



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:
Caracterización proteómica de Bordetella parapertussis.
Identificación de determinantes patogénicos y búsqueda de
inmunógenos protectores

Tesista: Juan Marcos Oviedo

Directora: María Eugenia Rodríguez

Codirector: Hugo A. Valdez

Año: 2019

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS, PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, SE REALIZÓ EN EL CENTRO DE INVESTIGACIONES Y DESARROLLO EN FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CINDEFI), FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA; BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARÍA EUGENIA RODRÍGUEZ Y LA CODIRECCIÓN DEL DR. HUGO ALBERTO VALDEZ

PARTE DE LOS RESULTADOS PRESENTADOS EN ESTE
TRABAJO DE TESIS HAN DADO ORIGEN A LAS SIGUIENTES
PUBLICACIONES.

A recombinant iron transport protein from *Bordetella pertussis* confers protection against *Bordetella parapertussis*. Alvarez Hayes, Jimena †; **Oviedo, Juan Marcos**†; Valdez, Hugo; Laborde, Juan Martín; Maschi, Fabricio; Ayala, Miguel; Shah, Rohan; Fernandez Lahore Marcelo; and Rodriguez, Maria Eugenia. Microbiology and Immunology. 2017 vol. 61 p. 407-415

Bordetella parapertussis shotgun proteomic analysis reveals physiological response to iron starvation and potential new virulence determinants absent in *Bordetella pertussis*
Oviedo, Juan Marcos; Surmann, Kristin; Gorgojo, Juan Pablo; Lamberti, Yanina; Valdez, Hugo; Schmidt, Frank; Volker, Uwe; Rodriguez, María Eugenia. Journal of Preteomics, 2019, 206, p.

MI RECONOCIMIENTO AL CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET), A LA AGENCIA NACIONAL DE PROMOCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLOGÍA (ANPCYT), Y, EN PARTICULAR, A LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA Y AL CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO EN FERMETACIONES INDUSTRIALES (CINDEFI) POR HABER HECHO POSIBLE LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.

Agradecimientos

Después de todos estos años de tanto aprendizaje y crecimiento, hay mucha gente a la que debo agradecerle enormemente por haberme ayudado y acompañada profesional o personalmente.

Agradezco a las autoridades del CINDEFI; a los doctores Edgardo Donati y Roque Hours que dirigieron el instituto desde mi incorporación; y nuevo director, Sebastián Cavallito quien confío que trabajará para el bien del instituto y de todos sus miembros.

A la Dra María Eugenia Rodríguez, mi directora de tesis, por haberme permitido realizar este trabajo de doctorado en su laboratorio. Gracias por todas las cosas que aprendí en estos años. Por haberme ayudado a alcanzar este objetivo y también por llevarme reflexionar sobre tantas cosas sobre mi carrera y formación profesional y también sobre mí mismo.

Al Dr. Hugo Valdez, mi codirector de tesis, por haberme enseñado tantas cosas del laboratorio y por haberme ayudado con gran parte de este trabajo, especialmente en los primeros años.

A Julio Figari, que nos facilita el trabajo de todos los días y además es una gran compañía en el laboratorio o tomando mate en el box.

A Fabricio Maschi, Miguel Ayala y Juan Martín Laborde que colaboraron en todos los ensayos con ratones. A María Serradel y Pablo Pérez por prestarnos las instalaciones del bioterio para los ensayos de inmunización.

A Rohan Shah y Marcelo Fernandez Lahore por su colaboración con la identificación de proteínas con MALDI-TOF.

A los doctores Peter Sebo y Branislav Vecerek, por haberme dado la posibilidad de trabajar en su laboratorio. Y también a Kristina, Anna, Ilona, Kuba, Shakir, Ondřej, João, Sergio y todo el grupo por la ayuda que me brindaron en los tres meses que pasé en Praga.

Al Dr. Uwe Völker, Kristin Surmann y a su grupo por la realización de los estudios proteómicos y el posterior análisis.

A mis compañeros de laboratorio. En primer lugar a los más grandes: Yani, Jime, Juano y Mariela que cada uno desde su posición y sus conocimientos contribuyó mucho en distintas partes de esta tesis. Muchas gracias a Yani por toda la ayuda en lo referente a proteómica, a Jime por los ensayos de vacunas y a Juan por todo lo referente a células y microscopía.

A Alejandra y Osvaldo que son una presencia vital y constante en el laboratorio. En especial a Aleca que nos cebaba mate cuando nos quedábamos trabajando hasta tarde.

A mis compañeros y amigos del laboratorio que fueron de tanta ayuda en este último tramo:

A Bruno y Dani. No sé si me queda algo por decirles que no les haya dicho, pero me gusta que quede escrito *in aeternum*. Gracias, porque llegaron en el momento que más los necesité y porque hicieron más fácil el día a día. Porque me siguieron en mis delirios aunque claramente no los entendían del todo, y por todas las cosas que compartimos también fuera del laboratorio.

A -la princesa- Belti porque fuiste de muchísima ayuda en estos últimos dos años. Porque me acompañaste y siempre estuviste dispuesta a escucharme y compartir tu opinión sobre todas las cosas que me pasaban.

A Hila, que fue un ejemplo para mí, siempre dispuesto a explicarme cualquier cosa que necesitara y también una persona muy divertida y un gran compañero. A Nati Cattelan

por haberme compartido todo su conocimiento y experiencia; a Ceci, a Ine (tiki tiki tiki), mi vecina y compañera de mates; a Maru por toda su ayuda bioinformática (aunque me venda rifas que nunca gano y hasta me pegue). También a los más nuevos: Cande, Carlos y Marti; gracias por lo mucho que aprendí de ustedes en este año y pico; espero haberlos ayudado en algo y que sepan que pueden contar conmigo. Les deseo lo mejor en sus doctorados. Y a todas las demás personas que pasaron por el laboratorio 2: Clau, Flor, Maca, Caro Vita, etc.

A Ivana (y a Tato de nuevo) que estuvo muy presente en este último año y con la que compartí muchas experiencias. Gracias por preocuparte por mí, escucharme y ayudarme.

A Marina Acosta porque siempre nos reímos mucho y porque me ayudó con los equipos del laboratorio de fermentadores y los autoclaves.

Al snack group (al original y al actual) por todas las actividades que hicimos juntos (cenas, cine, mundolinguo, bowling...). Gracias: Leo, Cande, Vero, Juli, Yuli, Fran y Ema. Y en especial le agradezco a Tuğçe (que espero que pueda leer esto) que por momentos fue casi una más del L2 y compartió con nosotros en un montón de almuerzos.

Les agradezco mucho también a los becarios de laboratorio 678: Ale, Fran, Monse, Ger, Cami y Mica por hacerme jugar al fútbol todas las semanas (aunque muchos no lo crean) y por la buena onda de todos los días.

A los demás becarios del CINDEFI, con los que compartí muchas cosas, en especial a partir de la mudanza al box de becarios: Berni, Sabri, Nati, Marian, Vivi, Lina, Esteban, Sole, Viki, Brenda, Flor, Aldi, Juan, Andrea, etc.

A mis compañeros jugadores de Pokemon Go, en especial al grupo de “Rancios” con los que compartí tantas incursiones, eventos y *community days* en Plaza Moreno: Diego, Facu, Gise, Negro Ale, Horacio, Lu, Nacho, Cristian, Marito, etc.

A mis amigos de la facu: María (Sarita y Kahuan), Coni, Stephie, Leo y Nati. Y también a Karen y Lu. Que aunque cada vez estamos más lejos físicamente, siempre los sentí y siento cerca.

A esas personas que en algún momento de mi vida di en llamar mis hermanos, y que cada tanto me reencuentro y me recuerdan tantas cosas de mí mismo.

A mis amigos del colegio: Juli, Seba, Lean, Gero y Gastón. Que siempre mostraron muchísimo interés por lo que hago y me llenan de preguntas aunque no entiendan mucho de biología

A mi familia, porque me acompañaron y sostuvieron durante todo este periodo y que tuvieron siempre la capacidad de recordarme quién soy y de qué estoy hecho. A mi papá, que me enseñó a ser una persona crítica, autónoma y recia, gracias por compartirme tu sabiduría y escucharme. A mi mamá, por su inmenso cariño y porque siempre me esperaba con un sonrisa y un mate en casa. A Fran, mi compañero de viajes y a Jime por todos los abrazos y el cariño que me comparte siempre.

Al resto de mi familia: Guille y Cris, Gustavo y Mirta, Vero y Javi, Flor y Cami, Juan P y Gise, Luis y Lore, Magui y Pablo, Juan M, Sol, Chiari, Sofi, Fran, Pedro, Lari y Alma. Y también a la parte de mi familia que ya no está y que fue tan importante en mi vida.

Lista de abreviaturas

ABGs	Agar Bordet-Gengou sangre
AF	Adyuvante de Freund
AFC	Adyuvante de Freund Completo
AFI	Adyuvante de Freund Incompleto
AMPc	AMP cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
aP	Vacuna acelular
ARRIVE	animal research reporting of in vivo experiment
Bp	<i>B. pertussis</i>
Bpp	<i>B. parapertussis</i>
BSA	Seroalbúmina bovina
Bvg	Sistema de dos componentes de <i>Bordetella</i>
Bvg (-)	Fase avirulenta
Bvg (+)	Fase virulenta
Bvg (i)	Fase intermedia
BvgA	Activador transcripcional de los genes de virulencia
BvgR	Represor de los genes de avirulencia
CR3	Receptor de complemento 3
Cy3	Cianina
CyaA	Toxina Adenilato Ciclasa
DE	Desviación Estándar
DNT	Toxina Dermonecrótica
DTT	Ditiotreitól
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
FHA	Hemaglutinina filamentosa
Fim	Fimbria
FITC	fluoresceína-5-isotiocianato
GFP	Proteína verde fluorescente

i.p.	Intraperitoneal
IEF	isoelectroenfoque
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IS	Secuencia Inercial
kDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolisacárido
LSD	test de Menor Diferencia Significativa
MLST	Tipificación multilocus de secuencias
NET	Trampa extracelular de neutrófilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer fosfato salino
PCA	análisis de componentes principales
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasas
PE	ficoeritrina
PMN	Leucocitos Polimorfonucleares
Prn	Pertactina
PT	Toxina Pertussis
PVDF	fluoruro de polivinilideno
Rib/c	relación inicial bacteria/célula
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SS	Medio líquido Stainer-Scholte
SS-Fe	Medio líquido Stainer-Scholte sin hierro
TCT	Citotoxina Traqueal
Th1	Linfocito T helper 1
Th17	Linfocito T helper 17
Th2	Linfocito T helper 2
UFC	unidades formadoras de colonias
vag	Genes activados en virulencia
vrg	Genes reprimidos en virulencia

ÍNDICE

Capítulo 1	1
1. Introducción general	3
1.1. La tos convulsa	3
1.2. Género <i>Bordetella</i>	6
1.3 <i>Bordetella parapertussis</i>	8
1.4. Evolución y tropismo	9
1.5. Factores de virulencia.....	12
1.5.1. Sistema de dos componentes BvgAS	14
1.5.2. Toxina Adenilato Ciclasa	17
1.5.3. Hemaglutinina Filamentosa.....	20
1.5.4. Fimbrias.....	22
1.5.5. Pertactina y otros autotransportadores.....	24
1.5.6. Toxina Dermonecrótica (DNT)	29
1.5.7. LPS	29
1.5.8. Sistemas de Captura de Hierro	33
1.6. Diagnóstico	38
1.7. Vacunas	39
1.8. Nuevas vacunas	43
1.9. Objetivos de este trabajo.....	46
1.10. Bibliografía.....	47
2. Estudio del proteoma <i>B. parapertussis</i> y búsqueda de candidatos vacunales.....	65
2.1. Introducción.....	65
2.2. Materiales y métodos.....	70
2.2.1. Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y limitación	70
2.2.2. Anticuerpos.....	71
2.2.3. Proteómica shotgun	71
2.2.4. Análisis de datos de MS	73
2.2.5. ELISA.....	74
2.2.6 Western Blot.....	75
2.2.7. Extracción de LPS y tinción con plata	76
2.2.8. Inmunización de ratones.....	76
2.2.9. Obtención de proteínas para geles bidimensionales	77
2.2.10. Electroforesis bidimensional	77
2.2.11. Análisis de geles.....	78

2.2.12. Digestión con Tripsina y Extracción de Péptidos del Gel	78
2.2.13. MALDI-TOF y búsqueda en base de datos	79
2.2.14. Ensayos de inmunodetección (dot blot).....	79
2.2.15. Análisis estadístico	80
2.3. Resultados y Discusión.....	81
2.3.1. Respuesta de <i>Bordetella parapertussis</i> a la limitación de hierro	83
2.3.1.1. Procesos celulares y adquisición de hierro	87
2.3.1.2. Metabolismo	90
2.3.1.4. Factores de virulencia.....	93
2.3.2. Análisis comparativo del proteoma de <i>B. parapertussis</i> cultivada en limitación o exceso de hierro a través de geles bidimensionales.....	98
2.3.3. Análisis de la reactividad de las proteínas inducidas por limitación de hierro con sueros de individuos infectados.....	101
2.4. Conclusiones.....	104
2.5. Bibliografía.....	106
Tabla Anexa. Proteínas de <i>B. parapertussis</i> cultivadas en limitación y exceso de hierro identificadas por proteómica <i>shotgun</i>	111
3. Evaluación de la capacidad protectora de AfuA e IRP1-3 contra infecciones de <i>B. parapertussis</i>	181
3.1. Introducción.....	181
3.2. Materiales y Métodos	186
3.2.1. Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y limitación	186
3.2.2. Sueros y anticuerpos	187
3.2.3. Células	187
3.2.4. Producción de proteínas recombinantes	188
3.2.5. Inmunización de ratones.....	189
3.2.6. Desafío de ratones inmunizados.....	190
3.2.7. Ensayos de ELISA.....	190
3.2.8. Ensayos de Opsonización	191
3.2.9. Opsonofagocitosis	192
3.2.10. Western Blot.....	193
3.2.11. Análisis estadístico	194
3.3. Resultados y Discusión.....	195
3.3.1. Análisis de homología de secuencia.....	195
3.3.2. Expresión durante la infección	196

3.3.3. Reconocimiento de AfuA e IRP1-3 de <i>B. parapertussis</i> por anticuerpos inducidos por la proteína recombinante.....	197
3.3.4. Evaluación de la localización celular de AfuA e IRP1-3	198
3.3.5. Evaluación de la actividad opsonofagocítica anti-rAfuA y anti-rIRP1-3.....	201
3.3.6. Evaluación de la capacidad protectora de las proteínas rAfuA y rIRP1- 3	204
3.4. Conclusiones.....	206
Figura anexa. Alineamiento de las secuencias de antígenos presentes en vacunas acelulares y sus homólogos en <i>B. parapertussis</i> 12822.	208
3.5. Bibliografía.....	209
4. Clonado, análisis y evaluación de un nuevo candidato vacunal contra la tos convulsa .	215
4.1. Introducción.....	215
4.2. Materiales y métodos.....	219
4.2.1. Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y limitación	219
4.2.2. Anticuerpos y sueros	220
4.2.3. Células	221
4.2.4. Clonado de LivJ de <i>B. parapertussis</i>	221
4.2.5. Inducción y purificación de proteínas recombinantes	222
4.2.6. Inmunización de ratones.....	223
4.2.7. Desafío de ratones inmunizados.....	224
4.2.8. Ensayos de Dot Blot.....	224
4.2.9. Western Blot.....	225
4.2.10. Ensayos de ELISA.....	226
4.2.11. Ensayos de Opsonización.....	227
4.2.12. Opsonofagocitosis	227
4.2.13. Análisis estadístico	229
4.3. Resultados y Discusión.....	230
4.3.1. Clonado, expresión y purificación de LivJ.....	230
4.3.2. Respuesta humoral generada por vacunación con rLivJ	234
4.3.3. Regulación por hierro de LivJ	236
4.3.4. Evaluación de la localización celular de LivJ	238
4.3.5. Actividad opsonizante y opsonofagocítica de los anticuerpos anti-rLivJ	240
4.3.6. Evaluación de la capacidad protectora de la proteína rLivJ	242
4.4. Conclusión.....	245
4.5. Bibliografía.....	246

5. COMPARACIÓN ENTRE LAS ESPECIES CAUSANTES DE LA TOS CONVULSA. BÚSQUEDA DE DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD.....	251
5.1. Introducción.....	251
5.2. Materiales y métodos.....	253
5.2.1. Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y limitación	253
5.2.2. Anticuerpos.....	253
5.2.3. Línea celular	253
5.2.4. Prueba de ELISA	254
5.2.5. Ensayo de aglutinación.....	255
5.2.6. Ensayos de adhesión bacteriana a células bronquiales.....	255
5.2.7. Análisis estadístico	256
5.3. Resultados y Discusión.....	257
5.3.1. Comparación de genomas de <i>B. parapertussis</i>	257
5.3.2. Proteínas de <i>B. parapertussis</i> ausentes en el genoma de <i>B. pertussis</i>	259
5.3.3. Búsqueda de proteínas expresadas en <i>B. pertussis</i> , sin ortólogos en el genoma de <i>B. parapertussis</i>	271
5.4. Conclusión.....	272
Tabla 1. Lista de proteínas identificadas en proteoma de <i>B. parapertussis</i> sin ortólogos codificados en el genoma de <i>B. pertussis</i> Tohama I.....	273
5.5. Bibliografía.....	277
6. Discusión general	283
5.2 Bibliografía.....	292

Capítulo 1

Introducción general

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. La tos convulsa

La tos convulsa es una enfermedad del tracto respiratorio superior altamente contagiosa, prevenible por vacunación, que presenta complicaciones graves particularmente en niños. Cada año hay aproximadamente 16 millones de casos y 200000 muertes causadas por la tos convulsa, principalmente a neonatos y menores de un año [1]. Los agentes causales de esta enfermedad son *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*.

En el siglo VII, durante la dinastía Sui, una enfermedad similar a la tos convulsa fue descrita por el médico chino Yuanfang Chao como "la tos de 100 días" [2]. Investigaciones recientes sugieren que las primeras epidemias registradas de pertussis se observaron en Persia (actualmente Irán), siendo tres las epidemias descritas entre los siglos XV y XVI [3]. Una enfermedad con características similares a la tos convulsa también es mencionada en libros de medicina de Corea del año 1433. En Europa, los primeros registros de la enfermedad datan del año 1540 en Inglaterra, y la primera epidemia de tos convulsa descrita fue en 1578, y ocurrió en París. Esta epidemia fue estudiada por Guillaume de Baillou, quien proporcionó la primera descripción de la enfermedad entre los niños de París a la que denominó "quinta" o "quinte", "El pulmón está tan irritado que en el esfuerzo que produce para deshacerse de lo que le afecta, puede inhalar y exhalar solo con dificultad... El paciente se hincha y casi se sofoca, siente como si su aliento se detuviera en medio de su garganta... Se creen que este nombre [quinte] se inventó debido al sonido del paciente al toser. La tos se suspende durante 4 a 5 horas, después de lo cual aparece el paroxismo, que a menudo es tan violento que hace que sangre salga de la nariz y la boca y con mucha frecuencia... causa vómitos"[3]. En 1679, Thomas Sydenham y Thomas Willis en 1682

llamaron a esta enfermedad con el nombre de pertussis: del latín- per "fuerte" + tussis "tos". En 1883, el científico alemán, Carl Burger observó bacterias en una tinción de una muestra de esputo de un paciente con sintomatología de tos convulsa. Pero no fue hasta 1906 que el microorganismo pudo ser aislado por Jules Bordet y Octave Gengou, quienes en 1900 también habían observado a la bacteria en muestras de esputo de pacientes infectados y la describieron como pequeños bacilos gram negativos.

La infección se inicia con la adhesión de la bacteria a las cilias de las células epiteliales [5]. La hemaglutinina filamentosa (FHA) es la principal adhesina tanto de *B. pertussis* como de *B. parapertussis* [4,6,7] Luego de una interacción inicial con el epitelio nasofaríngeo y la proliferación, estas bacterias se diseminan hacia el tracto respiratorio superior, aunque en casos severos la bacteria también coloniza el tracto medio e inferior.

La evasión de las defensas del hospedador es facilitada por la adenilato ciclasa (CyaA) y, en el caso de *B. pertussis*, también la toxina pertussis [8]. CyaA cataliza la producción del segundo mensajero AMP cíclico (AMPC), que intoxica a la célula inhibiendo la fagocitosis [9].

El daño local en las infecciones causadas por *B. pertussis* se debe principalmente a un factor ausente en *B. parapertussis*: la citotoxina traqueal [10]. En pacientes infectados por *B. parapertussis* factores como toxina dermonecrótica (DNT) y CyaA son los responsables del daño local generado por *B. parapertussis*.

La tos convulsa cursa con manifestaciones clínicas asociadas a linfocitosis (principalmente en infecciones por *B. pertussis*), desregulación en la secreción de insulina, vómitos, deshidratación y malnutrición [11]. Los síntomas de la tos convulsa pueden variar dependiendo de la edad, la inmunidad del individuo (si es la primera vez que se infecta con esa especie en particular o si es una reinfección) y el tiempo transcurrido desde la última

infección o vacunación. La fase sintomática de la enfermedad presenta tres estadios clínicos o fases: catarral, paroxística y convaleciente. Los síntomas durante la fase catarral son similares a los de muchas infecciones del tracto respiratorio superior, incluyendo el resfriado común. Después de una o dos semanas, la enfermedad progresa hacia la fase paroxística, que es la más grave, puede persistir de una a diez semanas y se caracteriza por períodos de función normal de las vías respiratorias intercalados con múltiples ataques de tos espasmódica severa, seguidos de sonidos inspiratorios característicos y con frecuencia vómitos y cianosis. En la fase de convalecencia los pacientes presentan una mejora progresiva de sus síntomas con una disminución de la frecuencia y gravedad de los paroxismos y con una eventual resolución. En lactantes (<1 año de edad), la tos convulsa puede tomar un curso más serio con bacterias que se diseminan en los pulmones causando bronquiolitis necrotizante, hemorragia intraalveolar y edema fibrinoso. En casos severos de tos convulsa causada por *B. pertussis*, ocurre una linfocitosis extrema, que se correlaciona con hipertensión pulmonar intratable, insuficiencia respiratoria y, finalmente, la muerte. En los casos causados por *B. parapertussis* el reclutamiento de linfocitos y células polimorfonucleares (PMN) es menor, pero en los casos fatales también se ha observado edema cerebral, depleción linfoide en bazo y tracto intestinal e involución acelerada de timo [16]. La enfermedad transcurre sin fiebre significativa a menos que haya una coinfección o una infección secundaria con otro agente.

Las complicaciones pueden ocurrir en todos los rangos etarios, pero más comúnmente en los neonatos que requieren hospitalización en aproximadamente el 50% de los casos y pueden experimentar apnea (50-76%), neumonía (20-23%) y pérdida de peso (12%). Las complicaciones observadas en adolescentes y adultos incluyen apnea (27-44%), pérdida de peso (3-33%) e incontinencia urinaria (3-28%). Las complicaciones

neurológicas, incluidas las convulsiones, también se describen en todos los grupos de edad, aunque más comúnmente en los lactantes [17].

En general, se ha observado que las infecciones causadas por *B. parapertussis* presentan síntomas de menor gravedad que las causadas por *B. pertussis*. [18]. Sin embargo existen trabajos que no encuentran tales diferencias y señalan a la linfocitosis que es causada por la toxina pertussis factor de virulencia exclusivo de *B. pertussis*, como el único síntoma que diferencia los cuadros clínicos causados por *B. pertussis* y *B. parapertussis* [19]. De cualquier manera, las infecciones producidas por ambas cepas pueden ser mortales [20].

La tos convulsa es una enfermedad muy contagiosa [4]. Numerosos estudios han demostrado que los adultos y los adolescentes son el reservorio y principal fuente de transmisión [4]. .

1.2. Género *Bordetella*

Las especies del género *Bordetella* son cocobacilos gram negativos, todas estrechamente relacionadas genéticamente y agrupadas dentro de la familia Alcaligenaceae, del orden Burkholderiales, β -proteobacterias. Actualmente hay nueve especies reportadas en el género: *B. pertussis*, *B. parapertussis* (que se subdivide en dos linajes uno que infecta ovinos, *B. parapertussis_{ov}*, y otro que infecta solamente humanos, *B. parapertussis_{hu}*), *B. brochiseptica*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. petrii* y *B. ansorpii*. La mayoría de las especies del género son patógenas. Algunas son patógenos humanos estrictas, otras son capaces de infectar a varios hospedadores, incluidos los humanos; y otras pueden encontrarse en humanos, animales y medio ambiente. *B. holmesii*, se ha encontrado causando infecciones pulmonares en humanos y ocasionalmente en muestras de

sangre y esputo [21]. *B. avium* es un patógeno de aves que causa inflamación de la mucosa de las fosas nasales y rinitis en aves de corral como, por ejemplo, pavos [22]. *B. hinzii* se encuentra principalmente como flora comensal de las vías respiratorias de aves pero es un potencial patógeno de humanos inmunocomprometidos, pudiendo incluso causar septicemia y llevar a la muerte [23]. *B. trematum* se ha aislado de infecciones de oído y heridas en la piel en humanos, pero nunca se ha asociado con infecciones del tracto respiratorio [24]. *B. parapertussis_{ov}* causa una infección crónica en el tracto respiratorio de la oveja [25]. *B. petrii*, se aisló del medio ambiente y es capaz de crecer anaeróticamente [26]. La especie más recientemente aislada, *B. ansorpii*, se encontró en el exudado purulento de un quiste epidérmico en Corea en el 2005 [27] y, posteriormente, en sangre de un paciente inmunocomprometido en Inglaterra en 2007 [28]. *B. bronchiseptica* causa infecciones respiratorias crónicas y a menudo asintomáticas en una gran variedad de mamíferos, incluidos perros, monos, conejos, cerdos y caballos. También se ha encontrado generando infecciones crónicas en humanos en contacto con animales infectados y en inmunodeprimidos [29]. Por último están las dos especies cuyo único hospedador conocido en el hombre, sin vector ni reservorio conocido por fuera de él, *B. pertussis* y *B. parapertussis_{hu}*. Ambas causan la enfermedad denominada tos convulsa, tos ferina, coqueluche o pertussis. Una enfermedad muy contagiosa, con una alta tasa de mortalidad en recién nacidos y recientemente declarada reemergente por la OMS. *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* son frecuentemente llamadas “Bordetellas clásicas” debido a su similitud a nivel genómico.

1.3 *Bordetella parapertussis*

B. parapertussis fue mencionada como una nueva especie por primera vez por William Bradford en 1937, treinta años después del descubrimiento de *B. pertussis* [30]. Bradford y Slavin aislaron ocho cepas, dos de niños con casos severos de tos convulsa, y el resto de casos más leves. Las razones que los llevaron a sospechar que se encontraban frente a una especie diferente fue la presencia de hemólisis a las 24 hs de cultivo (*B. pertussis* requiere normalmente 72 hs), el crecimiento más rápido, y la presencia de una coloración marrón, no observada en las placas inoculadas con *B. pertussis*. La bacteria causante de todos estos cuadros fue caracterizada como un microorganismo “semejante a *Haemophilus pertussis*”. En 1938, Grace Eldering y Pearl Kendrick reportaron que 10 aislados clínicos de la bacteria a la que llamaron *Bacillus parapertussis*, provenientes de distintos lugares de Estados Unidos, habían sido hallados en los últimos 10 años [31]. El organismo fue descrito como un pequeño bacilo gram negativo no móvil, morfológicamente indistinguible de *Haemophilus pertussis* (tal era el nombre de *B. pertussis* entonces) y que compartía factores antigénicos con *H. pertussis* y *Brucella bronchiseptica* (tal era el nombre de *Bordetella bronchiseptica*) pero que al mismo tiempo se diferenciaba de ambas especies tanto por el oscurecimiento del medio de cultivo como por su velocidad de crecimiento y también diferencias en los ensayos de aglutinación.

Aunque en general se asume que el cuadro clínico ocasionado por *B. parapertussis* es más leve que el causado por *B. pertussis*, en 1939 se reportaron dos casos letales causados por *B. parapertussis*, uno de una niña de 3 meses, y otro de una de 13 meses, ambas sin antecedentes clínicos [16]. Los síntomas fueron idénticos a los causados por *B. pertussis*, tos, paroxismo y cianosis. También se observó gran infiltración de PMN y linfocitos en pulmón y edema cerebral en las autopsias.

La incidencia relativa de *B. pertussis* y *B. parapertussis* varía. Un estudio llevado a cabo por 20 años en Dinamarca y publicado en 1971 mostró que la incidencia de *B. pertussis* fue 20 veces mayor que la de *B. parapertussis*. En un brote en Cincinnati, en la primavera de 1974, se observó que el 22% de casos fue causado por *B. parapertussis*. Algunos autores también apuntan a la posibilidad de que *B. parapertussis* tenga una incidencia similar a *B. pertussis* pero, al presentar una sintomatología más leve, es menor el número casos confirmados y reportados. Ambas especies circulan permanentemente en la población y tienen ciclos epidémicos cada 5 años aproximadamente. Sin embargo los picos epidémicos registrados para cada especie están desfasados en 2 años, lo cual indica que no hay protección cruzada entre ambas especies. En apoyo de esta hipótesis, o al menos que *B. pertussis* no confiere protección contra *B. parapertussis*, se observó en estos primeros trabajos que algunos de los pacientes infectados con *B. parapertussis* ya habían padecido tos convulsa causada *B. pertussis*.

1.4. Evolución y tropismo

El análisis de los genomas de *B. pertussis* y *B. parapertussis* indica que ambas especies derivan de un ancestro similar a *B. bronchiseptica* [32]. La comparación de genomas demostró que la organización de los genomas de *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis* es más similar que los genomas de *B. bronchiseptica* y *B. pertussis* (Figura 1). Las cepas de *B. parapertussis*_{hu} presentan muy poca diversidad en sus perfiles de electroforesis generados por técnicas de PCR y de digestión enzimática o análisis de elementos IS, independientemente del lugar o año de aislamiento [33]. El análisis de los genomas de distintos aislados de *B. parapertussis*_{hu} también demuestra poca variabilidad

comparado con el que muestran los aislados clínicos de *B. pertussis*. Esta falta de diversidad podría tener su origen en que *B. parapertussis*_{hu} evolucionó de su ancestro recientemente y en forma independiente de *B. pertussis*.

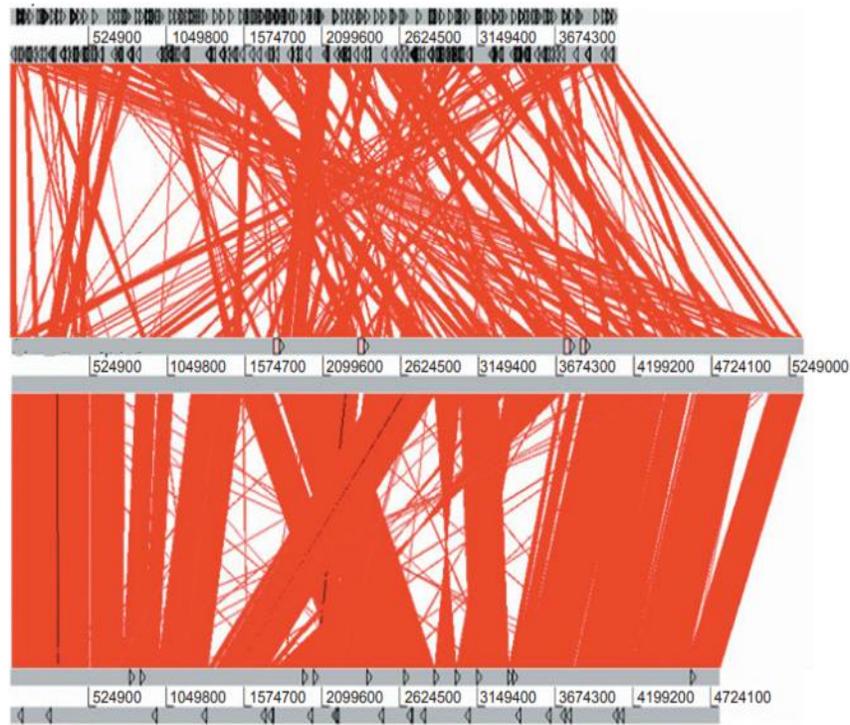


Figura 1. Comparación lineal de los genomas de *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis*. Las barras grises representan las hebras paralelas y antiparalelas. Arriba, *B. pertussis*. Los triángulos negros representan secuencias de inserción. Centro, *B. bronchiseptica*. Las cajas rosas representan profagos. Abajo, *B. parapertussis*. Las líneas rojas entre los genomas representan similitudes de ADN entre las dos secuencias (Fuente: Parkhill et al. (2003) *Nat. Genet.*).

Previo al secuenciamiento de los genomas de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*, se creía que las diferencias fenotípicas entre las especies podía provenir de la adquisición de genes, pero la información genómica obtenida en el año 2003, demostró que muchos de los rasgos individuales de los organismos se deben a eventos independientes de inactivación y pérdida de genes a gran escala en las tres especies [32]. El rango limitado de hospedadores de estas especies comparado con el de un antepasado putativo similar a *B.*

bronchiseptica podría entonces deberse a la pérdida de elementos genómicos relacionados a la interacción con el hospedador. La condición de patógenos humanos de *B. pertussis* y *B. parapertussis* también podría deberse a una sobreexpresión o expresión constitutiva de factores de virulencia que podrían estar sujetos a un control temporal o ambiental más estricto en las otras especies [32].

