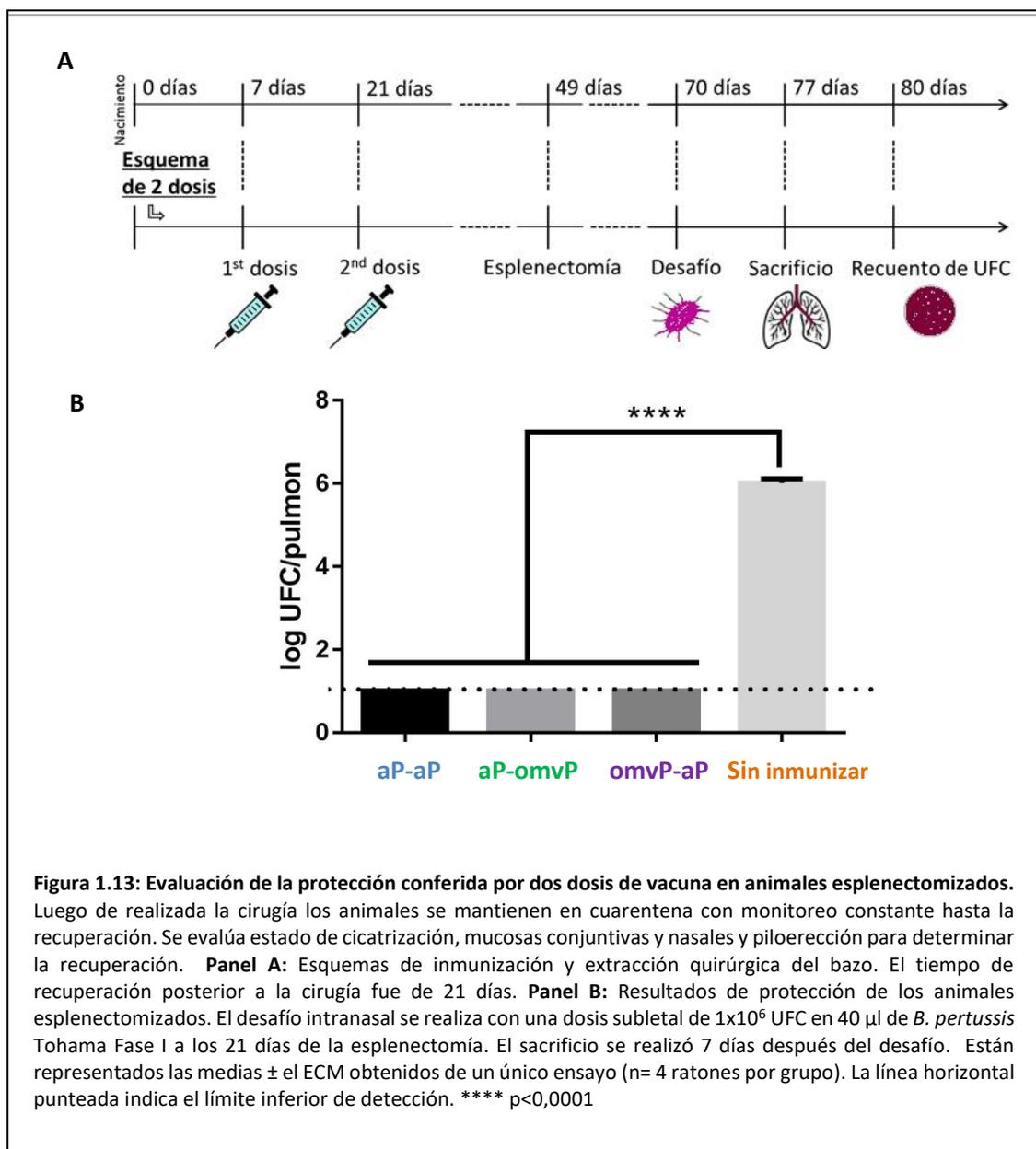


Figura 1.13: Evaluación de la protección conferida por dos dosis de vacuna en animales esplenectomizados. Luego de realizada la cirugía los animales se mantienen en cuarentena con monitoreo constante hasta la recuperación. Se evalúa estado de cicatrización, mucosas conjuntivas y nasales y piloerección para determinar la recuperación. **Panel A:** Esquemas de inmunización y extracción quirúrgica del bazo. El tiempo de recuperación posterior a la cirugía fue de 21 días. **Panel B:** Resultados de protección de los animales esplenectomizados. El desafío intranasal se realiza con una dosis subletal de 1×10^6 UFC en $40 \mu\text{l}$ de *B. pertussis* Tohama Fase I a los 21 días de la esplenectomía. El sacrificio se realizó 7 días después del desafío. Están representados las medias \pm el ECM obtenidos de un único ensayo ($n = 4$ ratones por grupo). La línea horizontal punteada indica el límite inferior de detección. **** $p < 0,0001$

Discusión

En el contexto epidemiológico actual de pertussis donde en muchos países el número de casos ha aumentado principalmente en recién nacidos y lactantes que no han recibido dosis primarias debido a la edad ¹²⁸, se vuelve a discutir la vacunación neonatal y su posible implementación ¹⁹⁷. La inmunización en los neonatos tiene como positivo el hecho de que brindaría una protección temprana reduciendo el período crítico de vulnerabilidad intrínseco a los esquemas de vacunación de rutina que comienzan más tarde en la vida. Esta estrategia también podría cubrir las brechas que deja la vacunación durante la gestación que fue implementada en varios países a partir del 2012, ya sea por la relativamente baja cobertura en gestantes o por la ocurrencia de partos prematuros. La vacunación durante el periodo neonatal que hemos llamado vacunación al nacer también resulta atractiva ya que es posible realizarla con altas coberturas, dado que el nacimiento es un punto de contacto crucial con los sistemas de salud del globo. Sin embargo, existen limitaciones potenciales para esta estrategia que incluyen una inmunogenicidad deficiente ¹⁸³, problemas de seguridad y el desarrollo de hiporrespuesta al mismo antígeno y / o antígenos concomitantes administrados al nacer o en los meses posteriores ^{154,155}. Además, la inmunidad innata neonatal muestra una deficiencia funcional en las células presentadoras de antígeno y la respuesta inmune está polarizada hacia la inmunidad de tipo Th2 ¹⁸⁴. El sistema inmune innato neonatal presenta diferencias con el del adulto. Entre otras, los neutrófilos y las células presentadoras de antígenos varían en su concentración y características en esta etapa comparado con otras edades ¹⁹⁸. En los neonatos por ejemplo, los neutrófilos representan un tercio de la concentración detectada en adultos ¹⁹⁹. La expresión de receptores como el TLR4 también se encuentran disminuidos en estas células ^{200,90}. Por otra parte, las células presentadoras de antígeno, compuestas principalmente células dendríticas (CD) también se expresan de manera diferencial en el neonato. Más aún, ellas tienen menor contenido del complejo MHCII y tienen una limitada capacidad de activar respuesta dependientes de linfocitos T y linfocitos B ^{201,198}. En suma, las células dendríticas en neonatos son mayormente células inmaduras ²⁰². Los linfocitos T colaboradores proliferan preferentemente hacia perfiles de tipo Th2 presentando una hipermetilación de la región codificante del INF- γ , necesario para la proliferación de tipo Th1 ¹⁷⁸. Los linfocitos Th17 poseen baja o nula presencia en las etapas tempranas de la vida, probablemente debido a la baja transcripción del factor de transcripción ROR γ t, clave en el desarrollo de Th17 ²⁰³. Los linfocitos T foliculares también presentan deficiencias en la expresión de receptores y en la producción de interleuquinas que limitan su función dentro de los centros germinales ²⁰⁴. Por su parte, los

linfocitos B en el neonato son células inmaduras con un bajo repertorio de inmunoglobulinas en su superficie ²⁰⁴.

Pese a estas deficiencias del sistema inmunitario del neonato, la eficacia de las vacunas que se utilizan actualmente en el período neonatal: BCG, hepatitis B y vacunas antipoliomielíticas orales, es una prueba de que las vacunas pueden administrarse con éxito al recién nacido para inducir protección frente a diferentes enfermedades ¹⁸⁵. En esta sección de mi trabajo de tesis, utilizamos el modelo de ratón para analizar si la inmunización neonatal con vacunas contra pertussis que inducen diferentes perfiles de respuesta inmune del tipo Th (vacuna aP que induce principalmente el perfil Th2, wP que induce Th1 / Th17 y vacuna basada en OMVs que induce Th1 / Th2 / Th17 mixto perfil). Nuestros ensayos mostraron que la protección contra *B. pertussis* en desafíos subletales resultó ser mayor en ratones en edades tempranas inmunizados con 1 dosis de vacuna aP que en ratones inmunizados con vacunas omvP o wP. La protección frente a pertussis se incrementó en el caso de los esquemas de dos inmunizaciones aplicadas una a los 7 días y la segunda dosis a los 21 días, no observándose interferencia de la dosis neonatal sobre la dosis infantil. Este aumento para los esquemas de dos dosis se observó cuando se utilizó la vacuna aP para las dos dosis o cuando se implementaron esquemas mixtos (prime boost heterólogo) que incluyen a la vacuna aP para la primera dosis y vacuna OMVP o wP para la segunda dosis. Es importante señalar aquí que los esquemas de dos dosis que incluían solo vacunas que inducen perfiles inmunitarios Th1 como wP (wP-wP) o la vacuna basada en omvP(omvP-omvP), no funcionaron correctamente. Esto está en acuerdo con el hecho que mencionamos anteriormente sobre que el entorno inmunológico neonatal está polarizado hacia la inmunidad de tipo Th2 con limitación de las respuestas de tipo Th1 ^{204,205}. Destacamos al candidato vacunal basado en OMVs que cuando se lo emplea como primera dosis en esquemas heterólogos el mismo resulta exitoso en términos de reducir significativamente la colonización bacteriana en los pulmones de ratones desafiados con dosis subletales de *B. pertussis*. Estos resultados fueron obtenidos no sólo en el corto plazo sino también cuando se realizó el desafío con *B. pertussis* a los 200 días post segunda inmunización (Figuras 1.7 y 1.8).

Para los recién nacidos se describió que no cuentan con un microambiente anatómico completamente desarrollado que sea adecuado para la interacción entre las CD y los linfocitos T y B ²⁰⁶. De hecho, no existe una demarcación definida entre las diferentes zonas linfoides y las zonas T CD4 + en los recién nacidos. De acuerdo con este conocimiento, en nuestros ensayos no se detectó proliferación de células T específicas de *B. pertussis* en ratones que solo recibieron una dosis a los 7 días de vida (datos no mostrados), sugiriendo que la protección estaba mediada por anticuerpos. De hecho, aun en los esquemas de 2 dosis (una dosis neonatal y una dosis infantil) la contribución en la protección de la respuesta mediada por los esplenocitos es

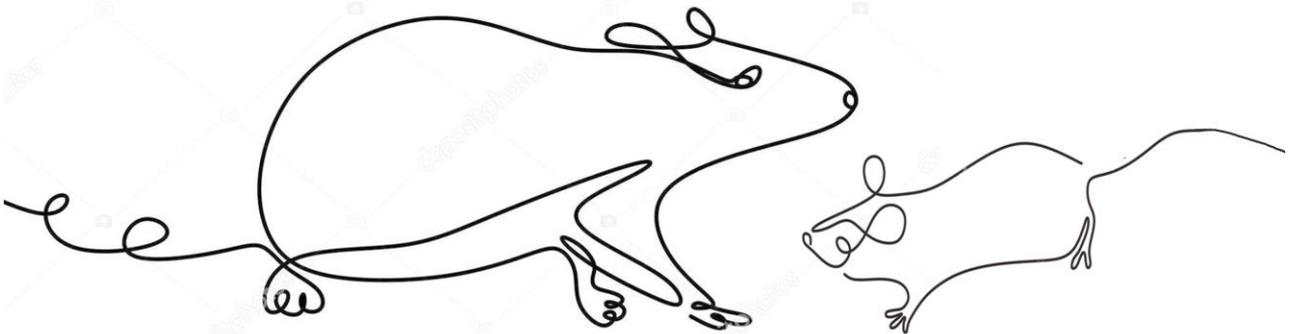
reducida (Figura 1.12 Panel B). Los niveles de protección detectados para los esquemas de aP-aP y para aquellos esquemas que incluían la inmunización neonatal con la vacuna aP es acorde con el aumento de los niveles de anticuerpos anti-PTxA detectados (Tabla 1.1). Curiosamente, los anticuerpos generados en ratones a partir de esquemas heterólogos mostraron anticuerpos con mayor avidéz que los obtenidos en ratones inmunizados con aP-aP. Lo que nos resultó interesante es la observación del aumento en el porcentaje de elución de anticuerpos anti-PTxA en presencia de NH₄SCN para esquemas de vacunación mixtos que comenzaron con una dosis neonatal con aP, sugiriendo la presencia de un efecto de prime –boost. Otra evidencia de este efecto fueron las relaciones entre los títulos IgG2a / IgG1 detectadas para esquemas mixtos que comenzaron con una dosis neonatal con vacunas que inducen un perfil Th1, es decir, la vacuna omvP o wP. En acuerdo con los resultados sobre los títulos de IgG y los resultados de los ensayos de avidéz, se observó en los ensayos de Western blot, que la intensidad de reconocimiento de PTxA resultó mayor para los esquemas conteniendo las vacunas comerciales aP que los esquemas wP-wP. El reconocimiento del esquema de doble dosis de nuestro candidato vacunal mostró un reconocimiento mayor al presentado por 2 dosis de vacuna aP, mostrando que sumado a la composición multi-epítope, es capaz de inducir un título de anticuerpos con capacidad de reconocimiento importante contra este antígeno clave en la protección. Al analizar los esquemas heterólogos que incluyen aP, es de destacar que aquellos que comienzan con la vacuna aP presentan mayor reconocimiento que los que utilizan aP como segunda dosis. Esto responde a la capacidad mayor de la aP de inducir respuesta en la etapa neonatal, debido a su inducción preferencial de linfocitos T del tipo Th2, el tipo preferencial mediante el cual del neonato desarrolla su respuesta inmune (Figura. 1.9). Más aún los ensayos de transferencia pasiva realizados a partir de dadores con los esquemas heterólogos de interés: aP- omvP y omvP -aP, muestran el mayor peso relativo del rol de la respuesta humoral en la protección respecto de la proveniente de las poblaciones celulares de los bazos inmunes.

Todos estos resultados aquí presentados muestran que la inmunización neonatal es factible de ser empleada contra pertussis, incluso en esquemas multidosis. Si bien el empleo de una vacuna con perfil Th2 en la dosis neonatal se muestra como efectiva tanto en esquemas de una dosis como en esquemas de 2 dosis con la misma vacuna, el empleo de un esquema heterólogo omvP-aP resultó superador en términos de la calidad de la respuesta inmunológica induciendo el perfil Th1 recomendado para la protección contra pertussis. Es de destacar que el esquema heterólogo wP-aP si bien indujo una respuesta caracterizada por el mismo perfil, la misma no resultó ser eficiente para la protección contra pertussis. Estos datos nos sugieren que la aplicación en la etapa neonatal de una vacuna multi-epítope con alta concentración de PAMPs que induce una respuesta mixta Th1/Th2/Th17 como la omvP sobrelleva las deficiencias del

sistema inmunológico neonatal. Esta capacidad no fue evidenciada para un candidato multi-epitope que induce una respuesta inmune con un fuerte perfil Th1, como la wP. Es así que resulta esencial elegir qué tipo de vacuna se utilizará como dosis al nacer para lograr un esquema de protección efectivo. Otra estrategia que está intentando subsanar las deficiencias en la inducción de un perfil de respuesta inmunológica más robusto en el neonato refiere al empleo de nuevos adyuvantes. En este sentido, otros autores han comenzado a investigar la capacidad adyuvante de la emulsión de aceite en agua llamada MF59 para ser utilizado a edad temprana²⁰⁶. Recientemente se observó que este adyuvante induce una estimulación prolongada del antígeno de la vacuna y mejora el reclutamiento y la actividad de APC, promoviendo posteriormente la actividad de las células T efectoras CD4 +²⁰⁶. Otro enfoque que se ha probado con éxito en el modelo murino para promover respuestas robustas de células T es la coadministración de IL-12 y la vacuna de subunidad específica para el virus de la influenza a ratones recién nacidos que condujo a una mayor expresión esplénica de IFN γ y una mayor eficacia protectora de las vacunas²⁰⁷. El modelo murino que incluye una dosis neonatal aquí puesto a punto puede servir de base para completar los estudios de nuevos adyuvantes que podrían resultar también efectivos para el control de pertussis.

Capítulo 2

INMUNIZACIÓN NEONATAL EN EL CONTEXTO DE LA VACUNACIÓN MATERNAL: ENSEÑANZAS DEL MODELO MURINO



Introducción

Como hemos descrito a lo largo de este trabajo de tesis, la principal preocupación sobre la situación epidemiológica reciente de pertussis es el aumento de la morbilidad y, por lo tanto, de la mortalidad en los recién nacidos y lactantes muy pequeños como para recibir sus primeras dosis vacunales contra la enfermedad ²⁰⁸. En este contexto para proteger a esta población vulnerable se ensayaron y se están implementando algunas estrategias. Una de ellas es la estrategia denominada "capullo" que consiste en inmunizar a los miembros del hogar y de la familia de los recién nacidos. El objetivo de esta estrategia es evitar el contagio desde el núcleo de contactos cercanos al recién nacido y aunque recomendada es de difícil implementación. Más aún, recientemente ha sido cuestionada porque los contactos inmunizados con la vacuna acelular pueden ser asintomáticos y en alguna medida seguir contagiando ^{209,210}. En nuestro país en lugar de esta estrategia se propuso en el año 2009 la vacunación de los padres de recién nacidos con un peso menor de 1.500 g. En Suiza, se recomienda la inmunización de los miembros del hogar si la última dosis de vacuna contra la pertussis fue hace más de 10 años. La única estrategia con más resultados que la sustentan es la inmunización materna durante el embarazo. Esta estrategia no solo busca reducir el contagio desde la madre sino también transferir en forma pasiva inmunidad específica al feto y al recién nacido^{211,212}. Esta estrategia fue recomendada en 2011 ²¹³ e implementada por primera vez en Argentina ¹⁷⁶ y en el Reino Unido en 2012 ²¹⁴. En un principio, la recomendación de la vacunación durante el embarazo fue para un solo embarazo, pero a partir del 2016 en Argentina y 2017 en Estados Unidos, se recomendó para todos los embarazos. Desde su implementación varios estudios han mostrado a esta estrategia como segura para la madre y para el feto ^{215,216,217,218,219}. La vacuna acelular que se emplea, a diferencia de la vacuna contra la influenza, contiene como adyuvante al fosfato de aluminio (0,39 mg / dosis para Boostrix® y 1,5 mg / dosis para Adacel®). No hay evidencia de que el aluminio en la vacuna ponga en riesgo al feto en desarrollo, especialmente porque se estima que la ingestión dietética natural de aluminio de un adulto es de 7 a 9 mg por día ²²⁰. Los estudios poblacionales realizados en Argentina y en Reino Unido han estimado una eficacia de la vacuna del 91 al 95% para prevenir la muerte infantil ^{221,222,151}. Recientemente, un estudio de cohorte retrospectivo de California mostró que la inmunización durante el embarazo en comparación con la vacunación posparto reduce significativamente el riesgo de contraer pertussis ²²³.

Respecto en qué momento aplicar la dosis de vacuna en el embarazo, el mismo se definió en base a la cinética de producción de anticuerpos después de la vacunación y la transferencia transplacentaria. Mientras que en Suiza se recomendó la vacunación a partir de

las 13 semanas de gestación, EE.UU, Argentina y Gran Bretaña inicialmente estuvieron a favor de una vacunación después de la semana 20 de gestación²²⁴. En un estudio observacional reciente, se mostró que la inmunización durante el segundo trimestre (13 a 26 semanas de gestación) genera títulos de anticuerpos más altos en el recién nacido en comparación con la vacunación posterior ^{224, 225}.

Si bien la estrategia de la inmunización durante el embarazo cuenta con sustento para su utilización, un aspecto que genera preocupación respecto su uso es que los anticuerpos transferidos al feto podrían interferir luego en la inducción de la respuesta inmune de las vacunas infantiles. Este fenómeno se conoce como interferencia inmune, *blunting* o bloqueo de respuesta inmune ^{226, 227} y se ha descrito para otras vacunas ²²⁸. En el caso de pertussis se ha detectado un apagamiento de la respuesta humoral para las vacunas de la infancia aunque su relevancia clínica no es clara e incluso difícil de establecer ya que no existe un correlato inmunológico de protección fácil de medir ^{229, 178, 230}. Algunos autores incluso indican que el efecto de *blunting* es fuertemente dependiente del tipo de vacuna a aplicar, y se ve exacerbado cuando la vacuna maternal y la infantil tienen la misma composición ¹⁵².

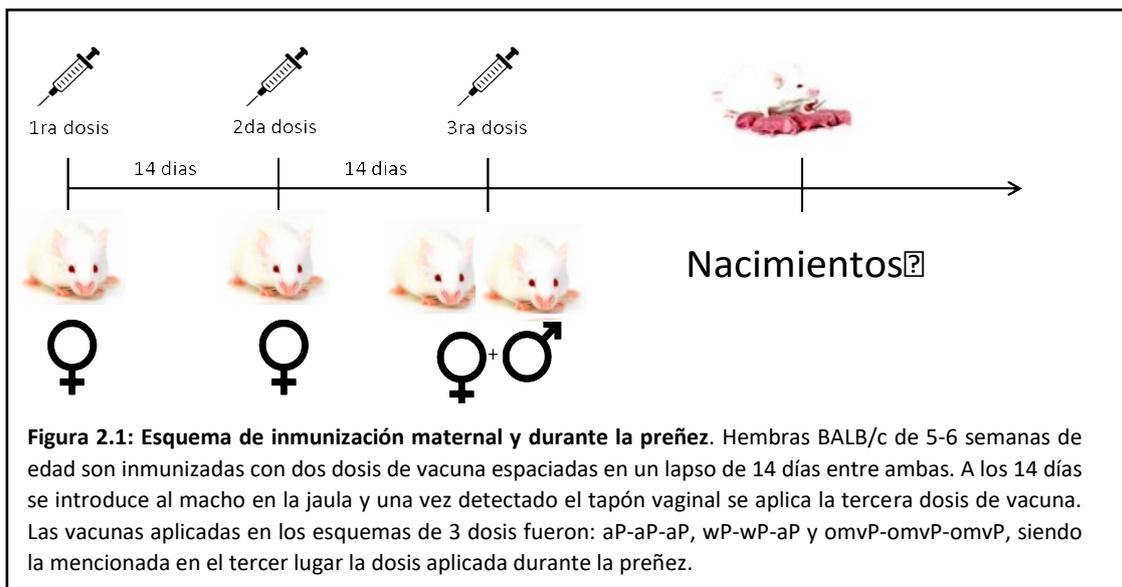
Más allá de estas dudas sobre la inmunización durante el embarazo, los efectos benéficos están haciendo que los distintos países vayan adoptando esta estrategia. Es en este contexto que nos propusimos evaluar en el modelo murino la inmunización neonatal estudiada en el capítulo anterior, pero en crías nacidas de madres inmunizadas contra pertussis durante la preñez. Para ello trabajamos con esquemas de vacunación en las madres que incluyen diferentes vacunas y también evaluamos el empleo de distintas formulaciones en las dosis al nacer. Los resultados alcanzados se presentan a continuación.

Resultados

La estrategia actualmente aceptada y aplicada para proteger contra pertussis al grupo más vulnerable de la enfermedad es la vacunación durante el embarazo. Para avanzar en la comprensión del impacto de la inmunidad transferida con la inmunización neonatal o al nacer que estamos estudiando empleamos el modelo murino de inmunización en la preñez ya establecido en nuestro laboratorio. Aquí creemos oportuno aclarar que la manera en que se transfiere la inmunidad durante el embarazo depende del modelo animal empleado. Las variaciones que se detectan entre los modelos están determinadas entre otros por diferencias en la estructura de la placenta y en la expresión de receptores FcRn. Así, mientras que en el humano la transferencia de la inmunidad ocurre mayoritariamente a través del tránsito

transplacentario, en el modelo murino la transferencia de inmunidad pasiva ocurre por vía transplacentaria y en mayor medida por la lactancia²³¹.

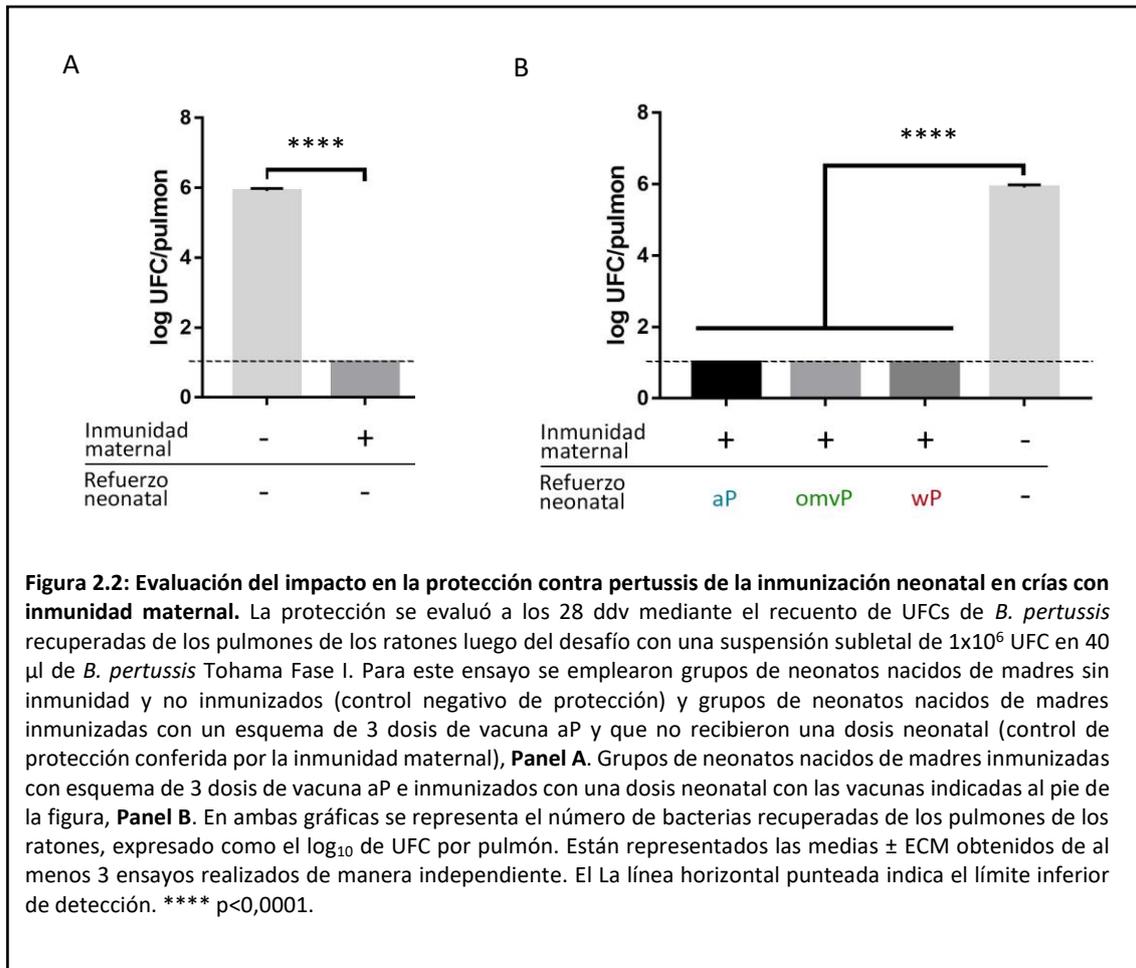
Teniendo en cuenta que la vacuna que se emplea en el embarazo es la vacuna acelular (aP) y que las dosis previas que ha recibido la mujer podrían tener impacto en la respuesta inmune durante el embarazo y en la transferencia, ensayamos esquemas que constan de 3 dosis según se indica en la Figura 2.1. Resumidamente el esquema realizado implicó inmunizar a un grupo de hembras BALB/c de 5-6 semanas con una primera dosis de la vacuna a ensayar y 14 días después con la segunda dosis. A los 14 días de la segunda dosis y luego de sincronizar el celo de la hembra, se procedió a colocar a las hembras inmunizadas en una jaula con un macho (una pareja por jaula) para el apareamiento. Como hemos detallado anteriormente hicimos una evaluación diaria para detectar la presencia de tapón mucoso vaginal que indica el coito y probablemente la preñez. Una vez detectado, se aplicó la tercera dosis a la madre. Ensayamos 3 esquemas de vacunación a las madres: aP-aP-aP, wP-wP-aP y omvP-omvP-omvP.