A pesar de que la adquisición horizontal de genes no ha contribuido mayormente a la virulencia de las especies del género *Bordetella* [32], parece haber estado involucrada en la aparición de factores de virulencia claves como el antígeno O y la toxina pertussis [34].

Como se menciona más arriba, se cree que *B. pertussis* y *B. parapertussis*_{hu} evolucionaron de forma independiente a partir de un ancestro similar a *B. bronchiseptica*. Un trabajo que estudió un total de 132 aislados de estas especies a través de MLST, hibridaciones y microarrays, [35] encontró que era posible clasificarlas en cuatro complejos (Figura 2). Los complejos II y III que contendrían las cepas de *B. pertussis* y *B. parapertussis*_{hu}, respectivamente. El complejo I contendría la mayoría de las cepas de *B. bronchiseptica*, mayoritariamente aisladas de animales, y los aislados de *B. parapertussis*_{ov}. Por último el complejo IV estaría compuesto por cepas de *B. bronchiseptica*, mayoritariamente aisladas de humanos. El análisis filogenético hecho en este trabajo sugiere que *B. pertussis* and *B. parapertussis*_{hu} provienen de los complejos I y IV, respectivamente, por lo que su adaptación al humano ocurrió como parte de dos eventos independientes [35]. Se cree que las diferencias observadas a nivel genómico entre los distintos complejos tienen su origen en la adaptación a los respectivos nichos [35].

La hipótesis de que *B. parapertussis*_{hu} ha surgido después que *B. pertussis* en un evento independiente, significa que *B. parapertussis* invadió un nicho ocupado por *B. pertussis*, en el seno de una población con inmunidad adquirida contra *B. pertussis*. Su

desarrollo y persistencia dentro de esta población es en sí mismo una prueba de la poca protección entre estas especies a pesar del gran similitud que existe entre ellas [36].

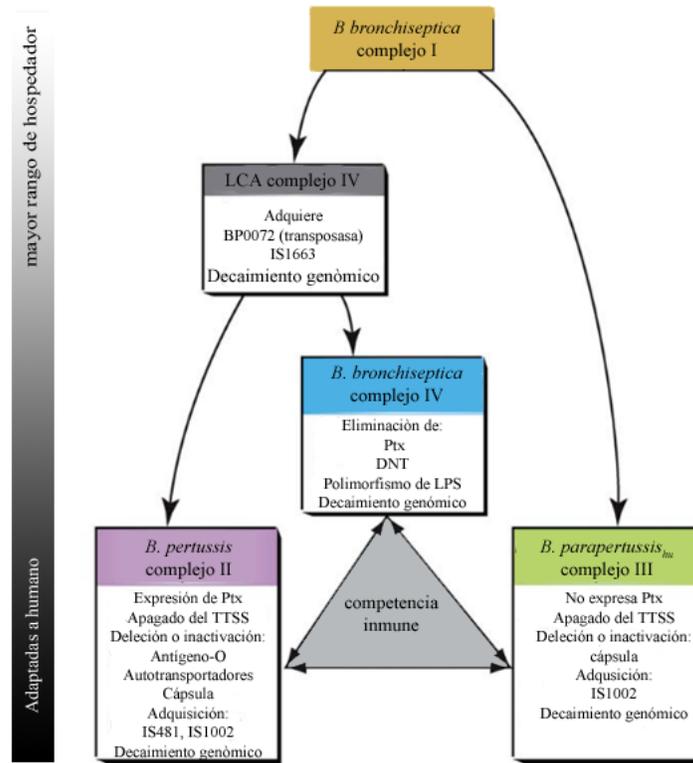


Figura 2. Modelo de la evolución de *B. pertussis* y *B. parapertussis*. Las flechas dobles entre complejos indican una posible competencia inmune dentro del huésped. En los recuadros, se muestran los eventos genéticos que pueden haber jugado un papel en la especiación y la adaptación del nicho (Fuente: Diavatopoulos et al. (2005) *Plos pathog.*).

1.5. Factores de virulencia

Muchos de los factores de virulencia del género *Bordetella*, como la hemaglutinina filamentosa (FHA), la pertactina, las fimbrias y las toxinas, adenilato ciclasa, toxina dermonecrótica y citotoxina traqueal están presentes en las tres especies denominadas *Bordetellas* clásicas. También se han descrito otros factores de virulencia expresados por

solo una o dos de las especies, como la toxina pertussis y la proteína de resistencia al suero, BrkA, solo expresada por *B. pertussis*, o el sistema de secreción tipo III expresado solo por *B. bronchiseptica* y *B. pertussis* [32,37]. A su vez muchos potenciales nuevos factores de virulencia fueron encontrados al analizar los genomas; y, dado que solo el 50% de los genes son compartidos por todas las cepas es probable que existan más factores de virulencia propios de cada especie. En la figura 3 se muestra un mapa de la diversidad en los genes de factores de virulencia entre las Bordetellas clásicas.

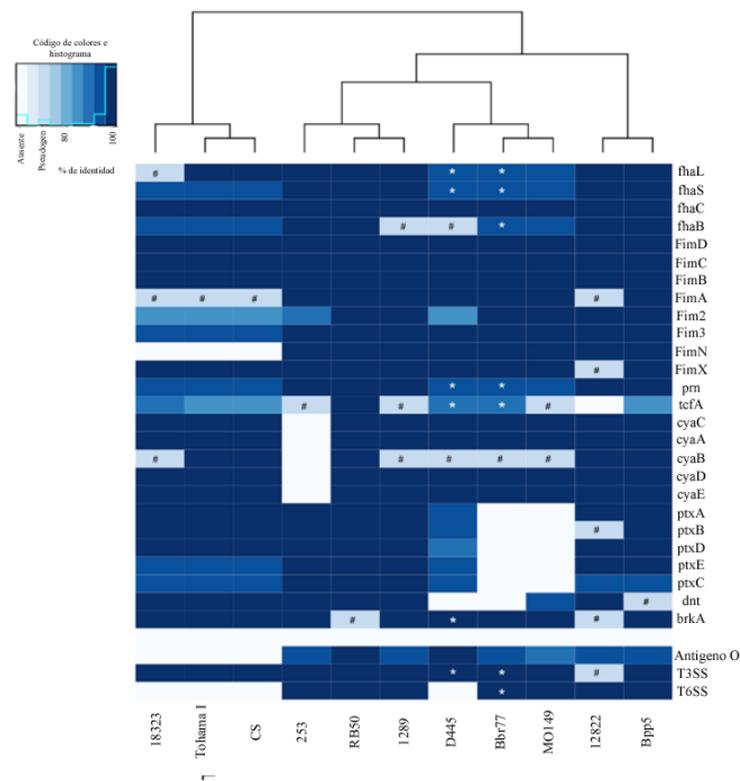


Figura 3. Diversidad en los genes de factores de virulencia entre las Bordetellae clásicas. El mapa de calor se basa en el porcentaje de identidad en comparación con RB 50 para cada gen de diversos aislados de *B. pertussis* (18323, Tohama I, CS), *B. bronchiseptica* (253, RB50, 1289, D445, Bbr77, MO149), *B. parapertussis*_{hu} (12822) y *B. parapertussis*_{ov} (Bpp5). Ausencia de un gen o pseudogen se destaca con blanco o celeste con un #. (Fuente: Park et al. (2012) *BMC Genom.*).

1.5.1. Sistema de dos componentes BvgAS

La expresión de la mayoría de los factores de virulencia de las bacterias del género *Bordetella* está controlada por el sistema de dos componentes BvgAS (Figura 4). Los sistemas de dos componentes están compuestos por dos proteínas, una quinasa sensora que percibe la o las señales, y se autofosforila en un residuo de histidina conservado; y un regulador de respuesta que se activa tras la fosforilación por su quinasa sensora afín y sirve como activador transcripcional. En el caso de BvgAS, BvgS es una quinasa sensora de 135kDa y BvgA el regulador transcripcional, de 23 kDa. Los genes que codifican para las proteínas BvgAS forman parte de un operón que tiene cuatro promotores, tres de los cuales son regulados por el sistema mismo. La proteína BvgS es una sensora "no ortodoxa" compuesta de tres dominios potencialmente involucrados en la percepción de la señal, dos dominios periplásmicos de *Venus Fly Trap* (Venus Atrapamosca) (VFT) en tándem, con una cavidad de unión de soluto entre ellos, y un dominio citoplasmático PAS (Per-ARNT-Sim) [39]. Le siguen varios dominios que participan en una cascada de fosforilación, un dominio de histidina quinasa (His-quinasa), un dominio receptor que contiene Asp, y un dominio de fosfotransferencia His (Hpt). Las señales a las que responde BvgS *in vivo* son desconocidas, pero *in vitro*, el sistema se activa a 37°C y se silencia por debajo de 27°C o agregando iones sulfato o ácido nicotínico al medio de crecimiento.

BvgA fosforilado por BvgS activa la transcripción de los llamados *vags* o *virulence-activated genes* uniéndose a sus promotores. Entre estos genes se encuentra el BvgR, que reprime a los genes reprimidos en fase virulenta, o *vrgs* (*virulence repressed genes*). Todo los factores de virulencia clásicos involucrados en la patogénesis de *Bordetella spp.* están regulados por BvgAS. Cuando BvgS esta fosforilado se transcriben todos los genes de la virulencia y esta fase de la bacteria se la denomina Bvg (+). Cuando BvgS está inactivo,

BvgA no está fosforilado, y los factores de virulencia no se expresan, tampoco BvgR por lo que se induce la expresión de los genes reprimidos por virulencia (*vrgs*). Esta fase se denomina Bvg (-). Hay evidencia que sugiere que esta es la fase de la bacteria durante la transición de hospedador a hospedador, en los aerosoles que la transportan y debido a la temperatura ambiente que está por debajo de los 37°C requeridos para que se induzca la fase Bvg (+). Una vez dentro del hospedador ocurriría la modulación a fase virulenta [41]. Este cambio de fase es gradual, primero se transcriben los que se conocen como factores de virulencia tempranos y luego los tardíos. Los promotores de los *vag* conocidos como tempranos son que requieren bajas concentraciones de BvgA fosforilada para su inducción (como la hemaglutinina filamentosa) [42]. Los tardíos (como adenilato ciclasa y toxina pertussis), que requieren concentraciones más altas BvgA fosforilada [43]. También se ha identificado un promotor intermedio, el de pertactina [44]. El sistema BvgAS media una transición progresiva entre las fases Bvg (-), Bvg (i) y Bvg (+). Se ha postulado que esta aparición gradual de adhesinas y luego las toxinas juega un papel relevante en la colonización inicial del huésped.

El estudio comparativo entre las fases Bvg (+) y Bvg (-) de *B. pertussis* por RNAseq, demostró que la transcripción una gran cantidad de genes implicados en rutas metabólicas, como el metabolismo de lípidos y ácidos grasos, transportadores de azúcares y aminoácidos, piruvato deshidrogenasa, y vías de utilización de glicolato y glioxilato se encuentran aumentada en fase de avirulencia [45], señalando que la diferencia entre ambas fases no solo se limita los factores “clásicos de virulencia”.

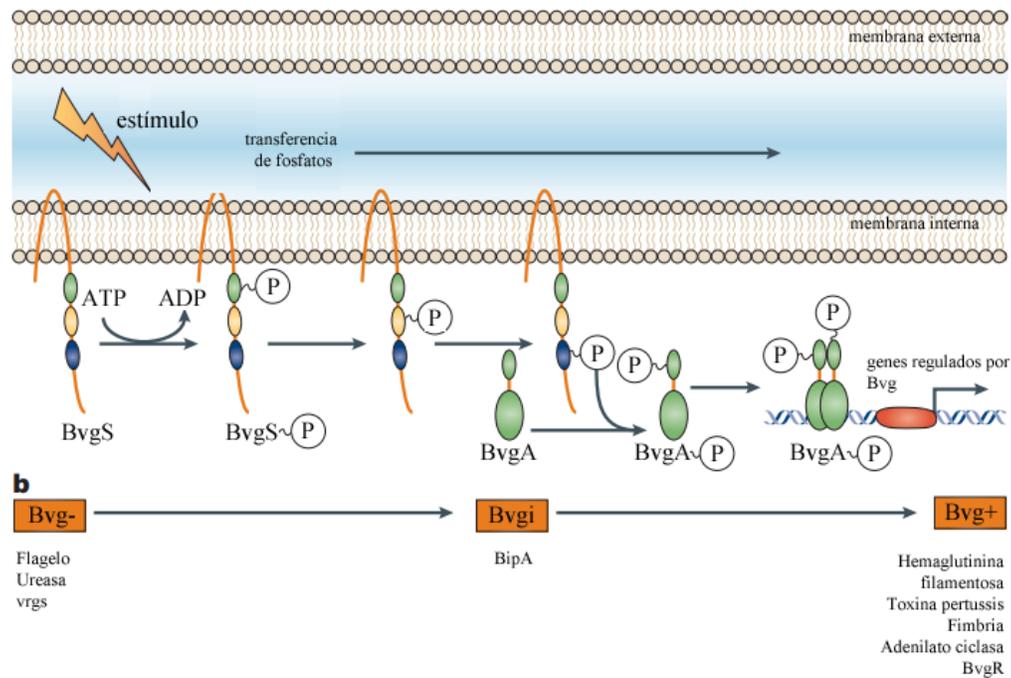


Figura 4. Diagrama esquemático de la acción del sistema de dos componentes BvgAS. La detección de un estímulo periplásmico activa BvgS y lleva a la autofosforilación de BvgS. El grupo fosfato se transmite a lo largo de BvgS y, en última instancia, a BvgA. El BvgA fosforilado tiene actividad de regulador transcripcional y activa la transcripción de varios genes. Este estado se conoce como la fase Bvg (+). Cuando el sistema se silencia, las bacterias pasan a la fase Bvg (-) que se caracteriza por la expresión de un subconjunto de genes específicos de dicha fase. La figura enumera los factores que se expresan en cada fase Bvg. (Fuente: Preston et al. (2004) *Nat. Rev. Microbiol.*)

En un trabajo reciente, se estudió la evolución del sistema BvgAS en los distintos aislados de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*. En este trabajo se encontró que BvgA se conserva notablemente entre estas especies pero las secuencias de BvgS difieren marcadamente lo que permite separar dos linajes de *Bordetella*. Curiosamente, el BvgS de *B. parapertussis* se asemeja más a aquellos de las cepas de *B. bronchiseptica* aislada de animales [39]. Los autores señalan que es posible que se deba a la reciente evolución de la especie, aunque también puede ser un indicativo de que su adaptación al entorno humano aún no se ha completado.

1.5.2. Toxina Adenilato Ciclasa

La toxina adenilato ciclasa-hemolisina, conocida como CyaA, ACT o AC-Hly, pertenece a la familia de toxinas RTX que tienen un aspartato de unión a calcio en el extremo C-terminal y repeticiones de nonapéptidos ricos en glicina de una secuencia consenso G-G-X-G-X-D-X-X-X (X, cualquier residuo de aminoácido). La toxina es un polipéptido de 1706 residuos de largo que tiene actividad adenilato ciclasa (AC) en el extremo N-terminal de aproximadamente 400 residuos, y un dominio hemolisina (Hly) RTX característico de unos 1300 residuos. El fragmento Hly consta de cuatro subdominios funcionales: (i) un dominio formador de poros hidrófobo; (ii) un dominio de activación, con los dos residuos de lisina acilados postraduccionalmente; (iii) un dominio RTX de unión al receptor que consiste en aproximadamente 40 repeticiones nonapeptídicas de unión a calcio; y (iv) una señal de secreción C-terminal no procesada reconocida por un sistema de secreción bacteriana de tipo I (T1SS) formado por las proteínas CyaBDE que se encuentran codificadas en el mismo operón [49] (Figura 5).

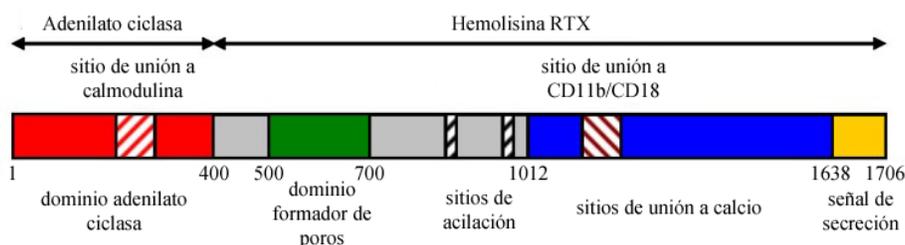


Figura 5. Representación esquemática de CyaA. CyaA es un polipéptido de 1706 residuos que consta de un dominio AC N-terminal (~ 400 residuos) y un dominio Hly C-terminal (~ 1300 residuos) que están unidos entre sí con un segmento de ~ 100 residuos. La porción Hly de CyaA alberga varios subdominios funcionales: (i) un dominio de formación de poros hidrófobos (residuos 500 a 700); (ii) un dominio de activación (residuos 800 y 1000), donde se produce la acilación postraduccional en dos residuos de lisina (K860 y K983); (iii) un dominio RTX de unión a calcio típico con las repeticiones nanopeptídicas de unión a iones de calcio y con el segmento de unión a CR3 (residuos 1166-1287); y (iv) una señal de secreción C-terminal (Fuente: Novak et al. (2017) *Toxins*).

El fragmento Hly de CyaA media la unión de la toxina al heterodímero CD11b/CD18, receptor de complemento 3 (CR3) presente en células fagocíticas de linaje mielóide como macrófagos y neutrófilos [50]. Tras la inserción en la membrana de la célula blanco, el fragmento Hly trasloca el dominio catalítico AC directamente en el citosol de las células mediante un mecanismo poco conocido inducido por el calcio que requiere de la acilación, el plegamiento adecuado, y la integridad de la región Hly [49]. Una vez en el citoplasma de la célula del hospedador, el dominio AC se une a calmodulina y afecta la señalización intracelular por conversión no regulada de ATP a una molécula de señalización clave como es el AMP cíclico (AMPc). El dominio Hly de CyaA es funcionalmente independiente del dominio AC y puede por sí mismo formar pequeños poros de membrana que provocan la lisis osmótica de las células.

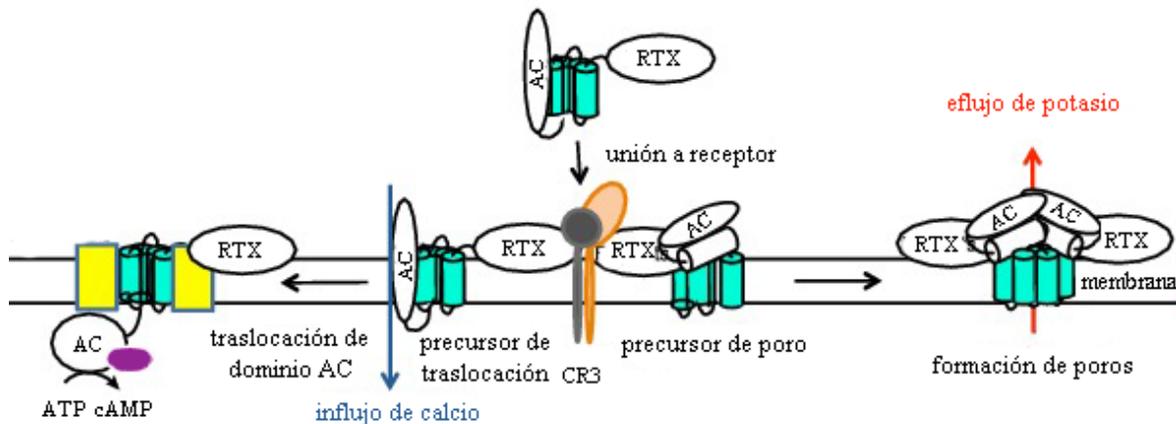


Figura 6. Modelo esquemático de la acción de CyaA en la membrana de la célula objetivo. Después de unirse al CR3 de células mieloides, CyaA penetra en la membrana citoplásmica. La invasión a través de la bicapa lipídica provoca un influjo concomitante de iones de calcio al citoplasma. La proteína también puede polimerizar en la membrana provocando el eflujo de potasio de las células (Fuente: Masin et al. (2015) *Pathog. Dis.*).

Una vez insertada a través de la membrana de la célula blanco, CyaA interfiere con las funciones celulares mediante al menos tres actividades citotóxicas sinérgicas y paralelas que alteran la señalización celular: (i) la entrada de iones de calcio en el citosol de las células; (ii) la translocación del dominio de AC que subvierte las vías de señalización celular por una elevación extremadamente rápida e incontrolada de la concentración de AMPc citosólico; y (iii) la formación de los poros que permeabilizan la membrana celular y activan la señalización de MAPK al mediar el flujo de iones de potasio de las células (Figura 6). Dependiendo de la cantidad de toxina encontrada, el fagocito sufre una muerte celular apoptótica o necrótica.

La comparación de las secuencias de aminoácidos de las toxinas CyaA de las tres principales especies del género *Bordetella* reveló que CyaA de *B. parapertussis* tiene un alto grado de similitud con la toxina de *B. bronchiseptica* y menos similitud con la de *B. pertussis*. Las diferencias en las secuencias entre los distintos aislados de las tres especies difieren principalmente en la parte C-terminal [51], y afecta especialmente a los aminoácidos 800–1000 y 1000–1600 de la proteína.- Esta región corresponde a epítopes y a sitios de dominio de unión al receptor para las células humanas, aunque no parece generar ningún cambio en la capacidad de la toxina de interactuar con CR3. El gen que codifica para CyaA nunca se ha visto eliminado ni desactivado en ninguno de los aislados de *B. pertussis* o *B. parapertussis*, pero se ha visto reemplazado por un operón de transporte de péptidos en algunos aislados de *B. bronchiseptica* [52]; esto sugiere que, a pesar de la importancia de esta toxina para *B. pertussis* o *B. parapertussis* existe algún nicho ecológico para *B. bronchiseptica* en el que no es crítica.

A pesar de la similitud a nivel de secuencia entre CyaA de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*, algunas diferencias fueron encontradas recientemente.

Estudios previos [53] sugieren que, a diferencia de la toxina de *B. pertussis*, la CyaA de *B. parapertussis*, no tiene actividad citotóxica sobre células J774. En concordancia con esos resultados, otro trabajo [54] demuestra que CyaA de *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* y *B. pertussis* tiene diferencias funcionales entre sí. CyaA de *B. parapertussis* se une a las células, y su dominio enzimático se transloca igual que CyaA de *B. pertussis*, e incluso conserva la actividad hemolítica en eritrocitos. Según este trabajo la diferencia se hace evidente en células nucleadas en las cuales solo CyaA de *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis* es fosforilada en el residuo Ser375. Con este aminoácido fosforilado se generaría un motivo (RSXpSXP, donde pS es fosfoserina) que sería reconocido por el factor del hospedador 14-3-3, lo que resultaría en la pérdida de la actividad adenilato ciclasa. En consecuencia, los efectos citotóxicos de CyaA *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis* se encontrarían notablemente atenuados.

1.5.3. Hemaglutinina Filamentosa

La hemaglutinina filamentosa (FHA) es una adhesina de 220 kDa que se encuentra asociada a la superficie bacteriana, pero también se secreta al medio extracelular en grandes cantidades [55]. FHA es una molécula en forma de horquilla (50 nm de longitud y aproximadamente 4 nm de ancho) que consiste predominantemente en tándems repetitivos en forma de B dispuestos en una β -hélice paralela [56]. Se han identificado cuatro dominios funcionales diferentes en FHA (unión a heparina, reconocimiento de carbohidratos, motivo Arg-Gly-Asp y dominio C-terminal maduro) que estarían implicados en la interacción de FHA con células eucariotas *in vitro* [57]. FHA es muy inmunogénica y se ha utilizado en la gran mayoría de las vacunas acelulares.

FHA es la adhesina más importante de las *Bordetellas* clásicas, todos patógenos del tracto respiratorio superior de mamíferos. Se ha observado que media la adhesión bacteriana a células epiteliales alveolares, bronquiales, células de epitelio traqueal e incluso células fagocíticas. En distintos trabajos se ha estudiado la importancia de los distintos dominios en la adhesión. El primero en ser identificado fue el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD), que tiene capacidad de unirse a glicolípidos de las ciliadas humanas [58]. Luego, se identificó el dominio inhibible por heparina, que podría mediar la adhesión a glicolípidos sulfatados y proteoglicanos como heparina y condroitin sulfato [59]. En cambio, se ha propuesto que la interacción con macrófagos ocurre a través de la unión directa del dominio RGD con CR3, de la que también participaría la integrina $\alpha V\beta 3$ LRI y VLA-5 o $\alpha 5\beta 1$ [60–63]. Por otro lado, un trabajo de nuestro grupo, muestra que FHA interactúa con colesterol y se dirige preferencialmente a balsas lipídicas en la superficie de células de epitelio pulmonar [64].

Un ortólogo de *fhaB* está presente en cada una de las tres especies de las *Bordetellas* clásicas (BP1879, BB2993 y BPP3027). Aunque cada uno parece estar intacto, hay variaciones en la secuencia y la longitud de las secuencias repetitivas internas [32,65]. El análisis de los genomas de *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis* reveló la existencia de dos genes adicionales, *fhaS* y *fhaL*, que codifican proteínas similares a FHA y que también presentan variaciones en su secuencia interna entre las distintas especies [32]. Por ejemplo, se observaron diferencias en la región denominada R1 (entre los residuos 344 y 1065 de FhaB de *B. pertussis*) que contiene pseudorepeticiones en tándem de secuencias de 19 residuos [66]. *FhaS* de *B. bronchiseptica* tiene 36 copias de la región R1, mientras que *fhaS* de *B. parapertussis* tiene 11 copias y *fhaS* de *B. pertussis* tiene solo 5 copias [67]. De acuerdo a un estudio en el que se realizaron fusiones transcripcionales, los genes *fhaS* y

fhaL podrían estar expresados, aunque a niveles mucho más bajos que *fhaB*; ambos están regulados positivamente por BvgAS y, por lo tanto, se califican como genes *vag* [68].

El rol de FHA en *B. parapertussis* fue estudiado a través de la construcción de una mutante defectiva en la expresión de FhaC, una proteína integral de membrana necesaria para traslocar a FhaB a través de la membrana bacteriana externa [70,71]. Esta mutante se encontró defectiva en su capacidad de adherirse a células del epitelio pulmonar humano [6], confirmando la importancia de este factor de virulencia en la adhesión, de *B. parapertussis*. La única diferencia encontrada entre FHA de *B. pertussis* y *B. parapertussis*, es que la adhesión de *B. parapertussis* no se ve inhibida por heparina, a diferencia de lo observado para *B. pertussis* [6].

Tanto la infección con *B. pertussis* o *B. parapertussis* [73] como la inmunización producen una respuesta inmune contra FHA [74]. A pesar de tener más del 95% de identidad, estudios realizados en modelos murinos sugieren que la inmunización con FHA de *B. pertussis* no confiere protección contra *B. parapertussis* [75]. Es posible, entonces, que las diferencias se encuentren en los epítopes protectores y que hayan sido seleccionadas durante la evolución de *B. parapertussis* debido a la reactividad cruzada.

1.5.4. Fimbrias

Al igual que muchas bacterias patógenas gram negativas, *B. parapertussis* expresa estructuras proteicas filamentosas y poliméricas en superficie celular denominadas fimbrias (Fim). Algunos trabajos demostraron la importancia de las fimbrias en la adhesión al epitelio respiratorio [76,77]. Las subunidades fimbriales más conocidas del género que forman los dos serotipos fimbriales predominantes de *B. pertussis*, son Fim2 y Fim3. El

análisis de la secuencia del genoma de *B. pertussis*, *B. parapertussis*_{hu} y *B. bronchiseptica* revela que las tres subespecies contienen los genes de *fim2* y *fim3*. Existe un tercer locus, *fimX*, en *B. pertussis* [78], y *B. bronchiseptica* que se encuentra en *B. parapertussis*_{hu} como un pseudogen. Los locus fimbriales, *fimN* y *fimA* fueron identificados en *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis*_{hu}, pero no se encuentran en *B. pertussis* [32]. Finalmente, hay también una recientemente descubierta subunidad fimbrial en *B. bronchiseptica* (BB3424) y *B. parapertussis*_{hu} (BPP1684) que está ausente en *B. pertussis* [32].

La expresión de los genes fimbriales de *Bordetella* está regulada positivamente por el sistema de dos componentes BvgAS. Un rasgo característico del promotor de las fimbrias es un tramo de citosinas, ubicado aguas arriba de la caja putativa -10 [79]. Las inserciones y deleciones de 1 a 5 pb en dichas citosinas son responsables de la variación de fase en fimbrias [78]. Dado que los cambios en la longitud de dicho tramo afecta la transcripción de los genes fimbriales individualmente y de manera independiente [81], las bacterias pueden expresar Fim2, Fim3, FimX, FimN, FimA o cualquier combinación en cualquier momento dado. Aun así, serotipos para FimX, FimN o FimA, no han sido descritos en ninguna de las tres especies [82].

Todos los serotipos fimbriales tienen una subunidad fimbrial menor común, FimD, que forma la adhesina de la punta [83]. El gen *fimD* está ubicado dentro del operón de biogénesis fimbrial *fimABCD*. La mutación de cualquiera de los genes del locus *fimBCD* da como resultado una falta completa de fimbrias en la superficie celular bacteriana, lo que sugiere que *fimBCD* es el único locus funcional de biogénesis fimbrial en *Bordetella* [84].

Estudios *in vivo* demostraron que las fimbrias están involucradas en la colonización nasofaringe y tráquea [83]. De acuerdo a un modelo recientemente desarrollado por Scheller y colaboradores [85], la adhesión de *Bordetella* es un proceso de dos pasos que

requiere tanto Fim como FHA. Las fimbrias mediarían la interacción inicial con el epitelio ciliado, y este primer paso crítico permite a FHA mediar una adhesión más estrecha con estas células.

Ningún estudio concluyente se ha llevado a cabo sobre la expresión de fimbrias en cepas de *B. parapertussis*; aunque se ha visto que no expresa Fim2 ni Fim3 [86].

1.5.5. Pertactina y otros autotransportadores

Las especies del género *Bordetella* expresan una serie de proteínas llamadas autotransportadores que son secretadas o se encuentran asociadas con la superficie de la bacteria cuya expresión está regulada por el sistema de dos componentes BvgAS. La familia de autotransportadores incluye proteínas funcionalmente diversas, como proteasas, adhesinas, toxinas, invasinas y lipasas. Los autotransportadores consisten típicamente de una región N-terminal, que confiere las funciones efectoras, y una región C-terminal conservada llamada β -barril, que se requiere para la secreción del dominio transportado a través de la membrana. La secuencia señal N-terminal facilita la translocación de la pre-proteína a través de la membrana interna en forma dependiente del sistema Sec. Tras el clivaje del péptido señal N-terminal en el periplasma, el extremo C se pliega en un barril en la membrana externa, formando un canal. La región enlazadora entre los extremos N y C dirige la translocación de la región N-terminal a través del canal formado por el β -barril. En la superficie, los dominios pasajeros pueden dividirse de la unidad de translocación y permanecer asociados de manera no covalente con la superficie bacteriana o pueden liberarse en el medio extracelular después de un evento autoproteolítico o ser escindido por una proteasa de membrana externa endógena.

Las bacterias del género *Bordetella* tienen gran número de autotransportadores, algunos compartidos por todas las especies. En el genoma de *B. bronchiseptica* RB50 se identificaron 21, en *B. parapertussis*_{hu} se encontraron 20, y 16 en *B. pertussis* Tohama I [32]. El autotransportador más estudiado en el género *Bordetella* es pertactina, una proteína que en su forma madura tiene 68 kDa en *B. bronchiseptica*, 69 kDa en *B. pertussis* y 70 kDa en *B. parapertussis*_{hu}, [87]. La estructura aparece como una hélice de la que sobresalen varios bucles. Una secuencia particular (GGXXP)₅ se ubica directamente después del motivo RGD, y puede también mediar la interacción con las células epiteliales. La región C-terminal de P.69 incorpora un bucle de motivo (PQP)₅ que contiene el epítotope inmunoprotector principal [88]. Las principales diferencias entre la pertactina de *B. parapertussis* y la pertactina de *B. pertussis* se encuentran en el número de unidades dentro de los motivos repetitivos encontrados en ambas proteínas. La secuencia GGXXP se repite cuatro veces en la pertactina P.70, y cinco veces en la pertactina P.69, mientras que la secuencia PQP se encuentra nueve veces en la pertactina P.70 y cinco veces en la pertactina P.69 [87].

Los dominios RGD, se han visto relacionadas a la interacción con receptores o integrinas de la superficie de células eucariotas [90]. Sin embargo nunca pudo demostrarse que pertactina fuera una adhesina [91]. La razón por la que este autotransportador ha sido muy estudiado es porque es un antígeno muy inmunogénico y protector [92], por ser blanco de opsoninas, incluido en todas las vacunas contra la tos convulsa (ver más adelante). Justamente su gran antigenicidad ha llevado a que la mayoría de las cepas circulantes de *B. pertussis* e incluso algunas cepas de *B. parapertussis* recientemente aisladas no expresen pertactina [93–96] debido a deleciones en el gen que codifica para esta proteína, sustituciones de una base que resultan en codones de stop, inversión en el promotor o

inserciones que generan cambios en el marco de lectura [97]. La gran diversidad de mutaciones que han aparecido en este gen entre los aislados clínicos sugiere que se ha producido una inmunoselección dirigida por vacunación más que una expansión clonal de una cepa defectiva [97]. Otra posible función atribuida a pertactina es la de afectar la respuesta inmune del hospedador [98]. En ese sentido, un trabajo reciente indica que la estimulación de células dendríticas con cepas de *B. pertussis* deficientes en pertactina produce un aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de estas células [99].

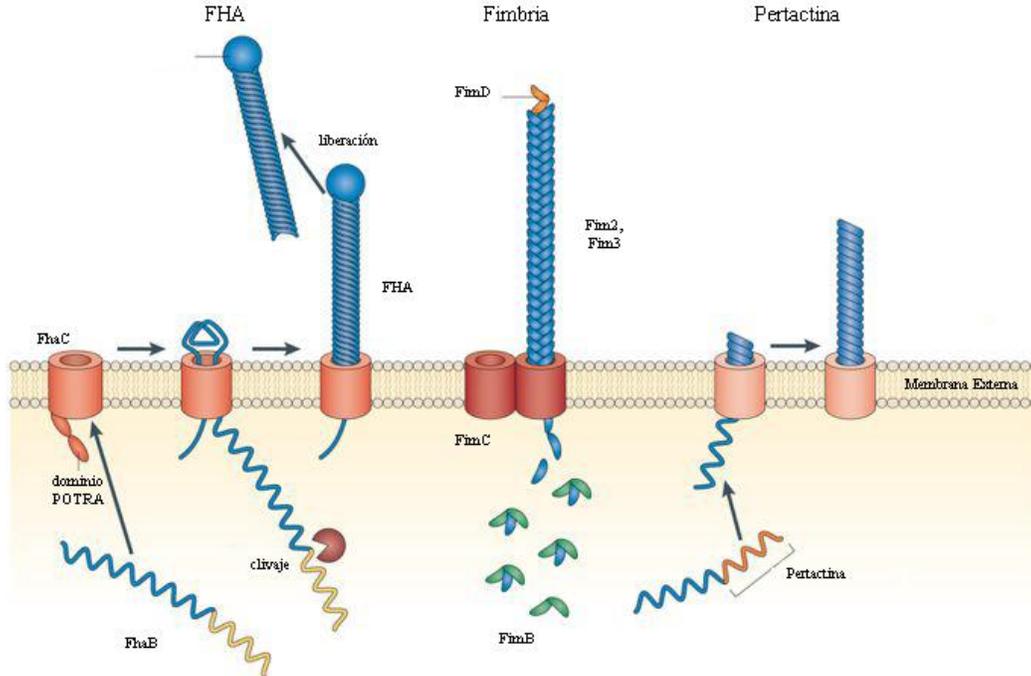


Figura 7. Presentación de FHA, fimbrias y pertactina en la superficie de *Bordetella*. Pertactina es un autotransportador clásico. La región C-terminal de 30 kDa (rojo) forma un canal en la membrana externa que se requiere para la translocación del dominio β -helicoidal de 70 kDa (azul) a la superficie celular. (b) FHA se transloca por la membrana externa a través de FhaC (rojo). El procesamiento durante la translocación elimina el dominio C-terminal (amarillo) de la proteína FhaB para producir la proteína FHA madura de 220 kDa. (c) FimB conduce las subunidades fimbriales principales (Fim2 o Fim3) a la membrana. FimB y FimC son necesarios para la secreción fimbrial y FimD (la subunidad de la punta) es necesario para el ensamblaje fimbrial (Fuente: Melvin et al. (2014) *Nat Rev Microbiol.*).

Otros autotransportadores del género *Bordetella* que han sido estudiados son BrkA, TcfA and Vag8. BrkA es otro autotransportador regulado por BvgAS y un antígeno asociado a la superficie celular de *B. pertussis* que evade los mecanismos bactericidas de la vía clásica del complemento [102]. El locus de *brk* codifica para dos marcos de lectura, *brkA* y *brkB*. El gen que codifica para BrkA también está presente en *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* pero es un pseudogen [32]. El autotransportador Vag8 es un factor de unión

al inhibidor de la esterasa C1. C1 es un componente de la cascada de complemento, por lo que la expresión de Vag8 confiere resistencia al suero en *B. pertussis* [103]. En el caso de *B. parapertussis*, Vag8 se encuentra codificada en el genoma pero su expresión no fue encontrada [103]. Curiosamente, ambos factores de virulencia de *B. pertussis* implicados en la resistencia al complemento (BrkA y Vag8) no se expresan por *B. parapertussis*.

Finalmente, cabe mencionar el autotransportador BapC. A partir de los datos del genoma de *Bordetella*, BapC se predijo como una proteína de 998 aminoácidos en *B. bronchiseptica* pero en *B. pertussis* Tohama I y *B. parapertussis* los productos se encontraron truncados con 102 y 100 aminoácidos, respectivamente, debido a corrimientos en los marcos de lectura. A pesar de ello, BapC se encontró expresada por *B. pertussis* [104]. Este autotransportador parece estar regulado por el sistema de dos componentes BvgAS, y su forma madura de 79 kDa presenta motivos RGD de unión a integrina, así como un motivo SGXG de unión a glicosaminoglicano. La posición del motivo RGD (aminoácidos 945–953) y SGXG (aminoácidos 1347–1358) sugiere que los sitios están realmente expuestos. En apoyo de esta posibilidad se ha observado que una mutante defectiva en BapC presenta una adhesión disminuida a ciertos tipos celulares por lo que BapC, podría ser una adhesina menor del género *Bordetella* [105]. Su función en *B. parapertussis* no ha sido aún estudiada.

Numerosos autotransportadores del género *Bordetella* y algunos de ellos solo de *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* continúan sin ser caracterizados, su estudio podría fortalecer el entendimiento de las bases moleculares de la patogénesis de estas bacterias.

1.5.6. Toxina Dermonecrótica (DNT)

La toxina dermonecrótica o DNT fue uno de los primeros factores de virulencia conocidos de *B. pertussis*, descrito por Bordet y Gengou en el año 1909. El nombre hace referencia a las lesiones características en la piel cuando es inyectada en animales como ratones, conejos y cobayo. La toxina se encuentra principalmente en el citoplasma de la bacteria [106]. La similitud entre DNT de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*, es muy alta [106]; está compuesta por un dominio N-terminal de unión al receptor y un dominio catalítico C-terminal. DNT causa cambios morfológicos en células osteoblásticas e incluso inhibe su diferenciación. Los cambios morfológicos resultan de la activación de pequeñas proteínas Rho con unión a GTP que son deaminadas por el dominio C-terminal de DNT [107,108] y que generan ensamblado de filamentos de actina y uniones focales. Además, DNT tiene actividad letal, vasoconstrictora y esplenotrófica.

1.5.7. LPS

El lipopolisacárido (LPS) es un glicolípido presente en la superficie de las bacterias gram negativas. Los LPS de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* tienen muchas similitudes estructurales en su lípido A. Sin embargo las características químicas e inmunológicas de los LPS de *B. pertussis* y *B. parapertussis* son diferentes [110,111]. Una de las diferencias más importantes es que *B. parapertussis* sintetiza cadenas de polisacáridos que consisten de un homopolímero de ácido 2,3-dideoxi-2,3-diN-acetilgalactosaminurónico (2,3-di- NAcGalA) [112] conocido con antígeno O, mientras que el LPS de *B. pertussis* no lo tiene. La razón de esta diferencia es que *B. parapertussis*, posee un operón denominado wbm que contiene 21 marcos de lectura, y es necesario para

la expresión de antígeno O [113]. A pesar de que *B. bronchiseptica* también expresa antígeno O [114], es posible que su rol durante la infección sea distinto, ya que una mutante defectiva en antígeno O de *B. parapertussis* tiene una capacidad mucho menor de colonizar tráquea y pulmón de ratón, mientras que ninguna diferencia se observó en *B. bronchiseptica* [115].

Se ha especulado que la diferencia entre los dos patógenos humanos (*B. pertussis* y *B. parapertussis*) derivados de un ancestro común similar a *B. bronchiseptica*, en dos eventos independientes se deba a las diferencias evolutivas y temporales de la aparición de ambas especies, mencionadas anteriormente en esta introducción. Los núcleos de los LPS de las tres especies se conservan con respecto a su composición de azúcares y disposiciones. Pero el núcleo del LPS de *B. parapertussis* se diferencia de los LPS de *B. pertussis* en dos aspectos. En primer lugar, no tiene el trisacárido distal que da lugar a la banda A que se observa en SDS-PAGE del LPS de *B. pertussis* [116]. *B. parapertussis* tiene el locus *wlb*, encargado de la biosíntesis de dicho trisacárido, por lo que la ausencia no se debe a la falta de los genes necesarios, aunque podría deberse a una mutación puntual en el gen *wlbH* [117]. El núcleo del LPS de *B. parapertussis* se diferencia también en que no tiene la heptosa terminal y la GalNA terminal [118]. La base molecular de estas diferencias aún se desconoce pero dado que ésta es una molécula muy inmunogénica estas diferencias podría ser consecuencia de mecanismos de inmunoselección durante la evolución de esta especie. Cabe señalar que las diferencias en el LPS también derivan en diferentes capacidades de activar el sistema inmune. Se ha observado que el LPS de *B. parapertussis* es un estimulador muy pobre de TLR4 en comparación con el LPS de *B. pertussis*, lo cual podría estar relacionado con su persistencia en el hospedador [119].

Si bien el LPS es una endotoxina expresada constitutivamente, algunos de los factores que lo modifican sí están regulados por BvgAS, sugiriendo que hay diferencias en la estructura del mismo dependiendo de la fase. Por ejemplo, PagP es una palmitoil transferasa de lípido A regulada por Bvg y que solo se encuentra en *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* [120,121]. Un patrón de movilidad diferente también fue observado para el antígeno O dependiendo de la fase de virulencia y podría deberse a una diferente expresión del gen wbmE [122]. También hay evidencia de que mecanismos post-transcripcionales podrían estar involucrados en la modificación de LPS en respuesta a diferentes efectores ambientales [123,124].

El antígeno O no pareciera ser esencial para la infección de humanos por *Bordetella*, como lo demuestra su ausencia en cepas de *B. pertussis*, pero el mantenimiento del antígeno O por parte de *B. parapertussis* puede haberle permitido emerger y persistir en una población en la que *B. pertussis* ya circulaba. Esta teoría está sustentada por múltiples trabajos llevados a cabo por el grupo de Eric Harvill y nuestro grupo [12,14,15,125,126]. En primer lugar, el antígeno O está relacionado con la falta de inmunidad cruzada entre las infecciones de *B. pertussis* y *B. parapertussis*, básicamente porque apantalla las estructuras antigénicas comunes a ambas especies presentes en superficie de *B. parapertussis* [12]. Este apantallamiento puede conferirle una ventaja selectiva a *B. parapertussis* circulando en poblaciones humanas en las cuales existe inmunidad contra *B. pertussis* [127]. Por otro lado, se observó que el antígeno O evita la deposición de C3 en la superficie de la bacteria, protegiendo así a *B. parapertussis* de la acción bactericida del complemento [128]. Curiosamente *B. pertussis* tiene una serie de factores de virulencia ya mencionados que tienen también dicha capacidad y que no se han conservado en *B. parapertussis*.

Al apantallar los antígenos de superficie bacteriana comunes a ambas especies el antígeno O protege a *B. parapertussis* de la acción de los anticuerpos inducidos por infección con *B. pertussis* y por vacunas formuladas únicamente con antígenos de *B. pertussis* (como es el caso de todas las vacunas en uso) previniendo la opsonofagocitosis mediada por anticuerpos y la eliminación mediada por anticuerpos *in vivo*. La opsonofagocitosis mediada por anticuerpos es crítica para inducir actividad bactericida en las células inmunes del hospedador. Según resultados de nuestro grupo [14,15,126] en ausencia de anticuerpos opsonizantes, la captura de *B. parapertussis* por neutrófilos y macrófagos es muy baja, no hay activación celular. Las pocas bacterias que son fagocitadas en ausencia de anticuerpos opsonizantes no siguen un tránsito bactericida ya que *B. parapertussis* es capaz de inhibir la fusión fagolisosomal y sobrevivir en localización intracelular, dando origen a eventuales nichos de persistencia intracelular [14,15]. En ausencia de anticuerpos opsonizantes la interacción de *B. parapertussis* con neutrófilos no induce tampoco actividad bactericida extracelular ya que no hay degranulación ni formación de NETs [126]. El antígeno O está involucrado en estos mecanismos de inhibición es la acción bactericida de las principales células de defensa en huéspedes no inmunes

Se cree que el operón necesario para la síntesis de antígeno O fue adquirido a través de transferencia horizontal por el ancestro común y se ha modificado mediante recombinación homóloga en las distintas especies. Debido a que este mecanismo parece haber sido muy poco frecuente en la evolución de los genomas de las bacterias del género *Bordetella*, podría ser el resultado de una fuerte presión selectiva para escapar de la inmunidad generada contra las especies más antiguas [34].

1.5.8. Sistemas de Captura de Hierro

Los patógenos de mamífero se enfrentan a la escasez de hierro libre dentro de sus respectivos hospedadores. El hierro es un elemento vital por su papel en los procesos celulares que van desde la generación de energía y la replicación del ADN hasta el transporte de oxígeno y la protección contra el estrés oxidativo. Uno de los mecanismos de defensa de los mamíferos, conocido como inmunidad nutricional, es la captura del hierro a través de la acción de proteínas de unión a dicho metal, como la transferrina y la lactoferrina, y otros mecanismos cuyo objetivo es la deprivación de hierro libre. La mayoría de las bacterias requieren concentraciones micromolares de hierro para su crecimiento [129,130]. Por la acción de las proteínas mencionadas la concentración de hierro libre en los fluidos corporales de mamíferos se estima en menos de 10^{-18} M. En este contexto es que los mecanismos bacterianos de alta afinidad de captura de hierro se consideran factores de virulencia. Hay diferentes tipos de sistemas bacterianos de captura de hierro, entre ellos los más comunes son los receptores de transferrina, lactoferrina o hemo, la secreción de quelantes de hierro de bajo peso molecular denominados sideróforos que pueden remover el hierro de la transferrina o lactoferrina y transferirlo a las bacterias [131]. Las bacterias, además de producir sideróforos y sus transportadores afines, pueden producir receptores y transportadores que permiten la utilización de sideróforos de otras bacterias, llamados xenosideróforos [132]. En las bacterias gram negativas, los receptores de membrana externa dependen de TonB para la transferencia de hierro al periplasma, seguido del transporte al citoplasma mediante transportadores de tipo ABC. El hierro inorgánico en el periplasma se transporta al citoplasma mediante transportadores de membrana.

Los genomas de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* tienen 12, 11 y 16 genes para transportadores dependientes de TonB, respectivamente. Las especies

adaptadas al humano han perdido algunos de estos transportadores o se han convertido en pseudogenes, por lo que se puede asumir que algunos de estos sistemas de transporte de hierro afectan a la amplitud de ambientes o nichos en que las bacterias pueden sobrevivir [32].

La captación de hierro en bacterias está controlada por el regulador fur (*ferric uptake repressor*). Cuando Fur tiene hierro unido como cofactor, se une a secuencias consenso conocidas como cajas fur para bloquear la expresión génica de sistemas de transporte de hierro. Debido a que la actividad de este regulador depende de la cantidad de hierro, se podría decir que, a través de la acción de Fur, el hierro participa directamente en el control genético de su propia asimilación. Sin embargo, Fur puede bloquear la expresión de otras proteínas no relacionadas con la adquisición de hierro y también tiene capacidad de inducir la expresión de diversos genes [134–137].

Al igual que las otras dos especies del género *Bordetella*, *B. parapertussis* produce el sideróforo alcaligina y receptores de xenosideróforos, que le permiten capturar hierro a través de sideróforos producidos por bacterias comensales o colonizadores temporales de la nasofaringe. La alcaligina es un sideróforo de hidroxamato similar a bisucaberina y putrebactina, que se une a hierro en una relación molar de 3:2 (Fe_2Alc_3). Este sideróforo es sintetizado por el operón *alcABCDEF* [138], a continuación del mismo se encuentran los genes *alcS*, del exportador de alcaligina, y el gen de la proteína receptora de FauA que se ubica en la membrana externa para el transporte de alcaligina férrica. El gen *alcR*, que codifica para el regulador positivo de la biosíntesis de alcaligina y las actividades de transporte, se ubica inmediatamente después de *alcABCDE*. En general, la transcripción se inicia en el promotor controlado por Fur inmediatamente aguas arriba de *alcA*, pero *alcR* también se transcribe a partir de un promotor secundario más débilmente regulado por Fur

ubicado inmediatamente aguas arriba de su propia región codificadora. Aunque los genes de biosíntesis de alcaligina en *Bordetella* son reprimibles por Fur, al igual que otros sistemas de biosíntesis de sideróforos, AlcR impone un nivel adicional de control que se requiere para la expresión completa del operón. Así la transcripción máxima del operón *alcABCDE* en condiciones de crecimiento con hierro y sin hierro depende del regulador AlcR y requiere la presencia de la alcaligina, que actúa como inductor. Además, se ha observado que la activación transcripcional de *alcABCDE* mediada por AlcR es muy sensible y, que responde a concentraciones extremadamente bajas de inductor [139] (Figura 8). La expresión de los genes involucrados en la síntesis de alcaligina se induce rápidamente durante la infección y es vital en estadios tempranos de la infección [140].

Entre los receptores de xenosideróforos encontrados en el género *Bordetella*, solo el sistema de captura de enterobactina ha sido estudiado en *B. pertussis*, pero no sería funcional en *B. parapertussis* debido a un cambio en el marco de lectura [141]. Pero ambas especies tienen también genes que codifican para múltiples receptores putativos de sideróforos con sustrato desconocido como BfrB, BfrC, BfrD, BfrF, BfrG, BfrH, y BfrI. BfrB y BfrC son similares a receptores de ferrisideróforos de tipo hidroxamato, son regulados por hierro y Bvg independientes [142]. Más estudios son necesarios para evaluar la especificidad y utilidad de todos estos receptores durante la infección.

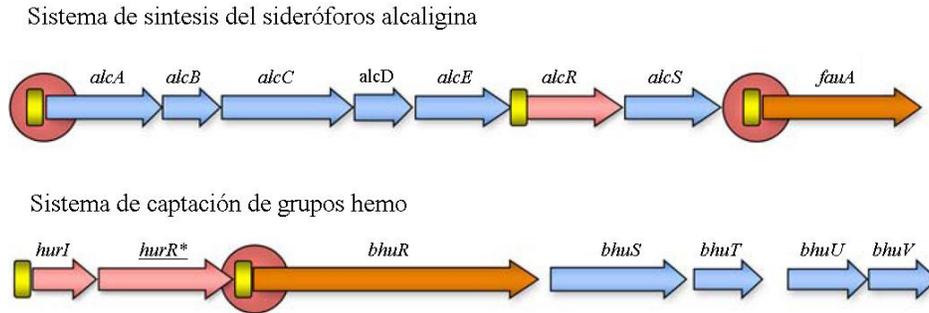


Figura 8. Organización genética de los sistemas de biosíntesis y utilización de alcalina, y hemo en *Bordetella*. Las flechas denotan los límites y la orientación transcripcional de los genes. Se muestran las ubicaciones de los sitios de unión de Fur (rectángulos), y los círculos representan regiones de control que responden al regulador positivo asociado y al inductor de la fuente de hierro. *hurR* es un pseudogen en *B. parapertussis* (Fuente: Brickamn et al. (2009) *Biometals*).

B. pertussis, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* también pueden utilizar hemina o hemoglobina como fuentes de hierro de manera tonB-dependiente. Esto se debe a la presencia de los genes *hurIR* y *bhuRSTUV* (Figura 8). Los genes de *bhu* de *Bordetella* codifican para homólogos de los sistemas de utilización de hemo conocidos por estudios en otros procariotas y están organizados genéticamente en forma similar a otros sistemas bacterianos de captación de hemo. Según la similitud de secuencias con los componentes de otros sistemas de utilización del hemo, BhuR es el receptor de la membrana externa para hemina, hemoglobina-haptoglobina, hemo-albúmina de suero y hemoglobina humana. Tiene un motivo TonB box C y el motivo de secuencia de aminoácidos FRAP / NPNL que se conserva entre los miembros de la familia de receptores de hemo bacterianos. Se supone que otras actividades de transporte son proporcionadas por la proteína de unión periplásmica específica de hemina BhuT, la proteína permeasa de membrana citoplasmática BhuU, y BhuV, funcionaría como la ATPasa requerida para el transporte de hemo a través de la membrana citoplásmica. BhuS es similar a las llamadas proteínas degradadoras de hemina. La expresión de *bhu* en *B. pertussis* se ve aumentada por la presencia de grupos

hemo en ausencia de hierro [143]. Los marcos de lectura abierta *hurIR* identificados aguas arriba de los genes *bhu* codifican para homólogos de la familia de proteínas reguladoras FecI de *E. coli*, que podría estar relacionado con una regulación transcripcional positiva del operón *bhu*. Se observó que la falta del receptor hemo *bhuR* determina un defecto en la colonización pero solo en estadios avanzados de la infección, lo que indica que la utilización del hemo contribuye poco a la supervivencia inicial de *B. pertussis*. Es posible que esto se deba a que el hemo no está disponible en el nicho al inicio de la infección, pero se hace accesible durante etapas más avanzadas de la infección, presumiblemente por la acción de otros factores de virulencia de *Bordetella* sobre células del hospedador. Esta hipótesis se ve sustentada por ensayos de expresión génica temporal *in vivo* que indican que la expresión de *bhuR* en *B. pertussis* es baja en los primeros estadios de la infección y aumenta con el correr de los días [140].

La adquisición de hierro a partir de grupos hemo no ha sido estudiada en *B. parapertussis*. Pero el análisis del genoma muestra la existencia de los mismos operones que en *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* y *B. avium*. La única diferencia es que *hurR*, posiblemente involucrado en el censado de grupos hemo y en los mecanismos regulatorios del operón *bhuRSTUV*, es un pseudogen. El gen ortólogo en *B. avium* (llamado *rhurR*), es un probable factor anti-sigma y un regulador negativo de la transcripción del operón *bhuRSTUV* en ausencia de grupos hemo [144], y no es necesario para la expresión de *BhuR* [145], por lo que es posible que la ausencia de *hurR* en *B. parapertussis* no afecte a su capacidad para captar grupos hemo.

1.6. Diagnóstico

El diagnóstico clínico de la tos convulsa se complica por la heterogeneidad en las manifestaciones de la enfermedad, la modificación del cuadro clínico por inmunización, las infecciones mixtas y el bajo índice de sospecha de tos convulsa entre muchos médicos [4,146]. El método estándar de laboratorio para el diagnóstico de *Bordetella* es el cultivo del organismo a partir de un hisopado nasofaríngeo. El cultivo rara vez se logra porque cuando aparecen los síntomas de la enfermedad la infección nasofaríngea se ha limitado pero es el *Gold Standard* del diagnóstico. Por esta razón se desarrolló el diagnóstico por PCR específica que hoy se usa de rutina y el cual se describe más adelante.

La infección por bacterias del género *Bordetella* también se puede determinar por diagnóstico serológico. Aunque títulos altos en una muestra de suero ha sido utilizado como diagnóstico de tos convulsa, el análisis pareado comparando muestras de suero de la fase aguda y de convalecencia es de mayor utilidad debido a su sensibilidad y especificidad [147,148]. Un alto título en suero de pacientes no vacunados sugiere una infección reciente. Pero la determinación no diferencia entre los anticuerpos resultantes de una infección natural y los que se producen debido a la vacunación, por lo que este método no puede ser usado en el año siguiente a la vacunación [149,150].

Comparado al cultivo, las técnicas de diagnóstico molecular han resultado mucho más sensibles [4] y pueden ser realizadas en forma más rápida que el diagnóstico por cultivo (que tarda hasta siete días) o el diagnóstico serológico [152]. Se utiliza PCR o PCR en tiempo real con cebadores específicos dirigidos a secuencias insercionales IS481 (presente en el genoma de *B. pertussis* y *B. holmesii*) e IS1001 (presente en el genoma de *B. parapertussis*). Esta técnica puede ser utilizada tanto en lavados nasofaríngeos como en aspirados y es la técnica recomendada por la Organización Mundial de la Salud para el

diagnóstico diferencial de *B. pertussis* y *B. parapertussis*. Esta técnica puede ser particularmente ventajosa entre los individuos recientemente vacunados y después de la vacunación, en los que el diagnóstico es frecuentemente tardío, la recuperación del microorganismo es rara y el diagnóstico serológico no es posible [153].

Entre las metodologías mencionadas, aparte del cultivo del agente causal, el diagnóstico molecular es el más indicado para la diferenciación entre *B. pertussis* y *B. parapertussis*. De cualquier forma, debido a que el tratamiento contra *B. pertussis* es también efectivo contra *B. parapertussis* [18], la discriminación de especie no se hace de rutina [154], por lo que es muy posible que el número de casos causados por esta especie esté subvalorado.

1.7. Vacunas

En la década de 1940 se desarrolló la primer vacuna de uso masivo a partir de células de *B. pertussis* inactivadas por calor, lo cual resultó en una drástica disminución de la incidencia de la enfermedad y una disminución de la morbilidad y mortalidad. En la era prevacunal, se observaban picos epidémicos cada 2 a 5 años. Después de la introducción de la vacuna y a pesar de la reducción drástica en la incidencia de la enfermedad, el carácter cíclico de la enfermedad no se modificó. Esta diferencia con otras enfermedades controladas por la inmunización se debe a que, si bien el número de casos reportados disminuyó, la bacteria continuó circulando por la población de manera similar que en la era prevacunal en adolescentes y adultos [155]. En ellos, la infección se manifiesta como tos prolongada, que muchas veces no es diagnosticada [147]. Esta infección de adultos vacunados se debe a que la duración de la inmunidad conferida por inmunización es relativamente corta [147]. La vacuna celular no se puede usar para dar refuerzos a adultos

porque las reacciones adversas asociadas a la presencia de LPS en estas vacunas son muy severas en este rango etario [74,156,157].

Hacia la década de 1970s, la atención se centró en los efectos secundarios asociados a la inmunización con vacuna acelular en niños. Un estudio llevado a cabo en Reino Unido a finales de la década del 70 para evaluar las enfermedades neurológicas agudas en niños entre 2 y 26 meses, encontró una fuerte correlación entre el daño cerebral y la vacunación con vacuna celular contra la tos convulsa [158]. Aunque posteriormente se aseguró que la asociación era causal y que no había evidencia para sostener ese vínculo [159], Inglaterra y otros países del mundo dejaron de vacunar. Esto derivó en la mayor epidemia de pertussis desde la era pre-vacunal, lo cual llevó al desarrollo de las vacunas acelulares formuladas con antígenos purificados y libres de LPS. La primera vacuna acelular (aP) contra la tos convulsa se desarrolló en Japón en 1981 [160]. Las formulaciones actuales contienen entre dos y cinco de los siguientes antígenos purificados por separado: toxina pertussis, hemaglutinina filamentosa, pertactina y fimbrias 2 y 3 [74]. Todos ellos codificados en los genomas tanto de *B. pertussis* como de *B. parapertussis*, a excepción de la toxina pertussis solo expresada por *B. pertussis*. Las vacunas difieren entre sí en cuanto a número y cantidad de componentes del antígeno, pero también con respecto la cepa de *B. pertussis* utilizada para la producción de antígeno primario, los métodos de purificación y detoxificación, los adyuvantes incorporados y el uso de conservantes [149]. Los países centrales fueron reemplazando las vacunas celulares por la acelulares en sus planes de vacunación. La introducción de estas vacunas, menos reactogénicas pero también menos eficaces, incluso contra *B. pertussis* [161] condujo a un aumento sostenido de la incidencia de la tos convulsa que llevó a la OMS a declararla como enfermedad reemergente en la década del 90. Esta reemergencia se detectó primero en los países desarrollados con

vigilancia activa de la tos convulsa y con esquemas de vacunación que incluían la vacuna acelular pero más tarde se observó que lo mismo estaba ocurriendo en todas partes del mundo incluso en Argentina. Otra de las consecuencias graves observadas luego de la introducción de la vacuna acelular fue la detección de un aumento sostenido en la incidencia de *B. parapertussis* en los casos de tos convulsa [162]. Trabajos de nuestro grupo de investigación y de otros demostraron que si bien la vacuna celular contra *B. pertussis* induce cierto grado de protección contra *B. parapertussis*, tal vez debido a los anticuerpos dirigidos contra el LPS, las vacunas acelulares formuladas con antígenos purificados de *B. pertussis* inducen muy poca protección, o ninguna según algunos estudios, contra *B. parapertussis* [163]. Esto último está asociado a la divergencia antigénica entre especies [75] sumado al apantallamiento que ejerce el antígeno O sobre los antígenos de la superficie bacteriana [127].

Otra causa asociada a la menor eficacia de las vacunas acelulares es el tipo de respuesta inmune [164]. Mientras que la respuesta a la vacuna celular (y a la infección) es una respuesta Th17/Th1, las vacunas acelulares dan una respuesta fundamentalmente Th2 [165]. Los anticuerpos inducidos por la vacunación con vacuna acelular previenen los síntomas, pero no la colonización [165]. Una respuesta con contribución Th17/Th1 es necesaria para eliminar a la bacteria, previene la infección y la enfermedad, y confiere protección por más tiempo [164]. La necesidad de una respuesta Th1 y Th17 está relacionada con la producción citoquinas como IFN- γ e IL-17 y el desarrollo de inmunidad celular, imprescindible para prevenir el establecimiento de nichos intracelulares de persistencia y la continua circulación de la bacteria en la población

En este contexto, a pesar de la amplia cobertura de vacunación, la tos convulsa sigue siendo un problema de salud pública considerable. En las últimas décadas, las tasas

de infección han aumentado notablemente en los países industrializados, alcanzando en los Estados Unidos su máximo en 60 años en 2012 [164,169],

La reemergencia de la tos convulsa también afectó a Argentina. Por lo que al programa de vacunación original que incluye una dosis de vacuna celular a los 2, 4 y 6 meses de edad, un refuerzo entre los 15 y 18 meses y un segundo refuerzo entre los 5 y 6 años de edad, se agregaron dosis de refuerzo en la vida adulta. Hoy se sabe que los reservorios son los adultos que infectan a los más susceptibles, los recién nacidos. Por esta razón el Ministerio de Salud agregó una dosis de refuerzo con vacuna acelular a los 11 años, a las embarazadas, a las personas que estén en contacto con bebés prematuros o de bajo peso al nacer (menos de 1500 gramos) y a los trabajadores de salud todos ellos con vacuna acelular.

Sin embargo todas estas medidas solo controlan la tos convulsa causada por *B. pertussis*. Pocos datos sobre la epidemiología de *B. parapertussis* han sido publicados. En épocas previas a la incorporación de las vacunas, *B. parapertussis* había sido aislada en California, Michigan, Nueva York, Inglaterra, Francia, Checoslovaquia, Bulgaria, Dinamarca, México, Chile, Australia, Japón, España, Portugal, Hungría, Yugoslavia y Finlandia [4]. Los datos disponibles de Dinamarca permiten estimar la tasa anual de casos de *B. parapertussis* para el período de 1950-1957 como de 73 cada 100000 personas por año, mientras que para *B. pertussis* en ese mismo período fue de 1569 cada 100000 personas por año [191,192]. En forma bastante similar Eldering estudió los aislados clínicos del área de Michigan entre 1935 y 1950 y encontró que, solo un 2,4% eran *B. parapertussis* [193]. Resultados análogos fueron encontrados en otros lugares como Italia, Suecia y Alemania [4,18]. Pero en aquellos países en que se reemplazó la vacuna celular por la acelular se observaron cambios importantes en la incidencia de *B. parapertussis*,

cuyas infecciones se volvieron más frecuentes que las previamente documentadas [162] [194].

1.8. Nuevas vacunas

En los últimos años, muchos enfoques distintos fueron aplicados en la búsqueda de mejorar las estrategias inmunopreventivas contra la tos convulsa, fundamentalmente tratando de mejorar la protección de las vacunas acelulares. Uno de los primeros antígenos estudiados fue BrkA. La selección de esta proteína como candidato vacunal se debió a la observación de que una cepa de *B. pertussis* mutante de *brkA*, tiene un defecto en la colonización [170], Este inmunógeno sin embargo no generó la protección esperada [172]. Otra vacuna impulsada en los últimos años es la vacuna de bacterias inactivadas BPZE1 [175]. La misma fue desarrollada mediante la inactivación de tres toxinas esenciales para la virulencia: PT, citotoxina traqueal (TCT), y DNT [175]. PT es enzimáticamente inactivada por una mutación puntual, TCT, mediante el reemplazo del gen *ampG* por el *ampG* de *E. coli* y DNT, por una delección del gen completo. Esta vacuna se administra por vía intranasal sin el agregado de adyuvantes e induce una respuesta inmune de mucosa y también sistémica. La cepa coloniza el tracto respiratorio del ratón por el mismo período de tiempo que la cepa salvaje, pero parece estar muy atenuada como lo demuestran los estudios histopatológicos[175]. Una única administración nasal de esta cepa protege a ratones contra el desafío con *B. pertussis* virulenta mejor que dos administraciones de vacuna acelular; y también tiene la capacidad de proteger contra la enfermedad en modelos de infección de babuinos [176]. Además, a diferencia de lo que fue reportado para las vacunas acelulares actualmente en uso, BPZE1 proporciona protección contra la infección

por *B. parapertussis*, que [175]. La vacunación con BPZE1 activa a linfocitos T CD4+ polarizando a un perfil Th1 y Th17. La protección que confiere la vacunación con BPZE1 contra *B. parapertussis* depende de la activación de estos linfocitos [177] y confiere una larga duración de protección en ratones. La vacuna BPZE1 ya fue también testada en fase I en humanos y se observaron aumentos significativos en las respuestas inmunes contra los antígenos en todos los sujetos colonizados. Sin embargo, esta vacuna aún no es completamente aceptada en la comunidad científica como la mejor y más segura opción.