Evaluación del impacto de la inmunización neonatal en crías nacidas de hembras que recibieron el esquema aP-aP-aP de vacunación.

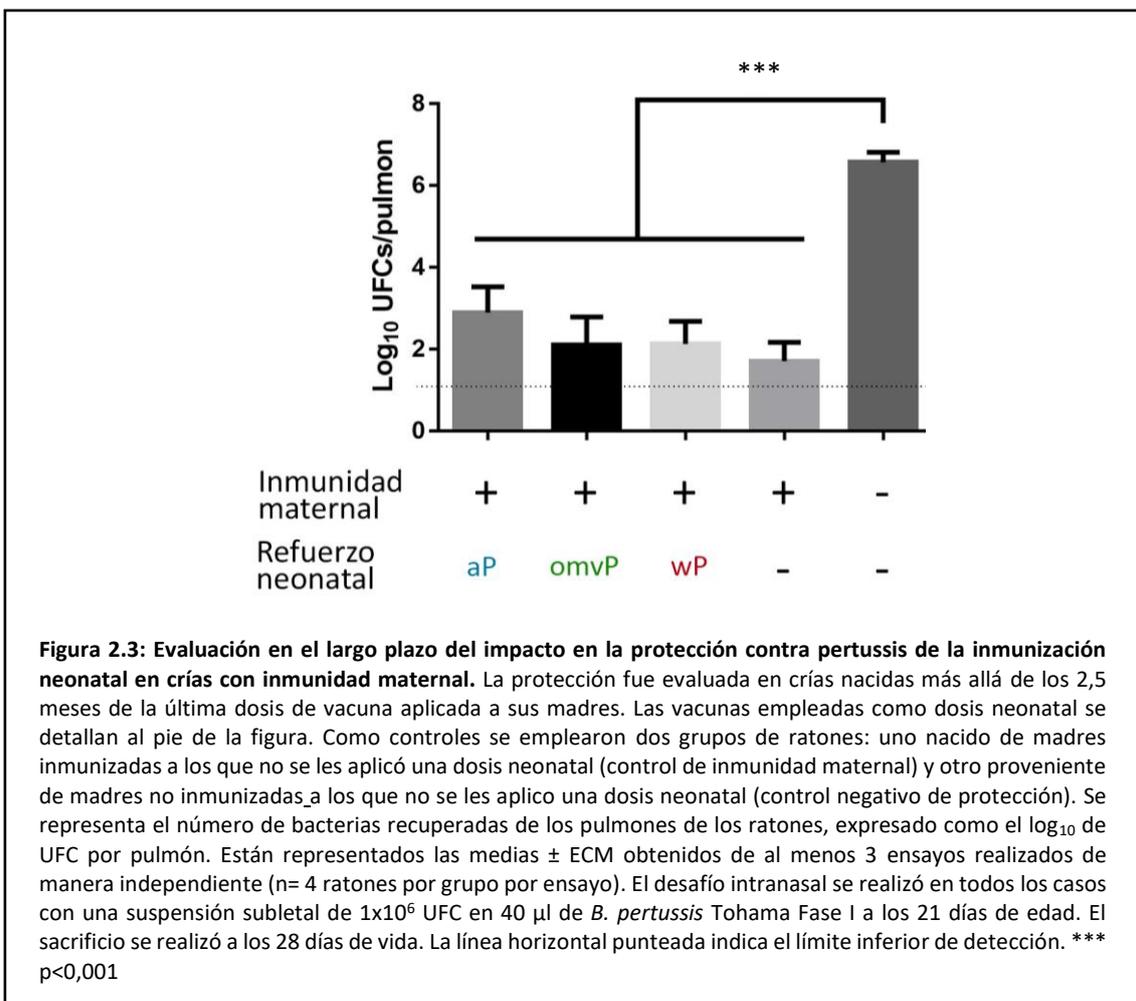
El esquema de 3 dosis de vacuna aP emula una situación propia de los países que emplean en todo su calendario de vacunación vacunas acelulares que promueven un perfil de respuesta del tipo Th2. Para este esquema pudimos comprobar que la inmunización maternal transfiere inmunidad protectora a las crías según los datos sobre los recuentos de UFC recuperados de los pulmones de los ratones provenientes de madres inmunizadas en comparación con las obtenidas en ratones provenientes de madres no inmunizadas (Figura 2.1

Panel A, $p < 0.001$). Una vez que corroboramos la transferencia de la inmunidad materna y la capacidad protectora de la misma en la cría, procedimos a evaluar el impacto de la dosis neonatal en el entorno de la inmunidad materna. Para la dosis neonatal (7 días de edad) ensayamos los tres tipos de vacunas empleadas en este trabajo de tesis: aP, omvP y wP. Para evaluar la protección, todos los ratones se expusieron a los 21 días de edad a un desafío subletal de 10^6 UFC de la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama fase I. Como grupos controles se se



utilizaron ratones no inmunizados nacidos tanto de madres inmunizadas como de madres no inmunizadas. Los resultados alcanzados se muestran en la Figura 2.2 Panel B. Los recuentos de UFC recuperados de los pulmones de las crías con inmunidad materna fueron no detectables para cualquiera de las vacunas utilizadas en las dosis al nacer. Estos recuentos fueron claramente inferiores a los detectados en el grupo utilizado como control negativo de protección ($p < 0.001$). Aquí nos resulta interesante marcar que, a diferencia de lo observado en las crías nacidas de madres no inmunizadas, la dosis al nacer resultó ser efectiva en la inducción de la protección independientemente del tipo de vacuna utilizada (Figura 2.2 Panel B). Mas aun, la inmunización neonatal no interfirió con la inmunidad protectora transferida por la madre (Figura 2.2 Panel A). Todos los datos que hasta aquí se presentaron se obtuvieron en ratones nacidos 1 mes después

de que sus madres recibieron la última dosis de aP. También hicimos evaluaciones de la capacidad protectora contra la infección por *B. pertussis* en ratones que nacieron más allá de los 2,5 meses después de que sus madres recibieran la dosis de vacuna en la gestación. Los resultados alcanzados se muestran en la Figura 2.3. Como puede observarse en dicha figura, los niveles de UFC detectados, aunque más altos que los detectados en las crías nacidas 1 mes después de que las madres recibieron su dosis durante el embarazo son mucho menores que los detectados en los animales sin inmunidad. Los valores más altos de UFC recuperados se detectaron en el grupo de animales vacunados con la vacuna aP (aunque sin afectar de manera significativa la capacidad protectora frente al control sin inmunidad), lo que indica que la inmunización neonatal aP interfirió con la funcionalidad de los anticuerpos maternos. También pudimos observar que los mejores resultados de protección se presentaron en aquellos animales que no fueron inmunizados al nacer, pero no hubo diferencias significativas entre los grupos que recibieron algún tipo de vacuna al nacer y los no inmunizados.



En cuanto a los títulos de anticuerpos, realizamos una cuantificación de anticuerpos IgG anti-PTxA en las crías vacunadas. En contraste con los títulos indetectables en las crías vacunadas con una dosis neonatal y nacidas de hembras no inmunizadas, en las crías nacidas de hembras inmunizadas y vacunadas con una dosis neonatal se detectaron niveles significativos de IgG anti-PTxA (Tabla 2.1). También pudimos observar que tal como se reportara en otros trabajos, existe una concentración de anticuerpos transferidos, donde la madre posee el mismo o menor título de anticuerpos que su cría sin inmunizar. Los valores más bajos de títulos de IgG se detectaron para los recién nacidos inmunizados con aP ($p < 0,05$). A su vez, detectamos que cuando la dosis neonatal era de vacuna aP, por ende, la misma vacuna que la madre, los títulos de anticuerpos anti-PTxA disminuyen significativamente ($p < 0,001$). Este resultado concuerda con los hallados por Feunou y colaboradores, que encuentran que existe una interferencia o efecto blunting cuando la vacuna maternal y neonatal es la misma ¹⁵².

Teniendo en cuenta que uno de los isotipos de IgG más transferidos de la madre al feto es el IgG1, evaluamos este isotipo en las crías de madres inmunizadas. Los resultados obtenidos volvieron a mostrar que en el caso de los lactantes inmunizados con aP los títulos de IgG1 eran inferiores a los de los neonatos con inmunidad materna pero no inmunizados. En cuanto a la avidéz de los anticuerpos de las crías, observamos, una vez más que, en ratones con inmunidad materna (aP) o en los que también fueron inmunizados con aP, los porcentajes de elución con NH_4SCN fueron superiores a los detectados en ratones que fueron inmunizados con wP o omvP (Tabla 2.1), indicando estos últimos una mayor estabilidad en la unión al antígeno de estos anticuerpos.

Esquemas de vacunación	IgG anti-PTxA	% de IgG eluido con NH_4SCN		IgG1
		0,1875 M	0,375 M	
Madre: aPaPaP	97,67±9,94	NT	NT	NT
Crías				
Sin refuerzo	111,41±6,87	11,36±2,18 *	30,22±1,93 *	28,34±2,95 *
aP	83,95±1,89 *	14,29±3,21 *	17,71±1,92 *	15,04±1,21
omvP	106,84±4,73	2,01±1,85	6,14±0,76 *	42,22±2,39 **
wP	95,93±1,48	0,42±0,31	0,56±0,75	15,90±1,94

Tabla 2.1: Títulos de IgG totales e isotipos determinados mediante técnicas de ELISA utilizando como antígeno a la toxina pertussis. Las determinaciones se realizaron en sueros obtenidos en las crías a los 14 días después de la dosis de vacunación. Como control se emplearon los sueros de animales nacidos de madres inmunizadas que no recibieron una dosis neonatal (sin refuerzo). Los títulos de IgG e IgG1 se expresan como la media geométrica de los valores obtenidos en 2 ensayos independientes. La avidéz de los anticuerpos IgG se midió en presencia de distintas concentraciones de NH_4SCN y los resultados se expresaron como el porcentaje de IgG anti-PT eluido en presencia de NH_4SCN respecto del valor de IgG hallado en ausencia de NH_4SCN . El análisis estadístico entre las medias de cada determinación (IgG, Avidéz, IgG1) se realizó mediante el test ONE-WAY ANOVA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. NT: no testeados.

A través de ensayos de inmunoblot y de acuerdo con los resultados de ELISA-IgG y avidéz obtenidos, se observó un reconocimiento de PTx diferencial (Figura 2.4). Es de destacar que mientras en ratones con inmunidad materna la banda PTxA fue claramente reconocida por los anticuerpos específicos, por el contrario, para ratones con inmunidad materna que recibieron una dosis de aP a los 7 días después del nacimiento el reconocimiento con anticuerpos anti-PTx fue prácticamente nulo.

Teniendo en cuenta todos estos resultados que muestran un efecto de *blunting* en aquellos animales vacunados a los 7 días de vida con vacuna aP, decidimos estudiar si este efecto también se observaba luego de aplicar la dosis infantil. En las crías nacidas de madres vacunadas evaluamos los siguientes esquemas: aP-aP, aP-omvP y aP-wP. Estos ensayos nos permitieron detectar que todas los esquemas aplicados en los

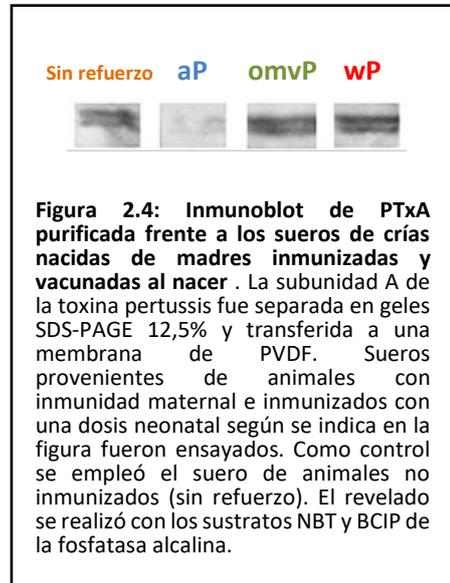


Figura 2.4: Inmunoblot de PTxA purificada frente a los sueros de crías nacidas de madres inmunizadas y vacunadas al nacer. La subunidad A de la toxina pertussis fue separada en gels SDS-PAGE 12,5% y transferida a una membrana de PVDF. Sueros provenientes de animales con inmunidad materna e inmunizados con una dosis neonatal según se indica en la figura fueron ensayados. Como control se empleó el suero de animales no inmunizados (sin refuerzo). El revelado se realizó con los sustratos NBT y BCIP de la fosfatasa alcalina.

ratones con inmunidad materna que incluyeron a la vacuna aP como dosis neonatal, mostraron

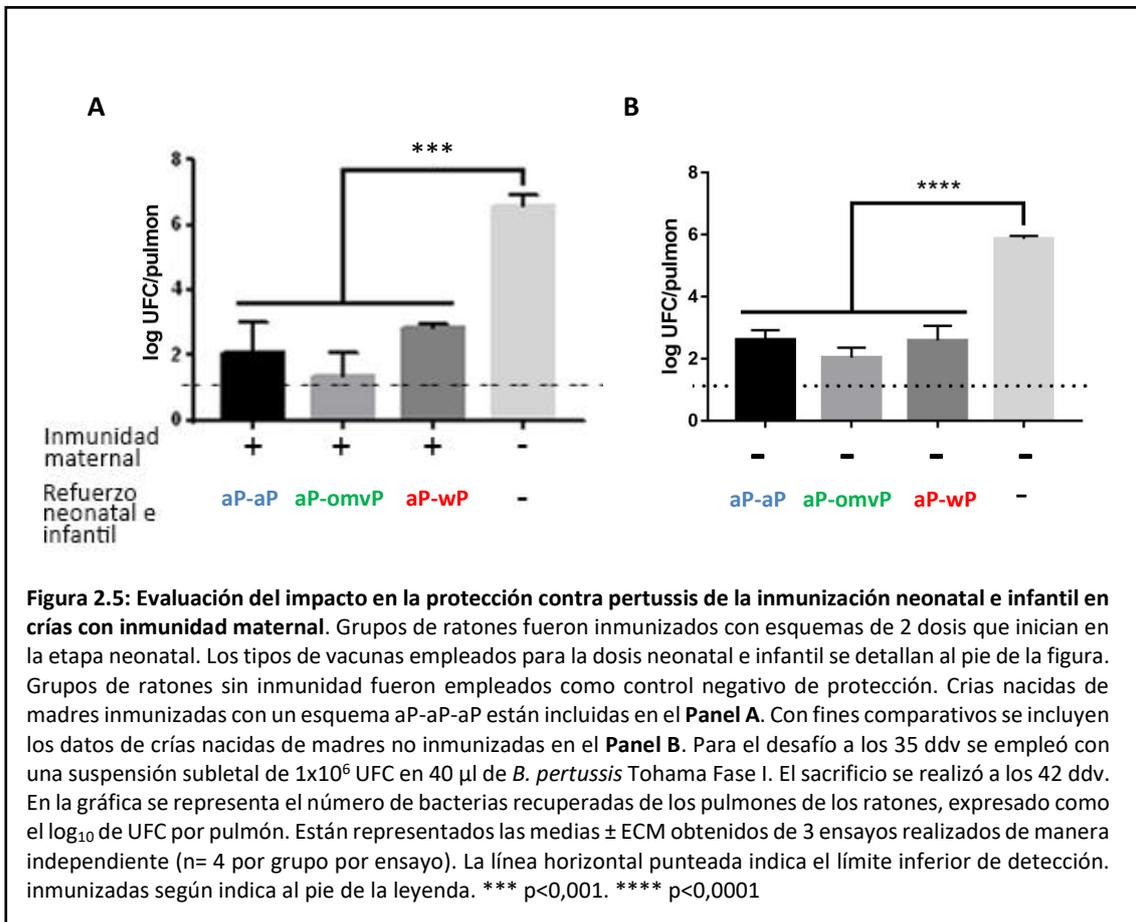
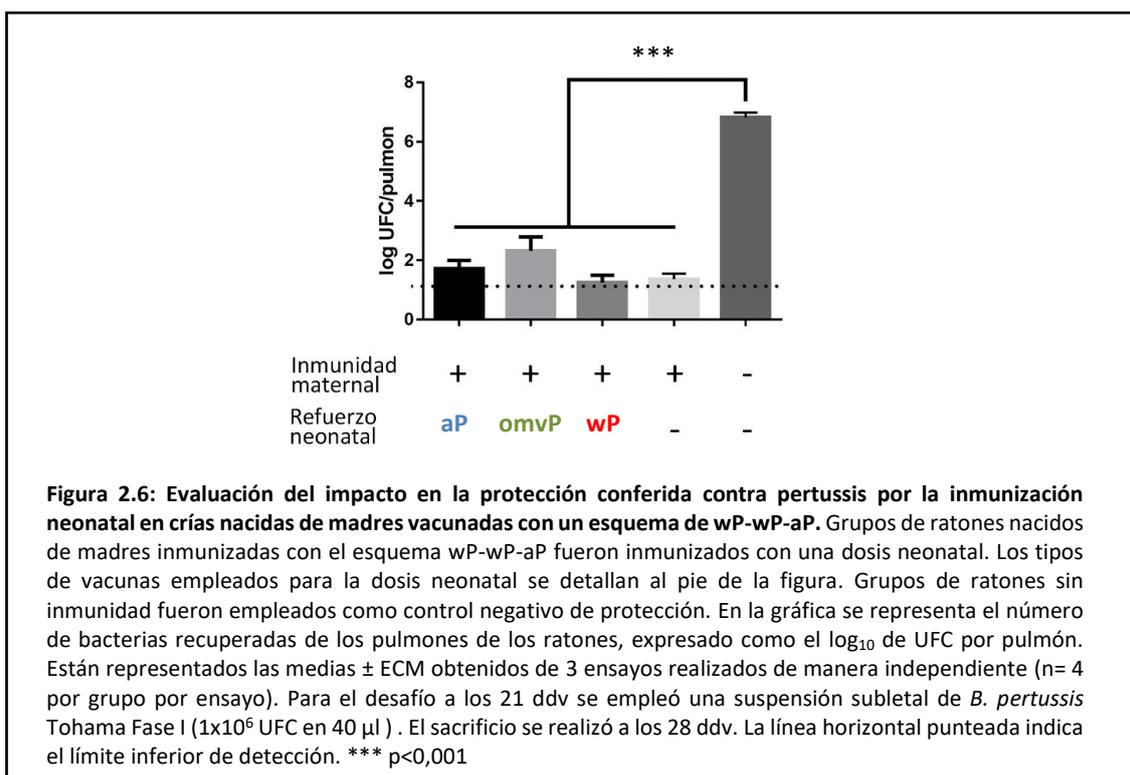


Figura 2.5: Evaluación del impacto en la protección contra pertussis de la inmunización neonatal e infantil en crías con inmunidad materna. Grupos de ratones fueron inmunizados con esquemas de 2 dosis que inician en la etapa neonatal. Los tipos de vacunas empleados para la dosis neonatal e infantil se detallan al pie de la figura. Grupos de ratones sin inmunidad fueron empleados como control negativo de protección. Crias nacidas de madres inmunizadas con un esquema aP-aP-aP están incluidas en el **Panel A**. Con fines comparativos se incluyen los datos de crías nacidas de madres no inmunizadas en el **Panel B**. Para el desafío a los 35 ddd se empleó con una suspensión subletal de 1×10^6 UFC en 40 μ l de *B. pertussis* Tohama Fase I. El sacrificio se realizó a los 42 ddd. En la gráfica se representa el número de bacterias recuperadas de los pulmones de los ratones, expresado como el \log_{10} de UFC por pulmón. Están representados las medias \pm ECM obtenidos de 3 ensayos realizados de manera independiente (n= 4 por grupo por ensayo). La línea horizontal punteada indica el límite inferior de detección. inmunizadas según indica al pie de la leyenda. *** p<0,001. **** p<0,0001

una reducción significativa de la colonización bacteriana en los pulmones en comparación con los hallados en los controles sin inmunizar y sin inmunidad maternal (Figura 2.5, $p < 0,001$). En el Panel B se observan los resultados de protección de los mismos tratamientos, pero sin inmunidad maternal. De allí podemos observar que los buenos niveles de protección conferidos por los esquemas de 2 dosis neonatal e infantil se obtienen con y sin inmunidad maternal.

Evaluación del impacto de la inmunización neonatal en crías nacidas de hembras que recibieron el esquema wP-wP-aP de vacunación.

En países como el nuestro, los esquemas de vacunación contra pertussis cuentan en sus dosis primarias con vacuna celular (wP) y los refuerzos de los 11 años y de las embarazadas con vacuna acelular (aP). Un esquema en nuestro modelo de estudio del tipo wP-wP-aP que incluye la vacunación con aP durante la gestación, reproduce el esquema utilizado en nuestra región. A partir de este esquema evaluamos el impacto de la dosis neonatal en el entorno de la inmunidad maternal generada por el esquema wP-wP-aP. Para la dosis neonatal (7 días de edad) ensayamos los tres tipos de vacuna empleadas en este trabajo de tesis: aP, omvP y wP. Para evaluar la protección, todos los ratones se expusieron a los 21 días de edad a un desafío subletal de 10^6 UFC de la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama fase I. Como grupos controles se utilizaron ratones no inmunizados nacidos tanto de madres inmunizadas como nacidos de madres no inmunizadas. Los resultados alcanzados se muestran en la Figura 2.6. En dicha figura se puede



observar que los recuentos de UFC en los pulmones de las crías con inmunidad materna independientemente de si recibieron o no una dosis de vacuna al nacer, fueron prácticamente no detectables. Estos recuentos fueron claramente inferiores de los detectados en el grupo utilizado como control negativo de protección ($p < 0.001$). Observamos nuevamente que todas las crías inmunizadas con una sola dosis de vacuna a los 7 días de edad independientemente del tipo de vacuna utilizada fueron protegidos.

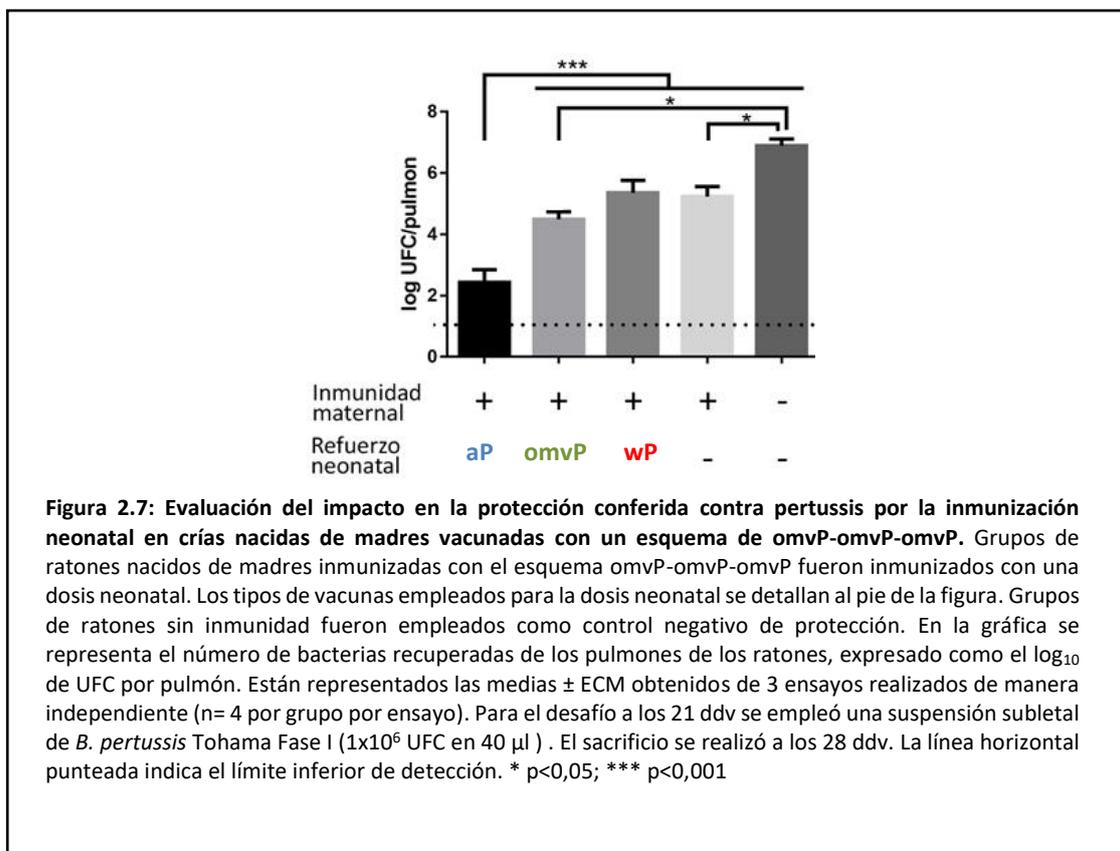
Respecto de la respuesta humoral, en las titulaciones realizadas frente a la toxina pertussis purificada pudimos observar una concentración de anticuerpos IgG anti-PTxA en las crías mayor respecto de lo hallado en las madres. Estos niveles más altos de IgG específicos se detectaron en las crías que no recibieron refuerzo y aquellas que recibieron una dosis neonatal de aP o de omvP, pero no en las que recibieron wP como dosis neonatal (Tabla 2.2). Al igual que lo que sucede para los esquemas maternos aP-aP-aP se observa una concentración de anticuerpos en la cría sin refuerzo neonatal. En relación a los isotipos de IgG, la relación IgG2a/IgG1 resultó mayor que 1 no sólo en las madres sino en las crías que recibieron como dosis neonatal o como refuerzo a la vacuna wP u omvP indicando un direccionamiento de la respuesta inmune hacia un perfil Th1. El hecho de que las crías sin refuerzo cuenten con un perfil mayormente Th2 podría relacionarse con el tránsito preferencial de inmunoglobulinas IgG1 de la madre a la cría. En el caso de las madres, las dos dosis de vacuna wP iniciales de su esquema dan cuenta del efecto prime-boost ya que la relación IgG2a/IgG1 mayor que 1¹⁹³.

Esquemas de vacunación	IgG totales	IgG2a/IgG1
Madre: wPwPaP	126,5±15,91	1,37243383
Crías		
Sin refuerzo	215,94±15,94	0,91057294
aP	184,68±6,751	0,87071197
omvP	232,18±38,82 *	1,12464955
wP	110,63±8,683	3,46613296

Tabla 2.2: Títulos de IgG totales e isotipos determinados mediante técnicas de ELISA utilizando como antígeno a la toxina pertussis. Las determinaciones se realizaron en sueros obtenidos en las crías a los 14 días después de la dosis de vacunación. Como control se emplearon los sueros de animales nacidos de madres inmunizadas que no recibieron una dosis neonatal (sin refuerzo). Los títulos de IgG se expresan como la media geométrica de los valores obtenidos en 2 ensayos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante el test ONE-WAY ANOVA. * $p < 0,05$. Los títulos de los isotipos IgG2a e IgG1 se expresan como la relación IgG2a /IgG1 a la derecha de la tabla.

Evaluación del impacto de la inmunización neonatal en crías nacidas de hembras que recibieron el esquema omvP-omvP-omvP de vacunación

Como último esquema maternal empleamos al que incluye 3 dosis de nuestro candidato novel basado en OMVsBp que induce un perfil mixto Th1/Th2/Th17. Sobre las crías nacidas de madres con este esquema de inmunización se evaluó el impacto de la vacunación neonatal con aP, omvP o wP (Figura. 2.7). Estos ensayos permitieron visualizar que ni la inmunidad maternal ni la vacunación neonatal con vacunas como omvP o wP resultan tan efectivas como en los esquemas maternos anteriormente ensayados. De hecho, la vacunación neonatal con wP no se diferencia del grupo sin inmunizar nacido de madres inmunizadas. La vacunación con aP muestra los mejores resultados, con una disminución de 4 órdenes de magnitud ($p < 0,0001$). La vacunación con vacuna omvP y los animales sin refuerzo neonatal también muestran diferencias significativas con respecto al control, pero con un descenso de 2 órdenes de magnitud ($p < 0,05$). Los animales que recibieron una dosis de wP a los 7 días de vida no mostraron diferencias significativas con respecto a los controles.



Para estos esquemas realizamos una titulación de IgG totales frente a un lisado de *B. Pertussis* y frente a PTxA, a fin de identificar las posibles interacciones entre los anticuerpos maternos circulantes y los refuerzos vacunales neonatales. Los resultados, que se muestran en la Tabla 2.3, indican la ausencia de efecto *blunting* al vacunar con la misma vacuna a la madre y

a la cría (omvP). Por el contrario, la vacunación neonatal con vacuna omvP mostró títulos mayores a los demás tratamientos ($p < 0,05$), mientras que aP, wP y los animales sin refuerzo no muestran diferencias significativas entre sí.

Se realizó también la determinación de anticuerpos anti-PTxA (Tabla 2.3). A través de este ensayo observamos que la cantidad de anticuerpos transferida a las crías fue significativamente menor que el detectado en las madres ($p < 0,01$). Mas aun, las dosis neonatal con vacuna aP u omvP no indujeron una producción diferencial de anticuerpos anti-PTx. Resultados similares en cuanto a la reducción de los títulos de anticuerpos de las crías

Esquemas de vacunación	IgG anti-Lisado Bp	IgG anti-PTxA
Madre: omvPomvPomvP	846,9±20,32 **	158,47±9,29 **
Crias		
Sin refuerzo	81,78±25,22	31,93±20,4
aP	72,93±38,86	34,739±5,50
omvP	263,6±29,15 *	38,11±29,14
wP	116,5±52,71	NT

Tabla 2.3: Títulos de IgG totales determinados mediante técnicas de ELISA utilizando como antígeno a la toxina pertussis y un lisado total de bacteria. Las determinaciones se realizaron en sueros obtenidos en las crías a los 14 días después de la dosis de vacunación. Como control se emplearon los sueros de animales nacidos de madres inmunizadas que no recibieron una dosis neonatal (sin refuerzo). Los títulos de IgG se expresan como la media geométrica de los valores obtenidos en 2 ensayos independientes. El análisis estadístico para cada determinación (IgG anti PtxA e IgG anti-Lisado de Bp) se realizó mediante el test ONE-WAY ANOVA. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

comparados con los de las madres se obtuvieron cuando realizamos los ensayos de ELISA empleando como antígeno a un lisado bacteriano de *B. pertussis*. Este resultado difiere del hallado para las madres inmunizadas con un esquema aP-aP-aP para las que se detectó un fenómeno de concentración de anticuerpos en las crías. Es de notar, sin embargo, que la inmunización neonatal con omvP incrementó significativamente los títulos de IgG anti-lisado bacteriano, respecto del detectado en los ratones con inmunidad materna pero no inmunizados con una dosis neonatal, y del detectado en los ratones que recibieron una dosis de aP o wP.

Discusión

El estado inmunológico de una embarazada posee particularidades que la diferencian del estado inmunológico de un adulto no gestante. Durante el embarazo se detectan una mayor predominancia de células *natural killer*, macrófagos y linfocitos T reguladores que permiten el desarrollo del feto, así un desbalance de estas poblaciones complica la continuidad del embarazo²³². Por ejemplo una marcada reducción de células *natural killer* impide la llegada del trofoblasto a los vasos del endometrio evitando su implantación y el avance del embarazo²³². El entorno feto-maternal resulta un delicado balance, donde dos organismos extraños conviven

por 9 meses. Una respuesta moduladora y antiinflamatoria es la clave de esta relación, donde la placenta y el trofoblasto actúan como mediadores para evitar el rechazo del feto por parte del sistema inmune materno ²³³. Las células dendríticas de la madre cumplen un rol fundamental, pues son capaces de censar cuales de los estímulos foráneos son peligrosos o no. A su vez, los linfocitos T reguladores tanto del feto como de la madre resultan esenciales y de hecho en un embarazo normal su presencia en ambas caras del entorno feto materno es de magnitud. Bajas concentraciones tanto de células dendríticas como de linfocitos se han asociado a partos prematuros o abortos ²³⁴.

Desde el momento de la implantación del trofoblasto y el desarrollo del embarazo, la interacción entre el feto y la madre no se trata de una simple coexistencia sino que implica un sistema inmunitario en actividad que incluso lleva a un entrenamiento del sistema inmune neonatal dentro del útero ²³⁵. De esta relación feto-maternal, se creía que solo existía un tránsito transplacentario de inmunoglobulinas que permitía la adquisición de inmunidad pasiva por parte del feto. Sin embargo, trabajos relativamente recientes muestran que además de anticuerpos, existe un tránsito hacia el feto de citoquinas moduladoras de la respuesta inmune, vitaminas, inmunocomplejos, antígenos y células del sistema inmune ²¹². De todas formas, la principal defensa del neonato durante sus primeros meses de vida está representada por los anticuerpos transferidos de su madre. Este tránsito no se produce por difusión pasiva, sino que se trata de un tránsito activo. Este proceso es posible gracias a la presencia de los receptores específicos de anticuerpos neonatales denominados FcRn por sus siglas en inglés. Estos receptores, presentes en altas concentraciones en las paredes de la placenta y del trofoblasto, transfieren de manera activa los anticuerpos al entorno neonatal. En el feto los mismos receptores se encuentran en altas concentraciones, sobre todo en su sistema digestivo. Esto es clave porque los anticuerpos además de llegar por la vía del cordón umbilical, llegan por filtrado del líquido amniótico y son reconocidos por los receptores de membrana intestinales ¹¹⁷. El entrenamiento de estos FcRn localizados en el sistema digestivo cumplen un rol luego del nacimiento, permitiendo la captación de las inmunoglobulinas presentes en el calostro y la leche materna.

Como hemos mencionado la transferencia de la inmunidad materno hacia el feto refiere principalmente al tránsito transplacentario de anticuerpos. Otro actor del sistema inmune que esta propuesto para el transito transplacentario son los antígenos. Existen estudios que indican que las infecciones parasitarias crónicas de madres pueden promover el entrenamiento de los linfocitos T fetales, en los cuales se puede observar producción de citoquinas al ser estimulados al nacer con los mismos patógenos ²³⁶. También se ha demostrado la presencia de altas concentraciones de antígenos en el cordón umbilical. Mediante la utilización de modelos ex-vivo

de perfusión placentaria se pudo demostrar que el tránsito de antígenos es dependiente de la presencia de anticuerpos, sugiriendo entonces que este tránsito puede darse en la forma de inmunocomplejos donde los anticuerpos van asociados a los antígenos y son captados por los receptores FcRn presentes en la placenta²³⁷.

La transferencia de inmunidad de la madre al neonato es clave en la protección de los recién nacidos contra enfermedades ya que de no ocurrir resultarían letales para los recién nacidos. La inmunización activa de la madre durante el embarazo para patologías como la gripe y pertussis son claros ejemplos de su impacto en la reducción de la letalidad causada por esas enfermedades. Durante mi trabajo de tesis y como estrategia complementaria estudiamos en el modelo murino la inmunización neonatal. En este capítulo presenté los resultados obtenidos al evaluar el impacto en la protección frente a pertussis en la etapa temprana de la vida de la inmunización neonatal en el entorno de la inmunidad materna. Los ensayos realizados mostraron que en ratones con anticuerpos maternos inducidos por la vacunación con vacuna acelular (aP), el nivel de protección inducido por la inmunidad materna transferida no se vio afectado por la inmunización neonatal realizada con cualquiera de las tres vacunas aquí probadas: aP, omvP y wP. En este caso y a diferencia de lo observado en esquemas de vacunación que consisten en una única dosis neonatal en ratones sin inmunidad materna, se detectaron niveles apreciables de IgG contra PTxA (Tabla 2.1). Es de destacar, sin embargo, que en el caso de la inmunización neonatal con la vacuna aP, los niveles de IgG contra PTxA fueron menores que los detectados en los sueros de ratones inmunizados a los 7 días con vacunas omvP o wP. Además, los niveles de IgG detectados en las crías inmunizadas con aP fueron más bajos que los detectados en las crías que solo tenían inmunidad materna. Se observaron resultados similares en las crías nacidas de madres cuya inmunización durante el embarazo se produjo al menos 2,5 meses anterior al nacimiento de estas crías. Las diferencias de protección detectadas en los lactantes inmunizados con aP y nacidos al mes con los vacunados a los 2,5 meses después de la vacunación de la madre podrían deberse a diferencias de la proporción de anticuerpos maternos capaces de mantener una protección efectiva, siendo mayor en las crías nacidas al mes después de la vacunación materna. Este fenómeno conocido como efecto blunting pudimos confirmarlo mediante ensayos de inmunotransferencia (Fig.2.4). Los resultados obtenidos por estos ensayos muestran que el reconocimiento frente a PTxA fue nulo para los sueros de las crías nacidas de la madre inmunizadas con la vacuna aP y vacunadas durante el período neonatal con aP. Más aún, los anticuerpos inducidos por la dosis neonatal de aP fueron de menor avidéz que los inducidos por las vacunas OMVP o wP.

El mecanismo por el cual los anticuerpos maternos limitan las respuestas a las vacunas aplicadas a la descendencia aún se conoce poco. Vono y col. evidenciaron que la inmunidad

materna ejerce influencia en la diferenciación de las células B del centro germinal (CG) en células plasmáticas secretoras de anticuerpos (PC) ¹⁵³. Estos autores propusieron que los anticuerpos maternos de alta avidéz se unen a epítopes inmunodominantes, siendo capaces de forzar la unión de células B de vida temprana a epítopes no inmunodominantes de menor afinidad ¹⁵³. Esto limitaría sus posibilidades de sobrevivir a través de los procesos de selección de GC y de diferenciación de PC ²³⁸. Se hipotetizó que el uso de distintas vacunas en madres y neonatos posiblemente recluten células B distintas en la respuesta inmunodominante. En nuestros experimentos, esta hipótesis se vio apoyada por la observación de que las respuestas de anticuerpos generadas en la descendencia vacunada con aP y nacida de madres inmunizadas con aP son de menor avidéz que en las crías nacidas de madres inmunizadas con aP y vacunados con dosis neonatal con OMVP o wP.

Paralelamente a los títulos de IgG y los resultados de la avidéz, se observó una ligera disminución de la protección en las crías nacidas al menos 2,5 meses después de que sus madres recibieron la dosis de aP e inmunizadas con una dosis neonatal de aP. En estos ratones, más allá de que los anticuerpos maternos de alta avidéz que se unen a los epítopes inmunodominantes, parece estar presentes anticuerpos maternos capaces de inducir una respuesta protectora sólida. Desafortunadamente, debido al diseño de nuestro experimento, esta hipótesis no pudimos evaluarla ya que no es factible discriminar los anticuerpos maternos de los inducidos por la vacunación neonatal.

Un hallazgo importante fue que la inmunización neonatal con omvP o wP en cualquiera de los tiempos respecto de la vacunación maternal probados no afectó la protección inducida por la inmunidad maternal. Los resultados sobre la dependencia del tipo de vacunas utilizadas en las madres y en los neonatos en la interferencia de la inducción de la inmunidad, concuerdan con los reportados por Feunou y colaboradores, quienes demostraron que la protección inducida por la vacunación primaria se ve afectada por anticuerpos maternos si la vacuna utilizada en la infancia era la misma que la vacuna utilizada durante el embarazo ¹⁵². Sin embargo, cuando las madres y los neonatos fueron inmunizados con dos tipos de vacunas diferentes, no se observó ninguna interferencia ¹⁵²

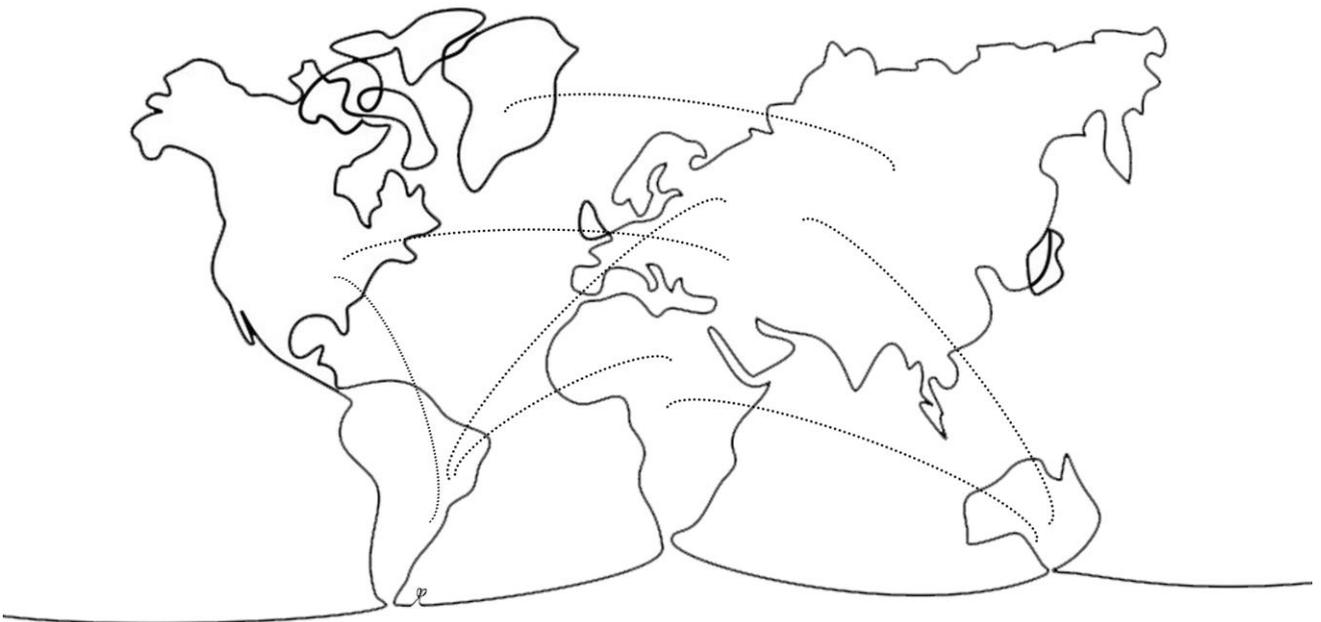
Los resultados aquí descritos se observaron tanto en esquema maternales que consisten en 3 dosis de vacuna acelular como aquellos que incluyen dos dosis de vacuna wP y una dosis de aP durante el embarazo. El esquema de 3 dosis de omvP resultó ser el menos efectivo en la transferencia de la inmunidad protectora.

Todos los resultados presentados muestran que, en el modelo animal, la estrategia de vacunación neonatal contra pertussis es factible de aplicar incluso en aquellos lactantes que tienen inmunidad materna. Sin embargo, para los neonatos con inmunidad materna inducida

por la vacuna aP, sería aconsejable utilizar una vacuna diferente para la inmunización neonatal. Si bien no se espera que el uso de modelos de ratón para investigar la vacunación neonatal reproduzca completamente la fisiología humana, los resultados obtenidos con un modelo de este diseño permitirán probar las hipótesis propuestas en condiciones controladas, donde los próximos resultados pueden luego refinar esas hipótesis para validación adicional en estudios posteriores en humanos.

Capítulo 3

INMUNIZACIÓN NEONATAL FRENTA A LAS CEPAS DE *B.* *PERTUSSIS* CIRCULANTES



Introducción

El resurgimiento de pertussis obligó a la comunidad científica y a los profesionales de la salud a investigar las posibles causas del aumento de casos detectados en numerosos países de forma de poder mejorar el control de la enfermedad. Así se identificaron como posibles causas de la resurgencia de la enfermedad a la pérdida de la inmunidad inducida por las vacunas en el tiempo, en particular las vacunas aP^{239,240} la adaptación de patógenos para escapar de la inmunidad inducida por la vacuna^{241,242,243,244,245,246,247,248} y la falla de las vacunas, en particular las vacunas aP, para prevenir la infección y propagación de *B. pertussis*^{249,250}.

En cuanto a la evolución de *B. pertussis*, los primeros reportes se relacionaron con polimorfismo en genes codificantes de proteínas incluidas en las vacunas acelulares (pertactina y toxina pertussis, entre otras) y posteriormente en el promotor de toxina pertussis (*ptxP*)^{100,137}.

El impacto de las vacunas en la evolución del patógeno y en la diversidad de los microorganismos, en particular de *B. pertussis* fue abordado desde años atrás cuando se evidenció el resurgimiento de la enfermedad. Así por ejemplo en el Reino Unido, se evaluaron 700 aislamientos de *B. pertussis* entre 1920 y 2006 a través del empleo de técnicas de *multi locus variable-tandem repeat analysis* (MLVA), genotipificación de las secuencias que codifican para PTx y PRN y serotipificación. Este estudio demostró que, durante los años de mayor cobertura de vacunación, la variabilidad genética entre los aislamientos clínicos fue menor prevaleciendo solo algunos genotipos. Durante el periodo 1977 y 1986 debido a los reportes sobre las reacciones adversas asociadas a la vacunación con vacunas celulares, la aceptación de la vacuna por parte de la población se redujo, promoviendo la ocurrencia de brotes. En este periodo de menor cobertura de vacunación, la diversidad genética fue mayor²⁵¹. Durante este período epidémico se detectaron nuevos MLVA, en particular el MLVA-27 apareció en 1982 que fue codominante durante el período 1998 a 2001 y comprendió aproximadamente el 70% de los aislamientos durante los períodos 2002 a 2004 y 2005 a 2006. El Reino Unido está dominado actualmente por el tipo clonal MLVA-27 *prn2-ptxA-1* y serotipo Fim3. Incluso durante los períodos recientes dominados por MLVA-27, se encontraron muchos genotipos nuevos con bajas frecuencias, lo que sugiere que hay una gran cantidad de genotipos MLVA poco comunes que circulan a bajas frecuencias o que surgen constantemente nuevos tipos. El patrón MLVA-27, que se diferencia del de las cepas que se emplean en la producción de vacuna, se ha detectado en numerosos países que tienen altas tasas de vacunación^{252,253,254,255}²⁵¹. Se ha propuesto por

ello que MLVA-27 está bajo alguna forma de selección positiva ejercido por las vacunas que le confiere a la bacteria una mayor supervivencia en una población altamente vacunada.

Recientemente, ha habido un aumento en las cepas de *B. pertussis* que no producen algunos de los antígenos de la vacuna ^{143, 138, 133, 141, 140, 142, 139, 144}. Se ha propuesto que la pérdida de la expresión de pertactina probablemente proporciona una ventaja selectiva para la supervivencia bacteriana en poblaciones vacunadas con vacunas aP. Existe consenso sobre el hecho de que las vacunas aP comerciales actuales que contienen PTx, PRN y hemaglutinina filamentosa (FHA) no resultan tan eficaces como se esperaba para controlar la infección causada por las bacterias circulantes de expansión reciente que no expresan PRN ¹³⁹. Como evidencia que apoya esta hipótesis se observa el incremento de la prevalencia de las cepas de *B. pertussis* deficientes en PRN solo en los países que emplean a la vacuna acelular en todo el esquema de vacunación recomendado para pertussis. Esta prevalencia alcanza el 85% del todas de las cepas circulantes en Estados Unidos ^{256, 141}, el 78% en Australia ²⁵⁷ y un 24,9% en Europa ²⁵⁸. En Estados Unidos se detectó una mayor proporción de los aislamientos PRN deficientes en personas vacunadas en población no vacunada ²⁵⁶. En Australia la prevalencia de las cepas deficientes en la expresión de PRN pasó de un 5,13 % en el año 2008 a un 77,78% para el año 2012 ²⁵⁹. En la mayoría de los países donde prevalecen las cepas deficientes en pertactina se pudo detectar que la inserción de la secuencia IS481 en la secuencia codificante de la pertactina resulta la alteración más frecuente que conduce a dicho fenotipo ^{259, 133, 141}. Recientemente se demostró en un modelo de ratón con infección mixta que PRN (-) *B. pertussis* coloniza el tracto respiratorio de ratones inmunizados con aP de manera más efectiva que la cepa PRN (+), superando cuantitativamente a la cepa PRN (+) ¹⁴⁴.

Todos estos datos muestran que en la vacunación contra pertussis, el tipo de vacuna y la cobertura han impactado en la evolución del agente causal de la enfermedad que hoy encuentra a su único huésped mayormente inmunizado. La prevalencia de cepas deficientes en antígenos vacunales en los países que emplean a la segunda generación de vacunas representadas por las vacunas acelulares marca una grave preocupación que debe ser abordada a través del desarrollo de nuevas vacunas o nuevas estrategias de vacunación que permitan mejorar el control de la enfermedad causada por las cepas de *B. pertussis* actualmente en circulación.

En este capítulo presentaremos los resultados alcanzados al evaluar la capacidad protectora que inducen esquemas que incluyen la inmunización neonatal frente a aislamientos circulantes, en particular frente a los aislamientos de *B. pertussis* los deficientes en pertactina. Para contextualizar este trabajo y como parte de nuestras actividades como laboratorio de

referencia presentaré resultados sobre la caracterización molecular de los aislamientos clínicos de *B. pertussis* que circulan en nuestro país y más específicamente en la provincia de Buenos Aires. Este trabajo lo llevamos a cabo entre varios miembros de nuestro grupo de investigación y parte de estos resultados han sido publicados recientemente en Ref.²⁶⁰.

Resultados

Análisis epidemiológico de la situación de pertussis en nuestro país, caracterización de los aislamientos clínicos de *B. pertussis* circulantes.

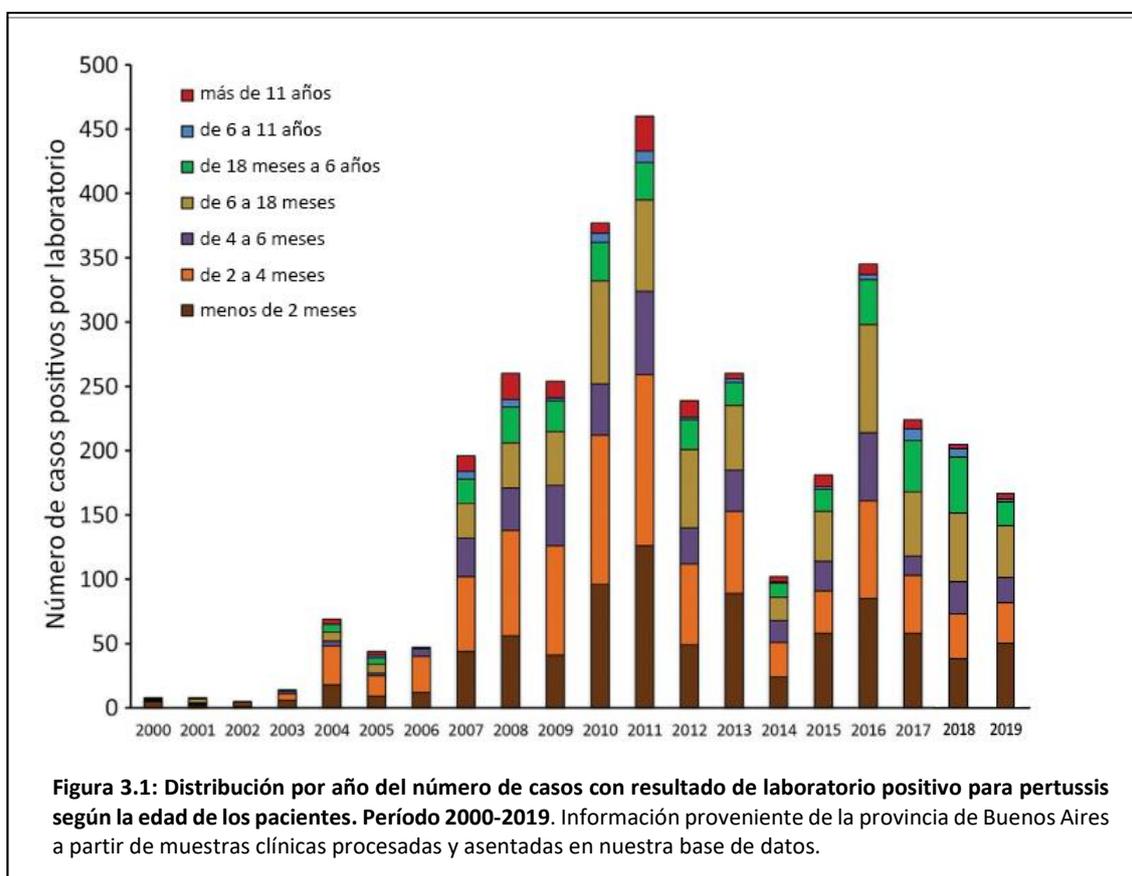
Nuestro país emplea la vacuna celular contra pertussis para cubrir las tres dosis primarias y los dos refuerzos que se aplican antes de los 7 años, mientras que la vacuna acelular se utiliza para refuerzos en adolescentes y grupos específicos de adultos que entran en contacto con bebés. Aunque en la mayor parte de Argentina, la cobertura de DTP3 durante los últimos años osciló entre el 91% y el 95%, en algunas jurisdicciones esa cifra fue del 80% o menos. Las coberturas oficiales de refuerzos para adolescentes e inmunización materna para el año 2015 fueron 75,3% y 81,9% respectivamente, para el 2016 88%, y 61,7%, y para el 2017 y 65,6% y 67%.

Según el Boletín Integral de Vigilancia del Ministerio de Salud, del 2000 al 2002 se presentó una situación epidemiológica estable con un bajo número de casos notificados de pertussis, pero después del año 2002, el número de casos aumentó de manera sostenida con tres brotes en 2008, 2011 y 2016 (<http://www.msal.gob.ar/index.php/home/boletin-integrado-de-vigilancia>). De ellos, el principal fue en el año 2011 con una incidencia de casos confirmados de pertussis de 6,9 por 100.000 habitantes y una letalidad del 2,6%. Como consecuencia de este brote, se introdujo en el año 2012 la inmunización maternal durante la gestación y, como consecuencia, en el brote de 2016 la incidencia y la tasa de letalidad disminuyeron alcanzando valores de 3,9% y 0,6%, respectivamente. La mayoría de los casos de pertussis notificados en Argentina correspondieron a las provincias más pobladas. Además, el patrón epidemiológico en estas provincias reflejó el del país en su conjunto. En consecuencia, debido a que la información a nivel de provincia de Buenos Aires es más detallada, en esta sección describimos la epidemiología y la epidemiología molecular de los últimos años.

Durante el periodo 2000-2019 como laboratorio de referencia recibimos 19.094 muestras clínicas provenientes de pacientes con un cuadro clínico compatible con pertussis. De estas muestras, 3.594 (18,82%) fueron casos confirmados por laboratorio mediante ensayos de PCR en los que participé activamente. La mayoría de los casos se detectaron en los grupos de lactantes de 0 a 2 meses y de 2 a 4 meses (Figura 3.1). Del total de muestras de muestras clínicas

recibidas en nuestro laboratorio de referencia durante el período 2000-2019, el 18,82% fueron positivas por PCR para genes específicos de *B. pertussis*, aunque solo el 2,16% fueron positivas por PCR y cultivo. Parte de estos resultados fueron publicados recientemente en la ref ²⁶⁰.