Otra propuesta fue la de emplear vesículas de membrana externa (OMV) de *B. pertussis* y de *B. parapertussis* como vacunas. Las OMVs contienen antígenos tales como BrkA, pertactina, FHA, y muchas otras proteínas que contribuyen a la respuesta inmune además de LPS [179] y, en el caso de *B. parapertussis*, antígeno O [180]. En modelos de infección murino, se encontró que las OMVs de *B. pertussis* protegen solo contra ella misma; mientras que las vesículas de *B. parapertussis* tienen la capacidad de proteger contra ambas especies y además son más seguras y menos tóxicas [181]. Sin embargo, la limitación de esta propuesta es que debido a la presencia de LPS en la formulación esta vacuna no podría usarse en adultos.

Finalmente, una aproximación recientemente explorada para mejorar las vacunas acelulares contra *B. pertussis* es el cambio de adyuvante. Las vacunas acelulares actuales son administradas con hidróxido de aluminio como adyuvante, e inducen principalmente una respuesta tipo Th2 y Th17, y una débil respuesta Th1. La reducción de la carga bacteriana es principalmente mediada por el reclutamiento de células a los pulmones asociado a las células Th17. La inmunidad protectora inducida por la vacuna acelular podría mejorarse sustituyendo el hidróxido de aluminio con un agonista TLR que induce una respuesta de tipo Th1 [182]. Por ejemplo, la formulación de la vacuna acelular con un

nuevo adyuvante basado en un agonista del receptor TLR7 (TLR7a) o con CpG (un agonista de TLR9) mejoró la protección contra *B. pertussis* conferida por la vacuna acelular [182,183]. Otro posible adyuvante evaluado para mejorar la respuesta inmune generada por la vacuna acelular es BcfA (*Bordetella colonization factor A*) [184]. BcfA es una proteína de membrana externa de *B. bronchiseptica* (no codificada en los genomas de *B. pertussis* ni *B. parapertussis*) que puede ser utilizado como adyuvante debido a que genera una respuesta inmune celular y humoral contra antígenos tanto heterólogos como de *B. pertussis*. Su agregado a las vacunas acelulares comerciales resulta en una mayor reducción en la carga bacteriana de *B. pertussis* en comparación con la vacuna comercial [185].

En el año 2007, nuestro grupo comenzó a trabajar en la búsqueda de nuevos candidatos vacunales. Con el fin de encontrar antígenos expresados por la bacteria infectante, se abordó la caracterización del fenotipo de *B. pertussis* inducido por el estrés más importante que los patógenos de mamíferos enfrentan *in vivo*, la limitación en hierro. Se empleó proteómica comparativa y seroproteómica para identificar aquellas proteínas inducidas por limitación de hierro que fueran reconocidas por sueros de individuos infectados. [186]. De esta manera, se identificaron dos proteínas que reaccionan con dichos sueros y que se localizan en la superficie celular denominadas AfuA e IRP1-3 [186]. Ambas proteínas se encuentran conservadas en todos aislados clínicos de *B. pertussis* analizados, son inductoras de anticuerpos con actividad opsonizante y que promueven la fagocitosis de la bacteria por células polimorfonucleares humanas [187,188]. Ambos antígenos probaron inducir protección contra *B. pertussis* en formulaciones monovalentes y de aumentar la protección de las vacunas comerciales en modelos murinos [187,188], y están actualmente en evaluación preclínica en modelos babuinos..El análisis del genoma de *B. parapertussis* muestra que existen secuencias codificantes para proteínas ortólogas de

ambos antígenos con un alto porcentaje de similitud de secuencia, por lo que podrían proteger también contra esta especie,.

1.9. Objetivos de este trabajo

Como se menciona más arriba, la tos convulsa es una enfermedad respiratoria aguda considerada reemergente debido al sostenido incremento de casos en las últimas décadas. Esta enfermedad tiene dos agentes causales, *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*. *B. parapertussis* es un patógeno relativamente poco estudiado, que ha cobrado relevancia debido al aumento sostenido de la incidencia de esta especie en los casos de tos convulsa luego de la introducción de la vacuna acelular que no brinda protección contra *B. parapertussis* a pesar de estar formuladas con antígenos comunes a ambas especies [200]. Hay al menos dos posibles razones para la falta de protección cruzada. Una es la presencia del antígeno O en la superficie de *B. parapertussis* (ausente en *B. pertussis*) [127], que interfiere con el reconocimiento de los antígenos expuestos en la superficie de la bacteria y la otra es la divergencia antigénica entre las dos especies [75].

En el contexto de reemergencia actual con el aumento de incidencia de *B. parapertussis*, el control de la tos convulsa requiere de estrategias preventivas que brinden protección contra ambos agentes causales. En este contexto el trabajo que se presenta a continuación tuvo como objetivo avanzar en el conocimiento de las bases de la patogénesis *B. parapertussis* y en la búsqueda de candidatos vacunales protectores contra esta especie.

1.10. Bibliografia

- [1] R.E. Black, S. Cousens, H.L. Johnson, J.E. Lawn, I. Rudan, D.G. Bassani, P. Jha, H. Campbell, C.F. Walker, Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis, *Lancet*. 375 (2008) 1969–1987. doi:10.1016/S0140-6736(10)60549-1.
- [2] Y. Liang, A.M. Salim, W. Wu, P.E. Kilgore, Chao Yuanfang: Imperial Physician of the Sui Dynasty and an Early Pertussis Observer?, *Open Forum Infect. Dis.* 3 (2016) ofw017. doi:10.1093/ofid/ofw017.
- [3] A. Aslanabadi, K. Ghabili, K. Shad, M. Khalili, M.M. Sajadi, Emergence of whooping cough: notes from three early epidemics in Persia, *Lancet Infect. Dis.* 15 (2015) 1480–1484. doi:10.1016/S1473-3099(15)00292-3.
- [4] S. Mattoo, J.D. Cherry, Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies, *Clin. Microbiol. Rev.* 18 (2005) 326–382. doi:10.1128/CMR.18.2.326.
- [5] A.A. Weiss, E.L. Hewlett, Virulence factors of *bordetella pertussis*, *Annu. Rev. Immunol.* 40 (1986) 661–686.
- [6] W.M. van den Akker, The filamentous hemagglutinin of *Bordetella parapertussis* is the major adhesin in the phase-dependent interaction with NCI-H292 human lung epithelial cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252 (1998) 128–33. doi:10.1006/bbrc.1998.9610.
- [7] L. Coutte, S. Alonso, N. Reveneau, E. Willery, B. Quatannens, C. Loch, F. Jacob-Dubuisson, Role of Adhesin Release for Mucosal Colonization by a Bacterial Pathogen, *J. Exp. Med.* 197 (2003) 735–742. doi:10.1084/jem.20021153.
- [8] G. Fedele, M. Bianco, C.M. Ausiello, The virulence factors of *bordetella pertussis*: Talented modulators of host immune response, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 61 (2013) 445–457. doi:10.1007/s00005-013-0242-1.
- [9] C.L. Weingart, a a Weiss, *Bordetella pertussis* virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils., *Infect. Immun.* 68 (2000) 1735–9. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=97341&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [10] K.E. Luker, J.L. Collier, E.W. Kolodziej, G.R. Marshall, W.E. Goldman, *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin and other muramyl peptides: distinct structure-activity relationships for respiratory epithelial cytopathology, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 (2006) 2365–2369. doi:10.1073/pnas.90.6.2365.
- [11] E.L. Hewlett, D.L. Burns, P.A. Cotter, E.T. Harvill, T.J. Merkel, C.P. Quinn, E.S. Stibitz, Pertussis pathogenesis-what we know and what we don't know, *J. Infect. Dis.* 209 (2014) 982–985. doi:10.1093/infdis/jit639.
- [12] D.N. Wolfe, E.M. Goebel, O.N. Bjornstad, O. Restif, E.T. Harvill, The O antigen enables *Bordetella parapertussis* to avoid *Bordetella pertussis*-induced immunity, *Infect. Immun.* 75 (2007) 4972–4979. doi:10.1128/IAI.00763-07.
- [13] J. Toubiana, S. Azarnoush, V. Bouchez, A. Landier, S. Guillot, S. Matczak, S. Bonacorsi, S. Brisse, *Bordetella parapertussis* Bacteremia: Clinical Expression and

- Bacterial Genomics, *Open Forum Infect. Dis.* 6 (2019) ofz122.
doi:10.1093/ofid/ofz122.
- [14] J. Gorgojo, Y. Lamberti, H. Valdez, E.T. Harvill, M.E. Rodriguez, *Bordetella parapertussis* Survives the Innate Interaction with Human Neutrophils by Impairing Bactericidal Trafficking inside the Cell through a Lipid Raft-Dependent Mechanism Mediated by the Lipopolysaccharide O Antigen, *Infect. Immun.* 80 (2012) 4309–4316. doi:10.1128/IAI.00662-12.
- [15] J. Gorgojo, E.T. Harvill, M.E. Rodríguez, *Bordetella parapertussis* Survives inside Human Macrophages in Lipid Raft-Enriched Phagosomes, *Infect. Immun.* 82 (2014) 5175–5184. doi:10.1128/IAI.02553-14.
- [16] W.E. Zuelzer, Wolf W., Wheeler, Parapertussis pneumonia: report of two fatal cases, *J. Pediatr.* 29 (1946) 493–497.
- [17] M. V Pinto, T.J. Merkel, Pertussis disease and transmission and host responses : insights from the baboon model of pertussis, *J. Infect.* 74 (2017) S114–S119. doi:10.1016/S0163-4453(17)30201-3.
- [18] P. Mastrantonio, P. Stefanelli, M. Giuliano, Y.H. Rojas, M.C. Degli Atti, A. Anemona, A.E. Tozzi, *Bordetella parapertussis* infection in children: Epidemiology, clinical symptoms, and molecular characteristics of isolates, *J. Clin. Microbiol.* 36 (1998) 999–1002.
- [19] C.H.W. Von Knig, H. Finger, Role of Pertussis Toxin in Causing Symptoms of *Bordetella parapertussis* Infection, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13 (1994) 455–458.
- [20] C.C. Linnemann, E.B. Perry, *Bordetella parapertussis* Recent Experience and a Review of the Literature, *Am. J. Dis. Child.* 131 (1977) 560–563.
- [21] H. Kamiya, N. Otsuka, Y. Ando, F. Odaira, S. Yoshino, K. Kawano, H. Takahashi, T. Nishida, Y. Hidaka, H. Toyozumi-ajisaka, K. Shibayama, K. Kamachi, T. Sunagawa, K. Taniguchi, N. Okabe, T. Study, D. Control, Transmission of *Bordetella Holmesii* during Pertussis Outbreak, Japan, *Emerg. Infect. Dis.* 18 (2012) 1166–1169.
- [22] P.A. Spears, L.M. Temple, D.M. Miyamoto, D.J. Maskell, P.E. Orndorff, Unexpected similarities between *Bordetella avium* and other pathogenic *bordetellae*, *Infect. Immun.* 71 (2003) 2591–2597. doi:10.1128/IAI.71.5.2591-2597.2003.
- [23] M.M. Kattar, J.F. Chavez, A.P. Limaye, S.L. Rassoulian-Barrett, S.L. Yarfitz, L.C. Carlson, Y. Houze, S. Swanzy, B.L. Wood, B.T. Cookson, Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the causative agent of fatal septicemia, *J. Clin. Microbiol.* 38 (2000) 789–794. doi:10.1086/301537.
- [24] E. Falsen, K. Kersters, K. Hinz, *Bordetella trematum* sp . nov ., Isolated from Wounds and Ear Infections in Humans, and Reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 4 (1996) 849–858.
- [25] J.F. Porter, K. Connor, W. Donachie, Isolation and characterization of *Bordetella parapertussis*-like bacteria from ovine lungs, *Microbiology.* 140 (1994) 255–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8180690>.
- [26] F. von Wintzingerode, A. Schattke, R.A. Siddiqui, U. Rösick, U.B. Göbel, R. Gross, *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (2001) 1257–1265. doi:10.1099/00207713-51-4-1257.
- [27] K.S. Ko, K.R. Peck, W.S. Oh, N.Y. Lee, J.H. Lee, New Species of *Bordetella*,

- Bordetella ansorpilii* sp. nov., Isolated from the Purulent Exudate of an Epidermal Cyst, *J. Clin. Microbiol.* 43 (2005) 2516–2519. doi:10.1128/JCM.43.5.2516-2519.2005.
- [28] N.K. Fry, J. Duncan, H. Malnick, P.M. Cockcroft, Case Report The first UK isolate of ‘*Bordetella ansorpilii*’ from an immunocompromised patient, *J. Med. Microbiol.* 56 (2007) 993–995. doi:10.1099/jmm.0.47078-0.
- [29] P. Gueirard, K. Le Blay, A. Le Coustumier, R. Chaby, N. Guiso, Variation in *Bordetella bronchiseptica* lipopolysaccharide during human infection, *FEMS Microbiol. Lett.* 162 (1998) 331–337. doi:10.1016/S0378-1097(98)00142-6.
- [30] W.L. Bradford, B. Slavin, An Organism Resembling *Hemophilus Pertussis*: With Special Reference to Color Changes Produced by Its Growth Upon Certain Media, *Am. J. Public Health Nations. Health.* 27 (1937) 1277–82.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1563421&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [31] G. Eldering, P. Kendrick, *Bacillus para-pertussis*: a species resembling both *Bacillus pertussis* and *Bacillus bronchisepticus* but identical with neither, *J. Bacteriol.* 35 (1938) 561–572.
- [32] J. Parkhill, M. Sebaihia, A. Preston, L.D. Murphy, N. Thomson, D.E. Harris, M.T.G. Holden, C.M. Churcher, S.D. Bentley, K.L. Mungall, A.M. Cerdeño-Tárraga, L. Temple, K. James, B. Harris, M. a Quail, M. Achtman, R. Atkin, S. Baker, D. Basham, N. Bason, I. Cherevach, T. Chillingworth, M. Collins, A. Cronin, P. Davis, J. Doggett, T. Feltwell, A. Goble, N. Hamlin, H. Hauser, S. Holroyd, K. Jagels, S. Leather, S. Moule, H. Norberczak, S. O’Neil, D. Ormond, C. Price, E. Rabinowitsch, S. Rutter, M. Sanders, D. Saunders, K. Seeger, S. Sharp, M. Simmonds, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, L. Unwin, S. Whitehead, B.G. Barrell, D.J. Maskell, Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*, *Nat. Genet.* 35 (2003) 32–40. doi:10.1038/ng1227.
- [33] A. Van Der Zee, F. Mooi, J. Van Embden, J. Musser, Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp.: Phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 6609–6617. doi:10.1128/JB.179.21.6609-6617.1997.
- [34] S.E. Hester, J. Park, L.L. Goodfield, H. a Feaga, A. Preston, E.T. Harvill, Horizontally acquired divergent O-antigen contributes to escape from cross-immunity in the classical *bordetellae*, *BMC Evol. Biol.* 13 (2013) 209. doi:10.1186/1471-2148-13-209.
- [35] D.A. Diavatopoulos, C.A. Cummings, L.M. Schouls, M.M. Brinig, D.A. Relman, F.R. Mooi, *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*, *PLoS Pathog.* 1 (2005) e45. doi:10.1371/journal.ppat.0010045.
- [36] O.N. Bjørnstad, E.T. Harvill, Evolution and emergence of *Bordetella* in humans, *Trends Microbiol.* 13 (2005) 355–359. doi:10.1016/j.tim.2005.06.007.
- [37] N. Hegerle, L. Rayat, G. Dore, N. Zidane, H. Bedouelle, N. Guiso, In-vitro and in-vivo analysis of the production of the *Bordetella* type three secretion system effector A in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*., *Microbes Infect.* 15 (2013) 399–408. doi:10.1016/j.micinf.2013.02.006.
- [38] J. Park, Y. Zhang, A.M. Buboltz, X. Zhang, S.C. Schuster, U. Ahuja, M. Liu, J.F.

- Miller, M. Sebahia, S.D. Bentley, J. Parkhill, E.T. Harvill, Comparative genomics of the classical *Bordetella* subspecies: the evolution and exchange of virulence-associated diversity amongst closely related pathogens, *BMC Genomics*. 13 (2012) 545. doi:10.1186/1471-2164-13-545.
- [39] J. Herrou, A.-S. Debie, E. Willery, G. Renaud-Mongénie, G. Renaud-Mongénie, C. Locht, F. Mooi, F. Jacob-Dubuisson, R. Antoine, Molecular evolution of the two-component system BvgAS involved in virulence regulation in *Bordetella*, *PLoS One*. 4 (2009) e6996. doi:10.1371/journal.pone.0006996.
- [40] G.M.D.E. Tejada, P.A. Cotter, U. Heininger, A. Camilli, B.J. Akerley, J.J. Mekalanos, J.F. Miller, Neither the Bvg- Phase nor the vrg6 Locus of *Bordetella pertussis* Is Required for Respiratory Infection in Mice, *Infect. Immun.* 66 (1998) 2762–2768.
- [41] Q. Chen, V. Ng, J.M. Warfel, T.J. Merkel, S. Stibitz, Activation of Bvg-Repressed Genes in *Bordetella pertussis* by RisA Requires Cross Talk from Noncooperonic Histidine Kinase RisK, *J. Bacteriol.* 199 (2017) 1–14.
- [42] V. Scarlato, B. Arico, A. Prugnola, R. Rappuoli, Sequential activation and environmental virulence genes in *Bordetella pertussis* regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*, *EMBO J.* 10 (1991) 3971–3975.
- [43] V. Scarlato, A. Prugnola, B. Aric, R. Rappuoli, Positive transcriptional feedback at the bvg locus controls expression of virulence factors in *Bordetella pertussis*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87 (1990) 6753–6757.
- [44] S.M. Kinnear, P.E. Boucher, S. Stibitz, N.H. Carbonetti, Analysis of BvgA Activation of the Pertactin Gene Promoter in *Bordetella pertussis*, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 5234–5241.
- [45] K. Moon, R.P. Bonocora, D.D. Kim, Q. Chen, J.T. Wade, S. Stibitz, M. Hinton, The BvgAS Regulon of *Bordetella pertussis*, *MBio.* 8 (2017) e01526-17.
- [46] T.O.D.J. Merkel, S. Stibitz, Identification of a Locus Required for the Regulation of bvg- Repressed Genes in *Bordetella pertussis*, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 2727–2736.
- [47] H. Jungnitz, N.P. West, M.J. Walker, G.S. Chhatwal, C.A. Guzman, A Second Two-Component Regulatory System of *Bordetella bronchiseptica* Required for Bacterial Resistance to Oxidative Stress, Production of Acid Phosphatase, and In Vivo Persistence, *Infect. Immun.* 66 (1998) 4640–4650.
- [48] L. Coutte, L. Huot, R. Antoine, S. Slupek, T.J. Merkel, Q. Chen, S. Stibitz, D. Hot, C. Locht, The multifaceted RisA regulon of *Bordetella pertussis*, *Sci. Rep.* 6 (2016) 32774. doi:10.1038/srep32774.
- [49] J. Novak, O. Cerny, A. Osickova, I. Linhartova, J. Masin, L. Bumba, P. Sebo, R. Osicka, Structure–Function Relationships Underlying the Capacity of *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin to Disarm Host Phagocytes, *Toxins (Basel)*. 9 (2017) 300. doi:10.3390/TOXINS9100300.
- [50] B.P. Guernonprez, N. Khelef, E. Blouin, P. Rieu, P. Ricciardi-castagnoli, N. Guiso, D. Ladant, C. Leclerc, The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18), *J. Exp. Med.* 193 (2001) 1035–1044.
- [51] V. Chenal-Francois, V. Caro, C. Boursaux-Eude, N. Guiso, Genomic analysis of the adenylate cyclase-hemolysin C-terminal region of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*, *Res. Microbiol.* 160 (2009) 330–336. doi:10.1016/j.resmic.2009.03.006.

- [52] A.M. Buboltz, T.L. Nicholson, M.R. Parette, S.E. Hester, J. Parkhill, E.T. Harvill, Replacement of adenylate cyclase toxin in a lineage of *Bordetella bronchiseptica*, *J. Bacteriol.* 190 (2008) 5502–5511. doi:10.1128/JB.00226-08.
- [53] V. Bouchez, T. Douché, M. Dazas, S. Delaplane, M. Matondo, J. Chamot-Rooke, N. Guiso, Characterization of Post-Translational Modifications and Cytotoxic Properties of the Adenylate-Cyclase Hemolysin Produced by Various *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* Isolates, *Toxins (Basel)*. 9 (2017) 304. doi:10.3390/toxins9100304.
- [54] A. Fukui-Miyazaki, H. Toshima, Y. Hiramatsu, K. Okada, K. Nakamura, Ak. Ishigaki, N. Shinzawa, H. Abe, Y. Horiguchi, The Eukaryotic Host Factor 14-3-3 Inactivates Adenylate Cyclase Toxins of *Bordetella bronchiseptica* and *B. parapertussis*, but Not *B. pertussis*, *MBio*. 9 (2018) 1–15. doi:10.1128/mBio.00628-18.
- [55] J. Mazar, P.A. Cotter, New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion, *Trends Microbiol.* 15 (2007) 508–515. doi:10.1016/j.tim.2007.10.005.
- [56] A.M. Makhov, J.H. Hannah, M.J. Brennan, B.L. Trus, E. Kocsis, J.F. Conway, P.T. Wingfield, M.N. Simon, A.C. Steven, Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*, *J. Mol. Biol.* 241 (1994) 110–124.
- [57] R.V. Romero, R. Osicka, P. Sebo, Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis* : a key adhesin with immunomodulatory properties?, *Future Microbiol.* 9 (2014) 1339–1360.
- [58] S.M. Prasad, Y. Yin, E.V.A. Rodzinski, H.R. Masure, Identification of a Carbohydrate Recognition Domain in Filamentous Hemagglutinin from *Bordetella pertussis*, *Infect. Immun.* 61 (1993) 2780–2785.
- [59] F.D. Menozzi, R. Mutombo, G. Renauld, C. Gantiez, J.H. Hannah, E. Leininger, M.J. Brennan, C. Loch, Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*, *Infect. Immun.* 62 (1994) 769–778. doi:10.1111/ace1.12309.
- [60] D. Relman, E. Tuomanen, S. Falkow, D.T. Golenbock, K. Saukkonen, S.D. Wright, Recognition of a Bacterial Adhesin by an Integrin: Macrophage CR3 Binds Filamentous Hemagglutinin of *Bordetella pertussis*, *Cell*. 61 (1990) 1375–1382.
- [61] B.Y. Ishibashi, S. Claus, D.A. Relman, *Bordetella pertussis* Filamentous Hemagglutinin Interacts with a Leukocyte Signal Transduction Complex and Stimulates Bacterial Adherence to Monocyte CR3 (CD11b/CD18), *J. Exp. Med.* 180 (1994) 1225–1233.
- [62] R.L. Friedman, K. Nordensson, L. Wilson, E.T. Akporiaye, D.E. Yocum, Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages, *Infect. Immun.* 60 (1992) 4578–85. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=258205&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [63] Y. Ishibashi, D.A. Relman, A. Nishikawa, Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: Possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and $\alpha 5\beta 1$ integrin, *Microb. Pathog.* 30 (2001) 279–288. doi:10.1006/mpat.2001.0432.
- [64] Y. Lamberti, J. Alvarez Hayes, M.L. Perez Vidakovics, M.E. Rodriguez, Cholesterol-dependent attachment of human respiratory cells by *Bordetella pertussis*, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 56 (2009) 143–150. doi:10.1111/j.1574-

695X.2009.00557.x.

- [65] I.R. Henderson, J.P. Nataro, Virulence functions of autotransporter proteins, *Infect. Immun.* 1843 (2014) 1466–1470. doi:10.1128/IAI.69.3.1231.
- [66] A. V Kajava, N. Cheng, R. Cleaver, M. Kessel, M.N. Simon, E. Willery, F. Jacob-dubuisson, C. Locht, A.C. Steven, Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins, *Mol. Microbiol.* 42 (2001) 279–292.
- [67] A. Preston, J. Parkhill, D.J. Maskell, The *Bordetellae*: Lessons from genomics, *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (2004) 379–390. doi:10.1038/nrmicro886.
- [68] R. Antoine, S. Alonso, D. Raze, L. Coutte, S. Lesjean, E. Willery, C. Locht, F. Jacob-Dubuisson, New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*, *J. Bacteriol.* 182 (2000) 5902–5. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=94716&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [69] E.I. Tuomanen, J. Nedelman, J.O. Hendley, E.L. Hewlett, Species specificity of *Bordetella* adherence to human and animal ciliated respiratory epithelial cells, *Infect. Immun.* 42 (1983) 692–695.
- [70] S. Guédin, E. Willery, J. Tommassen, E. Fort, H. Drobecq, C. Locht, F. Jacob-Dubuisson, Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 30202–30210. doi:10.1074/jbc.M005515200.
- [71] B. Clantin, A.-S. Delattre, P. Rucktooa, N. Saint, A.C. Méli, C. Locht, F. Jacob-Dubuisson, V. Villeret, Structure of the Membrane Protein FhaC: A Member of the Omp85-TpsB Transporter Superfamily, *Science* (80-.). 317 (2007) 957–961. doi:10.1126/science.1143860.
- [72] D. Menozzi, C. Gantiez, C. Locht, Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin, *FEMS Microbiol. Lett.* 78 (1991) 59–64.
- [73] E. Bergfors, B. Trollfors, J. Taranger, T. Lagergård, V. Sundh, G. Zackrisson, Parapertussis and pertussis: Differences and similarities in incidence, clinical course, and antibody responses, *Int. J. Infect. Dis.* 3 (1999) 140–146. doi:10.1016/S1201-9712(99)90035-8.
- [74] W.A. Keitel, L.R. Muenz, M.D. Decker, J.A. Englund, C.M. Mink, D.A. Blumberg, K.M. Edwards, A Randomized Clinical Trial of Acellular Pertussis Vaccines in Healthy Adults : Dose-Response Comparisons of 5 Vaccines and Implications for Booster Immunization, *J. Infect. Dis.* 180 (1999) 397–403.
- [75] N. Khelef, B. Danve, M.J. Quentin-Millet, N. Guiso, *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*: two immunologically distinct species, *Infect. Immun.* 61 (1993) 486–490. doi:10.1021/pr060681i.
- [76] W.L. Hazenbos, C.A. Geuijen, B.M. Van Den Berg, F.R. Mooi, R. Van Furth, *Bordetella pertussis* Fimbriae Bind to Human Monocytes via the Minor Fimbria Subunit FimD, *J. Infect. Dis.* 171 (1995) 924–929.
- [77] F.R. Mooi, W.H. Jawen, H. Brunings, H. Gielem, Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae, *Microb. Pathog.* 12 (1992) 127–135.
- [78] Q. Chen, K.B. Decker, P.E. Boucher, D. Hinton, S. Stibitz, Novel architectural features of *Bordetella pertussis* fimbrial subunit promoters and their activation by the

- global virulence regulator BvgA, *Mol. Microbiol.* 77 (2011) 1326–1340. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07293.x.Novel.
- [79] B. Riboli, P. Pedroni, A. Cuzzoni, G. Grandi, F. De Ferra, Expression of *Bordetella pertussis* fimbrial (fim) genes in *Bordetella bronchiseptica*: fimX is expressed at a low level and vir-regulated, *Microb. Pathog.* 10 (1991) 393–403.
- [80] R. Willems, A. Paul, Fimbrial phase variation in *Bordetella pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation, *EMBO J.* 9 (1990) 2803–2809.
- [81] K.B. Decker, T.D. James, S. Stibitz, D.M. Hinton, The *Bordetella pertussis* model of exquisite gene control by the global transcription factor BvgA, *Microbiology.* 158 (2012) 1665–1676. doi:10.1099/mic.0.058941-0.
- [82] A.R. Goringe, T.E. Vaughan, Expert Review of Vaccines *Bordetella pertussis* fimbriae (Fim): relevance for vaccines *Bordetella pertussis* fimbriae (Fim): relevance for vaccines, *Expert Rev. Vaccines.* 13 (2014) 1205–1214. doi:10.1586/14760584.2014.930667.
- [83] C.A.W. Geuijen, R.J.L. Willems, M. Bongaerts, J. Top, H. Gielen, F.R. Mooi, Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract, *Infect. Immun.* 65 (1997) 4222–4228.
- [84] R.J. Willems, C. Geuijen, H.G. van der Heide, G. Renauld, P. Bertin, W.M. van den Akker, C. Loch, F.R. Mooi, Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* fim/fha gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA., *Mol. Microbiol.* 11 (1994) 337–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8170396>.
- [85] E. V Scheller, J. a Melvin, A.J. Sheets, P. a Cotter, Cooperative Roles for Fimbria and Filamentous Hemagglutinin in *Bordetella* Adherence and Immune Modulation, *MBio.* 6 (2015) 1–11. doi:10.1128/mBio.00500-15.Editor.
- [86] V. Bouchez, N. Guiso, *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, vaccines and cycles of whooping cough, *Pathog. Dis.* 73 (2015) ftv055. doi:10.1093/femspd/ftv055.
- [87] L.J. Li, G. Dougan, P. Novotny, I.G. Charles, P.70 pertactin, an outer- membrane protein from *Bordetella parapertussis*: cloning, nucleotide sequence and surface expression in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 5 (1991) 409–417. doi:10.1111/j.1365-2958.1991.tb02123.x.
- [88] P. Emsley, I.G. Charles, N.F. Fairweather, N.W. Isaacs, Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin, *Nature.* 381 (1996) 90–92.
- [89] C. Boursaux-Eude, N. Guiso, Polymorphism of repeated regions of pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*, *Infect. Immun.* 68 (2000) 4815–4817. doi:10.1128/IAI.68.8.4815-4817.2000.
- [90] E. Leininger, M. Roberts, J.G. Kenimer, I.G. Charles, N.F. Fairweather, P. Novotny, M.J. Brennan, Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 38 (2003) 283–290. doi:10.1073/pnas.88.2.345.
- [91] P. Everest, J. Li, G. Douce, I. Charles, J. De Azavedo, S. Chatfield, G. Dougan, M. Roberts, Role of the *Bordetella pertussis* P.69/pertactin protein and the P.69/pertactin RGD motif in the adherence to and invasion of mammalian cells, *Microbiology.* 142 (1996) 3261–3268. doi:10.1099/13500872-142-11-3261.
- [92] S.M.M. Hellwig, M.E. Rodriguez, G. a M. Berbers, J.G.J. van de Winkel, F.R. Mooi, Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity, *J. Infect. Dis.* 188 (2003) 738–742. doi:10.1086/377283.