Todos los aislamientos que obtuvimos durante el periodo analizado provinieron de pacientes menores de 1 año. A partir de estos aislamientos realizamos su caracterización



genotípica y su serotipificación. En esta actividad participamos varios miembros de nuestro equipo. A través del empleo de técnicas de PCR pudimos determinar que de 350 aislamientos analizados contenían los alelos *ptxA1 prn2* en el 99,7% y 98,8%, respectivamente. El alelo *prn1* se detectó en 6 aislamientos clínicos y el alelo *no 1 ptxA* en 1, cabe destacar que estas últimas variantes alélicas son las mismas que presentan las cepas utilizadas en las vacunas. Estos aislamientos se obtuvieron antes de 2004. La variante *ptxP1* o *ptxP4* también fueron detectadas antes de 2004; a partir de entonces prevaleció el locus *ptxP3*. Después del año 2004 la mayoría de los aislamientos obtenidos contenían el genotipo *ptxP3-ptxA1-prn2-fim3-2* (291/350, 83,1%). Con respecto a la serotipificación de fimbrias, del total de aislamientos probados (n= 350) en solo 1 obtenido en 2016 se clasificó como Fim2 mientras que el resto de los aislamientos fueron Fim3.

Para el análisis de la secuencia codificante de la PRN aplicamos técnicas moleculares y ensayos de inmunotransferencia empleando un anticuerpo específico obtenido por nuestro laboratorio luego de un esquema de inmunización de tres inmunizaciones con 2 µg de la proteína purificada. Respecto de los análisis moleculares, realizamos ensayos de PCR de punto final con los primers específicos *prnF* y *prnR* (5'-CCCATTCTCCCTGTTCCAT-3' y 5'-CCTGAGCCTGGAGACTGG-3' respectivamente) 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*²⁶⁰. Mediante el empleo de estas técnicas pudimos detectar de manera relevante que solo dos aislamientos de un total de 350 resultaron ser deficientes en la expresión de PRN. Estos resultados están en acuerdo con la observación que la mayor prevalencia de aislamientos deficientes en pertactina se observa en países que usan vacunas acelulares para cubrir las dosis primarias, mientras que, en nuestro país, que emplea la vacuna celular para esas dosis solo dos aislamientos resultaron ser deficientes en la expresión de PRN. Estos aislamientos se obtuvieron de pacientes menores de 1 año con síntomas típicos de pertussis. Pudimos evidenciar que la secuencia de inserción 481 (*IS481*) interrumpió el gen *prn* en la posición 1613-1614. Una de estas cepas fue la empleada como cepa de desafío en los ensayos de protección que describiremos a continuación.

Evaluación de la capacidad protectora de esquemas que incluyen la inmunización neonatal frente a aislamientos clínicos de *B. pertussis* circulantes.

En los capítulos anteriores hemos demostrado que, en el modelo animal puesto a punto en nuestro laboratorio, la vacunación neonatal es posible y efectiva. En esta sección de mi trabajo de tesis presentaré los resultados que obtuvimos al evaluar la capacidad protectora de la inmunización neonatal 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 capítulo, 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.

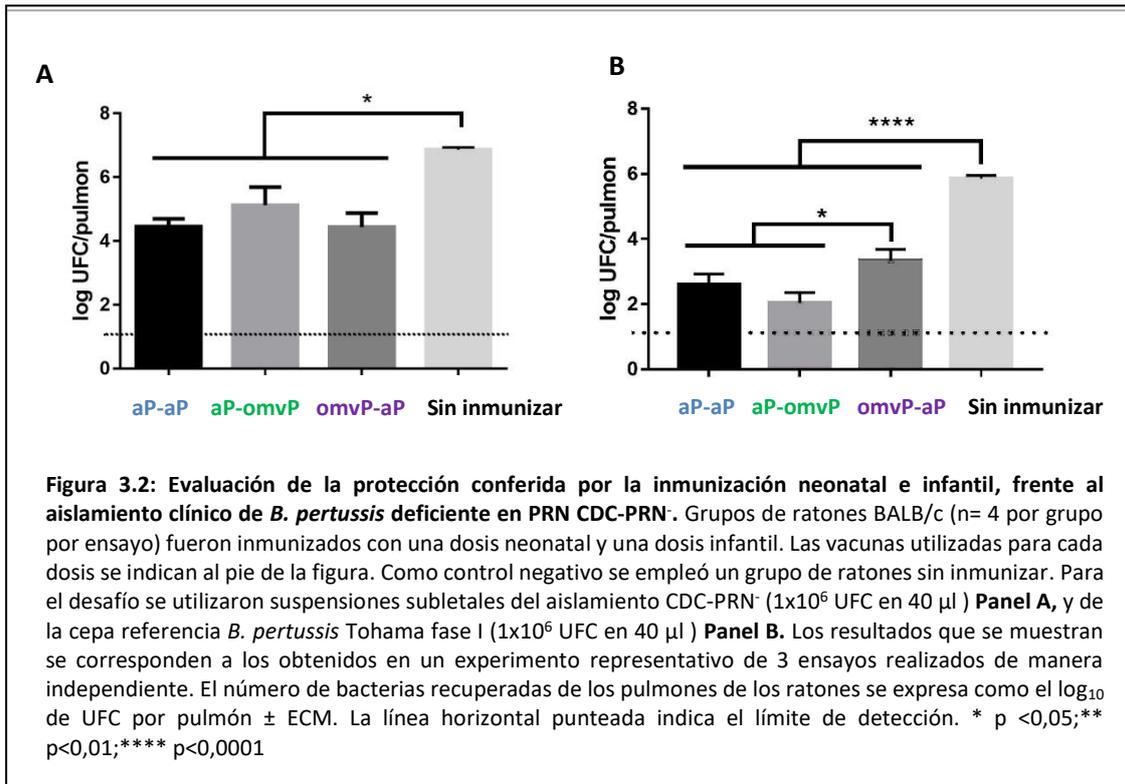
Para evaluar la capacidad protectora de las formulaciones combinadas frente a aislamientos circulantes deficientes en PRN, seleccionamos dos aislamientos clínicos de nuestra colección la cual contiene cepas locales y cepas importadas. Dentro de las cepas locales,

seleccionamos al aislamiento ArBpPRN⁻ (uno de los dos aislamiento que describimos en la sección anterior) y al aislamiento CDC-PRN⁻ obtenido durante el brote de pertussis detectado en el 2012 en la ciudad de Washington (USA) ²⁵⁶ como cepa representativa de un país que emplea sólo vacuna aP en su calendario. Este último aislamiento fue gentilmente cedido a nuestro laboratorio por la Dra. Lucía Tondella y su grupo pertenecientes a los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, (CDC) de Atlanta, USA, con quienes trabajamos en colaboración hace ya 10 años. Estos aislamientos comparten el mismo genotipo respecto del promotor de *ptx*, la subunidad A de *ptx* y *prn*, es decir ambos contienen el genotipo *ptxP3*, *ptxA1* y *prn2* que es el que mayormente circula en todos los países ¹³⁵.

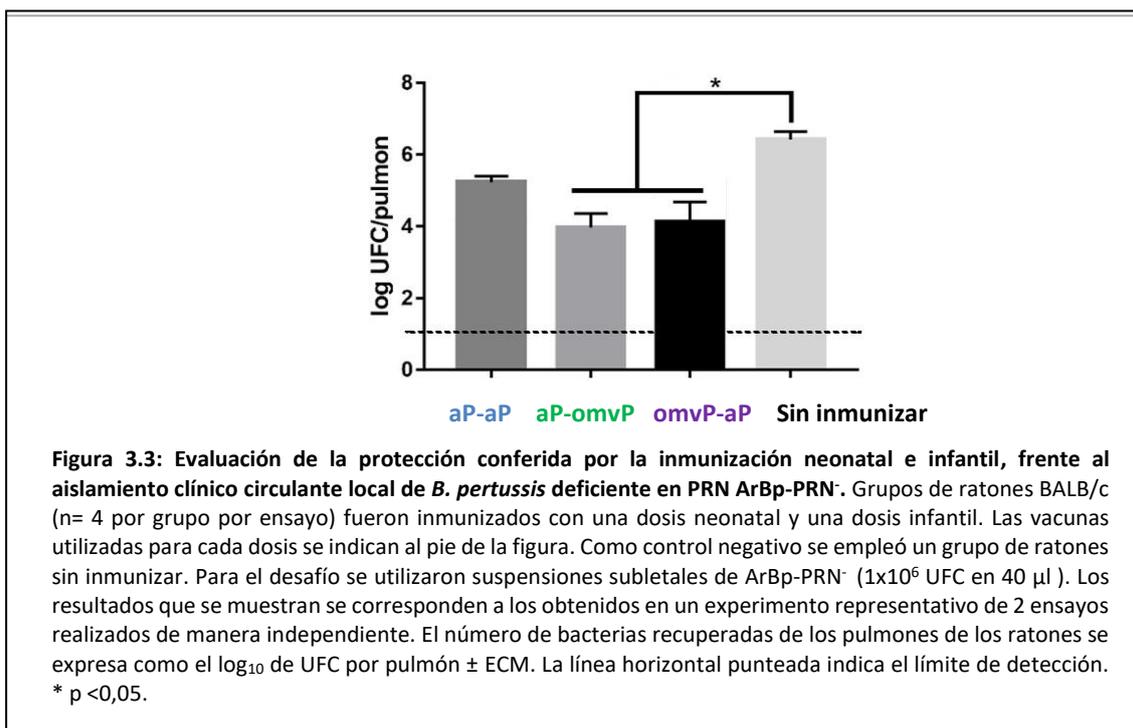
Sobre el aislamiento CDC-PRN⁻ nuestro grupo ya había ensayado la capacidad protectora de las vacunas individuales aP y la basada en OMVs en el modelo murino infantil. Los resultados obtenidos que fueron recientemente publicados ¹⁹⁶ mostraron que mientras para la vacuna aP la protección contra el desafío subletal de *B. pertussis* CDC-PRN⁻ en el modelo murino fue inadecuada, para 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 ¹⁹⁶.

Durante mi trabajo de tesis, utilizando el protocolo de inmunización indicado en el capítulo 1, extendimos los análisis de protección de los esquemas de dos dosis que incluyen la dosis neonatal a los 7 días de edad frente a este aislamiento. En particular evaluamos el esquema aP-aP y los esquemas que incluyen a nuestro candidato vacunal basado en omvP. Como control se empleó un grupo de ratones no inmunizados (control negativo de protección). Los resultados se presentan en la Figura 3.2 panel A. En dicha figura y con fines comparativos se incluyen los datos obtenidos cuando se empleó como cepa de desafío a la cepa *B. pertussis* Tohama fase I (Figura 3.2 Panel B). Como puede observarse en la Figura 3.2 Panel A, los esquemas de vacunación empleados fueron capaces de reducir la colonización en los pulmones de los ratones inmunizados en al menos 2,2 órdenes de magnitud respecto de la detectado en el grupo de ratones no inmunizados ($p < 0,05$). Sin embargo, la protección inducida por cualquiera de los esquemas ensayados frente a este aislamiento fue significativamente inferior a la detectada frente a la cepa *B. pertussis* Tohama fase I (Figura 3.2 Panel B) en el que la disminución del recuento en relación al control fue de 4 órdenes de magnitud para aP-omvP, de 3,5 para aP-aP y 3 para omvP-aP. Más aún, frente al aislamiento CDC-PRN⁻ la capacidad protectora inducida por los distintos esquemas no se diferencian entre sí, mientras que frente al desafío con *B.*

pertussis Tohama fase I, los esquemas que comienzan con una dosis de vacuna acelular son más eficientes.



Con el objetivo de evaluar el comportamiento de la inmunización frente a la cepa local PRN (-), repetimos estos ensayos para el aislamiento BpArPRN⁻; los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.3. Como puede observarse, a diferencia de los hallazgos para el



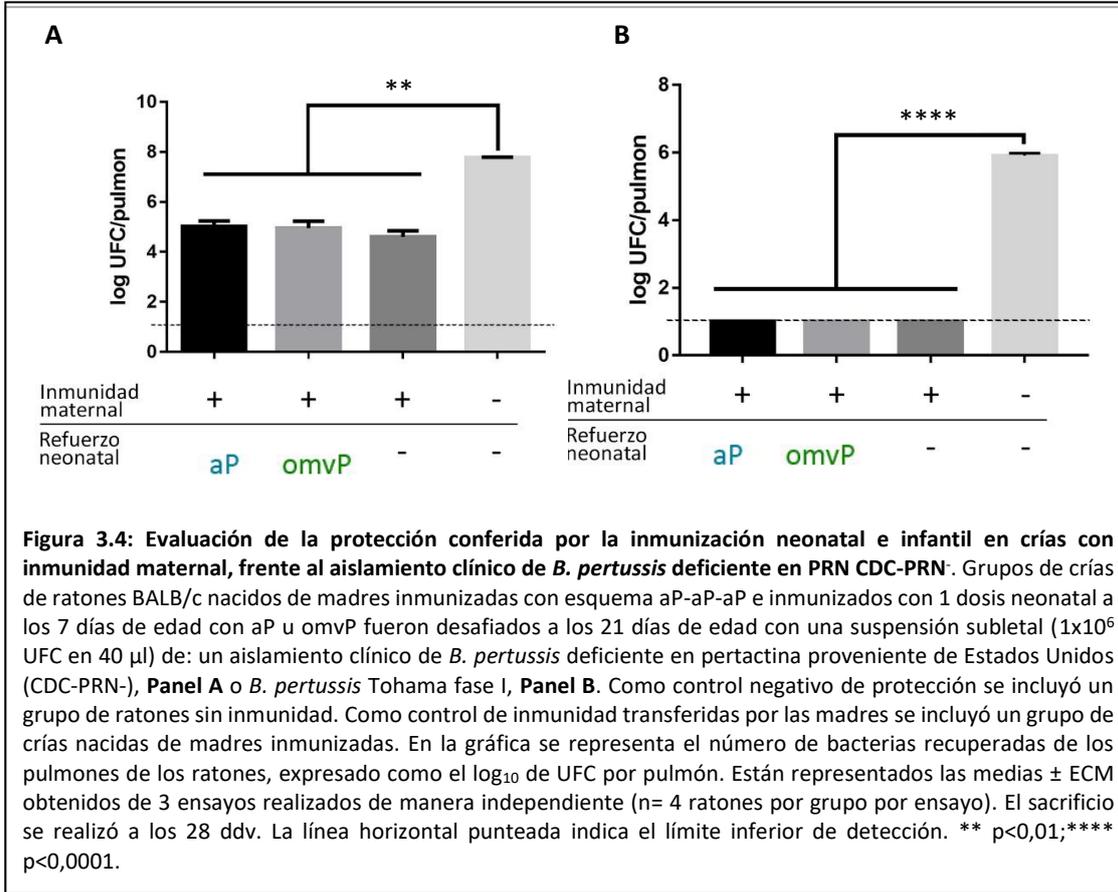
aislamiento CDC-PRN⁻, la capacidad protectora de los esquemas heterólogos resulta más eficiente que el esquema aP-aP ($p < 0,05$). Los niveles de UFCs detectados en los pulmones de los ratones inmunizados con estos esquemas heterólogos frente al desafío con el aislamiento BpAr-PRN⁻ son al menos 2,5 órdenes inferiores en comparación con los detectados en el grupo control no inmunizado ($p < 0,05$).

Todos los resultados presentados aquí muestran que la capacidad protectora de esquemas que incluyen una dosis neonatal resulta benéfica en términos de protección aun contra aislamientos clínicos de *B. pertussis* que hoy representan un problema grave para los países que solo emplean vacunas acelulares en sus calendarios. Sin embargo, la capacidad protectora de estos esquemas resulta inferior a la detectada para la cepa *B. pertussis* Tohama fase I. Otro aspecto a destacar es que los aislamientos deficientes en el factor de virulencia pertactina de diferentes orígenes, aunque tienen la misma alteración genética no se comportan de la misma manera en términos de su resistencia a la inmunidad inducida por las vacunas. Para el aislamiento argentino pertactina negativo, la capacidad protectora del esquema aP-aP resultó fuertemente afectado.

Finalmente nos preguntamos cuál sería el impacto de la protección de estos esquemas de inmunización neonatal sobre crías con un entorno de inmunidad maternal transferida. Primeramente, ensayamos esquemas de 1 dosis neonatal sobre crías nacidas de madres que recibieron un esquema de 3 dosis con vacuna acelular, la última aplicada durante la gestación. Para la dosis neonatal utilizamos la vacuna acelular o nuestro candidato vacunal. En la Figura 3.4, Panel A, se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de protección frente al aislamiento CDC-PRN⁻. En dicha figura y con fines comparativos se incluyen los datos obtenidos frente al desafío con la cepa *B. pertussis* Tohama fase I (Figura 3.4 Panel B). En dicha figura se puede observar que tanto las crías inmunizadas con una dosis neonatal de la vacuna aP o con la vacuna a base de OMVsBp, se encuentran protegidas si se comparan con los resultados obtenidos en el grupo control sin protección (grupo de animales sin inmunidad maternal sin dosis neonatal; $p < 0.05$). La reducción en el número de UFCs en los ratones que recibieron una dosis neonatal independientemente de la vacuna utilizada fue de 2 órdenes de magnitud respecto del grupo control negativo de protección. Es de destacar que los ratones con inmunidad maternal pero que no recibieron la dosis neonatal también estuvieron protegidos en niveles indistinguibles respecto de los hallados en los grupos que recibieron una dosis neonatal. Estos datos muestran que la inmunización neonatal, aunque no mejoró la protección tampoco afectó la capacidad protectora de la inmunidad maternal transferida. Por otra parte, si observamos los datos de colonización de los mismos tratamientos frente a *B. pertussis* Tohama

fase I (Figura 3. 4, Panel B), estos muestran que los niveles de protección frente a la cepa deficiente en PRN son significativamente menores a los hallados para la cepa *B. pertussis* Tohama fase I PRN+.

Luego nos propusimos evaluar si la inmunidad transferida por estas madres era capaz



de proteger frente a aislamientos circulantes locales. Para ello de nuestra colección de cepas seleccionamos al aislamiento ArBpPRN⁻ deficiente en pertactina ya ensayado y sumamos un aislamiento obtenido durante mismo periodo pero que a diferencia de este expresa PRN (ArBpPRN⁺). En la Figura 3.5 observamos que las crías con inmunidad materna cuentan con inmunidad protectora frente a los aislamientos ensayados. Sin embargo, frente al aislamiento ArBp-PRN⁻ de origen local la protección fue significativamente menor (reducción en la colonización de menos de 1 orden de magnitud respecto al control sin inmunidad, p<0,05) que la detectada para el aislamiento de *B. pertussis* PRN⁺ (reducción 5 órdenes de magnitud respecto al control sin inmunidad, p<0,001) obtenido el mismo año. Los datos de UFCs para el aislamiento ArBpPRN⁺ (Figura 3.5) fueron indistinguibles de los detectados para la cepa *B. pertussis* Tohama Fase I (Figura 3.4 Panel B).

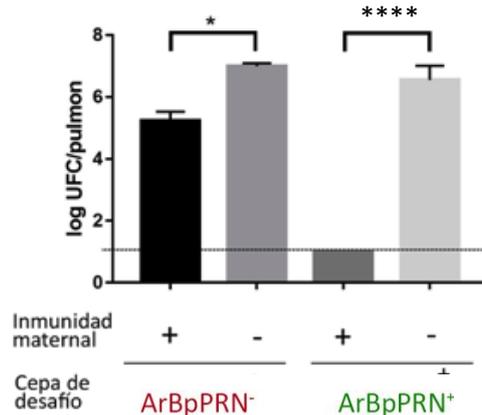


Figura 3.5: Evaluación de la protección en crías nacidas de madres inmunizadas, frente a aislamientos clínicos *B. pertussis* locales deficientes o no en la expresión PRN. Grupos de crías de ratones BALB/c nacidos de madres inmunizadas con esquema aP-aP-aP fueron desafiados a los 21 días de edad con una suspensión subletal (1×10^6 UFC en 40 μ l) de un aislamiento clínico deficiente en PRN ArBpPRN⁻ y de aislamiento clínico que sí expresa PRN ArBpPRN⁺. Como control negativo de protección se incluyó un grupo de ratones sin inmunidad materna. En la gráfica se representa el número de bacterias recuperadas de los pulmones de los ratones, expresado como el \log_{10} de UFC por pulmón. Están representadas las medias \pm ECM obtenidos de 2 ensayos realizados de manera independiente (n= 4 ratones por grupo por ensayo). La línea horizontal punteada indica el límite inferior de detección. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

Nos preguntamos entonces si en crías con inmunidad materna, los esquemas con 2 dosis de vacuna, una neonatal y una infantil, podrían mejorar la protección frente al aislamiento ArBpPRN⁻. Para ello ensayamos esquemas con 2 dosis homólogo y heterólogo. En particular ensayamos los esquemas aP-aP y aP-omvP que habían resultado eficaces frente a *B. pertussis* Tohama fase I. En la Figura 3.6 puede observarse que con los esquemas de dos dosis no se logra

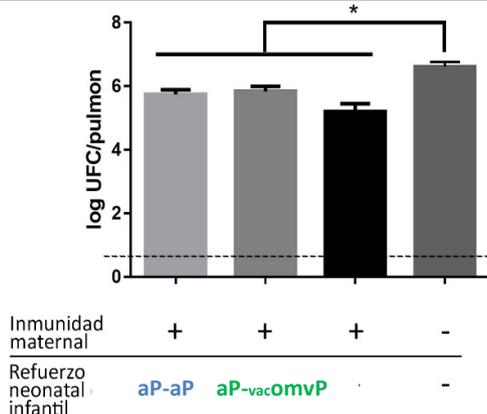
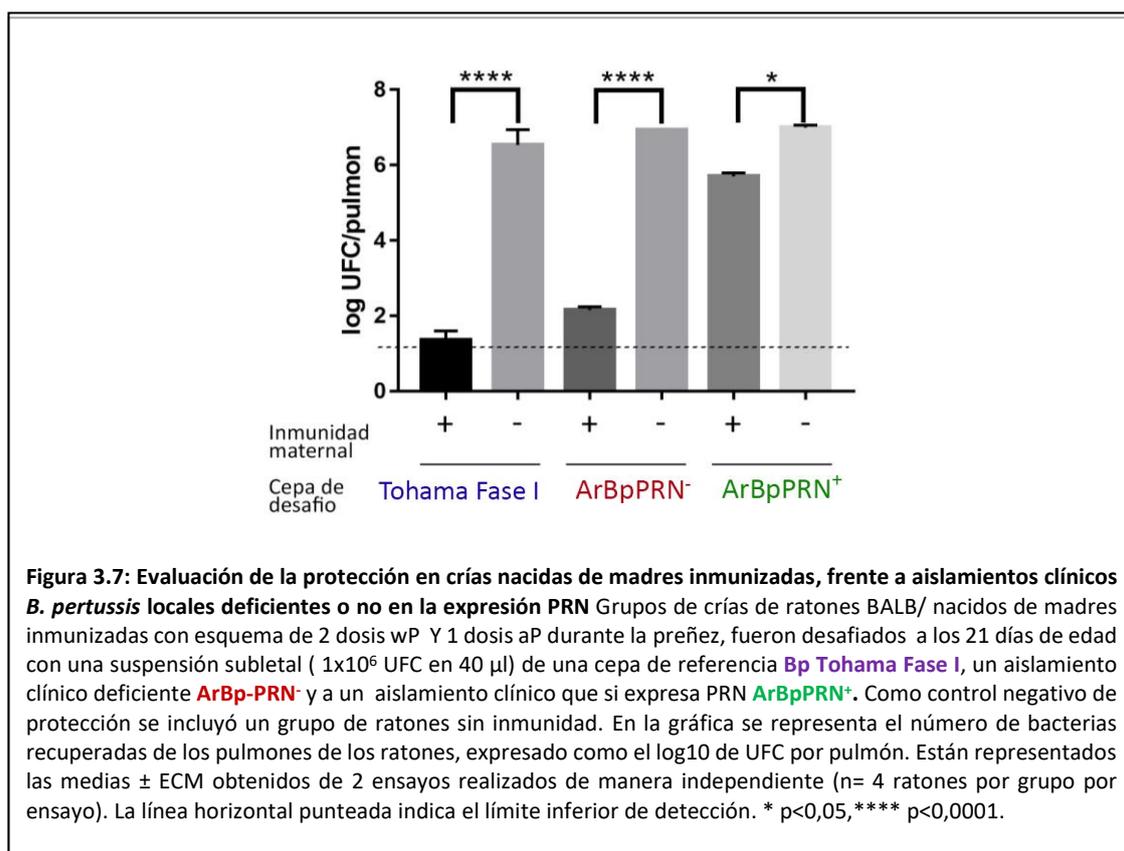


Figura 3.6: Evaluación de la protección conferida por la inmunización neonatal e infantil en crías con inmunidad materna frente al aislamiento clínico ArBp-PRN⁻. Grupos de crías de ratones BALB/c nacidos de madres inmunizadas con esquema de aP-aP-aP e inmunizados con 1 dosis neonatal de aP y una dosis infantil con aP u omvP a los 21 días, fueron desafiados a los 35 ddv con una suspensión de un aislamiento clínico de *B. pertussis* deficiente en pertactina local subletal (1×10^6 UFC en 40 μ l). Como control negativo de protección se incluyó un grupo de ratones sin inmunidad. Como control de inmunidad transferidas por las madres se incluyó un grupo de crías nacidas de madres inmunizadas. En la gráfica se representa el número de bacterias recuperadas de los pulmones de los ratones, expresado como el \log_{10} de UFC por pulmón. Están representadas las medias \pm ECM obtenidos de 3 ensayos realizados de manera independiente. La línea horizontal punteada indica el límite inferior de detección. * $p < 0,05$.

mejorar la protección frente al aislamiento local, y peor aún la capacidad protectora resultó ser menor que para el esquema de 1 dosis contra cepas deficientes en PRN y no mejora la observada en los ratones que sólo tienen inmunidad materna ($p < 0,05$).

Aunque la circulación en nuestro país de cepas deficientes en PRN es rara, tal como notificara nuestro grupo oportunamente ²⁶⁰, nos pareció importante analizar si las crías nacidas de madres inmunizadas con esquemas propios de nuestro país pueden hacer frente a la infección causada por estas cepas. En la Figura 3.7 podemos observar que las crías nacidas de madres inmunizadas con un esquema de 3 dosis wP-wP-aP están adecuadamente protegidas frente a la infección causada por la cepa de referencia Tohama Fase I. Resultados similares se obtuvieron frente al desafío con una cepa circulante en nuestro país que expresa pertactina. Nuevamente observamos para estas crías que la inmunidad transferida por las madres no resulta suficiente para hacer frente a la infección causada por la cepa argentina deficiente en PRN.



Discusión

En el contexto actual de resurgencia de pertussis se ha vuelto imprescindible diseñar formulaciones vacunales o esquemas vacunales que permitan a la población más vulnerable hacer frente a los aislamientos circulantes actuales en particular los deficientes en la expresión de PRN. Respecto de su capacidad de proteger frente a la infección causada por diferentes genotipos de *B. pertussis*, en un trabajo previo hemos podido corroborar que nuestro candidato vacunal basado en omvP es capaz de proteger a aislamientos que contienen el genotipo *ptxP3-ptxA1-prn2* de amplia circulación⁹⁵. Hoy el desafío se centra en inducir protección contra los aislamientos de *B. pertussis* más modernos deficientes en la expresión de PRN ya que se ha demostrado que las vacunas acelulares no resultan adecuadas para prevenir las infecciones causadas por estos aislamientos ^{144,261}. Como hemos comentado anteriormente, la alta prevalencia de estos aislamientos ha sido detectada hasta el momento sólo en países que emplean únicamente vacunas acelulares en sus calendario ^{140,133,141}. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de la mayor presión de selección que ejercen las vacunas acelulares respecto de las vacunas celulares con múltiples epítopes. Los datos sobre la caracterización de la población bacteriana circulante en nuestro país que realizamos como laboratorio de referencia ha permitido corroborar esta hipótesis. Durante el periodo 2000-2017 logramos recuperar y caracterizar 350 aislamientos clínicos de *B. pertussis* propios de nuestro país que emplea en su esquema primario la vacuna celular. 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 caracterizados se clasificaron como serotipo Fim3²⁶⁰. 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 ²⁶².

En cuanto a una deficiencia en la expresión de PRN, detectamos sólo dos aislamientos que contienen un *IS481* en la secuencia codificante de *prn*. 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. Este trabajo que corrobora la hipótesis planteada respecto de la presión de selección de la vacuna acelular también nos permite contar con una colección de cepas/aislamientos a partir de la cual podemos seleccionar las cepas de desafío para los ensayos de protección que realizamos buscando poner a prueba nuestro

candidato vacunal en el contexto de nuevos esquemas de inmunización y de combinaciones de nuestro candidato con las vacunas comerciales ya existentes.

Para completar nuestros estudios sobre la capacidad protectora de esquemas de inmunización que incluyen una dosis neonatal elegimos de nuestra colección bacteriana caracterizada el aislamiento local BpArPRN⁻ obtenido en el año 2016. Teniendo en cuenta la relevancia de los aislamientos PRN defectivos sumamos para los ensayos presentados aquí a un aislamiento deficiente en PRN representativo del brote de Estados Unidos del 2012. Estos aislamientos contienen el genotipo *ptxP3*, *ptxA1*, *fim3-2*, y *prn2*¹⁴¹.

En el modelo de inmunización neonatal puesto a punto durante mi trabajo de tesis pudimos detectar que los esquemas que incluyen dos dosis (una neonatal y otra infantil) en crías que no tiene inmunidad materna confieren protección muy robusta (reducción de UFCs de 4 órdenes de magnitud para aP-aP y aP--omvP, y de 3 órdenes para omvP-aP respecto a los animales no inmunizados, $p < 0,05$) frente a las cepas de referencia *B. pertussis* Tohama fase I que expresa pertactina en un entorno genotípico antiguo (*ptxP1*, *ptxA2*, *fim3-1*, y *prn1*) propio de las cepas vacunales pero también frente al genotipo más moderno *ptxP3*, *ptxA1*, *fim3-2*, y *prn2*, que también expresan PRN. Los resultados alcanzados en los esquemas de dos dosis en crías nacidas de madres no inmunizadas frente al aislamiento local deficiente en pertactina mostró que los mismos resultan poco eficaces en reducir la colonización en los pulmones. Lamentablemente estos resultados se repitieron al ensayar otro aislamiento de *B. pertussis* carente de PRN proveniente de un brote de Estados Unidos (Figura 3.2 Panel A). Esta ineficacia para inducir protección se observa marcadamente en los esquemas en los que ya sea como primera, segunda o ambas dosis se incluye a la vacuna acelular. Estos hallazgos no resultan del todo llamativos ya que estas vacunas, que en su composición cuentan con 3 antígenos de *B. pertussis* purificados, incluyendo a la pertactina, se ha descrito que generan una respuesta inmunológica mediada por anticuerpos bactericidas que no serían eficaces frente a los aislamientos deficientes en PRN²⁶³.

Es de destacar que los esquemas que incluyen a nuestro candidato vacunal basado en las omvP mostraron diferencias significativas respecto del control sin inmunizar cuando fueron evaluados contra el aislamiento circulante local deficiente en PRN. El hecho de que nuestro candidato vacunal induzca una respuesta inmune humoral de mejor calidad en términos de avidéz y capacidad bactericida que vaya más allá de la PRN por ser multi epítotope podría ser la razón de su mayor eficacia protectora frente al aislamiento *B. pertussis* local deficiente en PRN. Frente al aislamiento PRN deficiente proveniente de Estados Unidos los niveles de protección de nuestro candidato fueron similares a los observados frente al aislamiento local ArBp-PRN⁻ aunque para este aislamiento el esquema aP-aP también exhibió una adecuada protección. Esto

podría indicar que los aislamientos provenientes de los distintos países, aunque comparten su deficiencia en PRN podrían presentar otros cambios asociados que otorgan un comportamiento diferencial. Estudios de proteómica comparativa se están llevando a cabo dentro de nuestro grupo de trabajo para avanzar en este aspecto.

Los resultados aquí obtenidos utilizando el modelo de inmunización neonatal murino en el contexto de individuos nacidos de madres inmunizadas con aP, refuerzan la observación del escape de los aislamientos clínicos actuales de *B. pertussis* que no expresan pertactina a la inmunidad generada por esta vacuna. Observamos que, mientras la inmunidad maternal inducida por la vacuna acelular transferida a la cría es efectiva frente a los aislamientos más antiguos como la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama I o a aislamientos actuales que expresan al antígeno vacunal pertactina, no logra sobrellevar adecuadamente las debilidades de las vacunas de componentes o acelulares frente a los aislamientos pertactina negativos que se han expandido justamente en poblaciones en las que se ha utilizado de forma sostenida vacunas acelulares. Lamentablemente, ni el agregado de una dosis neonatal o de dos dosis, neonatal e infantil logran revertir este comportamiento aun incorporando una vacuna más compleja como la basadas en omvP multi-epítpe.

En el caso de los esquemas maternos que simulan los esquemas que reciben las embarazadas en nuestro país, es decir dosis de vacuna celular en la infancia (priming) y acelular para el refuerzo (*boost*) durante el embarazo, pudimos observar que la inmunidad transferida protege de manera muy eficaz frente a las infecciones causadas por cepas circulantes que expresan pertactina, pero la protección se ve significativamente disminuida cuando se enfrenta a un aislamiento que no expresa este antígeno. Estos resultados muestran que aún con esquemas heterólogos que han mostrado ser efectivos para pertussis y otras patologías como Chagas o COVID-19 no se logra mejorar la protección contra estas infecciones^{264, 265, 266}.

Todos los resultados presentados hasta aquí muestran que la inmunización neonatal si bien no logra superar la debilidad de las vacunas acelulares actuales en inducir protección contra los aislamientos de *B. pertussis* carentes del antígeno vacunal PRN, no interfieren en la inmunidad generada por la inmunización maternal ni la inducida por las dosis de la infancia. Sin dudas la inmunización neonatal es una estrategia con potencialidad de ser aplicada de manera complementaria a la inmunización maternal independientemente del esquema de vacunación que se emplee en las madres

DISCUSIÓN FINAL



En la década de 1950, los bebés prematuros no llegaban a sobrevivir y por ello las herramientas terapéuticas existentes se empleaban mayormente para hacer frente a las infecciones en los bebés nacidos a término. En ese momento, las infecciones más frecuentes eran las causadas por *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. A medida que avanzaba la capacidad sanitaria para apoyar la supervivencia de bebés más pequeños y menos maduros, la variedad de microorganismos con potencialidad de causar infección se expandió incluso a organismos infecciosos más oportunistas ²⁶⁷

Desde la década de 1960 hasta la de 1990, la infección por *Streptococcus agalactiae* superó a la causada *S. aureus*. ^{268, 269, 270, 271}. La lista de patógenos causantes de infecciones que son graves para los bebés ha ido creciendo en parte influenciado por las prácticas médicas actuales y el uso desenfrenado de antimicrobianos, incluidos medicamentos de amplio espectro que han contribuido a la selección de organismos multirresistentes dentro y fuera de los entornos hospitalarios ^{272, 273, 274}. Así además de *E. coli* se suman organismos Gram-negativos multirresistentes como *Pseudomonas*, *Klebsiella* y los hongos.

En la actualidad aunque se han logrado muchos avances en tratamientos y vacunas todavía se registran un número importante de muertes en los recién nacidos²⁷⁵. Según estimaciones de la OMS, cada año fallecen 2,5 millones aproximadamente de bebés recién nacidos siendo causadas por enfermedades como el sarampión, pertussis, malaria, meningitis neumococcica, diarrea y neumonías bacterianas o virales.

La enfermedad pertussis que es objeto de este trabajo de tesis es una enfermedad respiratoria que por muchos años estuvo adecuadamente controlada por la vacunación, sin embargo, en las últimas décadas la enfermedad ha resurgido en muchos países incluidos aquellos con altas coberturas de vacunación ^{276, 107, 130, 277, 111}. A escala global, se estima ocurren anualmente alrededor de 24 millones de casos y más de 116 mil muertes, de las cuales más de 48 mil se detectan en ~~son~~ lactantes menores de 1 año. Nuestro país no es ajeno a esta situación epidemiológica preocupante ^{278, 279, 128}. La fuerte contribución de nuestro laboratorio en el establecimiento de metodologías diagnósticas específicas para la patología en la red de laboratorios de enfermedades respiratorias, ha permitido detectar en las últimas dos décadas la ocurrencia de brotes y la prevalencia de casos en los menores de 6 meses de edad y en particular en los menores de 2 meses ^{128, 156, 157, 158, 159, 161, 162, 163} ⁴¹. El conocimiento de la epidemiología de la enfermedad en nuestro país ha permitido a las autoridades sanitarias evaluar e implementar estrategias tendientes a mejorar el control de la enfermedad. Así a través de la Comisión Nacional de Inmunizaciones en reuniones de la que fue participe la directora de nuestro grupo se tomó la decisión incluir a la vacunación contra pertussis (vacuna acelular) durante la gestación, primero como recomendación (2012) y luego de forma obligatoria al

incluirse en el Calendario Nacional de Vacunación (2013). Esta medida primeramente se aplicó para un único embarazo (2012-2015) y luego se extendió para todos los embarazos (2016). Esta estrategia ha permitido reducir la enfermedad y la letalidad asociada a pertussis ^{176, 150, 279, 128}. Datos similares se han hallado más recientemente en otros países^{226, 211}. De hecho se ha podido establecer que efectividad en nuestra población de la vacunación contra pertussis durante la gestación es del 80.7% ¹⁵¹. La incorporación de la vacunación durante el embarazo ha permitido alcanzar coberturas cercanas al 70%. Si bien esta cobertura no es óptima, supera a la otros países ^{280, 281}.

Todos estos datos son muy alentadores, pero aún se requiere de más información para hacer a la inmunización durante el embarazo una estrategia universal. Dado que el modelo murino se utiliza para estudios de vacunación materna, nuestro grupo de investigación hace uno años adoptó el modelo para reducir las brechas en nuestra comprensión sobre la inmunización durante el embarazo ¹¹⁸. Empleando este modelo pudimos detectar que inmunización durante la gestación es capaz de proteger a la descendencia contra pertussis y que inmunidad protectora de la madre puede transferirse varios meses después de haber recibido la madre la última dosis de vacunación. Más aún, la inmunidad adquirida por vacunación desde el primer embarazo es capaz de conferir protección a la descendencia hasta el cuarto embarazo. En las condiciones de nuestro protocolo experimental, la protección de la descendencia inducida por la vacuna aP administrada en el embarazo se transfiere tanto a través de la placenta como a través de la lactancia. Los experimentos de transferencia adoptiva demostraron que los anticuerpos transferidos eran los mayores responsables de la protección detectada en las crías. En contraste con los hallazgos reportados ¹⁵², la protección transferida no se perdió después de la vacunación de ratones lactantes con la misma u otra preparación formulación vacunal y, por el contrario, la inmunidad transferida no interfirió con la protección inducida por la vacunación infantil.

En mi trabajo de tesis evaluamos en el modelo murino la potencialidad de emplear a la vacunación neonatal como estrategia complementaria a la inmunización durante la gestación. La vacunación neonatal busca sobrellevar las ineficiencias de la estrategia de vacunación en la gestación: coberturas de vacunación inadecuadas para lograr el impacto buscado, las posibles interferencias con la inducción de la respuesta inmune producida por la vacunación infantil y su ineficacia para los neonatos que nacen prematuramente antes que la madre pueda transferirle la inmunidad^{179, 169, 41}. Respecto de este último punto, según la organización mundial de la salud, el 18% de los partos viables del mundo es prematuro, esto es que, aunque los bebés nazcan de madres inmunizadas 1 de cada 5 no tendrán la inmunidad suficiente para hacer frente a la enfermedad causada por *B. pertussis*. Otro aspecto sobre la vacunación durante la gestación que aún preocupa la posible interferencia de la inmunidad maternal con la inmunidad conferida

por las dosis que se aplican durante la infancia. Este fenómeno denominado *blunting* refiere al bloqueo de la respuesta inmune por parte de los anticuerpos maternos presentes en los lactantes ¹⁵³.

Nuestro primer desafío en el abordaje del estudio de la vacunación neonatal en el modelo murino fue contar con número suficiente de neonatos de forma de obtener resultados estadísticamente significativos y por otro hacer manipulaciones en los neonatos que implican mucho cuidado no sólo por su tamaño y peso mínimo sino para no alterar su comportamiento y su relación con la madre. Superado este desafío procedimos a implementar los esquemas de inmunización que nos propusimos ensayar. Para contextualizar los resultados me resulta interesante recordar que hace no muchos años atrás se consideraba al neonato como anérgico, es decir incapaz de montar una respuesta inmune frente a un estímulo, ya sea por una infección o por una inmunización. Esto es los linfocitos pese a estar presentes en el neonato, no son activos. Esta visión del sistema inmunológico neonatal se ha modificado y hoy se lo reconoce como un sistema con menos células y con vías de señalización y maduración disminuidas o depletadas, pero con capacidad de generar respuestas frente a estímulos ⁹⁰. Los neutrófilos por ejemplo están presentes en menor número en la médula ósea y son más inmaduros en comparación con los individuos adultos, tienen además menos péptidos antimicrobianos preformados y una menor capacidad de eliminación de bacterias Gram negativas, lo que justifica su mayor susceptibilidad a infecciones y sepsis ²⁸². Los recuentos de células NK están elevados en la sangre periférica de los recién nacidos, pero estas células secretan pequeñas cantidades de IFN- γ ²⁸³. La inmunidad innata está deteriorada en parte por la inmunomodulación de las células supresoras eritroides CD71 +. Estas células están presentes en un gran número en los recién nacidos y en la sangre del cordón humano y son capaces de inhibir por ejemplo la respuesta innata a la infección por *B. pertussis* en ratones recién nacidos mediante la expresión de arginasa II ²⁸⁴. De manera similar, y asociado a la susceptibilidad a las infecciones y en particular a la infección por *B. pertussis* es la presencia de células supresoras eritroides que provocan la reducción de la producción del TNF- α y de la fagocitosis de *B. pertussis* por células CD11b + humanas *in vitro*. Los neonatos no tienen un microambiente anatómico completamente desarrollado que resulte adecuado para la interacción entre las CD y los linfocitos T y B (no existe una demarcación definida entre las diferentes zonas linfoides y las zonas T CD4 + en los recién nacidos ²⁸⁵, las células del recién nacido tienen una menor capacidad de generar células de memoria y respuestas efectoras Th1, también debido a la menor producción de IL-12 por las CD ²⁸⁶. Los linfocitos T colaboradores proliferan preferentemente hacia perfiles de tipo Th2 como consecuencia de la hipometilación de regiones codificantes de

los factores involucrados en dicha diferenciación. Los linfocitos Th17 también se encuentran en baja concentración probablemente debido a la baja transcripción de ROR γ t²⁰³.

Las células T foliculares se encuentran arrestadas en una conformación inmadura no funcional, con bajos niveles de expresión de factores clave para la proliferación y diferenciación como el CXCR5, Il-21 y BLC6 si se los compara con los valores de la vida adulta⁸⁸.

Este contexto inmunológico sin dudas se presenta como un desafío que la vacunación debe sortear para que resulte exitosa. Varias alternativas se pueden abordar, en nuestro caso decidimos ensayar distintas vacunas contra pertussis que difieren en su composición y en el perfil de respuesta inmunológica que inducen: vacuna acelular comercial (aP), que induce principalmente un perfil Th2, vacuna celular (wP), que genera principalmente respuesta Th1 y Trm; o la vacuna basada en OMVP diseñada por nosotros; que induce un perfil mixto Th1 / Th17 y Th2 más una respuesta Trm¹⁹⁶.

A priori la vacuna aP y en menor medida la omvP utilizadas como dosis neonatal podrían generar una respuesta protectora por el perfil Th2 que son capaces de estimular. Cuando evaluamos la protección en animales nacidos de madres sin inmunidad inducida por la vacunación efectivamente hallamos que la vacuna aP en un esquema de dos dosis, una neonatal y otra en la infancia, resulta eficaz en evitar la colonización en los pulmones de la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama Fase I. Sin embargo, nuestro candidato vacunal omvP en esquemas heterólogos de dos dosis (neonatal e infantil) que incluyen a ambas vacunas resultan tan efectivos como los esquemas de dos 2 dosis de vacuna aP, pero inducen una respuesta humoral de mayor calidad en cuanto a la avidéz de los anticuerpos y al perfil Th de respuesta inmunológica. Interesantemente pudimos evidenciar en el contexto neonatal el efecto de prime boost del esquema omvP-aP, que además de inducir una respuesta humoral robusta, direcciona la respuesta hacia el perfil Th1 recomendada para la protección contra pertussis. El peso relativo del rol de los anticuerpos y de las poblaciones celulares del bazo en la respuesta protectora contra pertussis fue evidenciado mediante ensayos de transferencia pasiva (Figura 1.13).

Cuando evaluamos la propuesta de la inclusión de una inmunización neonatal contra pertussis, lo pensamos también en un contexto en el que puede coexistir con la estrategia de vacunación durante el embarazo. Los calendarios de vacunación que incluyen la inmunización durante el embarazo podrían ser desfavorables para implementar la estrategia de vacunación neonatal. Esto está sustentado en la preocupación que existe sobre la posible interferencia de los anticuerpos maternos transferidos al feto en la inducción de la respuesta inmunitaria generada por la vacunación en las etapas tempranas de la vida. Este fenómeno es conocido como interferencia inmune o embotamiento (*blunting*) de respuestas inmunes²²⁶. La interferencia de los anticuerpos maternos con respuestas inmunes después de la vacunación

infantil se ha descrito para otras vacunas infantiles (como el sarampión, la hepatitis A y B, paperas) ²²⁸.

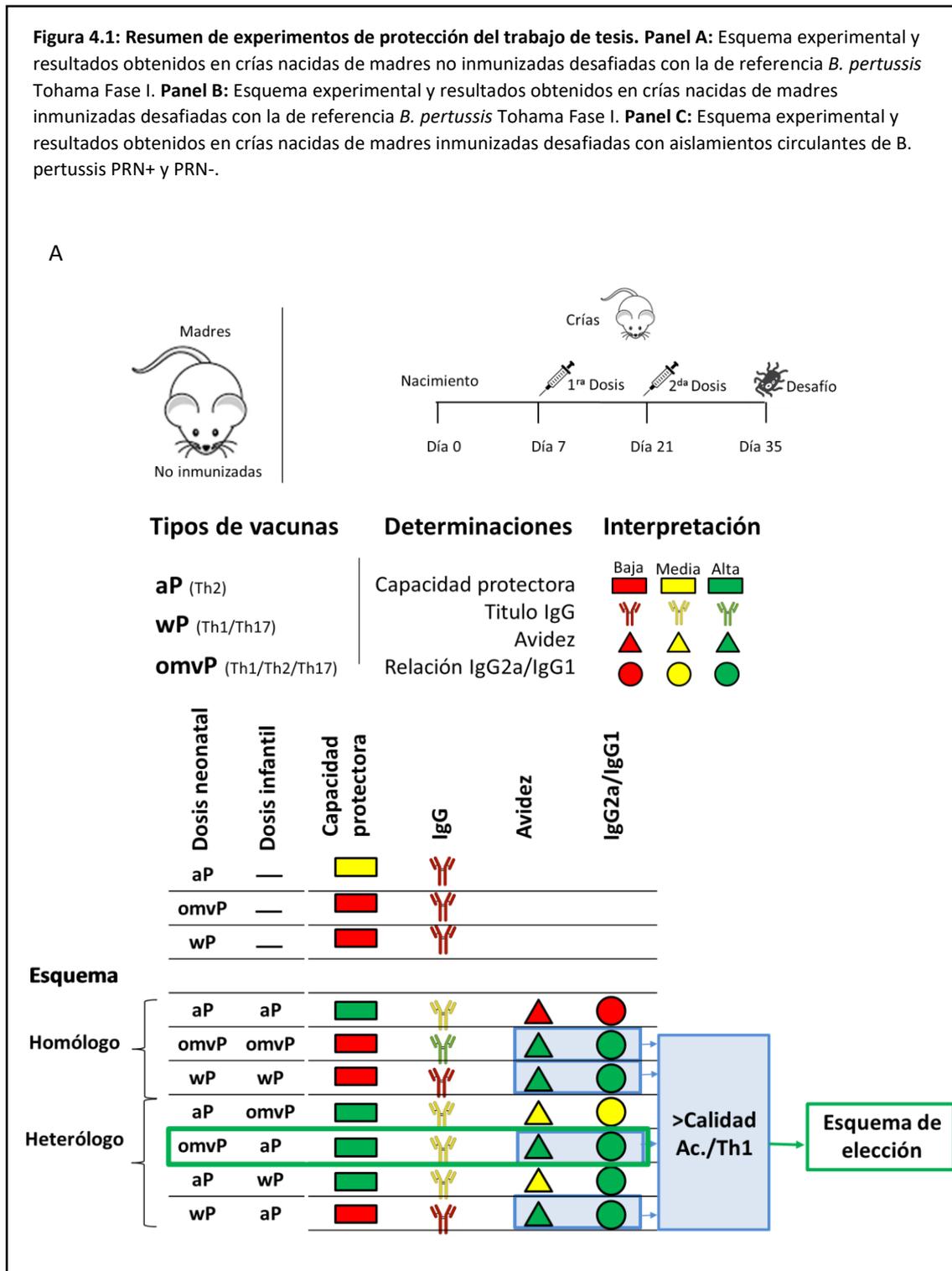
Para abordar este objetivo trabajamos con neonatos murinos nacidos de madres inmunizadas durante la preñez. Trabajamos con distintos esquemas de inmunización en las madres, pero en la mayoría de ellos se utilizó a la vacuna aP como dosis durante la preñez. A través de estos ensayos pudimos evidenciar que la vacunación a los 7 días de vida en el ratón no interfiere con la inmunidad protectora transferida por la madre. En el contexto de la inmunidad maternal con una sola dosis de vacuna (dosis neonatal) se alcanza el máximo de protección posible en el modelo murino. Estos hallazgos resultan de interés para la salud pública ya que permiten aplicar la estrategia de vacunación neonatal independientemente si la madre fue vacunada o no, sin la necesidad de generar protocolos para el vacunador que sean diferenciales según el estado inmunológico de la madre. El efecto *blunting* en nuestro modelo solo se hizo evidente en el caso en que las crías nacieran cierto tiempo después que sus madres hayan recibido la vacuna y que la dosis neonatal se haya realizado con vacuna acelular (Figura 2.4). Estos resultados sobre la aparición del efecto *blunting* en situaciones que incluyen el mismo tipo de vacunas para la preñez y la infancia, concuerdan con los publicados por Feunou y colaboradores ¹⁵². Para evitar este efecto parece ser necesario emplear vacunas maternas y neonatales distintas. Otro dato interesante que obtuvimos fue la factibilidad de realizar la vacunación neonatal en crías nacidas de madres con esquemas que combinan vacunas celular y acelular durante el embarazo o en aquellas que nacen de madres que tienen un esquema de vacunación que incluye solo a la vacuna acelular.

Respecto del desafío de lograr estrategias de vacunación contra pertussis que sean efectivas frente a las infecciones causadas por aislamientos clínicos de *B. pertussis* que están circulando en la actualidad, los experimentos realizados nos mostraron que la estrategia de vacunación neonatal es efectiva para aislamientos modernos que expresan al antígeno vacunal pertactina tanto en el entorno sin inmunidad maternal como con inmunidad maternal. La estrategia de vacunación neonatal sin embargo no se mostró como superadora de las actuales estrategias para hacer frente a las infecciones causadas por aislamientos clínicos que no expresan PRN y que prevalecen en los países que solo emplean en sus calendarios de vacunación a la vacuna acelular.

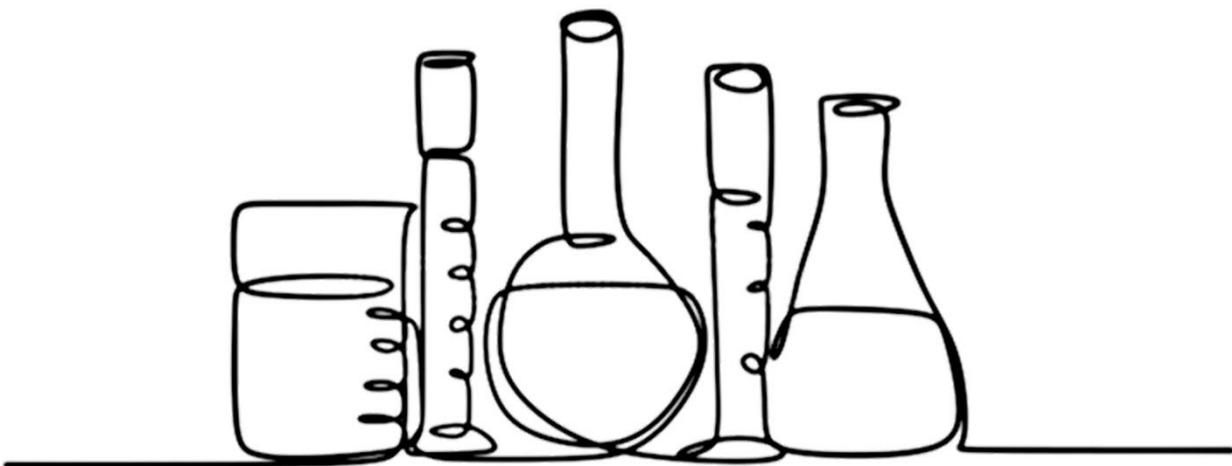
A continuación, presentamos un esquema que resume nuestros hallazgos (Figura 4.1). Este esquema busca resaltar que la estrategia de vacunación neonatal con vacunas que inducen un perfil mayoritariamente del tipo Th2 o un perfil mixto, pero que incluya de manera

significativa al perfil Th2, se presenta en el modelo murino como una estrategia factible de implementarse tanto en los calendarios de vacunación que no incluyen a la vacunación durante el embarazo como en los que si la incluyen. La implementación de esta estrategia asegurará que para aquellos neonatos que nacieron de madres que no se vacunaron o que nacieron prematuramente tengan inmunidad contra pertussis en esta edad tan crítica por la severidad de la enfermedad.

Figura 4.1: Resumen de experimentos de protección del trabajo de tesis. Panel A: Esquema experimental y resultados obtenidos en crías nacidas de madres no inmunizadas desafiadas con la de referencia *B. pertussis* Tohama Fase I. **Panel B:** Esquema experimental y resultados obtenidos en crías nacidas de madres inmunizadas desafiadas con la de referencia *B. pertussis* Tohama Fase I. **Panel C:** Esquema experimental y resultados obtenidos en crías nacidas de madres inmunizadas desafiadas con aislamientos circulantes de *B. pertussis* PRN+ y PRN-.



Anexo
**MATERIALES
Y MÉTODOS**



Medios y condiciones de cultivo para *B. pertussis*

Los stock bacterianos de las cepas de *B. pertussis* utilizadas se conservaron como una suspensión en el medio sintético de Stainer-Scholte (SS)²⁸⁷ suplementado con casaminoácidos 1 % p/v a -20 °C, en glicerol 50 % v/v. Para obtener biomasa de *B. pertussis* se inocularon 50µL de estos stocks conservados a -20°C en placas de Petri conteniendo el medio de cultivo Bordet Gengou suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 10% v/v (BGAS) a 36,5 °C durante 72 h. Transcurridas las 72 horas del primer cultivo efectuamos un subcultivo en el mismo medio durante 24 horas más.

Cepa de referencia y aislamientos clínicos de *B. pertussis*

En este trabajo de tesis se emplearon una cepa de referencia y 3 aislamientos clínicos de *B. pertussis*. Como cepa de referencia se empleó a la cepa *B. pertussis* Tohama Fase I aislada por primera vez en Japón en 1954 (Colección del Instituto Pasteur de París CIP 8132). El genotipo de esta cepa es *ptxP1*, *ptxA2*, *prn1*. Respecto de los aislamientos utilizados, uno, denominado CDC-PRN⁻ provino de un brote detectado en Washington, Estados Unidos, en el año 2016, y otros 2, denominados ArBpPRN⁻ y ArBpPRN⁺, fueron obtenidos el mismo año en Argentina. El genotipo de estos 3 aislamientos es *ptxP3*, *ptxA1*, *prn2*. Respecto del fenotipo, la cepa de referencia y el aislamiento ArBpPRN⁺ se caracterizan por expresar al antígeno vacunal pertactina, mientras que los aislamientos CDC-PRN⁻ y ArBpPRN⁻ no expresan dicho antígeno.