- [93] V. Bouchez, D. Brun, G. Dore, E. Njamkepo, N. Guiso, Bordetella parapertussis isolates not expressing pertactin circulating in France, *Clin. Microbiol. Infect.* 17 (2011) 675–682. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03303.x.
- [94] N. Hegerle, A.S. Paris, D. Brun, G. Dore, E. Njamkepo, S. Guillot, N. Guiso, Evolution of French Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis isolates: Increase of Bordetellae not expressing pertactin, *Clin. Microbiol. Infect.* 18 (2012) E340–E346. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03925.x.
- [95] N. Otsuka, H. Han, H. Toyozumi-ajisaka, Y. Nakamura, Y. Arakawa, Prevalence and Genetic Characterization of Pertactin-Deficient Bordetella pertussis in Japan, *PLoS One.* 7 (2012) e31985. doi:10.1371/journal.pone.0031985.
- [96] Q. He, Appearance of Bordetella pertussis Strains Not Expressing the Vaccine Antigen Pertactin in Finland, *Clin. Vaccine Immunol.* 19 (2012) 1703–1704. doi:10.1128/CVI.00367-12.
- [97] L.C. Pawloski, A.M. Queenan, P.K. Cassidy, A.S. Lynch, M.J. Harrison, W. Shang, M.M. Williams, K.E. Bowden, B. Burgos-Rivera, X. Qin, N. Messonnier, M.L. Tondella, Prevalence and Molecular Characterization of Pertactin-Deficient Bordetella pertussis in the United States, *Clin. Vaccine Immunol.* 21 (2014) 119–125. doi:10.1128/CVI.00717-13.
- [98] C.S. Inatsuka, Q. Xu, I. Vujkovic-Cvijin, S. Wong, S. Stibitz, J.F. Miller, P.A. Cotter, Pertactin is required for Bordetella species to resist neutrophil-mediated clearance, *Infect. Immun.* 78 (2010) 2901–2909. doi:10.1128/IAI.00188-10.
- [99] E.S. Hovingh, R. Mariman, L. Solans, D. Hijdra, H.-J. Hamstra, I. Jongerius, M. Van Gent, F. Mooi, C. Loch, E. Pinelli, Bordetella pertussis pertactin knock-out strains reveal immunomodulatory properties of this virulence factor, *Emerg. Microbes Infect.* 7 (2018). doi:10.1038/s41426-018-0039-8.
- [100] A. Safarchi, S. Octavia, L.D.W. Luu, C.Y. Tay, V. Sintchenko, N. Wood, H. Marshall, P. McIntyre, R. Lan, Pertactin negative Bordetella pertussis demonstrates higher fitness under vaccine selection pressure in a mixed infection model, *Vaccine.* 33 (2015) 6277–6281. doi:10.1016/j.vaccine.2015.09.064.
- [101] N. Hegerle, G. Dore, N. Guiso, Pertactin deficient Bordetella pertussis present a better fitness in mice immunized with an acellular pertussis vaccine, *Vaccine.* 32 (2014) 6597–6600. doi:10.1016/j.vaccine.2014.09.068.
- [102] R.C. Fernandez, A.A. Weiss, Cloning and Sequencing of a Bordetella-Pertussis Serum Resistance Locus, *Infect. Immun.* 62 (1994) 4727–4738. <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=7927748&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/uuid/46061385-4938-40EE-B5E7-426C958DAAD6>.
- [103] N. Marr, N.R. Shah, R. Lee, E.J. Kim, R.C. Fernandez, Bordetella pertussis autotransporter Vag8 binds human C1 esterase inhibitor and confers serum resistance, *PLoS One.* 6 (2011) e20585. doi:10.1371/journal.pone.0020585.
- [104] M. Noofeli, H. Bokhari, P. Blackburn, M. Roberts, J.G. Coote, R. Parton, BapC autotransporter protein is a virulence determinant of Bordetella pertussis, *Microb. Pathog.* 51 (2011) 169–177. doi:10.1016/j.micpath.2011.04.004.
- [105] H. Bokhari, I. Bilal, S. Zafar, BapC autotransporter protein of Bordetella pertussis is an adhesion factor, *J. Basic Microbiol.* 52 (2012) 390–396. doi:10.1002/jobm.201100188.
- [106] K.E. Walker, A.A. Weiss, Characterization of the dermonecrotic toxin in members

- of the Genus *Bordetella*, *Infect. Immun.* 62 (1994) 3817–3828.
doi:10.1002/jmri.25406.
- [107] M. Masuda, L. Betancourt, T. Matsuzawa, T. Kashimoto, T. Takao, Y. Shimonishi, Y. Horiguchi, Activation of Rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella* dermonecrotizing toxin, *EMBO J.* 19 (2000) 521–530.
- [108] G. Schmidt, U. Goehring, M. Lerm, K. Aktories, Identification of the C-terminal Part of *Bordetella* Dermonecrotic Toxin as a Transglutaminase for Rho GTPases, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 31875–31881.
- [109] P. Gueirard, N. Guiso, Virulence of *Bordetella bronchiseptica*: Role of adenylate cyclase-hemolysin, *Infect. Immun.* 61 (1993) 4072–4078.
doi:10.1529/biophysj.104.040634.
- [110] K. Amano, K. Fukushi, M. Watanabe, Biochemical and immunological comparison of lipopolysaccharides from *Bordetella* species, *J. Gen. Microbiol.* 136 (1990) 481–487. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2118165>.
- [111] A. El Hamidi, A. Novikov, D. Karibian, M.B. Perry, M. Caroff, Structural characterization of *Bordetella parapertussis* lipid A, *J. Lipid Res.* 50 (2009) 854–859.
doi:10.1194/jlr.M800454-JLR200.
- [112] J.L. Di Fabio, M. Caroff, D. Karibian, J.C. Richards, M.B. Perry, Characterization of the common antigenic lipopolysaccharide O-chains produced by *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*, *FEMS Microbiol. Lett.* 97 (1992) 275–281. doi:10.1016/0378-1097(92)90348-R.
- [113] A. Preston, A.G. Allen, J. Cadisch, R. Thomas, K. Stevens, C.M. Churcher, K.L. Badcock, J. Parkhill, B. Barrell, D.J. Maskell, Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *bordetellae*, *Infect. Immun.* 67 (1999) 3763–3767.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=96651&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [114] E. Vinogradov, M.S. Pepler, M.B. Perry, The structure of the nonreducing terminal groups in the O-specific polysaccharides from two strains of *Bordetella bronchiseptica*, *Eur. J. Biochem.* 7236 (2000) 7230–7236.
- [115] V.C. Burns, E.J. Pishko, A. Preston, D.J. Maskell, E.T. Harvill, Role of *Bordetella* O Antigen in Respiratory Tract Infection, *Infect. Immun.* 71 (2003) 86–94.
doi:10.1128/IAI.71.1.86.
- [116] A.G. Allen, R.M. Thomas, T. Joanna, D.J. Maskell, Molecular and functional analysis of the lipopolysaccharide biosynthesis locus *wlb* from *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*, *Mol. Microbiol.* 29 (1998) 27–38.
- [117] A. Preston, R. Thomas, D.J. Maskell, Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* *wlb* LPS biosynthesis locus, *Microb. Pathog.* 33 (2002) 91–95.
doi:10.1006/mpat.2002.0511.
- [118] A. Preston, B.O. Petersen, J.Ø. Duus, J. Kubler-Kielb, G. Ben-Menachem, J. Li, E. Vinogradov, Complete structures of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis* lipopolysaccharides, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 18135–44.
doi:10.1074/jbc.M513904200.
- [119] D.N. Wolfe, A.M. Buboltz, E.T. Harvill, Inefficient Toll-like receptor-4 stimulation enables *Bordetella parapertussis* to avoid host immunity., *PLoS One.* 4 (2009) e4280. doi:10.1371/journal.pone.0004280.
- [120] L.E. Hittle, J.W. Jones, a. M. Hajjar, R.K. Ernst, a. Preston, *Bordetella*

- parapertussis PagP Mediates the Addition of Two Palmitates to the Lipopolysaccharide Lipid A, *J. Bacteriol.* 197 (2015) 572–580. doi:10.1128/JB.02236-14.
- [121] A. Preston, E. Maxim, E. Toland, E.J. Pishko, E.T. Harvill, M. Caroff, D.J. Maskell, *Bordetella bronchiseptica* PagP is a Bvg-regulated lipid A palmitoyl transferase that is required for persistent colonization of the mouse respiratory tract, *Mol. Microbiol.* 48 (2003) 725–736.
- [122] J.D. King, E. Vinogradov, A. Preston, J. Li, D.J. Maskell, Post-assembly modification of *bordetella bronchiseptica* O Polysaccharide by a novel periplasmic enzyme encoded by *wbmE*, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 1474–1483. doi:10.1074/jbc.M807729200.
- [123] K. Moon, S. Gottesman, A PhoQ/P-Regulated small RNA Regulates Sensitivity of *Escherichia coli* to Antimicrobial Peptides, *Mol. Microbiol.* 74 (2010) 1314–1330. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06944.x.A.
- [124] G. Klein, S. Raina, Regulated Control of the Assembly and Diversity of LPS by Noncoding sRNAs, *Biomed Res. Int.* (2015). doi:10.1155/2015/153561.
- [125] X. Zhang, E.M. Goebel, M.E. Rodríguez, A. Preston, E.T. Harvill, The O antigen is a critical antigen for the development of a protective immune response to *Bordetella parapertussis*, *Infect. Immun.* 77 (2009) 5050–8. doi:10.1128/IAI.00667-09.
- [126] J. Gorgojo, E. Scharrig, R.M. Gómez, E.T. Harvill, M.E. Rodriguez, *Bordetella parapertussis* Circumvents Neutrophil Extracellular Bactericidal Mechanisms, *PLoS One.* 12 (2017) e0169936. doi:10.1371/journal.pone.0169936.
- [127] X. Zhang, M.E. Rodríguez, E.T. Harvill, O antigen allows *B. parapertussis* to evade *B. pertussis* vaccine-induced immunity by blocking binding and functions of cross-reactive antibodies, *PLoS One.* 4 (2009) e6989. doi:10.1371/journal.pone.0006989.
- [128] E.M. Goebel, D.N. Wolfe, K. Elder, S. Stibitz, E.T. Harvill, O antigen protects *Bordetella parapertussis* from complement, *Infect. Immun.* 76 (2008) 1774–80. doi:10.1128/IAI.01629-07.
- [129] M.L. Vasil, U.A. Ochsner, The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence, *Mol. Microbiol.* 34 (1999) 399–413.
- [130] K. Poole, G.A. McKay, Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome, *Front. Biosci.* 8 (2003) 661–686.
- [131] E. Pradel, N. Guiso, F.D. Menozzi, C. Locht, *Bordetella pertussis* TonB, a Bvg-independent virulence determinant, *Infect. Immun.* 68 (2000) 1919–1927. doi:10.1128/IAI.68.4.1919-1927.2000.
- [132] J.B. Neilands, Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 26723–26726. doi:10.1074/jbc.270.45.26723.
- [133] M. Lou Nicholson, B. Beall, Disruption of *tonB* in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis* prevents utilization of ferric siderophores, haemin and haemoglobin as iron sources, *Microbiology.* 145 (1999) 2453–2461. doi:10.1099/00221287-145-9-2453.
- [134] M.F. Fillat, The fur (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators, *Arch. Biochem. Biophys.* 546 (2014) 41–52. doi:10.1016/j.abb.2014.01.029.
- [135] V. Isabella, L.F. Wright, K. Barth, J.M. Spence, S. Grogan, C.A. Genco, V.L. Clark, V.L. Clark, cis- and trans-acting elements involved in regulation of *norB* (*norZ*), the gene encoding nitric oxide reductase in *Neisseria gonorrhoeae*, *Microbiology.* 154

- (2008) 226–239. doi:10.1099/mic.0.2007/010470-0.
- [136] S.A. Craig, C.D. Carpenter, A.R. Mey, E.E. Wyckoff, S.M. Payne, Positive Regulation of the *Vibrio cholerae* Porin OmpT by Iron and Fur, *J. Bacteriol.* 193 (2011) 6505–6511. doi:10.1128/JB.05681-11.
- [137] A. Nandal, C.C.O. Huggins, M.R. Woodhall, J. Mchugh, F. Rodríguez-quñones, M.A. Quail, J.R. Guest, S.C. Andrews, Induction of the ferritin gene (*ftnA*) of *Escherichia coli* by Fe⁺²-Fur is mediated by reversal of H-NS silencing and is RyhB independent, *Mol. Microbiol.* 75 (2010) 637–657. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06977.x.
- [138] H.Y. Kang, T.J. Brickman, F.C. Beaumont, S.K. Armstrong, Identification and characterization of iron-regulated *Bordetella pertussis* alcaligin siderophore biosynthesis genes, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 4877–4884. doi:10.1128/jb.178.16.4877-4884.1996.
- [139] T.J. Brickman, H.O.Y. Kang, S.K. Armstrong, Transcriptional Activation of *Bordetella* Alcaligin Siderophore Genes Requires the AlcR Regulator with Alcaligin as Inducer, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 483–489. doi:10.1128/JB.183.2.483.
- [140] T.J. Brickman, T. Hanawa, M.T. Anderson, R.J. Suhadolc, S.K. Armstrong, Differential expression of *Bordetella pertussis* iron transport system genes during infection, *Mol. Microbiol.* 70 (2008) 3–14. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06333.x.
- [141] B. Linz, Y. V. Ivanov, A. Preston, L. Brinkac, J. Parkhill, M. Kim, S.R. Harris, L.L. Goodfield, N.K. Fry, A.R. Goringe, T.L. Nicholson, K.B. Register, L. Losada, E.T. Harvill, Acquisition and loss of virulence-associated factors during genome evolution and speciation in three clades of *Bordetella* species, *BMC Genomics.* 17 (2016) 767. doi:10.1186/s12864-016-3112-5.
- [142] B. Beall, Two iron-regulated putative ferric siderophore receptor genes in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis*, *Res. Microbiol.* 143 (1998) 189–201. doi:10.1016/S0923-2508(98)80079-X.
- [143] C.K. Vanderpool, S.K. Armstrong, The *Bordetella bhv* Locus Is Required for Heme Iron Utilization, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 4278–4287. doi:10.1128/JB.183.14.4278.
- [144] C.K. Vanderpool, S.K. Armstrong, Heme-Responsive Transcriptional Activation of *Bordetella bhv* Genes, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 909–917. doi:10.1128/JB.185.3.909.
- [145] A.M.Y.E. Kirby, D.J. Metzger, E.R. Murphy, T.D. Connell, Heme Utilization in *Bordetella avium* Is Regulated by RhuI, a Heme-Responsive Extracytoplasmic Function Sigma Factor, *Infect. Immun.* 69 (2001) 6951–6961. doi:10.1128/IAI.69.11.6951.
- [146] J.D. Cherry, E. Grimprel, N. Guiso, U. Heininger, J. Mertsola, Defining Pertussis Epidemiology, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24 (2005) S25–S34. doi:10.1097/01.inf.0000160926.89577.3b.
- [147] J.D. Cherry, Epidemiological, Clinical, and Laboratory Aspects of Pertussis in Adults, *Clin. Infect. Dis.* 28 (1999) 112–117.
- [148] WHO Immunological Basis for Immunization Series Module 4 : Pertussis Update 2017, 2017.
- [149] Weekly epidemiological record, in: 2015: pp. 433–460.
- [150] L. Sammels, Laboratory Manual for the diagnosis of Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *bordetella parapertussis*, in: 2010: pp. 119–123. doi:10.1007/978-90-481-9039-3_9.
- [151] D.O.N.G. Burstyn, L.J. Baraff, M.S. Pepler, R.D. Leake, C.R. Manclark,

- Serological Response to Filamentous Hemagglutinin and Lymphocytosis-Promoting Toxin of *Bordetella pertussis*, *Infect. Immun.* 41 (1983) 1150–1156.
- [152] N.K. Fry, O. Tzivra, Y.T. Li, A. McNiff, N. Doshi, P.A.C. Maple, N.S. Crowcroft, E. Miller, R.C. George, T.G. Harrison, Laboratory diagnosis of pertussis infections: The role of PCR and serology, *J. Med. Microbiol.* 53 (2004) 519–525. doi:10.1099/jmm.0.45624-0.
- [153] E. Bamberger, N. Lahat, V. Gershtein, R. Gershtein, D. Benilevi, S. Shapiro, I. Kassis, L.R. Mph, I. Srugo, Diagnosing Pertussis: The Role of Polymerase Chain Reaction, *Isr. Med. Assoc. J.* 7 (2005) 351–354.
- [154] R. Tomialoic, P. Stefanoff, A. Zasada, Incidence and factors predicting whooping cough due to parapertussis diagnosis among patients referred to general practitioners, Poland, 2009–2011, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34 (2015) 101–107. doi:10.1007/s10096-014-2214-8.
- [155] J.D. Cherry, The Epidemiology of Pertussis : A Comparison of the Epidemiology of the Disease Pertussis With the Epidemiology of *Bordetella pertussis* Infection, *Pediatrics.* 115 (2014) 1422–1427. doi:10.1542/peds.2004-2648.
- [156] R.J. Booth, Antibody Response to Booster Dose of Diphtheria and Tetanus Toxoids and Pertussis Vaccine, *Public Health.* (1964) 199–205. doi:10.1016/B978-012373947-6.00036-2.
- [157] C.C. Linnemann, P.H. Perlstein, N. Ramundo, S.D. Minton, G.S. Englender, J.B. McCormick, P.S. Hayes, Use of Pertussis Vaccine in an Epidemic Involving Hospital Staff, *Lancet.* 306 (1975) 540–543. doi:10.1016/S0140-6736(75)90907-1.
- [158] D.L. Miller, E.M. Ross, R. Alderslade, M.H. Bellman, N.S. B Rawson, Pertussis immunisation and serious acute neurological illness in children, *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed).* 282 (1981) 1595–1599. doi:10.1136/bmj.282.6276.1595.
- [159] P. Ray, J. Hayward, D. Michelson, E. Lewis, J. Schwalbe, S. Black, H. Shinefield, M. Marcy, K. Huff, J. Ward, J. Mullooly, R. Chen, R. Davis, Encephalopathy after whole-cell pertussis or measles vaccination: Lack of evidence for a causal association in a retrospective case-control study, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 25 (2006) 768–773. doi:10.1097/01.inf.0000234067.84848.e1.
- [160] Y. Sato, H. Fukumi, M. Kimura, Development of a pertussis component vaccine in Japan, *Lancet.* (1982) 122–126.
- [161] E. Miller, L.A.E. Ashworth, K. Redhead, C. Thornton, P.A. Waight, T. Coleman, Effect of schedule on reactogenicity and antibody persistence of acellular and whole-cell pertussis vaccines: Value of laboratory tests as predictors of clinical performance, *Vaccine.* 15 (1997) 51–60. doi:10.1016/S0264-410X(96)00112-0.
- [162] Q. He, M.K. Viljanen, H. Arvilommi, B. Aittanen, J. Mertsola, Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population, *JAMA.* 280 (1998) 635–637. doi:10.1001/jama.280.7.635.
- [163] U. Heininger, K. Stehr, P. Christenson, J.D. Cherry, Evidence of efficacy of the Lederle/Takeda acellular pertussis component diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine but not the Lederle whole-cell component diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine against *Bordetella parapertussis* in, *Clin. Infect. Dis.* 28 (1999) 602–4. doi:10.1086/515154.
- [164] J.D. Cherry, The 112-Year Odyssey of Pertussis and Pertussis Vaccines—Mistakes Made and Implications for the Future, *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* 8 (2019) 334–341. doi:10.1093/jpids/piz005.

- [165] J.M. Warfel, L.I. Zimmerman, T.J. Merkel, 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 (2013) 787–792. doi:10.1073/pnas.1314688110.
- [166] R. Higgs, S.C. Higgins, P.J. Ross, K.H.G. Mills, Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*, *Mucosal Immunol.* 5 (2012) 485–500. doi:10.1038/mi.2012.54.
- [167] Y. a Lamberti, J. Alvarez Hayes, M.L. Perez Vidakovics, E.T. Harvill, M.E. Rodriguez, Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages, *Infect. Immun.* 78 (2010) 907–913. doi:10.1128/IAI.01031-09.
- [168] J. Liko, S.G. Robison, P.R. Cieslak, Do pertussis vaccines protect against bordetella parapertussis?, *Clin. Infect. Dis.* 64 (2017) 1795–1797. doi:10.1093/cid/cix221.
- [169] A.M. Acosta, R.N. Chas DeBolt, A. Tasslimi, M. Lewis, L.K. Stewart, L.K. Misegades, N.E. Messonnier, T.A. Clark, S.W. Martin, P. Manisha, Tdap Vaccine Effectiveness in Adolescents During the 2012 Washington State Pertussis Epidemic, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 135 (2015) 981–989. doi:10.1002/cncr.27633.Percutaneous.
- [170] K.D. Elder, E.T. Harvill, Strain-dependent role of BrkA during *Bordetella pertussis* infection of the murine respiratory tract, *Infect. Immun.* 72 (2004) 5919–5924. doi:10.1128/IAI.72.10.5919-5924.2004.
- [171] D.C. Oliver, R.C. Fernandez, Antibodies to BrkA augment killing of *Bordetella pertussis*, *Vaccine.* 20 (2001) 235–241. doi:10.1016/S0264-410X(01)00269-9.
- [172] N. Marr, D.C. Oliver, V. Laurent, J. Poolman, P. Denoël, R.C. Fernandez, Protective activity of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter in the murine lung colonization model, *Vaccine.* 26 (2008) 4306–4311. doi:10.1016/j.vaccine.2008.06.017.
- [173] D. de Gouw, D.O. Serra, M.I. de Jonge, P.W. Hermans, H.J. Wessels, A. Zomer, O.M. Yantorno, D. a Diavatopoulos, F.R. Mooi, The vaccine potential of *Bordetella pertussis* biofilm-derived membrane proteins, *Emerg. Microbes Infect.* 3 (2014) e58. doi:10.1038/emi.2014.58.
- [174] B. Fuchslocher, L.L. Millar, P.A. Cotter, Comparison of bipA alleles within and across *Bordetella* species, *Infect. Immun.* 71 (2003) 3043–3052. doi:10.1128/IAI.71.6.3043-3052.2003.
- [175] N. Mielcarek, A.S. Debie, D. Raze, J. Bertout, C. Rouanet, A. Ben Younes, C. Creusy, J. Engle, W.E. Goldman, C. Loch, Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough, *PLoS Pathog.* 2 (2006) 0662–0670. doi:10.1371/journal.ppat.0020065.
- [176] C. Loch, J.F. Papin, S. Lecher, A.S. Debie, M. Thalen, K. Solovay, K. Rubin, N. Mielcarek, Live Attenuated Pertussis Vaccine BPZE1 Protects Baboons Against *Bordetella pertussis* Disease and Infection, *J. Infect. Dis.* 216 (2017) 117–124. doi:10.1093/infdis/jix254.
- [177] P.F. Feunou, J. Bertout, C. Loch, T- and B-cell-mediated protection induced by novel, live attenuated pertussis vaccine in mice. Cross protection against parapertussis, *PLoS One.* 5 (2010) e10178. doi:10.1371/journal.pone.0010178.
- [178] R. Thorstensson, B. Trollfors, N. Al-Tawil, M. Jahnmatz, J. Bergström, M. Ljungman, A. Törner, L. Wehlin, A. Van Broekhoven, F. Bosman, A.S. Debie, N. Mielcarek, C. Loch, A phase I clinical study of a live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine - BPZE1; a single centre, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating

- study of BPZE1 given intranasally to healthy adult male volunteers, *PLoS One*. 9 (2014) e83449. doi:10.1371/journal.pone.0083449.
- [179] R.H.M. Raeven, L. Van Der Maas, W. Tilstra, J.P. Uittenbogaard, T.H.E. Bindels, B. Kuipers, A. Van Der Ark, J.L.A. Pennings, E. Van Riet, W. Jiskoot, G.F.A. Kersten, B. Metz, Immunoproteomic Profiling of Bordetella pertussis Outer Membrane Vesicle Vaccine Reveals Broad and Balanced Humoral Immunogenicity, *J. Proteome Res.* 14 (2015) 2929–2942. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00258.
- [180] D. Bottero, M.E. Zurita, M.E. Gaillard, F. Carriquiriborde, P. Martin Aispuro, M. Elizagaray, E. Bartel, C. Castuma, D. Hozbor, Outer-Membrane-Vesicle–Associated O Antigen, a Crucial Component for Protecting Against Bordetella parapertussis Infection, *Front. Immunol.* 9 (2018) 1–12. doi:10.3389/fimmu.2018.02501.
- [181] D. Bottero, M.E. Gaillard, A. Errea, G. Moreno, E. Zurita, L. Pianciola, M. Rumbo, D. Hozbor, Outer membrane vesicles derived from Bordetella parapertussis as an acellular vaccine against Bordetella parapertussis and Bordetella pertussis infection, *Vaccine*. 31 (2013) 5262–5268. doi:10.1016/j.vaccine.2013.08.059.
- [182] P.J. Ross, C.E. Sutton, S. Higgins, A.C. Allen, K. Walsh, A. Misiak, E.C. Lavelle, R.M. McLoughlin, K.H.G. Mills, 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) e1003264. doi:10.1371/journal.ppat.1003264.
- [183] A. Misiak, R. Leuzzi, A.C. Allen, B. Galletti, B.C. Baudner, U. D’Oro, D.T. O’Hagan, M. Pizza, A. Seubert, K.H.G. Mills, Addition of a TLR7 agonist to an acellular pertussis vaccine enhances Th1 and Th17 responses and protective immunity in a mouse model, *Vaccine*. 35 (2017) 5256–5263. doi:10.1016/j.vaccine.2017.08.009.
- [184] N. Sukumar, C.F. Love, M.S. Conover, N.D. Kock, P. Dubey, R. Deora, Active and passive immunizations with bordetella colonization factor a protect mice against respiratory challenge with bordetella bronchiseptica, *Infect. Immun.* 77 (2009) 885–895. doi:10.1128/IAI.01076-08.
- [185] J. Jennings-gee, S. Quataert, T. Ganguly, R.D. Agostino, R. Deora, The Adjuvant Bordetella Colonization Factor A Attenuates Alum-Induced Th2 Responses and Enhances Bordetella pertussis Clearance from Mouse Lungs, *Infect. Immun.* 86 (2018) e00935-17.
- [186] M.L. Perez Vidakovics, J. Paba, Y. Lamberti, C. Andre Ricart, M. Valle De Sousa, M.E. Rodriguez, Profiling the Bordetella pertussis Proteome during Iron Starvation, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 2518–2528. doi:10.1021/pr060681i.
- [187] J. Alvarez Hayes, E. Erben, Y. Lamberti, M. Ayala, F. Maschi, C. Carbone, B. Gatti, G. Parisi, M.E. Rodríguez, Identification of a new protective antigen of Bordetella pertussis, *Vaccine*. 29 (2011) 8731–8739. doi:10.1016/j.vaccine.2011.07.143.
- [188] J. Alvarez Hayes, E. Erben, Y. Lamberti, G. Principi, F. Maschi, M. Ayala, M.E. Rodríguez, Bordetella pertussis iron regulated proteins as potential vaccine components, *Vaccine*. 31 (2013) 3543–3548. doi:10.1016/j.vaccine.2013.05.072.
- [189] WHO, Pertussis vaccines: WHO position paper, August 2015-Recommendations, *Vaccine*. 34 (2016) 1423–1425. doi:10.1016/j.vaccine.2015.10.136.
- [190] E. Miller, C.-A. Siegrist, T.A. Clark, K.M. Edwards, N. Guiso, S. a Halperin, P. McIntyre, C.H. Wirsing von König, WHO SAGE pertussis working group Background paper, in: 2014.

- [191] H. Lautrop, Observations on parapertussis in Denmark, 1950-1957, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 43 (1958) 255–266.
- [192] H. Lautrop, Epidemics of parapertussis. 20 years' observations in Denmark, *Lancet.* 1 (1971) 1195–1198.
- [193] G. Eldering, P. Kendrick, Incidence of Parapertussis in the Grand Rapids Area as Indicated by 16 Years' Experience with Diagnostic Cultures, *Am. J. Public Health Nations. Health.* 42 (1937) 27–31.
- [194] H. Bokhari, F. Said, M. a Syed, A. Mughal, Y.F. Kazi, K. Heuvelman, F.R. Mooi, Whooping cough in Pakistan: *Bordetella pertussis* vs *Bordetella parapertussis* in 2005-2009, *Scand. J. Infect. Dis.* 43 (2011) 818–820. doi:10.3109/00365548.2011.577804.
- [195] Q. Zhang, Z. Yin, Y. Li, H. Luo, Z. Shao, Y. Gao, L. Xu, B. Kan, S. Lu, Y. Zhang, M. Li, M. Liu, P. Yao, Z. Zhao, Q. He, 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.* 46 (2014) 280–287. doi:10.3109/00365548.2013.878034.
- [196] J.M. Warfel, J. Beren, T.J. Merkel, Airborne Transmission of *Bordetella pertussis*, *J. Infect. Dis.* 206 (2012) 902–906. doi:10.1093/infdis/jis443.
- [197] J. Mertsola, O. Ruuskanen, E. Eerola, M.K. Viljanen, Intrafamilial spread of pertussis, *J. Pediatr.* 103 (1983) 359–363.
- [198] A.C. Rodman, W.L. Bradford, G.P. Berry, An epidemiological study of an outbreak of pertussis in a public school, *Am. J. Public Health Nations. Health.* 36 (1946) 1156–1162.
- [199] M.A. Riolo, P. Rohani, A.A. King, Epidemiological evidence for herd immunity induced by acellular pertussis vaccines, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111 (2014) 716–717. doi:10.1073/pnas.1323795111.
- [200] E. Komatsu, F. Yamaguchi, M. Eguchi, M. Watanabe, Protective effects of vaccines against *Bordetella parapertussis* in a mouse intranasal challenge model, *Vaccine.* 28 (2010) 4362–4368. doi:10.1016/j.vaccine.2010.04.053.

Capítulo 2

Estudio del proteoma *B. parapertussis* y búsqueda de
candidatos vacunales

2. ESTUDIO DEL PROTEOMA *B. PARAPERTUSSIS* Y BÚSQUEDA DE CANDIDATOS VACUNALES

2.1. Introducción

A pesar de que *B. parapertussis* fue aislada por primera vez en la década de 1930, sigue siendo un patógeno muy poco estudiado. Esto se debe en parte a que generalmente causa una forma más breve y leve de la enfermedad en comparación con *B. pertussis*. Sin embargo, como se mencionó en el Capítulo 1 de esta Tesis, recientemente se ha visto un aumento en el reporte de casos de tos convulsa causados por *B. parapertussis* [1], llegando a ser prevalente en lugares en donde la vacuna de células completas han sido reemplazadas por vacunas acelulares [2]. Se ha reportado que *B. parapertussis* puede infectar incluso a individuos vacunados con la vacuna acelular confirmando que esta vacuna no induce protección contra esta especie [3].

El aumento de la presencia de *B. parapertussis* en brotes epidémicos de tos convulsa en la actualidad ha obligado a prestar mayor atención a este patógeno humano. Entender más sobre su fisiología y sus mecanismos de patogénesis puede brindar nuevas herramientas para encontrar posibles blancos de reconocimiento inmune con el fin último de diseñar estrategias de prevención frente a esta bacteria.

En 2003 se secuenció por primera vez el genoma de una cepa de *B. parapertussis* humana (12822), aislada de un bebé alemán en 1993, junto con el genoma de *B. pertussis* Tohama I y el de *B. bronchiseptica* RB50 [4]. El análisis comparativo de estos genomas permitió la identificación de alrededor de mil marcos abiertos de lecturas de la cepa de *B. parapertussis* ausentes en el genoma de *B. pertussis*. Esta divergencia entre ambas especies

podría determinar diferencias en su fisiología y adaptación al hospedador que podrían ser relevantes en su patogénesis.

Las herramientas ómicas han permitido avances importantes en la identificación de las bases de la patogénesis bacteriana [5]. Los estudios proteómicos han sido ampliamente utilizados para la caracterización de microorganismos, así como su respuesta a diversas condiciones ambientales dada a la robustez de sus resultados.

Durante la infección, los patógenos experimentan una serie de condiciones de estrés, entre ellas la limitación de nutrientes, bajo pH y diferentes niveles de oxígeno y la respuesta inmune del huésped. Pero las bacterias poseen una gran plasticidad fenotípica que les permite adaptarse al entorno, por lo que es posible que en el transcurso de la infección expresen diferentes proteínas potencialmente inmunogénicas. Dicho ambiente se puede simular en modelos *in vitro* con cultivos bacterianos que se exponen a diferentes condiciones que tratan de imitar el entorno del hospedador. Una condición particular que ha sido ampliamente estudiada, incluso en *B. pertussis*, tanto a nivel transcripcional como proteico, es la limitación en hierro [6–8]. El hierro es un nutriente esencial para la gran mayoría de los microorganismos [9]. Los iones de hierro tienen baja solubilidad a pH fisiológico, lo cual hace posible la vida ya que estos iones pueden resultar tóxicos debido a la reacción de Fenton [10]. El hierro en el cuerpo humano se encuentra principalmente quelado por proteínas como la transferrina, lactoferrina y hemoglobina. La baja concentración de hierro libre limita la proliferación bacteriana y se la conoce como inmunidad nutricional [11]. Los patógenos bacterianos expresan sistemas de captura de hierro de alta afinidad que les permiten obtener el hierro tanto libre como quelado y así logran infectar a su hospedador. Muchos de los sistemas de captura de hierro presentes en el género *Bordetella* han sido estudiados en profundidad por Brickman y colaboradores

[12–15]. Nuestro grupo empleó previamente con éxito estrategias proteómicas para explorar la composición proteica diferencial de *B. pertussis* adaptada a la limitación de hierro. De dicho estudio proteómico se pudieron identificar proteínas pertenecientes a sistemas de captura de hierro cuya expresión está regulada por la disponibilidad de este nutriente en el entorno [7], y dos de ellas mostraron ser buenos candidatos vacunales contra *B. pertussis* [16,17].

La proteómica, combinada con técnicas inmunológicas (inmunoproteómica) ha permitido avances significativos en la búsqueda de candidatos vacunales [7,18,19]. En el análisis proteómico clásico, las proteínas son primero sometidas a electroforesis bidimensional que logra su separación en geles bidimensionales según sus propiedades fisicoquímicas (punto isoelectrico y peso molecular). Las proteínas de interés se extraen del gel y son identificadas. Para ello, el método más utilizado es el de la huella peptídica o PMF (del inglés *Peptide Mass Fingerprinting*). Una huella peptídica corresponde a un espectro de relaciones carga masa específicas del conjunto de los fragmentos peptídicos que se producen luego de la digestión enzimática de la proteína de interés con una enzima específica de secuencia, generalmente tripsina. El espectro se obtiene luego de la ionización de los péptidos según su tiempo de vuelo en un campo eléctrico de distancia conocida (MALDI-TOF, del inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight*). Esto genera para cada proteína un patrón único con una identidad propia que, al igual que una huella dactilar, permite su reconocimiento. En PMF, el conjunto de relaciones carga/masas determinados experimentalmente para cada péptido producido se compara informáticamente con bases de datos de conjuntos de relaciones carga/masas peptídicas generadas por simulación de una digestión análoga *in silico* (virtual) de las secuencias de proteínas obtenidas a partir del genoma del organismo de interés [20].