Vacunas utilizadas

Como vacuna acelular comercial se utilizó Boostrix (Glaxo Smith Kline, GSK), incluida como aP durante la redacción de la tesis, cuya composición es PT (8 µg), FHA (5 µg), PRN (2, 5 µg), 2,5 Lf y del toxoide diftérico y 5 Lf del tetánico. Como adyuvante contiene una mezcla de hidróxido de aluminio (0,3 mg) y fosfato de aluminio (0,2 mg). Como vacuna celular comercial se utilizó la proveniente del Serum Institute of India LTD (wP en la redacción de esta tesis) que se compone de una suspensión bacteriana de *B. pertussis* muerta por calor y detoxificada (≤ 16 UO), toxoide diftérico (≤ 25 Lf) y toxoide tetánico (≥ 5 Lf). Como adyuvante esta vacuna contiene 1,25 mg de fosfato de aluminio. También se empleó nuestro candidato vacunal basado en vesículas de membrana externa derivadas de *B. pertussis* (3 µg de proteína) formulado con 2,5 Lf de toxoide diftérico y 1,8 Lf de toxoide tetánico. Esta formulación figura como omvP en la redacción de esta tesis.

Obtención de vesículas de membrana externa de *B. pertussis*

Para la obtención de OMVs derivadas de *B. pertussis* Tohama fase I se cultivó en medio líquido SS con casaminoácidos 10% p/v suplementado con los componentes detallados más abajo (complemento 10X). La biomasa proveniente de las 16 horas de cultivo fue recolectada a través de una centrifugación a 6.000 x g por 20 min a 4°C. Dicha biomasa fue resuspendida en una solución 20mM Tris-HCl, 2mM EDTA pH 8,5 (buffer TE) y disgregada por sonicación en baño de agua fría. Posteriormente se centrifugó dos veces a 10.000 x g por 20 min a 4°C con el objetivo de eliminar los restos bacterianos. El sobrenadante se sometió a una ultracentrifugación a 100.000 x g por 2 h. El sedimento obtenido se resuspendió en una solución 20 mM TRIS. La presencia de OMVs en el preparado fue confirmada mediante una tinción negativa con Ácido Fosfotungstico a través del microscopio electrónica. La observación se realizó con una magnificación de 40.000x en un Microscopio de transmisión Jeol JEM 1200EX, del Servicio de Microscopia de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford ²⁸⁸ con el reactivo comercial (BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate) según indicaciones del fabricante. Se utilizó Seroalbúmina bovina (BSA por sus siglas en inglés) como proteína patrón (en concentraciones de 0,062 µg/µl a 0,5 µg/µl).

Ensayos en animales

Se utilizaron ratones BALB/C hembras y machos de más de 5-6 semanas de vida obtenidos del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Para la producción de neonatos en cantidades adecuadas para realizar los experimentos, se propició la ovulación y apareamiento de hembras en forma sincronizada tal como se detalla a continuación. Los protocolos diseñados y aplicados en la utilización de los animales fueron autorizados por el CICUAL, Comité de ética para el uso de animales de experimentación de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP (número de aprobación 004-06-15, 003-06-15 extendido y con validez hasta el 10 de agosto de 2023).

Apareamiento sincronizado para la producción de neonatos

Para obtener suficiente cantidad de animales con la misma fecha de nacimiento llevamos a cabo la sincronización de ovulación y apareamiento en ratones BALB/c. Para la sincronización, en primera instancia las hembras y los machos fueron mantenidos en jaulas separadas, luego se procedió a la estimulación del celo de la hembra mediante la introducción

de feromonas masculinas presentes en viruta proveniente de la jaula de los machos. Transcurridas las 48 -72 h de la estimulación se introdujeron los machos en las jaulas de las hembras y a partir de allí se realizó la revisión del área genital en las hembras, para determinar presencia de tapón mucoso vaginal. La evidencia de tapón mucoso en el introito vaginal de la hembra se consideró como parámetro decisivo de un apareamiento exitoso. Para reconfirmación de preñez además se observan cambios en comportamiento, visualizados como nidación a partir del día seis, y cambios físicos, abultamientos laterales en la región abdominal y palpación fetal, caracteres que se hacían evidentes aproximadamente al día 12 de la gestación.

Ensayos de protección utilizando el modelo desafío intranasal en ratones

Los esquemas de inmunización utilizados en los ratones consistieron en la inyección subcutánea (s.c) con 1/10 de la dosis humana de las vacunas bacterianas celulares wP, con 1/10 de la dosis humana de la vacuna acelular aP, o con la formulación obtenida en nuestro laboratorio basada en OMVs, omvP. Los esquemas de inmunización consistieron en la administración de 1, 2 o 3 dosis separadas por 14 días. A los 14 días de la última inmunización (a excepción de los ensayo de largo plazo) los ratones fueron desafiados por vía intranasal con una suspensión bacteriana en PBS a dosis subletal de *B. pertussis* (5×10^6 - 10^7 UFC/40 μ l). Los controles de estos experimentos consistieron ratones sin inmunizar (inyectados con PBS) y desafiados con las cepas utilizadas en cada ensayo (controles negativos de protección). Los ratones desafiados fueron sacrificados mediante dislocación cervical a los 7 días post-desafío. Se extrajeron los pulmones en esterilidad y se colectaron en 1000 μ L de PBS para ser homogeneizados con un homogeinizador Pro Scientific INC 200. Luego se realizaron diluciones seriadas 1/10 de los homogenatos de pulmón, se plaquearon en medio BGAS por duplicado y se realizaron los recuentos de UFC después de 4-5 días de incubación a 36,5 °C. El límite de detección de esta metodología está dado por la capacidad de contar colonias crecidas en una placa BGAS inoculada con un pulmón conteniendo bacterias viables. La placa que denominamos directa (se plaquean 100 μ L del homogenato pulmonar sin diluir), contendrá 10 veces menos UFC que el pulmón completo, la primera dilución 100 veces menos, y así sucesivamente. El límite inferior de detección está dado por la placa directa, pero a causa de tomar una alícuota de la décima parte, no es posible asegurar que el número de UFC en el pulmón sea nulo, aun cuando en la placa directa no aparezcan colonias. Este problema admite un planteo en términos de la distribución de Poisson para muestreo aleatorio. Si admitimos esta distribución, la probabilidad de encontrar al menos una colonia en nuestra alícuota de un décimo del volumen total será de prácticamente 1 cuando el número de colonias esperado sea de 10 UFC en el pulmón. Este es el límite inferior de detección que establecimos en nuestros experimentos (el valor

correspondiente es $\log_{10} 10=1$). El límite de detección superior no es problemático, porque realizamos las diluciones necesarias para lograr un número deseado de entre 30 y 300 colonias por placa.

Análisis estadístico.

Los datos correspondientes a la media y desviaciones estándares de los recuentos de UFC/pulmón de ratón, correspondientes a los distintos tratamientos, fueron transformados a $\log_{10}(1+UFC)$. Para los recuentos de viables por debajo del límite de detección (<10 UFC/pulmón) se utilizó un valor correspondiente al \log_{10} de 10 UFC. Las diferencias entre $\log_{10}(UFC)$ de las medias entre los distintos grupos fueron analizadas mediante Test de ONE-WAY ANOVA con comparaciones múltiples entre los grupos de manera no-pareada. Se utilizaron versiones 5.0,6.1 y 7.0 del software GraphPad Prism.

Obtención de sueros para caracterización de la respuesta inmune humoral e inmunización pasiva

Los sueros murinos utilizados en los ensayos de inmunoblot, ELISA, inmunizaciones pasivas y de lisis por complemento fueron obtenidos 14 días después de haber recibido la última dosis vacunal o a partir de los ratones control no inmunizados. El sangrado se realizó por punción de la vena submandibular con agujas 21G estériles, siguiendo protocolos aprobados por el CICUAL. Los sueros fueron separados por centrifugación a $4.000 \times g$ 10 m luego de obtener el coagulo por incubación a $4^{\circ}C$, y conservados hasta su uso a $-20^{\circ}C$.

Obtención de esplenocitos para transferencia a receptores naive

Los esplenocitos de ratones inmunes se obtuvieron mediante una esplenectomía. Brevemente este procedimiento quirúrgico consistió en anestesiarse al animal utilizando isofluorano a dosis constante, se atravesaron las capas cutánea y peritoneal del animal fijado a una cama de cirugía. Se expuso el bazo y se disectó con un bisturí electrocoagulador. El bazo se recibió en Buffer PBS. Se administró solución fisiológica termostaticada a $37^{\circ}C$ al animal para que recupere la volemia, se cerraron las capas utilizando suturas 5.0. Se administró Tramadol subcutáneo al terminar el procedimiento como analgésico pos-operatorio. El bazo obtenido luego se homogeniza por disgregación y filtrado. Se realiza un recuento de células con una cámara de Neubauer para determinar número de esplenocitos presentes.

Ensayos de transferencia pasiva de la inmunidad

Los experimentos de transferencia pasiva de sueros o esplenocitos se realizaron mediante la inyección intraperitoneal a receptores naive de 100 μ L de un pool de sueros o de esplenocitos (5×10^7) de ratones inmunes o control. 24 h luego de la transferencia, los ratones receptores son desafiados con una dosis subletal de *B. pertussis* (5×10^6 - 10^7 UFC/40 μ l) y los resultados de protección se obtuvieron de determinar el recuento de UFCs en pulmón.

Caracterización de la respuesta humoral mediante técnica de ELISA

Para determinar los títulos de inmunoglobulinas (totales e isotipos) se sensibilizaron placas de ELISA fondo plano (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) con un lisado de *B. pertussis* Tohama fase I en una concentración final de 3g/mL, o subunidad PtxA cedida por el Dr. Giorgio Fedele del Department of Infectious Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italia a concentración final de 6 g/ml en buffer carbonato 0,5M pH 9,5, a 4°C durante una noche. Luego de realizar un lavado, las placas se bloquearon por 1h a 37°C con una solución al 3% de leche descremada en buffer PBS-Tween 20 al 0,05% . Las placas fueron lavadas con una solución de PBS-Tween 20 al 0,05%, e incubadas con la dilución seriada de cada suero por 1h a temperatura ambiente. El revelado se realizó incubando por 1h a temperatura ambiente un anticuerpo secundario obtenido en cabra y anti ratón conjugado a peroxidasa de rábano (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). El sustrato utilizados fue o-fenilendiamina 1,0 mg/ml (Bio Basic Canadá, Inc.) en 0,1M buffer fosfato citrato-fosfato, pH 5,0 conteniendo 0,1% (v/v) peróxido de hidrogeno. La absorbancia fue medida a λ : 492nm en un lector Titertek Multiskan de 340 pocillos (ICN, USA). El título de los sueros se obtuvo graficando la curva Absorbancias a 420nm 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 (EC50). Como control inter ensayo se incluye un suero testigo. Para los ensayos de Aidez se realizó una incubación de 10 minutos a 37°C con el agente caotrópico tiocianato de amonio NH_4SCN en 2 concentraciones: 0,375M y 0,1875M previo al revelado; la afinidad medida se expresa como porcentaje del elución en relación al tratamiento control (sin incubación con el agente caotrópico) que refleja la fuerza de unión del anticuerpo al antígeno. Cada uno de estos ensayos se realizaron en al menos 3 réplicas independientes.

Caracterización de la respuesta humoral mediante la determinación de lisis bacteriana mediada por complemento.

Este ensayo se utilizó para evaluar la lisis mediada por el complemento activado vía anticuerpos específicos contra *B. pertussis* (denominada vía clásica del complemento). El procedimiento consistió en primera instancia en inactivar el complemento del suero que contiene los anticuerpos específicos mediante tratamiento a 56°C por 30 min. Este procedimiento se realizó para eliminar como variable la posible activación por la denominada vía alternativa por actividad del complejo C3 del sistema del complemento, que es una vía independiente de anticuerpos y es proclive a suceder en presencia de polisacáridos, como los presentes en la membrana de *B. pertussis*. Luego, los sueros inactivados se pusieron en contacto 50µl de una suspensión bacteriana ($DO_{650nm}=3,33 \times 10^{-7}$) preparada en Buffer de LISIS (PBS, MgCl 0,5mM, CaCl 0,15mM) con 50µl de suero inactivado, durante 1 hora y 30 minutos a 36,5°C en agitación moderada. Se agregaron 10µl de un suero conteniendo complemento a todas las muestras por igual para homogeneizar entre las muestras los niveles de complemento disponibles y se incubó por 2h a 36,5°C. En este caso se utilizó suero de ratón naive fresco como fuente de complemento. Finalmente se plaquearon diluciones en placas BGAS para realizar el recuento de UFC viables luego de cada tratamiento. Los resultados se calculan como el porcentaje de UFCs al final de la incubación en comparación con las incluidas en la mezcla inicial.

Obtención de proteínas totales para electroforesis en geles SDS-PAGE

La preparación de proteínas totales se realizó siguiendo el método descrito por Laemmli ²⁸⁹. Brevemente, las bacterias provenientes de un repique de 24 h en medio sólido BGA Se resuspendieron en PBS de modo de obtener una suspensión de $DO_{650nm} = 10$. Se agregó buffer Laemmli (con 5%v/v de β-mercaptoetanol) para favorecer la ruptura celular, y luego, las preparaciones se hirvieron por 15 minutos y se sonicaron en baño de agua (TESTLAB). Finalmente, la muestra se centrifugó por 5 minutos a 10.000 x g (Thermo scientific sorvall Legend Micro 21). Las muestras se conservaron a -20°C.

Electroforesis 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 ²⁸⁹. Se utilizó un gel de separación desnaturalizante con una concentración de acrilamida de 12,5% p/v (acrilamida: bisacrilamida 30:0,8, en buffer Tris-HCl 1M pH 8,8 y SDS 10 %p/v). 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). En cada calle se sembró el volumen

equivalente a 30 µg de la preparación de la subunidad PTxA purificada, solubilizada en buffer de Laemmli y calentada a 100°C durante 10 minutos. Las electroforesis se realizaron en equipos Miniprotean II (BioRad) durante 40 a 60 minutos a 110 volts en buffer de corrida (Glicina 0,37 M, SDS 10 % p/v, Tris-HCl 0,05 M pH 8,39).

Inmunodetección de proteínas (Inmunoblot).

Las muestras de subunidad PTxA purificada específicas de *B. pertussis* 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 con leche descremada (San Regim) 5 % p/v en buffer TBS (Tris-HCl 12 mM, NaCl 4 mM) para evitar el reconocimiento inespecífico. Seguidamente la membrana se incubó durante la noche a 4 °C con agitación suave junto con los anticuerpos murinos obtenidos para cada esquema de inmunización en una dilución 1/250 ó 1/500 en buffer TBS - leche 5 % p/v. Luego de esta incubación, se realizaron 6 lavados con buffer TBS- leche 5 % p/v y se agregó el segundo anticuerpo específico anti IgG total de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) disuelto en TBS-leche en una dilución 1/1000 que se incubaron durante 2,5 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Se realizaron tres lavados con buffer TBS y un lavado con buffer para el revelado con fosfatasa alcalina (PA) (Composición: 50 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 9,5). Finalmente, para el revelado se preparó una solución con el sustrato de la fosfatasa alcalina que contiene NBT (Nitroblue Tetrazolium Chloride) y BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-indolylphosphate p-toluidine) en buffer PA. El sustrato de la enzima se deja reaccionar hasta desarrollo de color y luego la reacción se detiene con agua bidestilada.

Genotipificación de variantes alélicas de aislamientos de *B. pertussis*

Se realizaron determinaciones de variantes alélicas del gen de la pertactina (*prn*), del promotor de la toxina pertussis (*ptxP*), de la subunidad PTxA de la toxina pertussis (*ptxA*), presencia de la secuencia de inserción IS481 en el gen *prn* y la presencia de la variante fim3 de la fimbria (*fim3*), mediante ensayos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) . Se utilizaron los siguientes primers para la genotipificación de los aislamientos locales de *B. pertussis* de nuestra colección.

Gen	Primers
<i>ptxP</i>	F:AATCGTCCTGCTCAACCGCC R:GGTATACGGTGGCGGGAGGA
<i>ptxA</i>	F:CCCCTGCCATGGTGTGATC R:TCAATTACCGGAGTTGGGCG
<i>prn</i>	F:CAATGTCACGGTCCAA R:GCAAGGTGATCGACAGGG
Inserción IS 481 en el gen <i>prn</i>	F:GGGCTGTTCCGCATGA R:CTGCGCATTGCCGTTGC
<i>fim3</i>	F:GACCTGATATTCTGATGCCG R:AAGGCTTGCCGGTTTTTTTGG

La mezcla de reacción para la PCR se realiza en un volumen final de 10 μ L y se preparó de la siguiente manera: 1 μ L de buffer de reacción 10x (200 mM Tris-HCl pH 8,4), 0,5 μ L de MgCl₂ 50 mM, 1 μ L de mezcla de dNTPs 5mM, 1 μ L DMSO (Dimetilsulfóxido), 1 μ L de cada primer 5 mM, 0,075 μ L de Taq ADN polimerasa (5 U/mL, Genbiotech), 2 μ L de ADN genómico, y agua hasta completar el volumen final.

Condiciones de ciclado para la detección de *Inserción IS 481 en el gen prn*:

Desnaturalización, 1 minuto a 94 °C

35 ciclos:

45'' a 94 °C

15'' a 52 °C

30'' a 72°C

Extensión final, 1 minuto a 72 °C.

Condiciones de ciclado para la amplificación de regiones polimórficas del gen *ptxA*:

Desnaturalización, 1 minuto a 94°C

12 ciclos de:

15'' a 94°C

15'' a 60°C

15'' a 72°C

Extensión final, 30'' a 72°C.

Condiciones de ciclado para la amplificación de regiones polimórficas del gen *prn*:

Desnaturalización, 1 minutos a 94°C

35 ciclos de

15'' a 94°C

10'' a 52°C

20'' a 72°C

Extensión final, 1 minuto a 72°C.

Condiciones de ciclado para la amplificación de regiones polimórficas del gen *ptxP*

Desnaturalización, 1 minuto a 94°C

17 ciclos de

20'' a 94 °C

10'' a 60°C

20'' a 72 °C

Extensión final, 45'' a 72°C.

Condiciones de ciclado para la amplificación de regiones polimórficas del gen *fim3*

Desnaturalización, 1 minuto a 94°C

17 ciclos de

2 min a 94 °C

10'' a 53°C

10'' a 72 °C

Extensión final, 45'' a 72°C.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un equipo GenePro (BIOER). Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa 1,5% p/v.

Electroforesis en gel de agarosa.

Se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa 1,5 % p/v utilizando SYBR Safe (Invitrogen) como agente intercalante de ADN para permitir la visualización de los productos de la reacción de PCR. Las muestras se sembraron en el gel utilizando un buffer de siembra. La electroforesis se desarrolló en un equipo Bio-Rad PowerPac Basic a 100 V durante 8 minutos, utilizando buffer de electroforesis TBE 0,5X, cuya composición se detalla en el Anexo. Una vez

finalizada la corrida electroforética, se visualizó el gel con un transiluminador Safe Imager 2.0 y se registró una imagen del mismo con una cámara Kodak EasyShare M530.

Anexo: medios de cultivo, soluciones y buffers

Medios de cultivo

- **Medio Bordet-Gengou agar sangre (BGAS):**

Agar Bordet Gengou DIFCO CATALOG N°248200, 30g/L de medio

Peptona DIFCO, 10 g/L de medio

Glicerina, 10 g/L de medio

Luego de esterilizar 15 minutos a 121°C, se suplementa con 10% v/v de sangre desfibrinada de carnero.

- **Medio Regan Lowe (RL):**

Agar carbon Oxoid, 51g/L de medio

Agua estéril y deionizada, 900ml/L de medio

Luego de esterilizar 15 minutos a 121°C, se suplementa con 10% v/v de sangre desfibrinada de carnero.

- **Medio Stainer Scholte (SS):**

Glutamato de sodio monohidrato, 10,7 g/L

L- Prolina, 0,24 g/L

NaCl, 2,50 g/L

KH₂PO₄, 0,50 g/L

KCl, 0,20 g/L

MgCl₂.6H₂O, 0,10 g/L

CaCl₂.6H₂O, 0,02 g/L

Tris-HCl, 1,52 g/L

Ésta solución se lleva a pH = 7,2 con HCl 1:1, y se esteriliza 15 minutos a 121 °C.

Luego se añade el complemento esterilizado mediante filtración:

- **Complemento 10X:**

L-Cisteína, 4 g/L

FeSO₄.7H₂O, 1 g/L

Ácido Ascórbico, 2 g/L

Acido Nicotínico, 0,4 g/L

HCl (concentrado), 1 % v/v

Se lleva a un volumen final de 20 mL con agua destilada.

SOLUCIONES

- **Buffer PBS**

KH_2PO_4 3,14 mM

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9,77 mM

NaCl 123,2 mM

BUFFERS

Buffers para la obtención de OMVs

- **Buffer de obtención de OMVs**

Tris-HCl 20mM

EDTA 2mM

pH 8,5

- **Buffer de resuspensión**

Tris 20 mM

Buffers para preparación de muestras para electroforesis desnaturizante SDS PAGE

- **Buffer de Laemmli**

Dodecil sulfato de sodio (SDS) 8% p/v

Glicerol 20% v/v

EDTA 0,004 M

Tris-HCl 0,2 M, pH 6,8

Azul de Bromofenol 0,01 %

β -mercaptoetanol 5 % v/v

Buffer para immunoblot

- **Buffer de transferencia 5X**

Tris 15g

Glicina 57,6 g

Llevar a 1 L con H_2O bidestilada

Diluir a 1X con 200 ml de buffer 5X + 200 ml MeOH + H_2O para llegar al litro.

Buffers para ELISA

- **Buffer de sensibilización**

Na₂CO₃ 1,59 g/l

NaHCO₃ 2,93 g/l

pH 9,6

- **Buffer fosfato citrato**

Ácido cítrico 0.1 M

Na₂HPO₄ 0.1 M

Llevar a pH 5 con NaOH

Electroforesis en geles de agarosa

- **Buffer de siembra:**

Sacarosa 40% p/v

Azul de bromofenol 0,25% p/v.

- **Buffer TBE (0,5X):**

EDTA 0.5 M (pH=8), 20 ml

Ácido Bórico, 0,275 %p/v

Tris, 0,57 %p/v

BIBLIOGRAFÍA



1. Clemens, J., Holmgren, J., Kaufmann, S. H. E. & Mantovani, A. Ten years of the global Alliance for vaccines and immunization: Challenges and progress. *Nature Immunology* (2010) doi:10.1038/ni1210-1069.
2. Liu, L. *et al.* Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet* **388**, 3027–3035 (2016).
3. Vojtek, I. *et al.* Maternal immunization: where are we now and how to move forward? *Annals of Medicine* (2018) doi:10.1080/07853890.2017.1421320.
4. Marchant, A. *et al.* Maternal immunisation: collaborating with mother nature. *The Lancet Infectious Diseases* (2017) doi:10.1016/S1473-3099(17)30229-3.
5. Kollmann, T. R. *et al.* Neonatal Innate TLR-Mediated Responses Are Distinct from Those of Adults. *J. Immunol.* (2009) doi:10.4049/jimmunol.0901481.
6. Levy, O., Goriely, S. & Kollmann, T. R. Immune response to vaccine adjuvants during the first year of life. *Vaccine* (2013) doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.016.
7. Miller, J. E. *et al.* Association of gestational age and growth measures at birth with infection-related admissions to hospital throughout childhood: a population-based, data-linkage study from Western Australia. *Lancet Infect. Dis.* (2016) doi:10.1016/S1473-3099(16)00150-X.
8. Cherry, J. D. & Seaton, B. L. Patterns of Bordetella parapertussis respiratory illnesses: 2008-2010. *Clin. Infect. Dis.* **54**, 534–537 (2012).
9. Warfel, J. M., Beren, J., Kelly, V. K., Lee, G. & Merkel, T. J. Nonhuman primate model of pertussis. *Infect. Immun.* **80**, 1530–1536 (2012).
10. Heining, U. *et al.* DTP Vaccine in German Children After Household Exposure. **102**, (2012).
11. Carbonetti, N. H. Pertussis leukocytosis: Mechanisms, clinical relevance and treatment. *Pathog. Dis.* **74**, 1–8 (2016).
12. Paddock, C. D. *et al.* Pathology and pathogenesis of fatal Bordetella pertussis infection in infants. *Clin. Infect. Dis.* **47**, 328–338 (2008).
13. Pero, R. S. *et al.* Gai2-mediated signaling events in the endothelium are involved in controlling leukocyte extravasation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2007) doi:10.1073/pnas.0700185104.
14. Pham, T. H. M., Okada, T., Matloubian, M., Lo, C. G. & Cyster, J. G. S1P1 Receptor Signaling Overrides Retention Mediated by Gai-Coupled Receptors to Promote T Cell Egress. *Immunity* (2008) doi:10.1016/j.immuni.2007.11.017.
15. Beck, T. C., Gomes, A. C., Cyster, J. G. & Pereira, J. P. CXCR4 and a cell-extrinsic mechanism control immature B lymphocyte egress from bone marrow. *J. Exp. Med.* (2014) doi:10.1084/jem.20140457.
16. Kilgore, P. E., Salim, A. M., Zervos, M. J. & Schmitt, H. Pertussis : Microbiology , Disease , Treatment , and Prevention. **29**, 449–486 (2016).
17. Mattoo, S. & Cherry, J. D. Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to. *Society* **18**, 326–382 (2005).
18. Jakubů, V., Zavadilová, J., Fabiánová, K. & Urbášková, P. Trends in the minimum inhibitory concentrations of erythromycin, clarithromycin, azithromycin, ciprofloxacin, and trimethoprim/ Sulfamethoxazole for strains of Bordetella Pertussis isolated in the

- Czech Republic, 1967–2015. *Cent. Eur. J. Public Health* (2017) doi:10.21101/cejph.a4948.
19. Greenberg, D. P., Von König, C. H. W. & Heininger, U. Health burden of pertussis in infants and children. *Pediatric Infectious Disease Journal* (2005) doi:10.1097/01.inf.0000160911.65632.e1.
 20. Cherry, J. D. Pertussis in young infants throughout the world. *Clin. Infect. Dis.* **63**, S119–S122 (2016).
 21. Center for Disease Control. CDC Pink Book Supplement (2017). *Epidemiol. Prev. Vaccine-Preventable Dis.* (2017).
 22. Liang, Y., Salim, A. M., Wu, W. & Kilgore, P. E. Chao Yuanfang: Imperial physician of the Sui Dynasty and an early pertussis observer? *Open Forum Infect. Dis.* **3**, 1–3 (2016).
 23. Yarmohammadi, H., Kazeruni, M. H. B., Soofi, A. & Zargaran, A. The first report of epidemic pertussis by Bahaodowle Razi from the 15th century Anno Domini. *Iran. Red Crescent Med. J.* (2015) doi:10.5812/ircmj.13454.
 24. Bloch, H. Guillaume de Baillou, M.D. (1538-1616): portrait of a sixteenth-century Renaissance pathfinder. (1979).
 25. Parkhill, J. *et al.* Comparative analysis of the genome sequences of bordetella pertussis, bordetella parapertussis and bordetella bronchiseptica. *Nat. Genet.* **35**, 32–40 (2003).
 26. Buboltz, A. M., Nicholson, T. L., Weyrich, L. S. & Harvill, E. T. Role of the type III secretion system in a hypervirulent lineage of Bordetella bronchiseptica. *Infect. Immun.* (2009) doi:10.1128/IAI.01362-08.
 27. Kozak, N. A., Mattoo, S., Foreman-Wykert, A. K., Whitelegge, J. P. & Miller, J. F. Interactions between partner switcher orthologs BtrW and BtrV regulate type III secretion in Bordetella. *J. Bacteriol.* (2005) doi:10.1128/JB.187.16.5665-5676.2005.
 28. Cotter, P. A. & Jones, A. M. Phosphorelay control of virulence gene expression in Bordetella. *Trends in Microbiology* (2003) doi:10.1016/S0966-842X(03)00156-2.
 29. GORDON, J. E. & HOOD, R. I. Whooping cough and its epidemiological anomalies. *Am. J. Med. Sci.* (1951) doi:10.1097/00000441-195109000-00011.
 30. Culotta, C. E., Dominick, D. & Harrison, E. R. Epidemiologic Studies in Whooping Cough. *Yale J. Biol. Med.* (1938).
 31. Storsaeter, J. & Gustafsson, L. Absolute efficacy of acellular pertussis vaccines in household settings. *Dev. Biol. Stand.* (1997).
 32. Rodman, A. C., Bradford, W. L. & Berry, G. P. An Epidemiological Study of an Outbreak of Pertussis in a Public School. *Am. J. Public Health Nations. Health* (1946) doi:10.2105/AJPH.36.10.1156.
 33. P., L. The epidemiology of Pertussis. *Am J Dis Child ;12;290–315.* (1916).
 34. Warfel, J. M., Beren, J. & Merkel, T. J. Airborne transmission of bordetella pertussis. *J. Infect. Dis.* **206**, 902–906 (2012).
 35. Trainor, E. A., Nicholson, T. L. & Merkel, T. J. Bordetella pertussis transmission. *Pathog. Dis.* **73**, ftv068 (2015).
 36. Anderson RM, M. R. Infectious Diseases of Humans: Dynamics and Control. *Oxford, U.K. Oxford Univ. Press. 199170e* (1991).
 37. Tiwari, T., Murphy, T. V. & Moran, J. Recommended antimicrobial agents for the

- treatment and postexposure prophylaxis of pertussis: 2005 CDC Guidelines. *MMWR. Recomm. Rep.* (2005).
38. Wood, N. & McIntyre, P. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatr. Respir. Rev.* **9**, 201–212 (2008).
 39. Ernest Kuchar, M. Karlikowska-Skwarnik, S. Han, and A. N.-O. Pertussis: History of the Disease and Current Prevention Failure. *Adv. Exp. Med. Biol. Respir.* **6**, 57–66 (2015).
 40. Cohen, S., Black, A., Ross, A. & Mandel, E. D. Updated treatment and prevention guidelines for pertussis. *J. Am. Acad. Physician Assist.* **27**, 19–25 (2014).
 41. Cherry, J. D. The prevention of severe pertussis and pertussis deaths in young infants. *Expert Rev. Vaccines* **18**, 205–208 (2019).
 42. Lewis, S. *et al.* Erythromycin-resistant *Bordetella pertussis* - Yuma County, Arizona, May- October 1994. *Journal of the American Medical Association* (1995) doi:10.1001/jama.1995.03520250027009.
 43. Bartkus, J. M. *et al.* Identification of a mutation associated with erythromycin resistance in *Bordetella pertussis*: Implications for surveillance of antimicrobial resistance. *J. Clin. Microbiol.* (2003) doi:10.1128/JCM.41.3.1167-1172.2003.
 44. Hill, B. C., Baker, C. N. & Tenover, F. C. A simplified method for testing *Bordetella pertussis* for resistance to erythromycin and other antimicrobial agents. *J. Clin. Microbiol.* (2000) doi:10.1128/jcm.38.3.1151-1155.2000.
 45. Korgenski, E. K. & Daly, J. A. Surveillance and detection of erythromycin resistance in *Bordetella pertussis* isolates recovered from a pediatric population in the intermountain west region of the United States. *J. Clin. Microbiol.* (1997) doi:10.1128/jcm.35.11.2989-2991.1997.
 46. Lönnqvist, E., Barkoff, A. M., Mertsola, J. & He, Q. Antimicrobial susceptibility testing of Finnish *Bordetella pertussis* isolates collected during 2006–2017. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* (2018) doi:10.1016/j.jgar.2018.02.012.
 47. Shahcheraghi, F. *et al.* The first macrolide-resistant *Bordetella pertussis* strains isolated from Iranian patients. *Jundishapur J. Microbiol.* (2014) doi:10.5812/jjm.10880.
 48. Guillot, S. *et al.* Macrolide-resistant *Bordetella pertussis* infection in newborn girl, France. *Emerg. Infect. Dis.* (2012) doi:10.3201/eid1806.120091.
 49. Yang, Y. *et al.* Variation in *Bordetella pertussis* susceptibility to erythromycin and virulence-related genotype changes in China (1970–2014). *PLoS ONE* (2015) doi:10.1371/journal.pone.0138941.
 50. Li, L. *et al.* High prevalence of macrolide-resistant *Bordetella pertussis* and ptxP1 Genotype, Mainland China, 2014–2016. *Emerging Infectious Diseases* (2019) doi:10.3201/eid2512.181836.
 51. Wang, Z. *et al.* High prevalence of erythromycin-resistant *Bordetella pertussis* in Xi'an, China. *Clin. Microbiol. Infect.* (2014) doi:10.1111/1469-0691.12671.
 52. Liu, X. *et al.* Pertussis Outbreak in a Primary School in China: Infection and Transmission of the Macrolide-resistant *Bordetella pertussis*. *Pediatr. Infect. Dis. J.* (2018) doi:10.1097/INF.0000000000001814.
 53. Madsen, T. Vaccination against whooping cough. *J. Am. Med. Assoc.* (1933) doi:10.1001/jama.1933.02740280007003.
 54. Cherry, J. D. The epidemiology of pertussis: A comparison of the epidemiology of the

- disease pertussis with the epidemiology of Bordetella pertussis infection. *Pediatrics* **115**, 1422–1427 (2005).
55. Klein, N. P. Licensed pertussis vaccines in the United States: History and current state. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* (2014) doi:10.4161/hv.29576.
 56. Romanus, V., Jonsell, R. & Bergquist, S. O. Pertussis in Sweden after the cessation of general immunization in 1979. *Pediatr. Infect. Dis. J.* (1987) doi:10.1097/00006454-198704000-00005.
 57. BRODY, M. & SORLEY, R. G. Neurologic complications following the administration of pertussis vaccine. *N. Y. State J. Med.* (1947).
 58. Kulenkampff, M., Schwartzman, J. S. & Wilson, J. Neurological complications of pertussis inoculation. *Arch. Dis. Child.* (1974) doi:10.1136/adc.49.1.46.
 59. Sato, H. & Sato, Y. Protective antigens of Bordetella pertussis mouse-protection test against intracerebral and aerosol challenge of B. pertussis. *Dev. Biol. Stand.* (1985).
 60. Olin, P., Rasmussen, F., Gustafsson, L., Hallander, H. O. & Heijbel, H. Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. *Lancet* (1997) doi:10.1016/S0140-6736(97)06508-2.
 61. Clark, T. A. Changing pertussis epidemiology: Everything old is new again. *Journal of Infectious Diseases* (2014) doi:10.1093/infdis/jiu001.
 62. Witt, M. A., Katz, P. H. & Witt, D. J. Unexpectedly limited durability of immunity following acellular pertussis vaccination in preadolescents in a north American outbreak. *Clin. Infect. Dis.* (2012) doi:10.1093/cid/cis287.
 63. Sheridan, S. L., Ware, R. S., Grimwood, K. & Lambert, S. B. Number and order of whole cell pertussis vaccines in infancy and disease protection. *JAMA - Journal of the American Medical Association* (2012) doi:10.1001/jama.2012.6364.
 64. Klein, N. P., Bartlett, J., Fireman, B., Rowhani-Rahbar, A. & Baxter, R. Comparative effectiveness of acellular versus whole-cell pertussis vaccines in teenagers. *Pediatrics* (2013) doi:10.1542/peds.2012-3836.
 65. Mills, K. H. G., Ross, P. J., Allen, A. C. & Wilk, M. M. Do we need a new vaccine to control the re-emergence of pertussis? *Trends in Microbiology* (2014) doi:10.1016/j.tim.2013.11.007.
 66. Ryan, M. *et al.* Distinct T-cell subtypes induced with whole cell and acellular pertussis vaccines in children. *Immunology* (1998) doi:10.1046/j.1365-2567.1998.00401.x.
 67. J, B., MM, W., WG, H., CA, van E. & KH, M. Roads to the development of improved pertussis vaccines paved by immunology. *Pathog. Dis.* **73**, (2015).
 68. Wilk, M. M. & Mills, K. H. G. CD4 TRM cells following infection and immunization: Implications for more effective vaccine design. *Front. Immunol.* **9**, 1–8 (2018).
 69. Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on immunization, April 2015: conclusions and recommendations. in *Relevé épidémiologique hebdomadaire / Section d'hygiène du Secrétariat de la Société des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* (2015).
 70. WHO. Pertussis vaccines: WHO position paper, August 2015-Recommendations. *Vaccine* (2016) doi:10.1016/j.vaccine.2015.10.136.
 71. Kapil, P. & Merkel, T. J. Pertussis vaccines and protective immunity. *Current Opinion in*

- Immunology* (2019) doi:10.1016/j.coi.2019.03.006.
72. Dias, W. O. *et al.* An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin. *Hum. Vaccines Immunother.* (2013) doi:10.4161/hv.22847.
 73. Solans, L. & Loch, C. The role of mucosal immunity in pertussis. *Frontiers in Immunology* (2019) doi:10.3389/fimmu.2018.03068.
 74. Loch, C. Live pertussis vaccines: will they protect against carriage and spread of pertussis? *Clinical Microbiology and Infection* (2016) doi:10.1016/j.cmi.2016.05.029.
 75. Loch, C. *et al.* Live Attenuated Pertussis Vaccine BPZE1 Protects Baboons Against Bordetella pertussis Disease and Infection. *J. Infect. Dis.* (2017) doi:10.1093/infdis/jix254.
 76. Fedele, G., Bianco, M., Debie, A.-S., Loch, C. & Ausiello, C. M. Attenuated Bordetella pertussis Vaccine Candidate BPZE1 Promotes Human Dendritic Cell CCL21-Induced Migration and Drives a Th1/Th17 Response . *J. Immunol.* (2011) doi:10.4049/jimmunol.1003765.
 77. Thorstensson, R. *et al.* 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* (2014) doi:10.1371/journal.pone.0083449.
 78. Rappuoli, R. The vaccine containing recombinant pertussis toxin induces early and long-lasting protection. *Biologicals* (1999) doi:10.1006/biol.1999.0189.
 79. Buasri, W. *et al.* Construction of Bordetella pertussis strains with enhanced production of genetically-inactivated Pertussis Toxin and Pertactin by unmarked allelic exchange. *BMC Microbiol.* (2012) doi:10.1186/1471-2180-12-61.
 80. Rohner, G. B. *et al.* Boosting Teenagers With Acellular Pertussis Vaccines Containing Recombinant or Chemically Inactivated Pertussis Toxin: A Randomized Clinical Trial. *Clin. Infect. Dis.* (2019) doi:10.1093/cid/ciy594.
 81. Sirivichayakul, C. *et al.* Safety and immunogenicity of a combined Tetanus, Diphtheria, recombinant acellular Pertussis vaccine (Tdap) in healthy Thai adults. *Hum. Vaccines Immunother.* (2017) doi:10.1080/21645515.2016.1234555.
 82. Cheung, G. Y. C. *et al.* Effect of different forms of adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis on protection afforded by an acellular pertussis vaccine in a murine model. *Infect. Immun.* (2006) doi:10.1128/IAI.01104-06.
 83. Marr, N. *et al.* Protective activity of the Bordetella pertussis BrkA autotransporter in the murine lung colonization model. *Vaccine* (2008) doi:10.1016/j.vaccine.2008.06.017.
 84. Alvarez Hayes, J. *et al.* Bordetella pertussis iron regulated proteins as potential vaccine components. *Vaccine* (2013) doi:10.1016/j.vaccine.2013.05.072.
 85. Geurtsen, J. *et al.* Lipopolysaccharide analogs improve efficacy of acellular pertussis vaccine and reduce type I hypersensitivity in mice. *Clin. Vaccine Immunol.* (2007) doi:10.1128/CVI.00074-07.
 86. Allen, A. C. *et al.* Sustained protective immunity against Bordetella pertussis nasal colonization by intranasal immunization with a vaccine-adjuvant combination that induces IL-17-secreting T RM cells. *Mucosal Immunol.* (2018) doi:10.1038/s41385-018-0080-x.
 87. Adkins, B., Bu, Y., Vincek, V. & Guevara, P. The primary responses of murine neonatal

- lymph node CD4+ cells are Th2-skewed and are sufficient for the development of Th2-biased memory. *Clin. Dev. Immunol.* **10**, 43–51 (2003).
88. Mastelic-Gavillet, B. *et al.* Neonatal T follicular helper cells are lodged in a pre-T follicular helper stage favoring innate over adaptive germinal center responses. *Front. Immunol.* **10**, 1–12 (2019).
 89. Vono, M. *et al.* Overcoming the neonatal limitations of inducing germinal centers through liposome-based adjuvants including C-type lectin agonists trehalose dibehenate or Curdlan. *Front. Immunol.* **9**, 1–12 (2018).
 90. Mohr, E. & Siegrist, C. A. Vaccination in early life: Standing up to the challenges. *Curr. Opin. Immunol.* **41**, 1–8 (2016).
 91. Schussek, S. *et al.* The CTA1-DD adjuvant strongly potentiates follicular dendritic cell function and germinal center formation, which results in improved neonatal immunization. *Mucosal Immunol.* (2020) doi:10.1038/s41385-020-0253-2.
 92. Hozbor, D. *et al.* Release of outer membrane vesicles from *Bordetella pertussis*. *Curr. Microbiol.* (1999) doi:10.1007/PL00006801.
 93. Roberts, R. *et al.* Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. *Vaccine* **26**, 4639–4646 (2008).
 94. Hozbor, D. F. Outer membrane vesicles: an attractive candidate for pertussis vaccines. *Expert Review of Vaccines* (2017) doi:10.1080/14760584.2017.1276832.
 95. Gaillard, M. E. *et al.* 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 (2014).
 96. Ormazábal, M. *et al.* Characterization of the key antigenic components of pertussis vaccine based on outer membrane vesicles. *Vaccine* (2014) doi:10.1016/j.vaccine.2014.08.084.
 97. Asensio, C. J. A. *et al.* Outer membrane vesicles obtained from *Bordetella pertussis* Tohama expressing the lipid a deacylase PagL as a novel acellular vaccine candidate. *Vaccine* (2011) doi:10.1016/j.vaccine.2010.12.068.
 98. Ryan, M. *et al.* *Bordetella pertussis* respiratory infection in children is associated with preferential activation of type 1 T helper cells. *J. Infect. Dis.* (1997) doi:10.1086/593682.
 99. Warfel, J. M. & Merkel, T. J. *Bordetella pertussis* infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates. *Mucosal Immunol.* (2013) doi:10.1038/mi.2012.117.
 100. Advani, A., Gustafsson, L., Åhrén, C., Mooi, F. R. & Hallander, H. O. Appearance of Fim3 and ptxP3-*Bordetella pertussis* strains, in two regions of Sweden with different vaccination programs. *Vaccine* (2011) doi:10.1016/j.vaccine.2011.02.070.
 101. Bottero, D. *et al.* Characterization of the immune response induced by pertussis OMVs-based vaccine. *Vaccine* (2016) doi:10.1016/j.vaccine.2016.04.079.
 102. Vaccine Preventable Deaths and the Global Immunization Vision and Strategy, 2006-2015. *JAMA* (2006) doi:10.1001/jama.295.24.2840.
 103. Vanderslott, S., Dadonaite, B. & Roser, M. Vaccination - Our World in Data. *OurWorldInData.org.* (2020).
 104. Center For Disease Control. Pertussis in other countries - CDC. *2012 West Nile virus update* (2012).

105. Samantha Vanderslott. *How is the world doing in its fight against vaccine preventable diseases? Our World in data* (2018).
106. Cherry, J. D. The science and fiction of pertussis vaccines. *Pediatrics* **112**, 405–406 (1999).
107. Nteyayabo, B., De Serres, G. & Duval, B. Pertussis resurgence in Canada largely caused by a cohort effect. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **22**, 22–27 (2003).
108. Klein, N. P., Bartlett, J., Fireman, B., Rowhani-Rahbar, A. & Baxter, R. Comparative effectiveness of acellular versus whole-cell pertussis vaccines in teenagers. *Pediatrics* **131**, (2013).
109. Cherry, J. D. Why do pertussis vaccines fail? *Pediatrics* **129**, 968–970 (2012).
110. Bart, M. J. *et al.* Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *MBio* **5**, 1–13 (2014).
111. Raguckas, S. E., VandenBussche, H. L., Jacobs, C. & Klepser, M. E. Pertussis resurgence: Diagnosis, treatment, prevention, and beyond. *Pharmacotherapy* (2007) doi:10.1592/phco.27.1.41.
112. Gu, X. X. *et al.* Waning immunity and microbial vaccines-workshop of the National Institute of Allergy and infectious diseases. *Clin. Vaccine Immunol.* **24**, (2017).
113. Roush, S. W. *et al.* Historical comparisons of morbidity and mortality for vaccine-preventable diseases in the United States. *Journal of the American Medical Association* (2007) doi:10.1001/jama.298.18.2155.
114. Galanis, E., King, A. S., Varughese, P. & Halperin, S. A. Changing epidemiology and emerging risk groups for pertussis. *Cmaj* **174**, 451–452 (2006).
115. Cherry, J. D. The History of Pertussis (Whooping Cough); 1906–2015: Facts, Myths, and Misconceptions. *Curr. Epidemiol. Reports* **2**, 120–130 (2015).
116. Cherry, J. D. Pertussis in the preantibiotic and prevaccine era, with emphasis on adult pertussis. in *Clinical Infectious Diseases* (1999). doi:10.1086/515057.
117. Roopenian, D. C. & Akilesh, S. FcRn: The neonatal Fc receptor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 715–725 (2007).
118. Gaillard, M. E. *et al.* Pertussis maternal immunization: Narrowing the knowledge gaps on the duration of transferred protective immunity and on vaccination frequency. *Front. Immunol.* **8**, 1–10 (2017).
119. Post, A. L. *et al.* Efficiency of placental transfer of vaccine-elicited antibodies relative to prenatal Tdap vaccination status. *Vaccine* (2020) doi:10.1016/j.vaccine.2020.05.036.
120. Report, S. Pertussis. (2020).
121. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Reported Pertussis Incidence and Cases Notice to Readers : Final 2018 Reports of Notifiable Diseases Hospitalization by Age Group Reported DTaP Vaccine Status of Children with Pertussis ,. *2018 Final Pertussis Surveill. Rep.* 292279 (2018).
122. Hellenbrand, W. *et al.* The epidemiology of pertussis in Germany: Past and present. *BMC Infect. Dis.* **9**, 1–11 (2009).
123. Arehart, C. H., David, M. Z. & Dukic, V. Tracking U.S. Pertussis Incidence: Correlation of Public Health Surveillance and Google Search Data Varies by State. *Sci. Rep.* **9**, 1–10 (2019).

124. Celentano, L. P., Massari, M., Paramatti, D., Salmaso, S. & Tozzi, A. E. Resurgence of pertussis in Europe. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**, 761–765 (2005).
125. Sheridan, S. L. *et al.* Acellular pertussis vaccine effectiveness for children during the 2009-2010 pertussis epidemic in Queensland. *Med. J. Aust.* **200**, 334–338 (2014).
126. Jayasundara, D. *et al.* Emergence of pertactin-deficient pertussis strains in Australia can be explained by models of vaccine escape. *Epidemics* **31**, 100388 (2020).
127. Pillsbury, A., Quinn, H. E. & McIntyre, P. B. Australian vaccine preventable disease epidemiological review series: pertussis, 2006-2012. *Commun. Dis. Intell. Q. Rep.* **38**, E179–E194 (2014).
128. Fabricius, G. *et al.* Pertussis epidemiology in Argentina: TRENDS after the introduction of maternal immunisation. *Epidemiol. Infect.* **146**, 858–866 (2018).
129. Cherry, J. D. The science and fiction of the ‘resurgence’ of pertussis. *Pediatrics* **112**, 405–406 (2003).
130. Rohani, P. & Drake, J. M. The decline and resurgence of pertussis in the US. *Epidemics* **3**, 183–188 (2011).
131. Domenech de Cellès, M., King, A. A. & Rohani, P. Commentary: resolving pertussis resurgence and vaccine immunity using mathematical transmission models. *Hum. Vaccines Immunother.* **15**, 683–686 (2019).
132. Hovingh, E. S. *et al.* Bordetella pertussis pertactin knock-out strains reveal immunomodulatory properties of this virulence factor article. *Emerg. Microbes Infect.* **7**, (2018).
133. Lam, C. *et al.* Rapid increase in pertactin-deficient Bordetella pertussis isolates, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* (2014) doi:10.3201/eid2004.131478.
134. Mooi, F. R. *et al.* Bordetella pertussis Strains with Increased Toxin Production Associated with Pertussis Resurgence. **15**, 1–8 (2009).
135. Bart, M. J. *et al.* Global population structure and evolution of Bordetella pertussis and their relationship with vaccination. *MBio* (2014) doi:10.1128/mBio.01074-14.
136. Houard, S., Hackel, C., Herzog, A. & Bollen, A. Specific identification of Bordetella pertussis by the polymerase chain reaction. *Res. Microbiol.* (1989) doi:10.1016/0923-2508(89)90069-7.
137. Kallonen, T., Mertsola, J., Mooi, F. R. & He, Q. Rapid detection of the recently emerged Bordetella pertussis strains with the ptxP3 pertussis toxin promoter allele by real-time PCR. *Clin. Microbiol. Infect.* (2012) doi:10.1111/j.1469-0691.2012.04000.x.
138. Bodilis, H. & Guiso, N. Virulence of pertactin-negative Bordetella pertussis isolates from infants, France. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 471–474 (2013).
139. Hegerle, N., Dore, G. & Guiso, N. Pertactin deficient Bordetella pertussis present a better fitness in mice immunized with an acellular pertussis vaccine. *Vaccine* (2014) doi:10.1016/j.vaccine.2014.09.068.
140. Tsang, R. S. W. *et al.* 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.* (2014) doi:10.1016/j.ijid.2014.08.002.
141. Pawloski, L. C. *et al.* Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient Bordetella pertussis in the United States. *Clin. Vaccine Immunol.* (2014)

doi:10.1128/CVI.00717-13.

142. Hellwig, S. M. M., Rodriguez, M. E., Berbers, G. A. M., Van De Winkel, J. G. J. & Mooi, F. R. Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity. *J. Infect. Dis.* **188**, 738–742 (2003).
143. Hegerle, N. & Guiso, N. *Bordetella pertussis* and pertactin-deficient clinical isolates: Lessons for pertussis vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **13**, 1135–1146 (2014).
144. Safarchi, A. *et al.* Pertactin negative *Bordetella pertussis* demonstrates higher fitness under vaccine selection pressure in a mixed infection model. *Vaccine* (2015) doi:10.1016/j.vaccine.2015.09.064.
145. Ross, P. J. *et al.* 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**, (2013).
146. Borkner, L., Misiak, A., Wilk, M. M. & Mills, K. H. G. Azithromycin Clears *Bordetella pertussis* Infection in Mice but Also Modulates Innate and Adaptive Immune Responses and T Cell Memory. *Front. Immunol.* (2018) doi:10.3389/fimmu.2018.01764.
147. Tan, T. *et al.* Pertussis Across the Globe: Recent Epidemiologic Trends From 2000 to 2013. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **34**, (2015).
148. Syed, M. A. & Bana, N. F. A reemerging and an underreported infectious disease. *Saudi Med. J.* **35**, 1181–1187 (2014).
149. Vizzotti, C. *et al.* Maternal immunization in Argentina: A storyline from the prospective of a middle income country. *Vaccine* **33**, 6413–6419 (2015).
150. Vizzotti, C. *et al.* Impact of a maternal immunization program against pertussis in a developing country. *Vaccine* (2016) doi:10.1016/j.vaccine.2016.10.081.
151. Romanin, V. *et al.* Maternal Vaccination in Argentina: Tdap Vaccine Effectiveness During Pregnancy in Preventing Pertussis in Infants Less Than 2 Months of Age. 1–19 (2019).
152. Feunou, P. F., Mielcarek, N. & Locht, C. Reciprocal interference of maternal and infant immunization in protection against pertussis. *Vaccine* **34**, 1062–1069 (2016).
153. Vono, M. *et al.* Maternal Antibodies Inhibit Neonatal and Infant Responses to Vaccination by Shaping the Early-Life B Cell Repertoire within Germinal Centers. *Cell Rep.* **28**, 1773-1784.e5 (2019).
154. Niewiesk, S. Maternal antibodies: Clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. *Front. Immunol.* **5**, 1–15 (2014).
155. Siegrist, C. A. Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: Review of hypotheses and definition of main determinants. in *Vaccine* (2003). doi:10.1016/S0264-410X(03)00342-6.
156. Chiappini, E., Stival, A., Galli, L. & de Martino, M. Pertussis re-emergence in the post-vaccination era. *BMC Infect. Dis.* (2013) doi:10.1186/1471-2334-13-151.
157. Straney, L. *et al.* Burden and outcomes of severe pertussis infection in critically ill infants. *Pediatr. Crit. Care Med.* (2016) doi:10.1097/PCC.0000000000000851.
158. McIntyre, P. & Wood, N. Pertussis in early infancy: Disease burden and preventive strategies. *Current Opinion in Infectious Diseases* (2009) doi:10.1097/QCO.0b013e32832b3540.
159. Tanaka, M. *et al.* Trends in Pertussis among Infants in the United States, 1980-1999. *J. Am. Med. Assoc.* **290**, 2968–2975 (2003).