Como se menciona más arriba, la proteómica convencional con geles bidimensionales ha brindado la posibilidad de resolver mezclas complejas de proteínas y analizar cambios en los perfiles proteicos de un microorganismo en respuesta a estímulos externos. Este tipo de técnica permite la recuperación de la proteína de interés por lo que además de ser identificadas, puedan ser evaluadas en ensayos inmunoquímicos como el dot blot o western blot: por ejemplo, se ha recurrido a esta técnica para evaluar la reactividad de las proteínas de interés con sueros de humanos o animales infectados. Si alguna proteína es reconocida por los anticuerpos presentes en los sueros se interpreta que se trata de una proteína expresada *in vivo*. Sin embargo, la proteómica en geles bidimensionales también presenta una serie de limitaciones; por ejemplo, no es eficiente para el análisis de proteínas hidrofóbicas, de alto peso molecular o proteínas de baja abundancia [20].

Recientemente se ha desarrollado una nueva metodología para el estudio proteómico, conocida como “proteómica *shotgun*” que permite el análisis de muestras complejas evitando la electroforesis en gel de poliacrilamida [21]. En la proteómica *shotgun*, la mezcla de proteínas es sometida a una digestión enzimática y, sin la necesidad de un paso previo de separación, el conjunto de los péptidos resultantes son separados con nano-HPLC acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución. Si bien esta técnica ha revolucionado el campo de la proteómica al permitir la detección de un gran número de proteínas en una muestra biológica con alto rendimiento, no permite recuperar la proteína y por lo tanto la búsqueda de proteínas inmunogénicas requiere de otro tipo de estrategias.

Por tal motivo en este trabajo de tesis doctoral usamos complementariamente las capacidades técnicas de las dos metodologías para aprovechar el potencial de cada una de ellas.

En este capítulo, se describe el estudio que permitió la primera caracterización proteómica de *B. parapertussis*. Se empleó proteómica *shotgun* para realizar un análisis global de las proteínas expresadas por esta bacteria en condiciones estándar de cultivo y evaluar la adaptación fenotípica de *B. parapertussis* al stress que genera la limitación en hierro, como un primer enfoque para comprender la adaptación de este patógeno a las condiciones de entorno durante la infección. Por otro lado, el empleo de la proteómica clásica de geles bidimensionales permitió recuperar proteínas de interés para ser evaluadas como potenciales antígenos vacunales

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y limitación

Para los estudios realizados en este capítulo, se empleó la cepa *B. parapertussis* CN2591. Las bacterias provenientes de stock a -80°C fueron cultivadas en placas de Agar Bordet Gengou (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan), suplementada con 15% v/v de sangre desfibrinada de carnero (ABGs) por 3 días a 37°C . Al cabo de este tiempo se repicó en una nueva placa ABGs y se cultivó a 37°C durante 20 hs y luego fueron inoculadas en medio líquido Stainer-Scholte (SS) [22].

Para obtener bacterias limitadas en hierro, *B. parapertussis* CN2591 se cultivó en medio SS en condiciones de exceso de hierro (SS) y de limitación de hierro (SS-Fe), como se describió previamente [23]. Brevemente, después de 20 horas en placa, las bacterias se subcultivaron en medio líquido SS y se mantuvieron en condiciones de agitación a 37°C durante 24 h. Luego, las células se recolectaron mediante centrifugación ($10000 \times g$ durante 15 minutos a temperatura ambiente), se lavaron con solución salina estéril libre de hierro y se usaron para inocular SS ($36 \mu\text{M}$ de hierro) o SS sin adición de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Las bacterias se cultivaron a 37°C durante 20 h, se subcultivaron una vez más en los medios de cultivo respectivos hasta la fase exponencial tardía. La presencia de sideróforos en los sobrenadantes de cultivo de *B. parapertussis* cultivados en medio sin hierro se evaluó mediante el ensayo de cromo azurol S (CAS) para confirmar el crecimiento limitado en hierro [24].

2.2.2. Anticuerpos

En este estudio se empleó suero policlonal de ratón anti-CyaA se obtuvo según se describe en [25] , un suero de ratón vacunado con vacuna acelular (aP) obtenido como se describe más abajo, suero de ratones infectados con *B. parapertussis* obtenido como fue descrito previamente [26].

Se emplearon además los siguientes anticuerpos. IgG humana purificada de un pool de suero de pacientes de tos convulsa con un alto título contra *B. parapertussis* que se describe en [27]. Anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugada con HRP, anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con fosfatasa alcalina o anticuerpos de cabra anti-IgG ratón conjugados con fosfatasa alcalina (los tres de Jackson Immuno Research, BaltimorePike, Pensilvania).

2.2.3. Proteómica shotgun

B. parapertussis cultivadas en SS o SS-Fe se suspendieron en 300 μ l de urea / tiourea (8M / 2M) (UT) y se incubaron con agitación durante 30 min a 25°C con agitación. Las células se rompieron en cinco ciclos alternativos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación durante 5 min a 30°C con agitación. Después de 10 segundos de mezcla, 5 min de incubación en un baño de ultrasonido y posterior centrifugación (1 h, 20°C, 17000 x g), la muestra se diluyó con otros 300 μ l de UT, se incubó durante 10 min en baño de ultrasonido, y se agitó durante 40 min a 25°C para mejorar la extracción de proteínas. El ADN se eliminó utilizando QiaShredder (Qiagen, Hilden, Alemania / Venlo, Países Bajos) dos veces durante 20 segundos a 20°C. 17000 \times g. El sobrenadante se transfirió a un nuevo vial. La concentración de proteína total se determinó utilizando Bradford (Biorad,

Alemania). Finalmente, 4 µg de proteínas solubilizadas en UT se diluyeron en bicarbonato de amonio 20 mM y se digirieron proteolíticamente con 160 ng de tripsina (proteína: tripsina = 25: 1) (promega, Madison, Wisconsin) durante 17 h. La digestión trípica se detuvo mediante la adición de ácido acético hasta una concentración final de 1% v/v. Los residuos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 16000×g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y los péptidos se purificaron y desalaron utilizando columnas µC18-ZipTip (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts) El disolvente se eliminó mediante liofilización y se reemplazó con 20 µl de buffer conteniendo acetonitrilo (ACN) al 2% y ácido acético al 0,1% en agua de calidad HPLC (J. T. Baker, Allentown Pennsylvania).

Los péptidos se separaron en UPLC nanoAcquity (Waters Corporation, Milford, Massachusetts) Se ionizaron con una fuente de nano-ESI y un Emisor de Picotip (New Objective, woburn, Massachusetts) Y se analizaron en un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Electron Corporation, Alemania). Después del enriquecimiento en una precolumna, los péptidos se separaron utilizando una columna analítica y un gradiente de 92 minutos que consiste en un buffer A (DMSO al 0,5% en agua con ácido acético al 0,1%) y un buffer B (DMSO al 5% en acetonitrilo con un acético al 0,1%). El análisis dependiente de los datos de los péptidos se realizó primero en el FTMS en modo positivo y de perfil y después de la disociación inducida por colisión, la exploración de MS / MS de los fragmentos de péptidos se adquirió en modo positivo y centroide. La MS cambió automáticamente entre Orbitrap-MS y LTQ-MS / MS para permitir la detección de eventos de MS y MS / MS. Los datos proteómicos de espectrometría de masas se han depositado en el Consorcio ProteomeXchange a través del repositorio asociado PRIDE [28] con el identificador de datos PXD012309.

2.2.4. Análisis de datos de MS

Para la identificación de proteínas, los datos sin procesar se analizaron con Proteome Discoverer 2.0 (Thermo Fisher, Alemania) en una base de datos Uniprot limitada a *B. paraptussis* 12822 (ATCC BAA-587, NC_002928.3, versión 02/2016, 4161 entradas). Los iones cargados 2+ o 3+ y de un rango de masa entre 600 y 5100 Da se consideraron con la oxidación de metionina como modificación variable. La especificidad de la enzima se seleccionó para la tripsina con un máximo de dos cortes perdidos permitidos y aplicando una tolerancia iónica de 10 ppm de MS1 y una tolerancia de 0,6 Da MS2. Las proteínas se consideraron para un análisis adicional si se identificaron con una tasa de descubrimiento falso <1%. Las intensidades de la proteína se calcularon como la mediana de las áreas de pico de todos los péptidos únicos respectivos por proteína. Además, las proteínas que se encontraron en tres o cuatro réplicas de la condición SS-Fe y en ningún replicado de SS, se consideraron "ON". Mientras que, para considerarse "OFF", las proteínas debían encontrarse ausentes en todos los replicados de SS-Fe pero identificarse en al menos tres de las cuatro réplicas de SS.". Las proteínas que se encontraron en tres o cuatro réplicas de una condición y en ninguna réplica de la otra condición, se consideraron "ON". Posteriormente, las intensidades de las proteínas se normalizaron en la mediana de todas las muestras y se utilizaron los promedios por proteína y condición para calcular las proporciones para comparar las dos condiciones. Para realizar el análisis estadístico, el test-t con la posterior corrección de Benjamini-Hochberg [29] se realizó con Genedata Analyst v10.0 (Genedata, Basilea, Suiza). Las intensidades de proteínas que muestran relaciones <0,66 o >1,5 y un valor $q < 0,05$ entre las dos condiciones probadas (*B. paraptussis* cultivadas en SS y *B. paraptussis* cultivadas en SS-Fe) se definieron como significativamente diferenciales. Las coordenadas de los componentes principales se calcularon utilizando Genedata Analyst

v10.0 (Genedata, Basel, Suiza) para las proteínas identificadas en al menos tres de las cuatro réplicas biológicas de una matriz de covarianza pero visualizadas en Microsoft Excel. El treemap de tipo Voronoi se creó utilizando el software Paver 2.1 (Decodon GmbH, Greifswald, Alemania) utilizando la base de datos de SEED para la cepa *B. parapertussis* 12822 [30].

Para facilitar su análisis, las proteínas se clasificaron funcionalmente según la asignación por la clasificación multifuncional descriptiva de Serres y Riley [31], en las categorías "metabolismo" (categoría 1 de MultiFun), "transferencia de información" (categoría 2 de MultiFun), "regulación" (categoría 3 de MultiFun), "transporte" (categoría 4 de MultiFun), "procesos celulares" (categoría 5 de MultiFun) y "estructura celular" (categoría 6 de MultiFun). Se clasificaron un total de 1010 proteínas según las categorías MultiFun. Las proteínas con una función putativa que solo se ha asignado por homología a otras proteínas, sin evidencia biológica, se incluyeron en la clasificación MultiFun, de acuerdo con su función predicha respectiva. Las otras 301 proteínas se incluyeron en otras dos categorías, "factores de virulencia" (factores de virulencia de *Bordetella* conocidos o supuestos) y "hipotética e hipotética conservada" (sin homólogo de *Escherichia coli* o función molecular desconocida).

2.2.5. ELISA

Los títulos de anticuerpos se determinaron por ELISA. Brevemente, se colocaron en placas de ELISA (NuncMaxisorp) 100 µl por pocillo de *B. parapertussis* (DO₆₅₀: 1) en PBS y se incubaron durante la noche a 4°C en cámara húmeda. Las placas recubiertas se lavaron tres veces con PBS que contenía Tween 20 (Sigma, Saint Louis, Missouri) al 0,05% y se

bloquearon con PBS con leche descremada al 10% p/v durante 1 h a 37°C. Se prepararon diluciones seriadas de suero de suero anti-aP de ratón en PBS que contenía 5% de leche descremada y 0,05% de Tween 20, se agregaron 100 µl por pocillo y las placas se incubaron durante 2 horas a 30°C. Anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugada con HRP se usaron como anticuerpos secundarios. El revelado se realizó con OPD (O-fenilendiamina de Sigma) y H₂O₂, la reacción se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico 2 M y se determinó la absorbancia a 492 nm. El título se calculó mediante el método de punto final, como la inversa de la dilución de suero más alta que dio una lectura por encima del valor de corte [32]. Suero normal de ratón fue utilizado para determinar el límite.

2.2.6. Western Blot

Proteínas totales de *B. parapertussis* cultivada en presencia (SS) o ausencia (SS-Fe) de hierro fueron obtenidas mediante ruptura con perlas de vidrio utilizando un homogenizador Precellys evolution super homogenizer (Stretton Scientific, Reino Unido). Después de separar los fragmentos celulares por centrifugación, la concentración de proteínas fue determinada por Bradford (Bio-Rad) y las suspensiones fueron mezcladas con Buffer laemmli con β-mercaptoetanol (Bio-Rad). Las muestras proteicas se resolvieron mediante SDS-PAGE al 7,5%. Las proteínas se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilo (Immobilon, Millipore, Bedford, Massachusetts). La membrana se bloqueó luego con buffer TBS con 10% de leche descremada y se incubó con anticuerpos anti-CyaA de ratón seguido de anticuerpos de cabra anti-IgG ratón conjugada con fosfatasa alcalina. La unión específica se visualizó usando NBT / BCIP (Promega) como sustrato.

2.2.7. Extracción de LPS y tinción con plata

El LPS de las suspensiones de células bacterianas (20 ml OD₆₅₀: 1) de *B. paraptussis* cultivada en SS o SS-Fe se extrajo mediante el método del fenol/agua caliente como se describió anteriormente [33]. A continuación, se sembraron las muestras de LPS en geles SDS-PAGE 15%, y estos fueron teñidos con la técnica de tinción de plata de Bio-Rad.

2.2.8. Inmunización de ratones

En ensayos con animales se utilizaron ratones hembras BALB/c de entre 3 y 5 semanas obtenidos y criados en salas de cría libres de patógenos de las instalaciones del bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata. El manejo de animales y todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de conformidad con las directrices de ARRIVE y de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE de la Unión Europea para Experimentos con Animales. Los protocolos descritos en este estudio fueron revisados y aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Grupos de 10 ratones fueron inmunizados por vía intraperitoneal con 1/6 de la dosis humana de la vacuna acelular comercial InfanrixTM (aP). Transcurridos 19 días, se realizó una segunda inmunización (refuerzo). Un grupo de 10 ratones inmunizados con adyuvante fue utilizado como control negativo. Se extrajeron muestras de sangre de todos los ratones los días 0, 14 y 28. El suero fue separado y almacenado a -20°C hasta su análisis.

2.2.9. Obtención de proteínas para geles bidimensionales

Células de *B. parapertussis* cultivada en exceso o limitación de hierro fueron centrifugadas a 8000 x g a 4°C, por 10 minutos. El pellet fue lavado (dos veces) y resuspendido en agua bidestilada suplementada con inhibidores de proteasas Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 5mM. Las bacterias se rompieron con perlas de vidrio utilizando el equipo precellys. Luego de tres ciclos de 5500 rpm por 40 segundos, las muestras fueron centrifugadas para remover las perlas y fragmentos celulares. La concentración de proteínas en el sobrenadante fue determinada con Bradford (Bio-Rad). Las muestras fueron liofilizadas para su conservación hasta el análisis.

2.2.10. Electroforesis bidimensional

Para isoelectroenfoque (IEF), se usaron tiras prefabricadas de 18 cm pH 4-7 (Immobiline DryStrips, Amersham Biosciences, Suecia). Las muestras se resuspendieron con buffer de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, Triton X-100 al 2% (p/v), ditiotreitól (DTT) 65 mM, Pharmalyte (Amersham Biosciences) al 0,5% (v/v), PMSF 1 mM y trazas de azul de bromofenol). Las muestras se dejaron 1 hora en agitación en hielo. Las proteínas solubilizadas se aplicaron en los IPG durante la noche mediante la técnica de rehidratación en gel. El IEF se realizó en una unidad de electroforesis Multiphor II (Amersham Biosciences) utilizando el siguiente programa: 500 V 1 Vh, 3500 V de gradiente, 3000 Vh, 3500 V 20 kVh, lo que arroja un voltaje total de 23 kVh. Los IPG con las proteínas enfocadas según su punto isoeléctrico se incubaron (15 min) en buffer de equilibrio (50mMTris-Cl, pH 8,8, 6M urea, 30% (v/v) de glicerol, 2% (p/v) SDS), luego se volvieron a incubar con el mismo buffer con el agregado DTT a una concentración final de 125 Mm

por otros 15 minutos y finalmente, con buffer de equilibrio con 300 mM de acrilamida. Las tiras se colocaron en la parte superior de un gel SDS-PAGE al 10% y se sellaron con agarosa al 0,5% en buffer de electroforesis. La electroforesis se realizó a corriente constante (25 mAmp por gel) a 20°C hasta que el frente de corrida alcanzó el extremo inferior del gel, usando una unidad de electroforesis de células PROTEAN II xi 2-D (Bio-Rad) conectada a un baño de enfriamiento Multitemp II (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie coloideal.

2.2.11. Análisis de geles

El programa Proteomweaver fue utilizado para analizar comparativamente los geles 2D. Después de la detección y el apareo de los spots, se realizaron la edición manual y el filtrado. Luego, los spots pareados que mostraron cambios de al menos 2 veces en intensidad entre ambas condiciones normalizadas, se asignaron como expresados diferencialmente y fueron identificados por MALDI-TOF.

2.2.12. Digestión con Tripsina y Extracción de Péptidos del Gel

La digestión de las proteínas y su identificación por MALDI-TOF fue realizada en cooperación con el Doctor Marcelo Fernandez Lahore, Jacobs University en Bremen, Alemania. La zona del gel conteniendo la proteína de interés fue escindida, desteñida usando bicarbonato de amonio en acetonitrilo, y la proteína fue reducida con DTT durante 30 minutos. Luego se llevó a cabo la digestión con tripsina en bicarbonato de amonio 50 mM durante toda la noche a 37°C. Los péptidos se extrajeron a 37°C usando 1:2 (v/v) 5% de ácido fórmico/acetonitrilo, y se reconstituyeron en ácido trifluoracético al 0,1% (v/v).

2.2.13. MALDI-TOF y búsqueda en base de datos

La mezcla digerida resultante fue luego analizada por Autoflex (Bruker Daltonics, Alemania) MALDI-TOF-MS. La muestra y la matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) en una relación 1:1 se observaron sobre un objetivo de acero templado (Bruker Daltonics) y el instrumento se calibró usando el estándar de calibración de péptidos (Bruker Daltonics). Todas las muestras se analizaron en modo de ionización de reflector positivo (Autoflex II; Daltonics de Bruker) y se generó el PMF. La identificación de proteínas se llevó a cabo utilizando el motor de búsqueda Mascot y el software Biotoools, versión 3.1 (Bruker Daltonics). Las listas de PMF se buscaron en la base de datos de NCBI. La búsqueda se restringió al taxón "otras proteobacterias" y la probabilidad de puntuación de mascot se estableció para $p < 0,05$; y condiciones: tolerancia de la masa del péptido, ± 10 ppm; modificación variable, carbamidometilación; modificación variable, oxidación.

2.2.14. Ensayos de inmunodetección (dot blot)

Para la inmunodetección mediante dot blot, volúmenes de muestra conteniendo cantidades (μg) equivalentes de cada proteína en estudio se aplicaron a una membrana de nitrocelulosa (Immobilon, Millipore) y se dejaron secar a temperatura ambiente. Células de *B. parapertussis* cultivada en medio con exceso de hierro (SS) y lactoferrina humana (Sigma) se utilizaron como control positivo y negativo, respectivamente. Las membranas se incubaron durante 2 hs a temperatura ambiente en solución de bloqueo (PBS, 0,05% v/v Tween 20,5% p/v de leche descremada), y luego durante toda noche a 4°C en cámara húmeda con IgG humana purificada de un pool de suero de pacientes de tos convulsa con un alto título contra *B. parapertussis* [27] o suero de ratones infectados con *B.*

parapertussis. Luego de los lavados con PBS con 5% p/v de leche descremada, la unión específica de anticuerpos IgG se visualizó mediante incubación con anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con fosfatasa alcalina o anticuerpos de cabra anti-IgG ratón conjugados con fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario y NBT/BCIP (Bio-Rad) como sustrato de reacción.

2.2.15. Análisis estadístico

La comparación de medias para dos grupos independientes fue realizada con la prueba t de Student con un grado de significación (p) de 0,05. La comparación estadística para más de dos grupos fue realizada con el análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación de los valores obtenidos (medias) se utilizó el test de Menor Diferencia Significativa (LSD) con un grado de significación (p) de 0,05.

2.3. Resultados y Discusión

Con la colaboración del Dr. Frank Schmidt, de University Medicine Greifswald, Alemania se estudió el proteoma *shotgun* de *B. parapertussis*. Esta colaboración nos permitió acceder a la experiencia y a las herramientas de última generación disponibles en este laboratorio. El diseño experimental fue planteando para hacer una comparación en la composición proteica de *B. parapertussis* en dos condiciones de crecimiento, una en exceso de hierro (el medio Stainer-Scholte (SS) que está formulado con fuente de hierro en exceso estequiométrico) y la otra en limitación de hierro (SS formulado sin hierro, SS-Fe), con el fin de evaluar el proteoma inducido en un entorno similar al de infección en el que la falta de hierro es el stress nutricional más importante.

Se llevaron a cabo 4 replicados independientes de cada condición de cultivo. Las bacterias fueron colectadas en fase exponencial tardía (Figura 1), lavadas, liofilizadas y guardadas hasta su procesamiento.

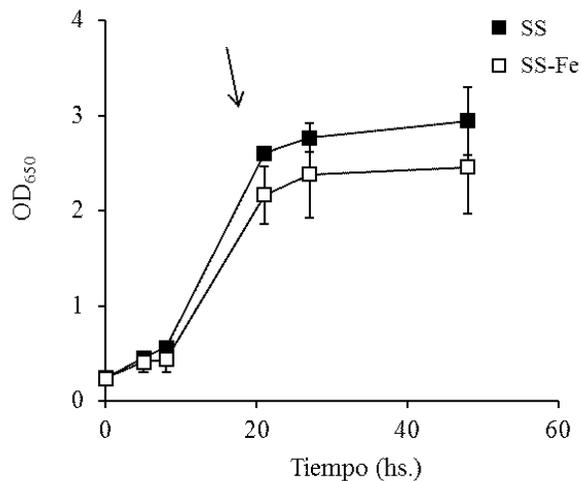


Figura 1. Crecimiento de *B. parapertussis* en exceso y limitación de hierro. *B. parapertussis* se cultivó en medio SS (cuadrados rellenos) y SS-Fe (cuadrados abiertos). Se muestran las medias \pm DE de resultados representativos de dos determinaciones independientes por triplicado. La flecha indica el momento en el que se tomaron las muestras para los estudios proteómicos.

El total de proteínas identificadas en ambas condiciones de cultivo fue de 1311 proteínas (Tabla Anexa), esto representa un 29,8% de todas las secuencias codificantes según lo descrito por Parkhill y colaboradores [4] (el genoma de *B. parapertussis* tiene 4404 marcos abiertos de lectura). Una primera forma de análisis de un estudio proteómico es agrupando las proteínas por categorías según sus funciones. Para ello, en nuestro caso, utilizamos la clasificación MultiFun (www.ecocyc.org); según la función de los homólogos en *E. coli*, las proteínas restantes fueron asignadas a la categoría de hipotéticas o como factores de virulencia en el caso de tener una función relevante conocida en la infección causada por alguna bacteria del género *Bordetella* [31]. Las categorías de mayor representación fueron: metabolismo, proteínas hipotéticas y conservadas, y proteínas de transferencia de información, con un 29, 21 y 16% respectivamente. Con una representación un poco menor también encontramos proteínas relacionadas con transporte,

regulación y procesos celulares con un 12, 10, y 8%, respectivamente. Por último, las de menor representación fueron las agrupadas de la categoría estructura celular y factores de virulencia con un 4 y 2% respectivamente, como se muestra en la Figura 2.

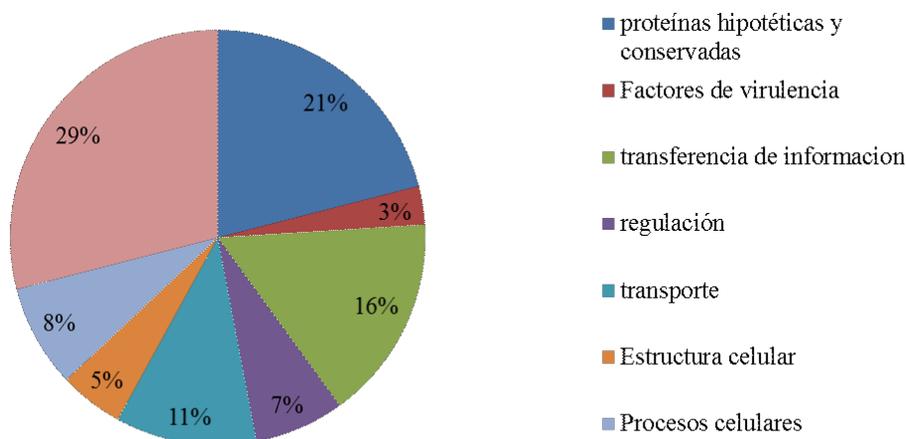


Figura 2. Clasificación de las proteínas de *Bordetella parapertussis* identificadas en este estudio en categorías funcionales. La representación corresponde al total de proteínas identificadas en ambas condiciones de crecimiento de *B. parapertussis*

2.3.1. Respuesta de *Bordetella parapertussis* a la limitación de hierro

El proteoma de los microorganismos está muy influenciado por las condiciones ambientales. Como ya se mencionó, la reducción de las concentraciones de hierro libre es un mecanismo inmune inespecífico de los mamíferos. Los patógenos necesitan adaptarse a esta condición para poder crecer dentro del huésped. El análisis del fenotipo de un microorganismo cultivado en limitación de hierro podría, por lo tanto, ayudar a identificar mecanismos vinculados a la patogénesis. En este capítulo se evaluó comparativamente el perfil proteico de *B. parapertussis* cultivada en diferentes condiciones de disponibilidad de hierro. De este estudio resultó una lista final de 175 proteínas con cambios en abundancia

significativos (se tomaron como significativas las diferencias mayores a 1,5 con un $q < 0,05$) en respuesta a la disponibilidad de hierro (Tabla anexa), lo que representa un 13,3% de las proteínas identificadas. Para confirmar la reproducibilidad entre los replicados biológicos y el efecto de la disponibilidad de hierro sobre el proteoma, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con todas las proteínas identificadas (Figura 3). El PCA es una técnica estadística descriptiva utilizada para representar un conjunto de datos en términos de nuevas variables no correlacionadas. Las nuevas variables son combinaciones lineales de las anteriores y se van construyendo según el orden de importancia en cuanto a la variabilidad total que recogen de la muestra. En la Figura 3 se observa que el PCA de todas las muestras mostró diferencias en los perfiles de expresión entre los replicados de la condición SS y los de la condición SS-Fe se separan en el componente principal 1; esto quiere decir que la condición de cultivo explica el mayor porcentaje de variación entre las muestras.

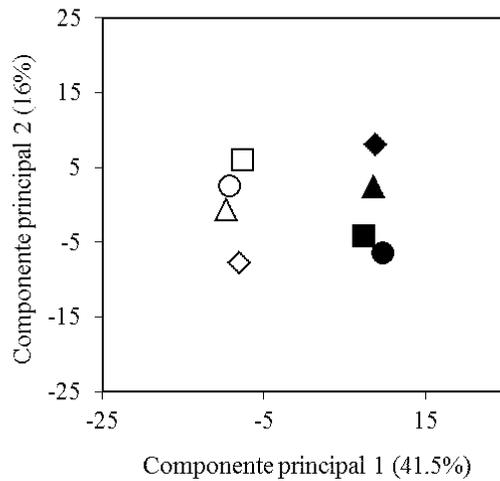


Figura 3. Análisis de componente principal (PCA). Se aplicó PCA a los datos proteómicos generados a partir de *Bordetella parapertussis* cultivados en exceso de hierro (símbolos rellenos) y limitación de hierro (símbolos vacíos). Cada punto representa un replicado biológico independiente.

Para obtener una imagen completa de los cambios asociados a la limitación de hierro, los datos del proteoma se visualizaron utilizando mapa tipo árbol de Voronoi (Figura 4). El azul indica un nivel de abundancia menor en las bacterias limitadas en hierro mientras que el rojo, un nivel de abundancia mayor. Algunos de los campos rojos más importantes involucran proteínas asociadas a la adquisición de hierro, a sistema de transporte de hemo/hemina, y a sistemas de transporte Ton y Tol. En cuanto a las regiones azules, las más relevantes son aquellas que contienen proteínas asociadas a ribosomas SSU bacterianos, ribosomas LSU bacterianos, biogénesis de citocromos de tipo c y complejo respiratorio I.

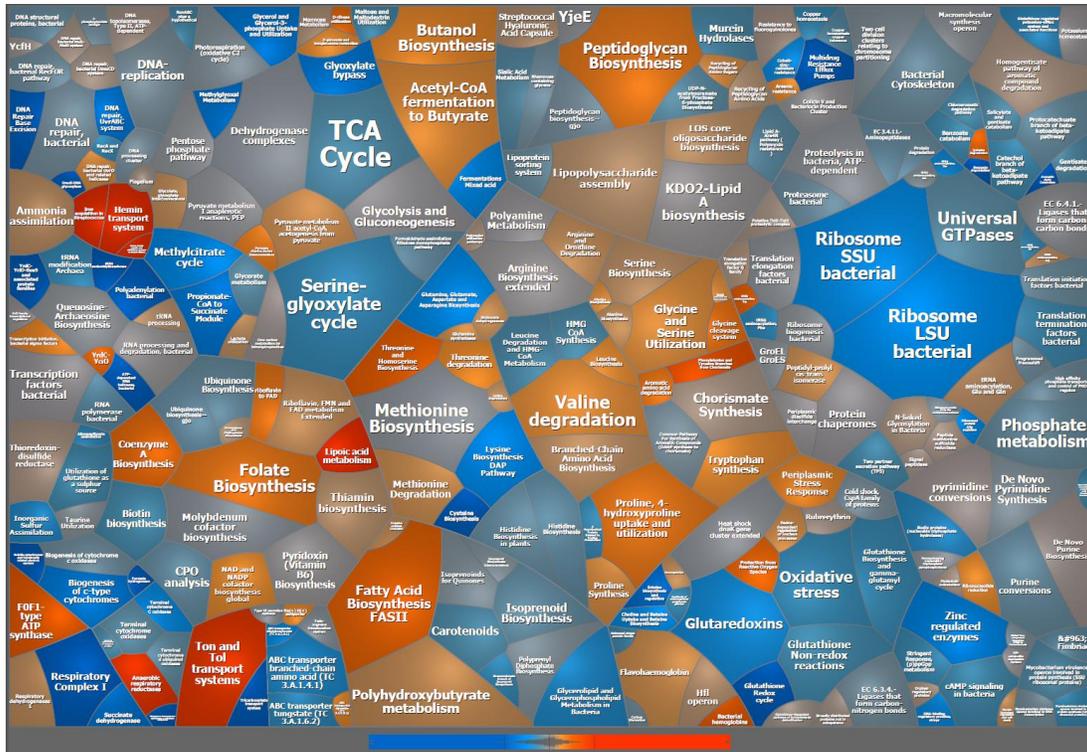


Figura 4. Rutas metabólicas de *B. parapertussis* afectadas por la limitación en hierro. En este Árbol de Voronoi e muestran las relaciones (SS-Fe/SS) de los valores del recuento espectral normalizado entre bacterias cultivadas en limitación de hierro (SS-Fe) y bacterias cultivadas en exceso de hierro (SS). El color azul indica una menor abundancia de proteínas en las bacterias crecidas sin hierro en comparación con las bacterias de control (cultivadas en SS); las regiones rojizas indican una mayor abundancia en respuesta a la limitación de hierro en comparación con el control. Las manchas grises indican proteínas que no cambiaron en abundancia en respuesta a la disponibilidad de hierro.

Las proteínas que mostraron cambios significativos entre ambas condiciones de cultivo fueron clasificadas funcionalmente utilizando el servidor MultiFun. De las 175 proteínas que cambian su expresión en limitación en hierro 63 pertenecen a la categoría de metabolismo, 31 son proteínas hipotéticas, 26 de procesos celulares y 22 a la categoría de transporte. La Figura 5 muestra la distribución de las proteínas diferenciales dentro de cada categoría funcional.

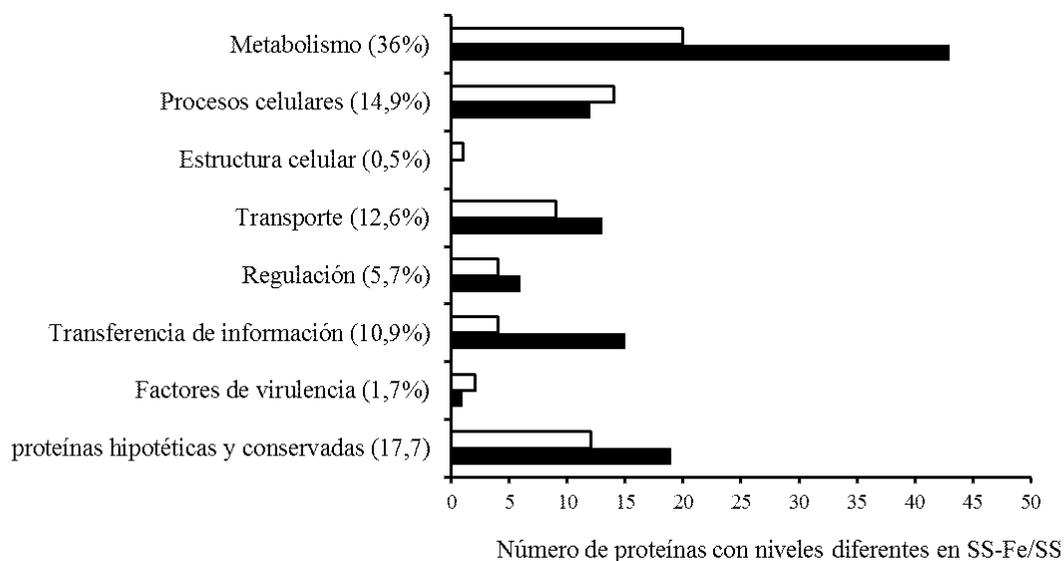


Figura 5 . Distribución de las proteínas diferenciales en las categorías funcionales. Se muestra el número de proteínas que se encontraron aumentadas estadísticamente (proporción SS-Fe / SS > 1,5 y un valor $q < 0,05$) (barras blancas) o disminuido (relación SS-Fe/SS < 0,66 y un valor $q < 0,05$) (barras negras) bajo limitación de hierro dentro de cada categoría funcional. El porcentaje de la distribución de proteínas reguladas de esa ruta de se muestra entre paréntesis.

2.3.1.1. Procesos celulares y adquisición de hierro

En condiciones de limitación de hierro, encontramos una mayor abundancia de varias proteínas implicadas en la adquisición de este nutriente a partir de diversas fuentes. Entre ellas, los receptores dependientes de tonB, BrfB (BPP2396), BfrC (BPP0079), que participan en la adquisición de hierro a partir de sideróforos aún desconocidos [34]. Otro receptor de sideróforos descrito como regulado por hierro en *B. pertussis* es el receptor de enterobactina BfeA [35]. Aunque el gen que codifica para este receptor está presente en el genoma de *B. paraptussis*, esta proteína no se encontró en este estudio proteómico. Es posible que se deba a que, como fue descrito recientemente [36], en *B. paraptussis* éste sea un pseudogen debido a una mutación del marco de lectura. Los sideróforos son pequeños compuestos quelantes de hierro de alta afinidad que se liberan al medio extracelular para capturar este metal del entorno. La relevancia de BrfB y BfrC aún no está

clara, pero podría indicar que *B. parapertussis* tiene la capacidad de capturar sideróforos producidos por otros microorganismos que sería de particular importancia en los primeros estadios de la infección.

Además, varias proteínas relacionadas con la adquisición de hierro a partir de grupos hemo también se encontraron incrementadas en abundancia durante la limitación en hierro. Específicamente, BhuR (BPP4185), BhuS (BPP4186) y BhuT (BPP4187). También encontramos aumento en la abundancia de una proteína no caracterizada que tiene un dominio de receptor dependiente de tonB, BPP1991 bajo limitación de hierro. El gen que codifica para esta proteína está presente en los genomas tanto de *B. pertussis* como de *B. parapertussis*, pero nunca se ha incluido en ninguna lista de transportadores dependientes de tonB de las bacterias del género *Bordetella* [4,15]. BPP1991 comparte un gran porcentaje de identidad con un transportador de membrana externa de coprógeno férrico/ácido rhodotorúlico de *Mycobacterium abscesus*. El coprógeno y el ácido rhodotorúlico son sideróforos producidos por algunos hongos tales como *Penicillium* y *Aspergillaceae*. Por lo que BPP1991 podría formar parte de alguno de los tantos sistemas de captura de hierro de *B. parapertussis*.

La adquisición de hierro a partir de sideróforos, grupos hemo o transferrina es un proceso dependiente de energía. El complejo tonB-exbB-exbD interactúa con los receptores de la membrana externa implicados en la obtención de hierro descritos anteriormente (BfrC, BrfB y BhuR) y transduce la energía requerida para la transferencia del hierro al espacio periplásmico. Se ha descrito que este complejo es crítico para la colonización en *B. pertussis*, probablemente debido a su participación en la adquisición de hierro durante la infección [37]. En este estudio proteómico encontramos que exbB (BPP2536) y exbD (BPP2537), aumentaron en abundancia en *B. parapertussis* en limitación de hierro. Por su

parte, la proteína TonB fue encontrada en los cuatro replicados de *B. parapertussis* limitada en hierro y en uno de la condición control, por lo que no fue considerada para el análisis final pero su inducción en limitación de hierro es clara. De estos resultados se deduce que *B. parapertussis* limitada en hierro aumenta su capacidad de captar hierro no solo a través del aumento en expresión de receptores de grupos hemo y de sideróforos, sino también aumentando la expresión del complejo TonB, un sistema que participa de muchos de esos mecanismos.

Otra proteína encontrada aumentada en abundancia en condiciones de ausencia de hierro es BPP1825. Esta proteína contiene un dominio de función desconocida (DUF4198). Estas proteínas fueron inicialmente mal anotadas como transportadoras de níquel tienen homología con permeasas de sistemas de transporte tipo ABC involucrados en el transporte de iones inorgánicos, como podría ser el hierro mismo. Aunque su especificidad no ha sido descrita, su homólogo en *B. pertussis* también se encontró aumentado bajo la limitación de hierro en las dos aproximaciones proteómicas llevadas a cabo por este grupo previamente [7,8], lo que sugiere que esta proteína podría cumplir un papel en la homeostasis de este oligoelemento.

Finalmente, también encontramos que BPP2980 y BPP2982 están aumentadas en abundancia en *B. parapertussis* limitada hierro. De acuerdo a un trabajo recientemente publicado por Banerjee y colaboradores [12], estas dos proteínas son parte de un sistema de transporte involucrado en la adquisición de hierro a partir de lactoferrina, transferrina y sideróforos. Nuestro grupo ha caracterizado previamente al homólogo de BPP2980 (también denominada AfuA) en *B. pertussis* (BP1640) como un antígeno y candidato vacunal contra *B. pertussis* en conjunto con otra proteína inducida en limitación de hierro BP1152 (denominada IRP1-3) cuyo homólogo en *B. parapertussis* es BPP3193. Ambas

proteínas mostraron ser buenos antígenos protectores en modelos murinos contra *B. pertussis* y actualmente están en ensayos preclínicos en babuinos. En este estudio proteómico, el homólogo de IRP1-3 en *B. parapertussis*, BPP3193, fue identificado en mayores niveles en limitación de hierro pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. La presencia de ambas proteínas en el proteoma de *B. parapertussis* nos llevó a estudiar la posibilidad de que estos antígenos sean también protectores contra esta especie y, por ende, buenos candidatos para una nueva generación de vacunas contra la tos convulsa. Ese estudio se describe en un capítulo posterior.

2.3.1.2. Metabolismo

Entre las proteínas con una mayor abundancia en la condición de limitación de hierro encontramos BPP1170, que es una proteína involucrada en la producción de polihidroxialcanoato (PHA). El PHA es un polímero de reserva; la mayor abundancia de esta proteína en ausencia de hierro podría estar relacionada con el exceso de fuente de carbono. Se encontraron resultados similares en *B. pertussis* bajo limitación de hierro, lo que indica que ambas especies son capaces de almacenar energía y carbono en forma de un polímero de almacenamiento que podrá metabolizarse cuando las fuentes externas de carbono estén menos disponibles. BPP1169, otra proteína del mismo operón y que formaría parte del mismo proceso de biosíntesis también fue encontrada aumentada en limitación de hierro, aunque no significativamente ($q=0,08$).

En lo que se refiere a la capacidad de *B. parapertussis* de degradar de ácidos grasos, no encontramos un indicio claro de la importancia de esta vía en el metabolismo de *B. parapertussis* durante la limitación de hierro, como si se observó en el caso de *B. pertussis*

[8]. En nuestro estudio, solo dos proteínas relacionadas con la biosíntesis de ácidos grasos y una relacionada con la degradación se encontraron aumentadas en abundancia en *B. parapertussis* (FabI-BPP1167-, BPP3417 y BPP3647), y una proteína involucrada tanto en la biosíntesis como en la degradación, se encontró disminuida en abundancia (FadD2-BPP3729-) bajo limitación de hierro.

Por otro lado, tres enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) se encontraron disminuidas en abundancia bajo limitación de hierro, concretamente, SdhB (BPP3227), AcnA (BPP2394) y AcnB (BPP2400). La disminución en abundancia de proteínas de este ciclo se ha descrito previamente para otras bacterias [38] y levaduras [39]. Entre las proteínas del TCA solo FumC (BPP3619) se vio incrementada en abundancia en ausencia de hierro. Esta enzima es una forma independiente de hierro de la fumarato-hidratasa. Mayores cantidades de FumC son probablemente una respuesta tendiente a compensar la disminución de la fumarato-hidratasa dependiente de Fe como se describió previamente en *E. coli* [40] y también en *B. pertussis* [7]. El ciclo de TCA es una vía metabólica dependiente de hierro debido a la presencia de enzimas que contienen grupos Fe-S. Por lo tanto, el cambio en la abundancia de estas proteínas podría deberse a una estrategia de conservación de hierro. Consistente con la cantidad reducida de proteínas de TCA, observamos una disminución en la abundancia de muchas proteínas que contienen grupos Fe-S implicadas en la biosíntesis de aminoácidos como la glutamato sintasa (BPP4254), GltB (BPP4253) e IlvD1 (BPP0429). Estos cambios predicen un aprovechamiento menos eficiente de la fuente de Carbono y Energía en limitación de hierro lo cual concuerda con la menor velocidad específica de crecimiento de *B. parapertussis* observada en limitación de hierro.

Por otro lado, proteínas relacionadas con el metabolismo energético, por ejemplo, proteínas de la cadena de transferencia de electrones como NADH ubiquinona oxidorreductasas: NuoB (BPP3390), NuoD (BPP3388), NuoG (BPP3385), NuoI (BPP3383) y citocromos (BPP1932, cyt -BPP3769-, BPP4111, BPP4243 y BPP3478) se encontraron disminuidos en abundancia bajo limitación de hierro lo que supone una menor cantidad de energía disponible para biosíntesis. Lo mismo se observó en petA (BPP4283) y BPP0066, ambas proteínas involucrados en la biogénesis de citocromos. Los citocromos transportan electrones como parte del proceso de respiración celular y tienen ligados uno o varios grupos hemo. Se ha observado que la transcripción de los genes de citocromos se reprime de manera dependiente de Fur en ausencia de hierro [41]. Muchas de las proteínas enumeradas aquí, como las enzimas del TCA y los citocromos, usan hierro como cofactor, por lo que su disminución en condiciones de limitación en hierro puede ser interpretada como una estrategia para preservar el hierro. Pero, al analizar más en profundidad este proteoma, se observa que en ausencia de hierro aumentan algunas proteínas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos aromáticos y hasta de la biosíntesis de ATP. En conjunto, este estudio muestra como *B. paraptussis* adapta su metabolismo ante la escasez de hierro y redirige este nutriente cambiando las rutas metabólicas para mantener la viabilidad y eventualmente sobrevivir dentro del hospedador.

Entre las proteínas encontradas en menor abundancia en limitación de hierro respecto a la condición de exceso de hierro, hallamos varias proteínas ribosomales: rpmE2 (BPP1847), rpsG (BPP0025), rpsO (BPP3432), rplU (BPP0311), rplR (BPP0047), rpsI (BPP3883), rpsE (BPP0048), rpsF (BPP2466), rplW (BPP0047). Además, encontramos una disminución en abundancia de proteínas con grupos de Fe-S como BPP0276, BPP1928, BPP1931 y BPP0280. Por otra parte, se encontró que la abundancia de Fpr (BPP2979), una

ferredoxina-NADP reductasa aumenta en condiciones de limitación de hierro. Esta última proteína participa como donante o aceptor de electrones en el ensamblaje de los grupos Fe-S y en otros microorganismos y se ha encontrado aumentada bajo múltiples condiciones de estrés, incluyendo la ausencia de hierro [42]. Es posible que Fpr aumente bajo limitación de hierro como parte de un mecanismo compensatorio para restaurar o reparar esas proteínas con grupos Fe-S con el fin de mantener dichas funciones celulares.

2.3.1.4. Factores de virulencia

En el presente estudio, la mayoría de los factores de virulencia regulados por el sistema BvgAS no mostraron cambios significativos en su expresión en respuesta a la disponibilidad de hierro, excepto por la toxina CyaA (BPP0321). A diferencia de lo encontrado en el caso de *B. pertussis* [7], y también en trabajos que estudiaron el efecto del hierro en factores de virulencia de *B. bronchiseptica* [43], la abundancia de CyaA de *B. paraptussis* aumenta en bacterias adaptadas a la limitación de hierro. CyaA es una toxina con un dominio de adenilato ciclasa, y otro de hemolisina; un factor de virulencia que confiere la capacidad de evadir el sistema inmune tanto a *B. pertussis* [44–46] como a *B. paraptussis* [47]. Esta toxina tiene la capacidad de afectar a células del sistema inmune y modular la respuesta innata evitando la fagocitosis y los mecanismos intracelulares de muerte, como el estallido respiratorio y la síntesis de óxido nítrico [46]. Dada la relevancia de este factor de virulencia y para confirmar el aumento de CyaA en respuesta a la disponibilidad de hierro, estudiamos la abundancia relativa de dicha proteína por western blot. Para ello, muestras proteicas de *B. paraptussis* cultivada en SS o SS-Fe, conteniendo la misma cantidad de proteínas, fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida

y transferidas a membranas de PVDF y evaluadas en ensayos de inmunodetección con anticuerpos anti-CyaA. La Figura 6 muestra que en limitación de hierro hay un aumento relativo de CyaA.



Figura 6. Efecto de la limitación de hierro en la expresión de adenilato ciclasa en *B. parapertussis*. Extractos de proteína totales de *B. parapertussis* cultivada en presencia (SS) o ausencia (SS-Fe) de hierro se analizaron por electroforesis en SDS-PAGE (7, 5%), se transfirieron a membranas de PVDF, y se revelaron con suero de ratón contra CyaA. Los gels se cargaron con la misma cantidad de proteínas de cada muestra.

El aumento en abundancia de esta toxina bajo limitación en hierro podría implicar una mayor virulencia en condiciones fisiológicas. Es importante señalar que, a diferencia de *B. pertussis* que expresa toxina pertussis, para *B. parapertussis* CyaA es la toxina más importante involucrada en modulación de la respuesta defensiva del huésped. Un estudio reciente sugiere una diferencia importante en la CyA de ambas especies causales de la tos convulsa con posible impacto en la fase de persistencia intracelular. Se observó que CyaA de *B. parapertussis*, a diferencia de CyaA de *B. pertussis*, tiene una reducida capacidad de intoxicar ciertas células eucariotas [48]. Estudios complementarios son necesarios para ahondar en el rol de la toxina adenilato ciclasa en la patogénesis de *B. parapertussis*, pero es posible que esta bacteria dependa del aumento en la expresión de CyaA durante la infección para lograr la inmunomodulación necesaria para garantizar su persistencia.

El autotrasportador BPP1617 también se encontró en mayor abundancia bajo limitación de hierro. Esta proteína no tiene ningún homólogo cercano en el genoma de *B.*

pertussis y tiene un gran porcentaje de identidad con la proteína P93 de *Mycobacterium abscessus* que estaría involucrada en procesos de adhesión a células.

Por último, se observó una disminución significativa de WbmQ (BPP0128) en baja disponibilidad de hierro. Esta proteína es una formiltransferasa putativa y parte del operón involucrado en la biosíntesis de antígeno O [49]. En un trabajo previo se encontró que una mutante de *Brucella melitensis* defectiva en la formiltransferasa no expresa antígeno O [50], indicando una relación directa entre esta enzima y la expresión de esta molécula. Se investigó entonces la cantidad relativa de antígeno O de *B. paraptussis* cultivada en exceso y en limitación de hierro. Para ello igual número de bacterias de cada condición se lisaron y se extrajo el LPS. Estas muestras se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE y se visualizaron por tinción con plata. La Figura 7 muestra que las células *B. paraptussis* cultivadas en limitación de hierro tiene una cantidad menor de antígeno O en comparación con las bacterias cultivadas en condiciones de exceso de hierro. Algo similar a lo observado en este estudio se encontró *Helicobacter pylori* que mostró una disminución significativa del contenido de antígeno O en respuesta a la limitación de hierro [51].

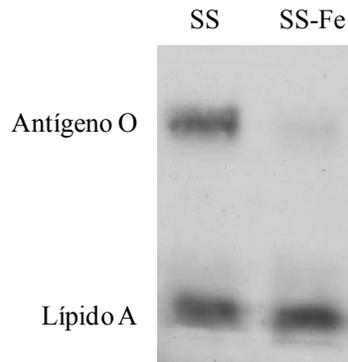


Figura 7. Efecto de la disponibilidad de hierro sobre la expresión del antígeno O en *B. paraptussis*. LPS extraído de igual número de células de *B. paraptussis* cultivada en presencia (SS) o ausencia (SS-Fe) de hierro se analizaron por electroforesis en SDS-PAGE (15%), y se revelaron con tinción con plata

Como se mencionó anteriormente el antígeno O es uno de los factores de virulencia más relevantes durante la colonización del tracto respiratorio por *B. paraptussis*. En trabajos previos Zhang y colaboradores [52] mostraron que el antígeno O ejerce un apantallamiento de los antígenos de superficie lo que evita parcialmente la opsonización de la bacteria por anticuerpos específicos y también interfiere con la deposición de complemento sobre la superficie bacteriana [53] interfiriendo tanto con la inmunidad innata como con la adquirida. Evaluamos entonces el efecto que la adaptación fenotípica a la limitación de hierro, condición que la bacteria enfrentará durante la colonización, sobre el reconocimiento de antígenos en la superficie. En particular nos interesaba evaluar si la disminución del contenido de antígeno O observada en limitación de hierro aumentaba el reconocimiento de los anticuerpos inducidos por la vacuna acelular. Cabe destacar que, de los tres antígenos que se incluyen en la vacuna que evaluamos (toxina pertussis, pertactina y hemaglutinina filamentosa), uno de ellos no se expresa en por *B. paraptussis* (toxina pertussis) y los otros dos (pertactina y hemaglutinina filamentosa) no muestran cambios

significativos en condiciones de limitación de hierro, según nuestros datos de proteómica *shotgun* (Tabla Anexa). Para evaluar el efecto de la adaptación a la limitación de hierro en el reconocimiento de los antígenos de superficie usamos células de *B. parapertussis* cultivada en exceso y limitación de hierro como antígeno de sensibilización en ELISA en los que se determinó el título de un suero producido en ratones vacunados con vacuna acelular (sueros anti-aP). La Figura 8 muestra que los sueros inducidos por vacunación con aP tienen un mayor reconocimiento de la bacteria limitada en hierro. Esto sugiere que, la limitación en hierro efectivamente genera cambios en el antígeno O de *B. parapertussis* que disminuye un poco su capacidad de apantallamiento.

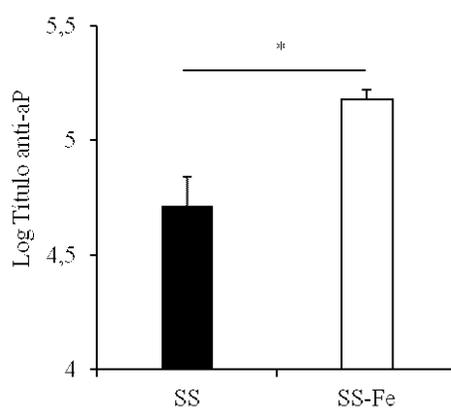


Figura 8. Efecto de la limitación de hierro sobre el apantallamiento del antígeno O de *B. parapertussis*. El título de sueros de ratones inmunizados con aP fue determinado mediante ensayos de ELISA en placas sensibilizadas con células enteras de *B. parapertussis* cultivada en exceso (SS) o limitación de hierro (SS-Fe). (* $p < 0,05$). Los títulos de anticuerpos se expresan como la media del logaritmo del título \pm DE de resultados representativos de dos determinaciones independientes por triplicado

Dado que el antígeno O es una molécula altamente inmunogénica, esta reducción en condiciones fisiológicas podría favorecer la persistencia bacteriana dentro del hospedador. En apoyo de esta hipótesis, se han encontrado que algunos patógenos como *Pseudomonas*

aeruginosa modifican o incluso dejan de expresar el antígeno O [54]. Lo mismo se ha observado para *B. bronchiseptica*, recuperados de infecciones crónicas [55].

2.3.2. Análisis comparativo del proteoma de *B. parapertussis* cultivada en limitación o exceso de hierro a través de geles bidimensionales

Con el fin de recuperar las proteínas diferenciales para evaluación antigénica se llevó a cabo la caracterización por proteómica de *B. parapertussis* cultivada en ambas condiciones de disponibilidad de hierro en geles bidimensionales. Proteínas totales de *B. parapertussis* creciendo en exceso y limitación de hierro fueron sometidas a electroforesis bidimensional y analizados según se especifica en la sección de Materiales y Métodos. El análisis de la imagen de los mapas en 2D reveló un promedio de 550 spots. Cabe señalar que el número de proteínas que se observa (bastante menor que el número identificado por la proteómica *shotgun*) es lo esperado en este tipo de estudio proteómico, fundamentalmente porque aquí cubrimos únicamente las proteínas cuyo punto isoeléctrico está entre 4 y 7. En este rango de pH se encuentra la mayoría, pero no todas, las proteínas bacterianas. El análisis comparativo entre los geles 2D correspondientes a bacterias cultivadas en cada condición se llevó a cabo por medio del programa ProteomWeaver. Aquellas proteínas con expresión diferencial, aumentadas en bacterias adaptadas a la limitación de hierro fueron recuperadas del gel y enviadas para su identificación por MALDI-TOF (Figura 9 y Tabla 1). Debido a problemas técnicos solo 6 proteínas diferenciales pudieron ser identificadas, además de GroEl que sirvió como *landmark* para la comparación. Las 6 proteínas que se identificaron fueron IrpA, Fpr, NlpA, IRP1-1, DapD, y LivJ.

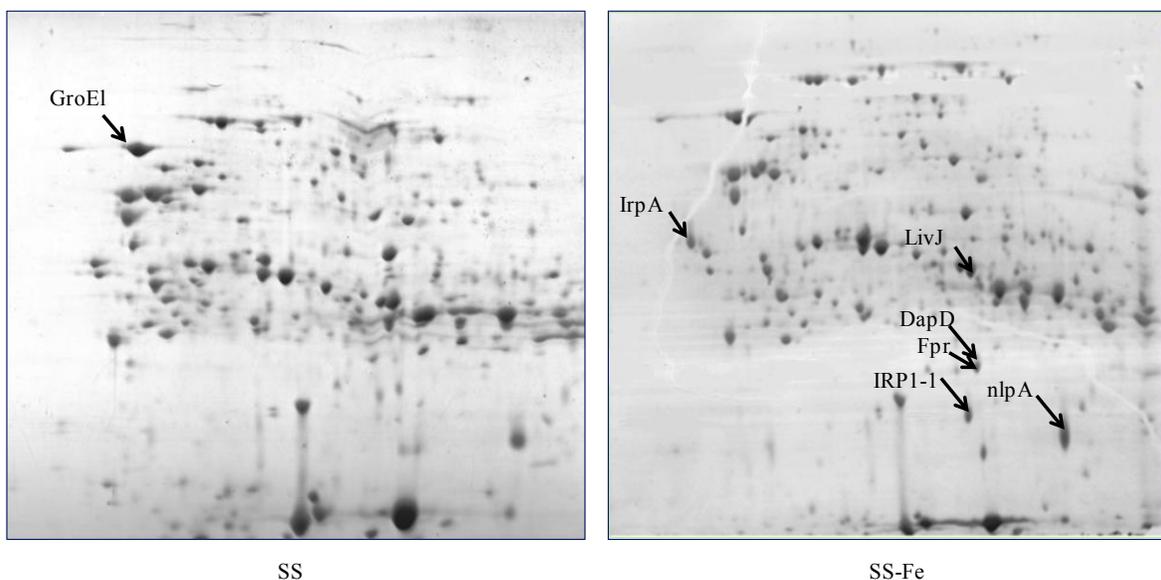


Figura 9. Geles 2D representativos (pH: 4-7, SDS-PAGE 10%) de *B. paraperussis* creciendo en exceso (SS) o limitación de hierro (SS-Fe) teñidos con coomasie coloideal. Las proteínas sometidas a identificación por MALDI-TOF MS se indican con flechas y se detallan en la Tabla 3.

IrpA (BPP2269), es una proteína putativa exportada que tiene un dominio similar a imelisina. Estas proteínas reguladas por hierro están potencialmente involucradas en la interacción con el hospedador pero también en mecanismos de absorción de hierro en diversos microorganismos. Las Imelisininas se encontraron primero como peptidasas con capacidad de cortar insulina y fibrinógeno en *Pseudomonas aeruginosa* [56]. Posteriormente, se ha demostrado que son esenciales para el crecimiento en condiciones de ausencia de hierro para *Synechococcus* [57] e incluso recientemente se ha sugerido un papel en la adquisición de grupos hemo [58]. Dos proteínas con dominio de imelisininas (BPP2269 y BPP2271) fueron encontradas en la proteómica *shotgun* y muestran un claro incremento en condiciones de limitación en hierro, pero no fueron incluidas en la lista final de diferenciales porque se identificaron solo en un replicado biológico.

Tabla 1 Proteínas diferenciales según la electroforesis bidimensional identificadas por MALDI-TOF

ORF	Nombre	ms/mascot score	Porcentaje de cobertura	Condición de crecimiento	Intensidad de spot (SS/SS-Fe)	Anotación
BPP2269	IrpA	90	24	Limitación de hierro	0/2.269	peptidasa
BPP2979	Fpr	93	41	Limitación de hierro	0.61/2.5	Ferredoxin--NADP reductasa
BPP1825	IRP1-1	80	27	Limitación de hierro	0.083/7.4	Proteína hipotética
BPP3723	nlpA	127	52	Limitación de hierro	0.9/18.4	Proteína putativa exportada
BPP1995	DapD	120	31	Limitación de hierro	0.13/0.71	2,3,4,5-tetrahiropiridin-2,6-dicarboxilato N-succiniltransferasa
BPP2948	LivJ	124	42	Limitación de hierro	2.63/1.75	Proteína de unión a leucina/isoleucina/valina
BPP0868	GroEl	112	39	Limitación de hierro/exceso de hierro	7.75/7.8	Chaperonina

La ferredoxina-NADP reductasa, Fpr (BPP2979), también fue encontrada en la proteómica *shotgun*. Su supuesta función en la biosíntesis de grupos Fe-S ya fue descrita más arriba. Se ha demostrado que esta proteína está regulada positivamente en múltiples condiciones de estrés [42]. También está relacionado con la adquisición de hierro a partir de hemo en *Leptospira interrogans* [59].

NlpA (BPP3723), que también se encontró aumentada en limitación de hierro por proteómica *shotgun*, es un supuesto transportador ABC de metales y una lipoproteína relacionada con varias proteínas antigénica. Se presume que tiene papel en la activación de TLR-2 durante la infección y la virulencia [60].

También se identificó a la proteína DapD (BPP1995), que participa en la biosíntesis de la lisina y el precursor diaminopemilato (DAP) necesarios para la síntesis de la citotoxina traqueal implicada en la virulencia de la bacteria. Proteínas de la ruta de

biosíntesis de DAP ya se habían visto aumentada en *B. pertussis* durante la limitación de hierro [7], pero no se observó lo mismo en las aproximaciones por proteómica *shotgun*.

Por último, LivJ (BPP2948), una proteína de unión a leucina, isoleucina y valina que forma parte de un sistema de transporte de aminoácidos ramificados de alta afinidad. Se ha visto que *Campylobacter jejuni* necesita de esta proteína para su completa virulencia [61]. La misma ha sido previamente identificada como antígeno en *Shigella flexneri*, *Brucella abortus* e incluso en dos trabajos de inmunoproteómica de *B. pertussis* [62,63].

2.3.3. Análisis de la reactividad de las proteínas inducidas por limitación de hierro con sueros de individuos infectados

Los spots correspondientes a las proteínas sobreexpresadas en el fenotipo inducido por limitación de hierro e identificadas mencionadas en el apartado anterior fueron recuperadas por elución y utilizadas en ensayos de inmunodetección (dot blot) con IgG purificada de un pool de sueros de individuos convaleciente de tos convulsa [27,64,65]. Como control positivo, se incluyeron células de *B. parapertussis* previamente sonicada, y como control negativo, se usó lactoferrina humana. De las seis proteínas incluidas en el ensayo, solo LivJ fue reconocida por los anticuerpos generados en el transcurso de la enfermedad (Figura 10).

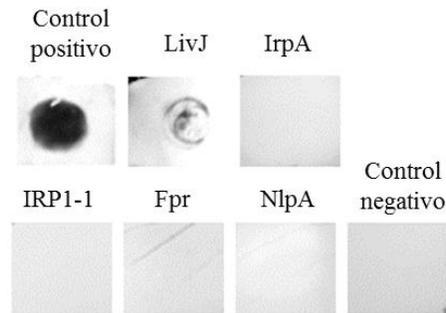


Figura 10. Reactividad de las proteínas diferenciales con anticuerpos de personas enfermas de tos convulsa. Las proteínas recuperadas del gel, fueron cargadas en una membrana de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpos (fracción IgG) de un pool de sueros de individuos convalecientes. Células de *B. paraptussis* sonicadas y lactoferrina humana fueron utilizadas como control positivo y negativo, respectivamente.

Como el dot blot que se muestra en la Figura 10 se llevó a cabo con IgG humana proveniente de individuos infectados que pueden tener anticuerpos contra ambas especies de *Bordetella* (*B. pertussis* y *B. paraptussis*), se confirmó la reactividad de esta proteína con sueros inducidos por infección con *B. paraptussis* empleando sueros de ratones libres de patógenos infectados con esta especie de *Bordetella*. En la Figura 11 se confirma la reactividad de esta proteína con sueros de ratones infectados únicamente con *B. paraptussis* por lo que en los capítulos siguientes se evaluará su potencial como antígeno vacunal.

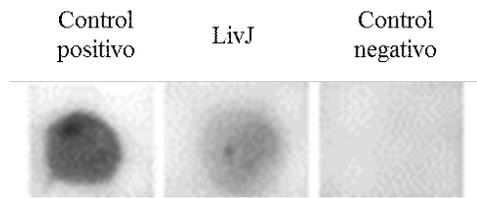


Figura 11. Reactividad de LivJ con anticuerpos de ratones infectados con *B. paraptussis*. La proteínas LivJ recuperada del gel, fue transferida a una membrana de nitrocelulosa e incubada con suero de ratones infectados con *B. paraptussis*. Células de *B. paraptussis* sonicadas fueron utilizadas como control positivo y suero normal de ratón como anticuerpo primario en el control negativo.

2.4. Conclusiones

En este capítulo se estudió por primera vez el proteoma *B. parapertussis* a través de dos técnicas con diferentes alcances y limitaciones que permiten un análisis más completo del fenotipo de esta bacteria junto con la identificación de nuevas proteínas inmunogénicas.

Empleando ambas estrategias se estudió la adaptación fenotípica de la bacteria a una condición fisiológica como es la limitación de hierro. Este fenotipo ya había sido estudiado en *B. pertussis* tanto a través de transcriptómica como de proteómica por geles bidimensionales y *shotgun*. En comparación, el estudio realizado en *B. parapertussis* arrojó un número más grande de proteínas, una mayor cobertura del genoma y hasta un mayor porcentaje de proteínas reguladas por la escasez de hierro. Dentro de las proteínas reguladas por hierro, como era de esperarse, se encontró un aumento en muchas relacionadas con la adquisición de este metal a partir de sideróforos y grupos hemo. Si bien hay un gran grado de analogía con lo observado para *B. pertussis*, también se identificaron algunos receptores nuevos como BPP1991. En limitación de hierro se observó un aumento significativo en la abundancia del homólogo de AfuA de *B. parapertussis* y un aumento del homólogo de IRP1-3, aunque en este último caso el aumento no fue estadísticamente significativo. Ambas proteínas son inmunogénicas y su posible utilización en formulaciones vacunales contra *B. parapertussis* será estudiada en los próximos capítulos.

Entre los factores de virulencia, se observó una particularidad muy interesante. A diferencia de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*, la expresión de CyaA aumenta en *B. parapertussis* limitada en hierro, mientras que una enzima clave en el armado del antígeno O disminuye. La disminución en el nivel de antígeno O en *B. parapertussis* adaptada a la limitación de hierro hace más accesibles a los anticuerpos inducidos por vacuna acelular los

antígenos comunes a ambas especies incluidos en estas vacunas, sin embargo este aumento en el reconocimiento de antígenos de superficie no parece afectar la capacidad de la *B. paraptussis* de colonizar el tracto respiratorio de ratones inmunizados con este tipo de vacunas.

Finalmente, la proteómica con geles bidimensionales fue utilizada para la búsqueda de nuevos candidatos vacunales. El análisis serológico de las proteínas inducidas en limitación de hierro permitió seleccionar un potencial candidato vacunal; LivJ. Esta proteína será evaluada como antígeno vacunal en capítulos siguientes.