160. Elumogo, T. N. *et al.* Bordetella pertussis in a neonatal intensive care unit: Identification of the mother as the likely source. *J. Hosp. Infect.* (2012) doi:10.1016/j.jhin.2012.07.012.
161. Somerville, R. L. *et al.* Infants hospitalised with pertussis: Estimating the true disease burden. *J. Paediatr. Child Health* **43**, 617–622 (2007).
162. Lievano, F. A. *et al.* Issues associated with and recommendations for using PCR to detect outbreaks of pertussis. *J. Clin. Microbiol.* (2002) doi:10.1128/JCM.40.8.2801-2805.2002.
163. Masseria, C. *et al.* Incidence and burden of pertussis among infants less than 1 year of age. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **36**, e54–e61 (2017).
164. States, M., Strategic, W. H. O., Group, A. & Grade, T. Pertussis vaccines: WHO position paper - September 2015. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **90**, 433–458 (2015).
165. Munoz, F. M. *et al.* The Fourth International Neonatal and Maternal Immunization Symposium (INMIS 2017): Toward Integrating Maternal and Infant Immunization Programs. *mSphere* (2018) doi:10.1128/msphere.00221-18.
166. Healy, C. M. Pertussis vaccination in pregnancy. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* (2016) doi:10.1080/21645515.2016.1171948.
167. Hoang, H. T. T. *et al.* Pertussis vaccination during pregnancy in Vietnam: Results of a randomized controlled trial Pertussis vaccination during pregnancy. *Vaccine* (2016) doi:10.1016/j.vaccine.2015.10.098.
168. Christie, C. D. C. & Baltimore, R. S. Pertussis in Neonates. *Am. J. Dis. Child.* (1989) doi:10.1001/archpedi.1989.02150220097027.
169. Redfield, R. R. *et al.* Prevention of Pertussis, Tetanus, and Diphtheria with Vaccines in the United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports Centers for Disease Control a. *Recomm. Reports* **67**, 31 (2018).
170. Kapil, P. *et al.* Maternal Vaccination with a Monocomponent Pertussis Toxoid Vaccine Is Sufficient to Protect Infants in a Baboon Model of Whooping Cough. *J. Infect. Dis.* **217**, 1231–1236 (2018).
171. Elahi, S., Buchanan, R. M., Babiuk, L. A. & Gerdt, V. Maternal immunity provides protection against pertussis in newborn piglets. *Infect. Immun.* **74**, 2619–2627 (2006).
172. Elahi, S., Thompson, D. R., Van Kessel, J., Babiuk, L. A. & Gerdt, V. Protective role of passively transferred maternal cytokines against Bordetella pertussis infection in newborn piglets. *Infect. Immun.* **85**, 1–16 (2017).
173. Warfel, J. M., Papin, J. F., Wolf, R. F., Zimmerman, L. I. & Merkel, T. J. Maternal and neonatal vaccination protects newborn baboons from pertussis infection. *J. Infect. Dis.* **210**, 604–610 (2014).
174. Gentile, A. *et al.* Bordetella pertussis (Bp) disease: Before (2003–2011) and after (2013–2016) maternal immunization strategy in a pediatric hospital. *Vaccine* (2018) doi:10.1016/j.vaccine.2018.01.091.
175. Baxter, R., Bartlett, J., Fireman, B., Lewis, E. & Klein, N. P. Effectiveness of vaccination during pregnancy to prevent infant pertussis. *Pediatrics* (2017) doi:10.1542/peds.2016-4091.
176. Vizzotti, C. *et al.* Maternal immunization in Argentina: A storyline from the prospective

- of a middle income country. *Vaccine* **33**, 6413–9 (2015).
177. Amirthalingam, G. Strategies to control pertussis in infants. *Archives of Disease in Childhood* (2013) doi:10.1136/archdischild-2012-302968.
 178. Siegrist, C. A. Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine* **19**, 3331–3346 (2001).
 179. Munoz, F. M. *et al.* Safety and immunogenicity of tetanus diphtheria and acellular pertussis (Tdap) immunization during pregnancy in mothers and infants: A randomized clinical trial. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **311**, 1760–1769 (2014).
 180. Organización Mundial de la Salud. Panorama general Informe sobre la salud en el mundo 2005 ¡Cada madre y cada niño contarán! *World Heal. Rep.* **4**, 8–11 (2005).
 181. Wood, N. *et al.* Immunogenicity and Safety of Monovalent Acellular Pertussis Vaccine at Birth: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Pediatr.* **172**, 1045–1052 (2018).
 182. Roudit, C. *et al.* Immunogenicity and Protective Efficacy of Neonatal Vaccination against. **70**, 3521–3528 (2002).
 183. Prabhudas, M. *et al.* Challenges in infant immunity: Implications for responses to infection and vaccines. *Nature Immunology* (2011) doi:10.1038/ni0311-189.
 184. Dowling, D. J. & Levy, O. Ontogeny of early life immunity. *Trends in Immunology* (2014) doi:10.1016/j.it.2014.04.007.
 185. Wood, N. & Siegrist, C. A. Neonatal immunization: Where do we stand? *Curr. Opin. Infect. Dis.* (2011) doi:10.1097/QCO.0b013e328345d563.
 186. Kamath, A. T. *et al.* A liposome-based mycobacterial vaccine induces potent adult and neonatal multifunctional T cells through the exquisite targeting of dendritic cells. *PLoS One* **4**, (2009).
 187. Jakobsen, H. *et al.* Intranasal immunization with pneumococcal conjugate vaccines with LT-K63, a nontoxic mutant of heat-labile enterotoxin, as adjuvant rapidly induces protective immunity against lethal pneumococcal infections in neonatal mice. *Infect. Immun.* **70**, 1443–1452 (2002).
 188. Adkins, B. Session I: Developmental immunity: Impact on neonatal and childhood mucosal responses. Neonatal T cell function. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **40**, 5–7 (2005).
 189. Bailoo, J. D. *et al.* Effects of weaning age and housing conditions on phenotypic differences in mice. *Sci. Rep.* **10**, 1–13 (2020).
 190. Richter, S. H., Kästner, N., Loddenkemper, D. H., Kaiser, S. & Sachser, N. A time to wean? Impact of weaning age on anxiety-like behaviour and stability of behavioural traits in full adulthood. *PLoS One* **11**, 1–21 (2016).
 191. Foxwell, A. R., McIntyre, P., Quinn, H., Roper, K. & Clements, M. S. Severe pertussis in infants: Estimated impact of first vaccine dose at 6 versus 8 weeks in Australia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* (2011) doi:10.1097/INF.0b013e3181f43906.
 192. WHO Strategic Advisory Group of Experts (SAGE) on Immunization. Report from the SAGE Working Group on Pertussis vaccines 26 - 27 August 2014 meeting. 1–29 (2014).
 193. Lu, S. Heterologous prime-boost vaccination. *Current Opinion in Immunology* (2009) doi:10.1016/j.coi.2009.05.016.
 194. Kardani, K., Bolhassani, A. & Shahbazi, S. Prime-boost vaccine strategy against viral infections: Mechanisms and benefits. *Vaccine* (2016) doi:10.1016/j.vaccine.2015.11.062.

195. Jung, S. Y. *et al.* Heterologous prime–boost vaccination with adenoviral vector and protein nanoparticles induces both Th1 and Th2 responses against Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Vaccine* (2018) doi:10.1016/j.vaccine.2018.04.082.
196. Zurita, M. E. *et al.* 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**, 1–11 (2019).
197. Lumbreras Areta, M., Eberhardt, C. S., Siegrist, C. A. & Martinez de Tejada, B. Antenatal vaccination to decrease pertussis in infants: safety, effectiveness, timing, and implementation. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* (2019) doi:10.1080/14767058.2017.1406475.
198. Willems, F., Vollstedt, S. & Suter, M. Phenotype and function of neonatal DC. *Eur. J. Immunol.* **39**, 26–35 (2009).
199. Melvan, J. N., Bagby, G. J., Welsh, D. A., Nelson, S. & Zhang, P. Neonatal sepsis and neutrophil insufficiencies. *International Reviews of Immunology* (2010) doi:10.3109/08830181003792803.
200. Al-Hertani, W., Sen, R. Y., Byers, D. M. & Bortolussi, R. Human newborn polymorphonuclear neutrophils exhibit decreased levels of MyD88 and attenuated p38 phosphorylation in response to lipopolysaccharide. *Clin. Investig. Med.* (2007) doi:10.25011/cim.v30i2.979.
201. Langrish, C. L., Buddle, J. C., Thrasher, A. J. & Goldblatt, D. Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. *Clin. Exp. Immunol.* (2002) doi:10.1046/j.1365-2249.2002.01817.x.
202. Borràs, F. E., Matthews, N. C., Lowdell, M. W. & Navarrete, C. V. Identification of both myeloid CD11c+ and lymphoid CD11c- dendritic cell subsets in cord blood. *Br. J. Haematol.* (2001) doi:10.1046/j.1365-2141.2001.02840.x.
203. De Roock, S. *et al.* Defective TH17 development in human neonatal T cells involves reduced RORC2 mRNA content. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2013) doi:10.1016/j.jaci.2013.04.014.
204. Basha, S., Surendran, N. & Pichichero, M. Immune responses in neonates. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **10**, 1171–1184 (2014).
205. Zaghouni, H., Hoeman, C. M. & Adkins, B. Neonatal immunity: faulty T-helpers and the shortcomings of dendritic cells. *Trends Immunol.* **30**, 585–591 (2009).
206. Marchant, A. & Kollmann, T. R. Understanding the ontogeny of the immune system to promote immune-mediated health for life. *Frontiers in Immunology* (2015) doi:10.3389/fimmu.2015.00077.
207. Arulanandam, B. P., Mittler, J. N., Lee, W. T., O’Toole, M. & Metzger, D. W. Neonatal Administration of IL-12 Enhances the Protective Efficacy of Antiviral Vaccines. *J. Immunol.* (2000) doi:10.4049/jimmunol.164.7.3698.
208. Warfel, J. M. & Edwards, K. M. Pertussis vaccines and the challenge of inducing durable immunity. *Current Opinion in Immunology* (2015) doi:10.1016/j.coi.2015.05.008.
209. Zhang, Q. *et al.* Prevalence of asymptomatic *bordetella pertussis* and *bordetella parapertussis* infections among school children in China as determined by pooled real-time PCR: A cross-sectional study. *Scand. J. Infect. Dis.* (2014) doi:10.3109/00365548.2013.878034.
210. De Schutter, I. *et al.* Molecular typing of *Bordetella pertussis* isolates recovered from

- Belgian children and their household members. *Clin. Infect. Dis.* (2003) doi:10.1086/375071.
211. Bento, A. I., King, A. A. & Rohani, P. Maternal pertussis immunisation: Clinical gains and epidemiological legacy. *Eurosurveillance* **22**, 1–4 (2017).
 212. Jennewein, M. F., Abu-Raya, B., Jiang, Y., Alter, G. & Marchant, A. Transfer of maternal immunity and programming of the newborn immune system. *Semin. Immunopathol.* **39**, 605–613 (2017).
 213. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated recommendations for use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, and acellular pertussis vaccine (Tdap) in pregnant women--Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2012. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* (2013).
 214. Department of Health, U. K. Pregnant women to be offered whooping cough vaccination. *28 September 2012* (2012).
 215. Kharbanda, E. O. *et al.* Evaluation of the association of maternal pertussis vaccination with obstetric events and birth outcomes. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* (2014) doi:10.1001/jama.2014.14825.
 216. Shakib, J. H. *et al.* Tetanus, diphtheria, acellular pertussis vaccine during pregnancy: Pregnancy and infant health outcomes. *J. Pediatr.* (2013) doi:10.1016/j.jpeds.2013.06.021.
 217. Zheteyeva, Y. A. *et al.* Adverse event reports after tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, and acellular pertussis vaccines in pregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* (2012) doi:10.1016/j.ajog.2012.05.006.
 218. Villarreal Pérez, J. Z. *et al.* Randomized clinical trial of the safety and immunogenicity of the Tdap vaccine in pregnant Mexican women. *Hum. Vaccines Immunother.* (2017) doi:10.1080/21645515.2016.1232786.
 219. Talbot, E. A. *et al.* The safety of immunizing with tetanus-diphtheria-acellular pertussis vaccine (Tdap) less than 2 years following previous tetanus vaccination: Experience during a mass vaccination campaign of healthcare personnel during a respiratory illness outbreak. *Vaccine* (2010) doi:10.1016/j.vaccine.2010.09.034.
 220. Willhite, C. C. *et al.* Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts. *Critical Reviews in Toxicology* (2014) doi:10.3109/10408444.2014.934439.
 221. Amirthalingam, G. *et al.* Sustained effectiveness of the maternal pertussis immunization program in England 3 years following introduction. *Clin. Infect. Dis.* (2016) doi:10.1093/cid/ciw559.
 222. Dabrera, G. *et al.* A case-control study to estimate the effectiveness of maternal pertussis vaccination in protecting newborn infants in England and Wales, 2012-2013. *Clin. Infect. Dis.* (2015) doi:10.1093/cid/ciu821.
 223. Winter, K., Nickell, S., Powell, M. & Harriman, K. Effectiveness of prenatal versus postpartum tetanus, diphtheria, and acellular pertussis vaccination in preventing infant pertussis. *Clin. Infect. Dis.* (2017) doi:10.1093/cid/ciw634.
 224. Eberhardt, C. S. *et al.* Maternal immunization earlier in pregnancy maximizes antibody transfer and expected infant seropositivity against pertussis. *Clin. Infect. Dis.* **62**, 829–836 (2016).

225. Eberhardt, C. S. *et al.* Pertussis antibody transfer to preterm neonates after second-versus third-trimester maternal immunization. *Clin. Infect. Dis.* (2017) doi:10.1093/cid/cix046.
226. Campbell, H. *et al.* Review of vaccination in pregnancy to prevent pertussis in early infancy. *Journal of Medical Microbiology* vol. 67 1426–1456 (2018).
227. Forsyth, K., Plotkin, S., Tan, T. & Von König, C. H. W. Strategies to decrease pertussis transmission to infants. *Pediatrics* (2015) doi:10.1542/peds.2014-3925.
228. Edwards, K. M. Maternal antibodies and infant immune responses to vaccines. *Vaccine* **33**, 6469–6472 (2015).
229. Nahm, M. H., Glezen, P. & Englund, J. The influence of maternal immunization on light chain response to Haemophilus influenzae type b vaccine. *Vaccine* **21**, 3393–3397 (2003).
230. Leuridan, E. Pertussis vaccination in pregnancy: State of the art. *Vaccine* (2017) doi:10.1016/j.vaccine.2017.03.061.
231. Pentšuk, N. & Van Der Laan, J. W. An interspecies comparison of placental antibody transfer: New insights into developmental toxicity testing of monoclonal antibodies. *Birth Defects Res. Part B - Dev. Reprod. Toxicol.* **86**, 328–344 (2009).
232. Hanna, J. *et al.* Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat. Med.* **12**, 1065–1074 (2006).
233. Cardenas, G. M. and I. The immune system in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* **63**, 425–433 (2011).
234. Than, N. G., Hahn, S., Rossi, S. W. & Szekeres-Bartho, J. Editorial: Fetal-Maternal Immune Interactions in Pregnancy. *Front. Immunol.* **10**, 1–4 (2019).
235. Collado, M. C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E. & Salminen, S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci. Rep.* **6**, 1–13 (2016).
236. Dauby, N., Goetghebuer, T., Kollmann, T. R., Levy, J. & Marchant, A. Uninfected but not unaffected: Chronic maternal infections during pregnancy, fetal immunity, and susceptibility to postnatal infections. *The Lancet Infectious Diseases* (2012) doi:10.1016/S1473-3099(11)70341-3.
237. May, K. *et al.* Antibody-dependent transplacental transfer of malaria blood-stage antigen using a human ex vivo placental perfusion model. *PLoS One* (2009) doi:10.1371/journal.pone.0007986.
238. Phan, T. G. *et al.* High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *J. Exp. Med.* (2006) doi:10.1084/jem.20061254.
239. Koepke, R. *et al.* Estimating the effectiveness of tetanus-diphtheria-acellular pertussis vaccine (Tdap) for preventing pertussis: Evidence of rapidly waning immunity and difference in effectiveness by Tdap brand. in *Journal of Infectious Diseases* (2014). doi:10.1093/infdis/jiu322.
240. McGirr, A. & Fisman, D. N. Duration of pertussis immunity after DTaP immunization: A meta-analysis. *Pediatrics* (2015) doi:10.1542/peds.2014-1729.
241. King, A. J. *et al.* Role of the polymorphic region 1 of the Bordetella pertussis protein pertactin in immunity. *Microbiology* (2001) doi:10.1099/00221287-147-11-2885.
242. Mooi, F. R., Van Loo, I. H. M. & King, A. J. Adaptation of Bordetella pertussis to

- vaccination: A cause for its reemergence? in *Emerging Infectious Diseases* (2001). doi:10.3201/eid0707.017708.
243. Mäkelä, P. H. Vaccines, coming of age after 200 years. *FEMS Microbiology Reviews* (2000) doi:10.1016/S0168-6445(99)00025-X.
 244. David, S., Van Furth, R. & Mooi, F. R. Efficacies of whole cell and acellular pertussis vaccines against *Bordetella parapertussis* in a mouse model. *Vaccine* (2004) doi:10.1016/j.vaccine.2003.11.005.
 245. He, Q. *et al.* *Bordetella pertussis* protein pertactin induces type-specific antibodies: One possible explanation for the emergence of antigenic variants? *J. Infect. Dis.* (2003) doi:10.1086/368412.
 246. Bottero, D. *et al.* 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 (2007).
 247. Gzyl, A. *et al.* Sequence variation in pertussis S1 subunit toxin and pertussis genes in *Bordetella pertussis* strains used for the whole-cell pertussis vaccine produced in Poland since 1960: Efficiency of the DTwP vaccine-induced immunity against currently circulating B. . *Vaccine* (2004) doi:10.1016/j.vaccine.2003.12.006.
 248. Bowden, K. E. *et al.* Genome Structural Diversity among 31 *Bordetella pertussis* Isolates from Two Recent U.S. Whooping Cough Statewide Epidemics. *mSphere* (2016) doi:10.1128/msphere.00036-16.
 249. Warfel, J. M., Zimmerman, L. I. & Merkel, T. J. 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 (2014).
 250. Althouse, B. M. & Scarpino, S. V. Asymptomatic transmission and the resurgence of *Bordetella pertussis*. *BMC Med.* (2015) doi:10.1186/s12916-015-0382-8.
 251. Litt, D. J., Neal, S. E. & Fry, N. K. Changes in genetic diversity of the *Bordetella pertussis* population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 680–688 (2009).
 252. Xu, Y. *et al.* Genetic diversity and population dynamics of *Bordetella pertussis* in China between 1950–2007. *Vaccine* **33**, 6327–6331 (2015).
 253. States, U. *et al.* Genomic Survey of *Bordetella pertussis* Diversity, United States, 2000–2013. **25**, (2019).
 254. Litt, D. J., Jauneikaite, E., Tchipeva, D., Harrison, T. G. & Fry, N. K. Direct molecular typing of *Bordetella pertussis* from clinical specimens submitted for diagnostic quantitative (real-time) PCR. *J. Med. Microbiol.* **61**, 1662–1668 (2012).
 255. Kurniawan, J. *et al.* *Bordetella pertussis* clones identified by multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 297–300 (2010).
 256. Martin, S. W. *et al.* Pertactin-negative *Bordetella pertussis* strains: Evidence for a possible selective advantage. *Clin. Infect. Dis.* (2015) doi:10.1093/cid/ciu788.
 257. Barkoff, A. M. & He, Q. Molecular Epidemiology of *Bordetella pertussis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1183**, 19–33 (2019).
 258. Barkoff, A. M. *et al.* Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates: Evidence of increased circulation in Europe, 1998 to 2015. *Eurosurveillance* (2019) doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.7.1700832.

259. Xu, Z. *et al.* Pertactin-Negative and Filamentous Hemagglutinin-Negative. *Emerg. Infect. Dis.* **25**, 1196–1199 (2019).
260. Carriquiriborde, F. *et al.* Rare Detection of Bordetella pertussis Pertactin-Deficient Strains in Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* **25**, 2048–2054 (2019).
261. Safarchi, A. *et al.* Better colonisation of newly emerged Bordetella pertussis in the co-infection mouse model study. *Vaccine* (2016) doi:10.1016/j.vaccine.2016.06.052.
262. Bottero, D., Gaillard, M. E., Basile, L. A., Fritz, M. & Hozbor, D. F. Genotypic and phenotypic characterization of Bordetella pertussis strains used in different vaccine formulations in Latin America. *J. Appl. Microbiol.* (2012) doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05299.x.
263. Lesne, E. *et al.* Acellular Pertussis Vaccines Induce Anti-pertactin Bactericidal Antibodies Which Drives the Emergence of Pertactin-Negative Strains. *Front. Microbiol.* (2020) doi:10.3389/fmicb.2020.02108.
264. Sanchez Alberti, A. *et al.* Mucosal Heterologous Prime/Boost Vaccination Induces Polyfunctional Systemic Immunity, Improving Protection Against Trypanosoma cruzi. *Front. Immunol.* (2020) doi:10.3389/fimmu.2020.00128.
265. Logunov, D. Y. *et al.* Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet* (2020) doi:10.1016/S0140-6736(20)31866-3.
266. Witt, M. A., Arias, L., Katz, P. H., Truong, E. T. & Witt, D. J. 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.* (2013) doi:10.1093/cid/cit046.
267. Gladstone, I. M., Ehrenkranz, R. A., Edberg, S. C. & Baltimore, R. S. A ten-year review of neonatal sepsis and comparison with the previous fifty-year experience. *Pediatr. Infect. Dis. J.* (1990) doi:10.1097/00006454-199011000-00009.
268. Baker, C. J., Barrett, F. F., Gordon, R. C. & Yow, M. D. Suppurative meningitis due to streptococci of lancefield group B: A study of 33 infants. *J. Pediatr.* (1973) doi:10.1016/S0022-3476(73)80606-7.
269. Barton, L. L., Feigin, R. D. & Lins, R. Group B beta hemolytic streptococcal meningitis in infants. *J. Pediatr.* (1973) doi:10.1016/S0022-3476(73)80605-5.
270. Franciosi, R. A., Knostman, J. D. & Zimmerman, R. A. Group B streptococcal neonatal and infant infections. *J. Pediatr.* (1973) doi:10.1016/S0022-3476(73)80604-3.
271. McCracken, G. H. Group B streptococci: The new challenge in neonatal infections. *J. Pediatr.* (1973) doi:10.1016/S0022-3476(73)80603-1.
272. Kaufman, D. & Fairchild, K. D. Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants. *Clinical Microbiology Reviews* (2004) doi:10.1128/CMR.17.3.638-680.2004.
273. Stoll, B. J. & Hansen, N. Infections in VLBW infants: Studies from the NICHD Neonatal Research Network. *Semin. Perinatol.* (2003) doi:10.1016/S0146-0005(03)00046-6.
274. Stoll, B. J. *et al.* Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: A report from the national institute of child health and human development neonatal research network. *J. Pediatr.* (1996) doi:10.1016/S0022-3476(96)70191-9.

275. Estimates developed by the United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation. United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation (UN IGME), 'Levels & Trends in Child Mortality: Report 2018. 1–44 (2018).
276. Choi, Y. H., Campbell, H., Amirthalingam, G., van Hoek, A. J. & Miller, E. Investigating the pertussis resurgence in England and Wales, and options for future control. *BMC Med.* **14**, (2016).
277. Fullen, A. R., Yount, K. S., Dubey, P. & Deora, R. Whoop! There it is: The surprising resurgence of pertussis. *PLoS Pathog.* **16**, e1008625 (2020).
278. Hozbor, D. *et al.* Pertussis in Latin America: Recent epidemiological data presented at the 2017 Global Pertussis Initiative meeting. *Vaccine* **37**, 5414–5421 (2019).
279. Romanin, V. *et al.* Epidemiological situation of pertussis and strategies to control it. Argentina, 2002–2011 | Situación epidemiológica de coqueluche y estrategias para su control. Argentina, 2002–2011. *Arch. Argent. Pediatr.* (2014) doi:10.5546/aap.2014.413.
280. Kahn, K. E. *et al.* Influenza and Tdap Vaccination Coverage Among Pregnant Women — United States, April 2018. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* (2018) doi:10.15585/mmwr.mm6738a3.
281. Public Health England. Pertussis vaccination programme for pregnant women update: vaccine coverage in England, October to December 2019 Health Protection Report Volume 14 Number 4. **14**, (2020).
282. Levy, O. *et al.* Impaired innate immunity in the newborn: Newborn neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein. *Pediatrics* (1999) doi:10.1542/peds.104.6.1327.
283. Siegrist, C. A. & Lambert, P. H. Immunization with DNA vaccines in early life: Advantages and limitations as compared to conventional vaccines. *Springer Seminars in Immunopathology* (1997) doi:10.1007/BF00870271.
284. Dunsmore, G. *et al.* Erythroid Suppressor Cells Compromise Neonatal Immune Response against *Bordetella pertussis*. *J. Immunol.* (2017) doi:10.4049/jimmunol.1700742.
285. De Brito, C. A., Goldoni, A. L. & Notomi-Sato, M. Immune adjuvants in early life: Targeting the innate immune system to overcome impaired adaptive response. *Immunotherapy* (2009) doi:10.2217/IMT.09.38.
286. Zhang, X., Zhivaki, D. & Lo-Man, R. Unique aspects of the perinatal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* (2017) doi:10.1038/nri.2017.54.
287. Stainer, D. W. & Scholte, M. J. A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *J. Gen. Microbiol.* (1970) doi:10.1099/00221287-63-2-211.
288. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* (1976) doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
289. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970) doi:10.1038/227680a0.
290. Stein, P. E. *et al.* The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* **2**, 45–57 (1994).
291. Carbonetti, N. H. Contribution of pertussis toxin to the pathogenesis of pertussis disease. *Pathog. Dis.* **73**, ftv073 (2015).

292. Coutte, L. & Loch, C. Investigating pertussis toxin and its impact on vaccination. *Future Microbiol.* **10**, 241–254 (2015).
293. Askelof, P. *et al.* 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.* (1990) doi:10.1073/pnas.87.4.1347.
294. Barry, E. M. *et al.* Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *J. Bacteriol.* (1991) doi:10.1128/jb.173.2.720-726.1991.
295. Carbonetti, N. H. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: Key virulence factors of Bordetella pertussis and cell biology tools. *Future Microbiology* (2010) doi:10.2217/fmb.09.133.
296. Sebo, P., Osicka, R. & Masin, J. Adenylate cyclase toxin-hemolysin relevance for pertussis vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **13**, 1215–1227 (2014).
297. Hasan, S. *et al.* crossm Bordetella pertussis Adenylate Cyclase Toxin Disrupts. (2018).
298. Walker, K. E. & Weiss, A. A. Characterization of the dermonecrotic toxin in members of the Genus Bordetella. *Infect. Immun.* **62**, 3817–3828 (1994).
299. Brockmeier, S. L. *et al.* Role of the dermonecrotic toxin of Bordetella bronchiseptica in the pathogenesis of respiratory disease in swine. *Infect. Immun.* (2002) doi:10.1128/IAI.70.2.481-490.2002.
300. Stanek, O. *et al.* Production of highly active recombinant dermonecrotic toxin of bordetella pertussis. *Toxins (Basel)*. **12**, (2020).
301. Madan Babu, M., Bhargavi, J., Singh Saund, R. & Kumar Singh, S. Virulence factors of Bordetella pertussis. *Current Science* (2001) doi:10.1146/annurev.micro.40.1.661.
302. Estrella, C. G. Bordetella pertussis: reemergente. **65**, 18–21 (2018).
303. Luker, K. E., Collier, J. L., Kolodziej, E. W., Marshall, G. R. & Goldman, W. E. Bordetella pertussis tracheal cytotoxin and other muramyl peptides: Distinct structure-activity relationships for respiratory epithelial cytopathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 2365–2369 (1993).
304. Cundell, D. R. *et al.* Effect of tracheal cytotoxin from Bordetella pertussis on human neutrophil function in vitro. *Infect. Immun.* (1994) doi:10.1128/iai.62.2.639-643.1994.
305. AlBitar-Nehme, S. *et al.* Comparison of lipopolysaccharide structures of Bordetella pertussis clinical isolates from pre- and post-vaccine era. *Carbohydr. Res.* (2013) doi:10.1016/j.carres.2013.05.002.
306. Amano, K. I., Fukushi, K. & Watanabe, M. Biochemical and immunological comparison of lipopolysaccharides from Bordetella species. *J. Gen. Microbiol.* (1990) doi:10.1099/00221287-136-3-481.
307. Gaillard, M. E., Bottero, D., Castuma, C. E., Basile, L. A. & Hozbor, D. Laboratory adaptation of Bordetella pertussis is associated with the loss of type three secretion system functionality. *Infect. Immun.* **79**, 3677–3682 (2011).
308. Fennelly, N. K. *et al.* Bordetella pertussis expresses a functional type III secretion system that subverts protective innate and adaptive immune responses. *Infect. Immun.* (2008) doi:10.1128/IAI.00836-07.
309. Abramson, T., Kedem, H. & Relman, D. A. Modulation of the NF-κB pathway by Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin. *PLoS One* (2008)

doi:10.1371/journal.pone.0003825.

310. Inatsuka, C. S., Julio, S. M. & Cotter, P. A. Bordetella filamentous hemagglutinin plays a critical role in immunomodulation, suggesting a mechanism for host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2005) doi:10.1073/pnas.0507910102.
311. Scheller, E. V. & Cotter, P. A. Bordetella filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential. *Pathog. Dis.* **73**, ftv079 (2015).
312. Van Den Akker, W. M. R. 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.* (1998) doi:10.1006/bbrc.1998.9610.
313. Guetter, S. D. & Eiteman, M. A. Production of biomass and filamentous hemagglutinin by Bordetella bronchiseptica. *Bioprocess Biosyst. Eng.* (2014) doi:10.1007/s00449-013-0977-4.
314. Ashworth, L. A. E., Irons, L. I. & Dowsett, A. B. Antigenic relationship between serotype-specific agglutinin and fimbriae of Bordetella pertussis. *Infect. Immun.* (1982) doi:10.1128/iai.37.3.1278-1281.1982.
315. Gorringe, A. R. & Vaughan, T. E. Bordetella pertussis fimbriae (Fim): Relevance for vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **13**, 1205–1214 (2014).
316. Ashworth, L. A. E. *et al.* Agglutinogens and fimbriae of Bordetella pertussis. in *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine* (1988).
317. Bassinet, L. *et al.* Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by Bordetella pertussis. *Infect. Immun.* (2000) doi:10.1128/IAI.68.4.1934-1941.2000.
318. Dutta, S. & Sengupta, P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sciences* (2016) doi:10.1016/j.lfs.2015.10.025.