2.5. Bibliografia

- [1] H. Bokhari, F. Said, M. a Syed, A. Mughal, Y.F. Kazi, K. Heuvelman, F.R. Mooi, Whooping cough in Pakistan: *Bordetella pertussis* vs *Bordetella parapertussis* in 2005-2009, *Scand. J. Infect. Dis.* 43 (2011) 818–820. doi:10.3109/00365548.2011.577804.
- [2] J.G. Liese, C. Renner, S. Stojanov, B.H. Belohradsky, Clinical and epidemiological picture of *B pertussis* and *B parapertussis* infections after introduction of acellular pertussis vaccines, *Arch. Dis. Child.* 88 (2003) 684–687. doi:10.1136/adc.88.8.684.
- [3] Q. He, M.K. Viljanen, H. Arvilommi, B. Aittanen, J. Mertsola, Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population, *JAMA.* 280 (1998) 635–637. doi:10.1001/jama.280.7.635.
- [4] J. Parkhill, M. Sebahia, A. Preston, L.D. Murphy, N. Thomson, D.E. Harris, M.T.G. Holden, C.M. Churcher, S.D. Bentley, K.L. Mungall, A.M. Cerdeño-Tárraga, L. Temple, K. James, B. Harris, M. a Quail, M. Achtman, R. Atkin, S. Baker, D. Basham, N. Bason, I. Cherevach, T. Chillingworth, M. Collins, A. Cronin, P. Davis, J. Doggett, T. Feltwell, A. Goble, N. Hamlin, H. Hauser, S. Holroyd, K. Jagels, S. Leather, S. Moule, H. Norberczak, S. O’Neil, D. Ormond, C. Price, E. Rabinowitsch, S. Rutter, M. Sanders, D. Saunders, K. Seeger, S. Sharp, M. Simmonds, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, L. Unwin, S. Whitehead, B.G. Barrell, D.J. Maskell, Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*, *Nat. Genet.* 35 (2003) 32–40. doi:10.1038/ng1227.
- [5] M. Semanjski, B. Macek, Shotgun proteomics of bacterial pathogens : advances, challenges and clinical implications, *Expert Rev. Proteomics.* 9450 (2016). doi:10.1586/14789450.2016.1132168.
- [6] T.J. Brickman, C. a Cummings, S.-Y. Liew, D. a Relman, S.K. Armstrong, Transcriptional profiling of the iron starvation response in *Bordetella pertussis* provides new insights into siderophore utilization and virulence gene expression, *J. Bacteriol.* 193 (2011) 4798–812. doi:10.1128/JB.05136-11.
- [7] M.L. Perez Vidakovics, J. Paba, Y. Lamberti, C. Andre Ricart, M. Valle De Sousa, M.E. Rodriguez, Profiling the *Bordetella pertussis* Proteome during Iron Starvation, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 2518–2528. doi:10.1021/pr060681i.
- [8] J. Alvarez Hayes, Y. Lamberti, K. Surmann, F. Schmidt, U. Völker, M.E. Rodríguez, Shotgun proteome analysis of *Bordetella pertussis* reveals a distinct influence of iron availability on the bacterial metabolism, virulence, and defense response, *Proteomics.* 15 (2015) 2258–2266. doi:10.1002/pmic.201400512.
- [9] J.E. Posey, F.C. Gherardini, Lack of a Role for Iron in the Lyme Disease Pathogen, *Science* (80-.). 288 (2000) 1651–1653.
- [10] J.A. Imlay, S. Linn, DNA Damage and Oxygen Radical Toxicity, *Science* (80-.). 240 (1988) 1302–1309.
- [11] M. Nairz, A. Schroll, T. Sonnweber, G. Weiss, The struggle for iron - a metal at the host-pathogen interface, *Cell. Microbiol.* 12 (2010) 1691–1702. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01529.x.
- [12] S. Banerjee, A.J. Weerasinghe, C.J. Parker Siburt, R.T. Kreulen, S.K. Armstrong, T.J. Brickman, L.A. Lambert, A.L. Crumbliss, *Bordetella pertussis* FbpA Binds Both Unchelated Iron and Iron Siderophore Complexes, *Biochemistry.* 53 (2014) 3952–

3960. doi:10.1021/bi5002823.
- [13] T.J. Brickman, S.K. Armstrong, Iron and pH-responsive FtrABCD ferrous iron utilization system of *Bordetella* species, *Mol. Microbiol.* 100 (2012) 130–134. doi:10.1016/j.pestbp.2011.02.012. Investigations.
- [14] T.J. Brickman, H.O.Y. Kang, S.K. Armstrong, Transcriptional Activation of *Bordetella* Alcaligin Siderophore Genes Requires the AlcR Regulator with Alcaligin as Inducer, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 483–489. doi:10.1128/JB.183.2.483.
- [15] T.J. Brickman, M.T. Anderson, S.K. Armstrong, *Bordetella* iron transport and virulence, *BioMetals.* 20 (2007) 303–22. doi:10.1007/s10534-006-9031-1.
- [16] J. Alvarez Hayes, E. Erben, Y. Lamberti, M. Ayala, F. Maschi, C. Carbone, B. Gatti, G. Parisi, M.E. Rodríguez, Identification of a new protective antigen of *Bordetella pertussis*, *Vaccine.* 29 (2011) 8731–8739. doi:10.1016/j.vaccine.2011.07.143.
- [17] J. Alvarez Hayes, E. Erben, Y. Lamberti, G. Principi, F. Maschi, M. Ayala, M.E. Rodríguez, *Bordetella pertussis* iron regulated proteins as potential vaccine components, *Vaccine.* 31 (2013) 3543–3548. doi:10.1016/j.vaccine.2013.05.072.
- [18] M.S. Walters, H.L.T. Mobley, Bacterial proteomics and identification of potential vaccine targets, *Expert Rev. Vaccines.* 7 (2010) 181–184.
- [19] X. Peng, X. Ye, S. Wang, Identification of novel immunogenic proteins of *Shigella flexneri* 2a by proteomic methodologies, *Vaccine.* 22 (2004) 2750–2756. doi:10.1016/j.vaccine.2004.01.038.
- [20] S.O.T. Curreem, R.M. Watt, S.K.P. Lau, P.C.Y. Woo, Two-dimensional gel electrophoresis in bacterial proteomics, *Protein Cell.* 3 (2012) 346–363. doi:10.1007/s13238-012-2034-5.
- [21] B. Porteus, C. Kocharunchitt, R.E. Nilsson, T. Ross, J.P. Bowman, Utility of gel-free, label-free shotgun proteomics approaches to investigate microorganisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90 (2011) 407–416. doi:10.1007/s00253-011-3172-z.
- [22] D.W. Stainer, M.J. Scholte, A Simple Chemically Defined Medium for the Production of Phase I *Bordetella pertussis*, *J. Gen. Microbiol.* 63 (1971) 211–220. doi:10.1099/00221287-63-2-211.
- [23] J. Alvarez Hayes, J.M. Oviedo, H. Valdez, J.M. Laborde, F. Maschi, M. Ayala, R. Shah, M. Fernandez Lahore, M.E. Rodriguez, A recombinant iron transport protein from *Bordetella pertussis* confers protection against *Bordetella parapertussis*, *Microbiol. Immunol.* 61 (2017) 407–415. doi:10.1111/1348-0421.12532.
- [24] B. Schwyn, J.B. Neilands, Universal Chemical Assay for the Detection Determination of Siderophores, *Anal. Biochem.* 56 (1987) 47–56.
- [25] D. Hozbor, F.G. Chirido, M.E. Rodriguez, C. Valverde, O. Yantorno, Quantitation of adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* by enzyme linked immunosorbent assay, *Biologicals.* 23 (1995) 279–284. doi:10.1006/biol.1995.0046.
- [26] X. Zhang, E.M. Goebel, M.E. Rodríguez, A. Preston, E.T. Harvill, The O antigen is a critical antigen for the development of a protective immune response to *Bordetella parapertussis*, *Infect. Immun.* 77 (2009) 5050–8. doi:10.1128/IAI.00667-09.
- [27] J. Nagel, E.J. Poot-Scholten, Serum IgA antibody to *Bordetella pertussis* as an indicator of infection, *J. Med. Microbiol.* 16 (1983) 417–426.
- [28] J.A. Vizcaíno, A. Csordas, N. Del-Toro, J.A. Dianes, J. Griss, I. Lavidas, G. Mayer, Y. Perez-Riverol, F. Reisinger, T. Ternent, Q.W. Xu, R. Wang, H. Hermjakob, 2016 update of the PRIDE database and its related tools, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) D447–D456. doi:10.1093/nar/gkv1145.

- [29] Y. Benjamini, D. Drai, G. Elmer, N. Kafkafi, I. Golani, Controlling the false discovery rate in behavior genetics research, *Behav. Brain Res.* 125 (2001) 279–284. doi:10.1016/S0166-4328(01)00297-2.
- [30] R. Overbeek, T. Begley, R.M. Butler, J. V Choudhuri, H. Chuang, M. Cohoon, V. Crécy-Lagard, N. Diaz, T. Disz, R. Edwards, M. Fonstein, E.D. Frank, S. Gerdes, E.M. Glass, A. Goesmann, A. Hanson, D. Iwata-reuyl, R. Jensen, N. Jamshidi, L. Krause, M. Kubal, N. Larsen, B. Linke, A.C. McHardy, F. Meyer, H. Neuweger, G. Olsen, R. Olson, A. Osterman, V. Portnoy, G.D. Pusch, D.A. Rodionov, C. Rückert, J. Steiner, R. Stevens, I. Thiele, O. Vassieva, Y. Ye, O. Zagnitko, V. Vonstein, The Subsystems Approach to Genome Annotation and its Use in the Project to Annotate 1000 Genomes, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 5691–5702. doi:10.1093/nar/gki866.
- [31] M. Serres, Margrethe Hauge and Riley, Multifun, Multifunctional Classification Scheme for *Escherichia coli* K-12 Gene Products, *Microb. Comp. Genomics.* 5 (2000) 205–222. doi:10.1089/omi.1.2000.5.205.
- [32] A. Frey, J. Di Canzio, D. Zurakowski, A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays, *J. Immunol. Methods.* 221 (1998) 35–41. doi:10.1016/S0022-1759(98)00170-7.
- [33] D. Hozbor, M.E. Rodriguez, A. Samo, A. Lagares, O. Yantorno, Release of lipopolysaccharide during *Bordetella pertussis* growth, *Res. Microbiol.* 144 (1993) 201–209. doi:10.1016/0923-2508(93)90045-4.
- [34] B. Beall, Two iron-regulated putative ferric siderophore receptor genes in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis*, *Res. Microbiol.* 143 (1998) 189–201. doi:10.1016/S0923-2508(98)80079-X.
- [35] M.T. Anderson, S.K. Armstrong, The BfeR Regulator Mediates Enterobactin-Inducible Expression of *Bordetella* Enterobactin Utilization Genes, *J. Bacteriol.* 186 (2004) 7302–7311. doi:10.1128/JB.186.21.7302.
- [36] B. Linz, Y. V. Ivanov, A. Preston, L. Brinkac, J. Parkhill, M. Kim, S.R. Harris, L.L. Goodfield, N.K. Fry, A.R. Gorryng, T.L. Nicholson, K.B. Register, L. Losada, E.T. Harvill, Acquisition and loss of virulence-associated factors during genome evolution and speciation in three clades of *Bordetella* species, *BMC Genomics.* 17 (2016) 767. doi:10.1186/s12864-016-3112-5.
- [37] M. Lou Nicholson, B. Beall, Disruption of *tonB* in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis* prevents utilization of ferric siderophores, haemin and haemoglobin as iron sources, *Microbiology.* 145 (1999) 2453–2461. doi:10.1099/00221287-145-9-2453.
- [38] Z. Yao, Z. Wang, L. Sun, W. Li, Y. Shi, L. Lin, W. Lin, X. Lin, Quantitative proteomic analysis of cell envelope preparations under iron starvation stress in *Aeromonas hydrophila*, *BMC Microbiol.* 16 (2016) 161–173. doi:10.1186/s12866-016-0769-5.
- [39] S. Puig, E. Askeland, D.J. Thiele, Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation, *Cell.* 120 (2005) 99–110. doi:10.1016/j.cell.2004.11.032.
- [40] J.P. Folsom, A.E. Parker, R.P. Carlson, Physiological and proteomic analysis of *Escherichia coli* iron-limited chemostat growth, *J. Bacteriol.* 196 (2014) 2748–2761. doi:10.1128/JB.01606-14.
- [41] B.M. Carpenter, J.J. Gilbreath, O.Q. Pich, A.M. McKelvey, E.L. Maynard, Z.Z. Li, D. Scott Merrell, Identification and characterization of novel *helicobacter pylori* apo-

- Fur-Regulated target genes, *J. Bacteriol.* 195 (2013) 5526–5539.
doi:10.1128/JB.01026-13.
- [42] A. Romsang, J. Duang-nkern, W. Wirathorn, P. Vattanaviboon, S. Mongkolsuk, *Pseudomonas aeruginosa* IscR-Regulated Ferredoxin NADP (+) Reductase Gene (*fprB*) Functions in Iron-Sulfur Cluster Biogenesis and Multiple Stress Response, *PLoS One.* 10 (2015) e0134374. doi:10.1371/journal.pone.0134374.
- [43] J. Kurushima, A. Kuwae, A. Abe, Iron starvation regulates the type III secretion system in *Bordetella bronchiseptica*, *Microbiol. Immunol.* 56 (2012) 356–362. doi:10.1111/j.1348-0421.2012.00442.x.
- [44] H.A. Valdez, J.M. Oviedo, J.P. Gorgojo, Y. Lamberti, M.E. Rodriguez, *Bordetella pertussis* modulates human macrophage defense gene expression, *Pathog. Dis.* 74 (2016) ftw073. doi:10.1093/femspd/ftw073.
- [45] O. Cerny, J. Kamanova, J. Masin, I. Bibova, K. Skopova, P. Sebo, *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin Blocks Induction of Bactericidal Nitric Oxide in Macrophages through cAMP-Dependent Activation of the SHP-1 Phosphatase, *J. Immunol.* 194 (2015) 4901–4913. doi:10.4049/jimmunol.1402941.
- [46] G. Fedele, I. Schiavoni, I. Adkins, N. Klimova, P. Sebo, Invasion of Dendritic Cells, Macrophages and Neutrophils by the *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin: A Subversive Move to Fool Host Immunity, *Toxins (Basel).* 9 (2017) 293. doi:10.3390/toxins9100293.
- [47] J. Gorgojo, E. Scharrig, R.M. Gómez, E.T. Harvill, M.E. Rodriguez, *Bordetella parapertussis* Circumvents Neutrophil Extracellular Bactericidal Mechanisms, *PLoS One.* 12 (2017) e0169936. doi:10.1371/journal.pone.0169936.
- [48] A. Fukui-Miyazaki, H. Toshima, Y. Hiramatsu, K. Okada, K. Nakamura, Ak. Ishigaki, N. Shinzawa, H. Abe, Y. Horiguchi, The Eukaryotic Host Factor 14-3-3 Inactivates Adenylate Cyclase Toxins of *Bordetella bronchiseptica* and *B. parapertussis*, but Not *B. pertussis*, *MBio.* 9 (2018) 1–15. doi:10.1128/mBio.00628-18.
- [49] A. Preston, A.G. Allen, J. Cadisch, R. Thomas, K. Stevens, C.M. Churcher, K.L. Badcock, J. Parkhill, B. Barrell, D.J. Maskell, Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *bordetellae*, *Infect. Immun.* 67 (1999) 3763–3767. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=96651&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [50] F. Godfroid, A. Cloeckert, B. Taminiau, I. Danese, A. Tibor, X. De Bolle, P. Mertens, J.J. Letesson, Genetic organisation of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of *Brucella melitensis* 16M (wbk), *Res. Microbiol.* 151 (2000) 655–668. doi:10.1016/S0923-2508(00)90130-X.
- [51] J.I. Keenan, K. a Davis, C.R. Beaugie, J.J. McGovern, A.P. Moran, Alterations in *Helicobacter pylori* outer membrane and outer membrane vesicle-associated lipopolysaccharides under iron-limiting growth conditions, *Innate Immun.* 14 (2008) 279–290. doi:10.1177/1753425908096857.
- [52] X. Zhang, M.E. Rodríguez, E.T. Harvill, O antigen allows *B. parapertussis* to evade *B. pertussis* vaccine-induced immunity by blocking binding and functions of cross-reactive antibodies, *PLoS One.* 4 (2009) e6989. doi:10.1371/journal.pone.0006989.
- [53] E.M. Goebel, D.N. Wolfe, K. Elder, S. Stibitz, E.T. Harvill, O antigen protects *Bordetella parapertussis* from complement, *Infect. Immun.* 76 (2008) 1774–80. doi:10.1128/IAI.01629-07.

- [54] R.F. Maldonado, S. Isabel, M.A. Valvano, Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection, *FEMS Microbiol. Rev.* 40 (2016) 480–493. doi:10.1093/femsre/fuw007.
- [55] P. Gueirard, K. Le Blay, A. Le Coustumier, R. Chaby, N. Guiso, Variation in *Bordetella bronchiseptica* lipopolysaccharide during human infection, *FEMS Microbiol. Lett.* 162 (1998) 331–337. doi:10.1016/S0378-1097(98)00142-6.
- [56] B. Fricke, O. Parchmann, K. Kruse, P. Ruknagel, A. Schierhorn, S. Menge, Characterization and purification of an outer membrane metalloproteinase from *Pseudomonas aeruginosa* with fibrinogenolytic activity, *Biochim. Biophys. Acta.* 1454 (1999) 236–250.
- [57] S. Pcc, K.J. Reddy, G.S. Bullerjahn, D.M. Sherman, L.A. Sherman, Cloning, Nucleotide Sequence, and Mutagenesis of a Gene (*irpA*) Involved in Iron-Deficient Growth of the Cyanobacterium, *J. Bacteriol.* 170 (1988) 4466–4476.
- [58] K. Augustyniak, A. Gilles, E. Turlin, M. De, *Staphylococcus aureus* FepA and FepB Proteins Drive Heme Iron Utilization in *Escherichia coli*, *PLoS One.* 8 (2013) 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0056529.
- [59] A. Soldano, H. Yao, M. Rivera, E.A. Ceccarelli, D.L. Catalano-dupuy, Heme-iron utilization by *Leptospira interrogans* requires a heme oxygenase and a plastidic-type ferredoxin-NADP + reductase, *Biochim. Biophys. Acta.* 1840 (2014) 3208–3217. doi:10.1016/j.bbagen.2014.07.021.
- [60] P. Cornelis, S. Matthijs, L. Van Oeffelen, Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*, *BioMetals.* 22 (2009) 15–22. doi:10.1007/s10534-008-9193-0.
- [61] S. Basavanna, S. Khandavilli, J. Yuste, J.M. Cohen, A.H.F. Hosie, A.J. Webb, G.H. Thomas, J.S. Brown, Screening of *Streptococcus pneumoniae* ABC transporter mutants demonstrates that livJHMGF, a branched-chain amino acid ABC transporter, is necessary for disease pathogenesis, *Infect. Immun.* 77 (2009) 3412–3423. doi:10.1128/IAI.01543-08.
- [62] Y.Z. Zhu, C.S. Cai, W. Zhang, H.X. Guo, J.P. Zhang, Y.Y. Ji, G.Y. Ma, J.L. Wu, Q.T. Li, C.P. Lu, X.K. Guo, Immunoproteomic analysis of human serological antibody responses to vaccination with whole-cell pertussis vaccine (WCV), *PLoS One.* 5 (2010) e13915. doi:10.1371/journal.pone.0013915.
- [63] E. Altındış, B.E. Tefon, V. Yildirim, E. Özcengiz, D. Becher, M. Hecker, G. Özcengiz, Immunoproteomic analysis of *Bordetella pertussis* and identification of new immunogenic proteins, *Vaccine.* 27 (2009) 542–548. doi:10.1016/j.vaccine.2008.11.020.
- [64] M.E. Rodriguez, S.M. Hellwig, D.F. Hozbor, J. Leusen, W.L. van der Pol, J.G. van de Winkel, Fc receptor-mediated immunity against *Bordetella pertussis*, *J. Immunol.* 167 (2001) 6545–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714823>.
- [65] J. Gorgojo, Y. Lamberti, H. Valdez, E.T. Harvill, M.E. Rodriguez, *Bordetella parapertussis* Survives the Innate Interaction with Human Neutrophils by Impairing Bactericidal Trafficking inside the Cell through a Lipid Raft-Dependent Mechanism Mediated by the Lipopolysaccharide O Antigen, *Infect. Immun.* 80 (2012) 4309–4316. doi:10.1128/IAI.00662-12.

Tabla Anexa. Proteínas de *B. parapertussis* cultivadas en limitación y exceso de hierro identificadas por proteómica *shotgun*

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP3360	<i>risS</i>	Sensor kinase protein	6,9E+06	20,8	6,0E+06	23,2	0,9	0,50	0,68
BPP3406	<i>BPP3406</i>	Azurin	1,8E+08	13,6	1,8E+08	6,3	1,0	0,98	0,99
BPP4406	<i>katA</i>	Catalase	7,3E+08	11,8	1,4E+08	10,8	0,2	0,00	0,00
BPP0869	<i>groS</i>	10 kDa chaperonin	6,5E+09	11,7	6,8E+09	7,0	1,1	0,49	0,67
BPP2001	<i>cspA</i>	Cold shock-like protein CspA	3,1E+08	12,9	1,6E+08	6,0	0,5	0,00	0,01
BPP3494	<i>fur</i>	Ferric uptake regulation protein	4,1E+08	5,6	4,3E+08	3,8	1,1	0,17	0,36
BPP2533	<i>BPP2533</i>	PKHD-type hydroxylase BPP2533	2,2E+07	34,6	4,6E+07	54,5	2,0	0,13	0,31
BPP2633	<i>recA</i>	Protein RecA	1,2E+08	2,3	8,8E+07	7,2	0,7	0,00	0,00
BPP0056	<i>rpsD</i>	30S ribosomal protein S4	2,0E+08	23,8	1,2E+08	12,3	0,6	0,02	0,09
BPP0057	<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	4,1E+08	59,4	2,6E+08	11,5	0,6	0,27	0,48
BPP3028	<i>bvgA</i>	Virulence factors putative positive transcription regulator BvgA	2,0E+09	9,8	1,9E+09	3,4	1,0	0,84	0,91
BPP1150	<i>prn</i>	Pertactin autotransporter	2,4E+08	9,8	2,6E+08	4,5	1,1	0,24	0,45
BPP3029	<i>bvgS</i>	Virulence sensor protein BvgS	9,2E+07	7,0	9,7E+07	12,7	1,1	0,51	0,69
BPP0077	<i>ssb</i>	Single-stranded DNA-binding protein	4,7E+08	4,6	4,7E+08	3,2	1,0	0,75	0,86
BPP3960	<i>zapD</i>	Cell division protein ZapD	1,2E+07	45,5	1,4E+07	32,4	1,1	0,76	0,86
BPP3359	<i>risA</i>	Tresponse regulator protein	4,2E+08	48,6	4,0E+08	49,4	1,0	0,90	0,94
BPP0007	<i>tufI</i>	Elongation factor Tu	5,2E+09	6,5	4,1E+09	8,6	0,8	0,01	0,05
BPP0271	<i>BPP0271</i>	Uncharacterized protein	3,0E+07	11,3	2,1E+07	8,3	0,7	0,00	0,04

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP2252	<i>BPP2252</i>	Transposase	5,5E+07	21,8	4,5E+07	32,8	0,8	0,32	0,53
BPP0078	<i>BPP0078</i>	Transposase	5,5E+07	21,8	4,5E+07	32,8	0,8	0,32	0,53
BPP1637	<i>hmp</i>	Flavoheprotein	8,2E+06	8,7	1,4E+07	17,8	1,7	0,02	0,09
BPP0203	<i>cca</i>	CCA-adding enzyme	1,5E+07	8,2	na	na	OFF	na	na
BPP4035	<i>hprK</i>	HPr kinase/phosphorylase	1,9E+07	29,8	1,9E+07	11,6	1,0	0,97	0,98
BPP3007	<i>spoT</i>	Guanosine-3',5'-bis(Diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase	7,6E+06	38,3	4,6E+06	45,8	0,6	0,17	0,37
BPP3353	<i>ligA</i>	DNA ligase	2,4E+07	11,0	2,1E+07	8,8	0,9	0,11	0,29
BPP2023	<i>lexA</i>	LexA repressor	1,6E+07	25,8	2,5E+07	45,4	1,5	0,21	0,42
BPP2008	<i>lon</i>	Lon protease	3,2E+07	17,7	3,0E+07	12,5	0,9	0,46	0,65
BPP1990	<i>uvrD</i>	DNA helicase	1,6E+07	13,9	1,8E+07	3,8	1,1	0,11	0,28
BPP0971	<i>BPP0971</i>	Putative isochorismatase	1,3E+07	10,9	1,1E+07	7,9	0,8	0,04	0,15
BPP0968	<i>BPP0968</i>	Probable cation-transporting ATPase	1,4E+07	37,0	4,2E+06	90,6	0,3	0,02	0,12
BPP0966	<i>BPP0966</i>	Uncharacterized protein	8,7E+07	40,0	9,9E+07	15,2	1,1	0,56	0,73
BPP0964	<i>BPP0964</i>	Uncharacterized protein	4,3E+07	30,1	7,5E+07	18,3	1,7	0,02	0,09
BPP0962	<i>BPP0962</i>	Putative ABC transport proteins, ATP-binding component	1,0E+07	96,5	6,9E+06	114,8	0,7	0,64	0,79
BPP0956	<i>BPP0956</i>	Putative exported protein	8,8E+06	47,9	4,4E+06	24,8	0,5	0,14	0,33
BPP0955	<i>ribE</i>	Riboflavin synthase alpha chain	7,9E+06	13,5	2,9E+07	15,2	3,6	0,00	0,01
BPP0940	<i>BPP0940</i>	Probable short chain dehydrogenase	8,7E+07	8,1	6,3E+07	9,0	0,7	0,00	0,03
BPP0939	<i>BPP0939</i>	Uncharacterized protein	2,5E+07	18,1	2,5E+07	22,4	1,0	0,94	0,98
BPP0936	<i>BPP0936</i>	Putative exported protein	9,1E+07	3,7	7,0E+07	15,3	0,8	0,01	0,06
BPP0935	<i>BPP0935</i>	Putative enoyl-CoA hydratase	1,3E+08	20,8	1,2E+08	20,2	1,0	0,80	0,89

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP0931	<i>BPP0931</i>	Putative GntR-family transcriptional regulator	1,9E+07	19,1	1,9E+07	3,3	1,0	0,87	0,93
BPP0927	<i>BPP0927</i>	Uncharacterized protein	1,1E+07	59,2	1,6E+07	43,4	1,4	0,42	0,62
BPP0921	<i>BPP0921</i>	Putative membrane protein	4,1E+07	35,2	4,1E+07	56,7	1,0	0,98	0,99
BPP0914	<i>BPP0914</i>	Putative enoyl-CoA hydratase/isomerase	1,5E+07	43,9	2,3E+07	15,7	1,5	0,10	0,26
BPP0911	<i>BPP0911</i>	Putative exported protein	na	na	6,0E+06	11,0	ON	na	na
BPP0885	<i>ggt</i>	Gamma-glutamyltranspeptidase	1,6E+07	10,0	6,2E+06	27,4	0,4	0,00	0,01
BPP0868	<i>groL</i>	60 kDa chaperonin	8,1E+09	6,2	7,1E+09	5,8	0,9	0,02	0,12
BPP0864	<i>ndh</i>	Putative NADH dehydrogenase	4,8E+07	27,0	5,3E+07	11,1	1,1	0,52	0,69
BPP0863	<i>pyrF</i>	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase	7,8E+07	8,7	9,4E+07	12,4	1,2	0,05	0,17
BPP0862	<i>BPP0862</i>	Uncharacterized protein	9,9E+06	23,7	1,6E+07	5,1	1,6	0,00	0,04
BPP0859	<i>nusB</i>	N utilization substance protein B homolog	7,3E+07	9,8	8,2E+07	12,9	1,1	0,20	0,41
BPP0858	<i>ribH</i>	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	1,4E+08	19,8	9,8E+07	39,8	0,7	0,11	0,28
BPP0857	<i>ribB</i>	Putative 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	2,6E+07	21,8	2,3E+07	15,2	0,9	0,30	0,52
BPP0856	<i>BPP0856</i>	Haloacid dehalogenase-like hydrolase	2,9E+07	24,1	3,3E+07	6,8	1,1	0,34	0,55
BPP0855	<i>BPP0855</i>	Putative transcriptional regulator	8,5E+06	8,4	7,1E+06	9,0	0,8	0,03	0,13
BPP0854	<i>BPP0854</i>	Putative exported protein	1,7E+07	32,9	1,0E+07	19,9	0,6	0,07	0,21
BPP0849	<i>ftsY</i>	Signal recognition particle receptor FtsY	2,3E+07	10,2	1,8E+07	14,2	0,8	0,03	0,12
BPP0848	<i>BPP0848</i>	Uncharacterized protein	1,2E+08	183,9	4,4E+08	15,9	3,6	0,04	0,15
BPP0847	<i>coaD</i>	Phosphopantetheine adenylyltransferase	8,1E+07	16,8	1,1E+08	13,0	1,3	0,04	0,16
BPP0844	<i>BPP0844</i>	Uncharacterized protein	3,8E+07	6,3	4,0E+07	15,4	1,0	0,62	0,78
BPP0843	<i>BPP0843</i>	Putative exported protein	5,6E+07	8,9	2,3E+08	51,2	4,1	0,03	0,12

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP0832	<i>maeB</i>	NADP-dependent malic enzyme	1,9E+08	9,9	2,0E+08	14,0	1,0	0,68	0,82
BPP0821	<i>yhcF</i>	Ribosome-binding ATPase YchF	2,6E+07	21,8	1,8E+07	31,8	0,7	0,08	0,24
BPP0819	<i>pth</i>	Peptidyl-tRNA hydrolase	3,5E+07	12,0	2,7E+07	9,6	0,8	0,02	0,11
BPP0818	<i>rplY</i>	50S ribosomal protein L25	2,3E+08	29,2	1,4E+08	28,9	0,6	0,06	0,20
BPP0817	<i>prs</i>	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	1,4E+08	8,3	7,4E+07	11,8	0,5	0,00	0,00
BPP0815	<i>lolB</i>	Outer-membrane lipoprotein LolB	2,1E+07	86,2	1,7E+07	52,6	0,8	0,73	0,85
BPP0814	<i>BPP0814</i>	Uncharacterized protein	3,0E+07	10,6	4,1E+07	13,7	1,4	0,01	0,09
BPP0812	<i>BPP0812</i>	Putative cyclase	6,4E+07	13,0	4,2E+07	10,0	0,7	0,00	0,04
BPP0806	<i>fahA</i>	Fumarylacetoacetase	1,4E+07	5,1	1,5E+07	6,2	1,1	0,03	0,13
BPP0805	<i>BPP0805</i>	Putative sulfatase	2,9E+08	16,1	2,1E+08	3,1	0,7	0,02	0,10
BPP0800	<i>pgm</i>	Phosphoglucomutase	2,5E+07	41,5	2,6E+07	57,2	1,0	0,96	0,98
BPP0799	<i>pgi</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	2,2E+07	20,2	2,3E+07	6,8	1,0	0,75	0,86
BPP0796	<i>BPP0796</i>	Putative glycosyltransferase	4,7E+06	17,0	6,2E+06	26,8	1,3	0,16	0,36
BPP0795	<i>BPP0795</i>	Putative asparagine synthase	1,2E+07	22,9	1,4E+07	10,8	1,2	0,19	0,39
BPP0792	<i>BPP0792</i>	UDP-N-acetylglucosamine C4 epimerase	3,0E+07	11,8	3,4E+07	16,8	1,1	0,27	0,48
BPP0791	<i>wbpO</i>	Polysaccharide biosynthesis protein	1,3E+08	36,1	1,3E+08	10,3	1,0	1,00	1,00
BPP0787	<i>thyA</i>	Thymidylate synthase	3,0E+07	4,8	4,1E+07	5,2	1,4	0,00	0,01
BPP0777	<i>BPP0777</i>	Uncharacterized protein	1,1E+07	26,3	1,3E+07	14,3	1,2	0,37	0,58
BPP0772	<i>BPP0772</i>	Putative GntR-family transcriptional regulator	8,9E+06	28,4	9,1E+06	50,1	1,0	0,94	0,98
BPP0770	<i>gcvH</i>	Glycine cleavage system H protein	1,8E+07	18,8	3,0E+07	32,3	1,7	0,05	0,18
BPP0769	<i>gcvT</i>	Aminomethyltransferase	1,3E+07	19,0	2,0E+07	8,2	1,6	0,00	0,03
BPP0767	<i>sodA</i>	Superoxide dismutase	na	na	6,8E+07	33,8	ON	na	na

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP0765	<i>BPP0765</i>	Probable orn/arg/lys decarboxylase	3,1E+07	8,9	3,5E+07	4,7	1,1	0,03	0,14
BPP0760	<i>dcd</i>	Deoxycytidine triphosphate deaminase	1,1E+08	20,7	1,3E+08	9,6	1,2	0,15	0,34
BPP0759	<i>BPP0759</i>	Putative exported protein	7,1E+06	34,4	8,7E+06	45,1	1,2	0,50	0,68
BPP0755	<i>metG</i>	Methionine--tRNA ligase	2,9E+07	4,4	3,3E+07	29,7	1,1	0,50	0,68
BPP0753	<i>BPP0753</i>	Putative lipoprotein	8,9E+07	21,0	1,2E+08	9,9	1,3	0,05	0,17
BPP0752	<i>BPP0752</i>	Putative lipoprotein	2,9E+06	36,1	6,3E+06	41,7	2,2	0,06	0,19
BPP0745	<i>BPP0745</i>	Putative exported protein	3,0E+07	7,8	3,9E+07	10,6	1,3	0,01	0,06
BPP0743	<i>BPP0743</i>	Putative exported protein	7,6E+07	86,4	2,9E+08	9,5	3,8	0,00	0,02
BPP0741	<i>BPP0741</i>	Uncharacterized protein	6,6E+06	150,5	1,6E+07	75,9	2,4	0,31	0,52
BPP0739	<i>modB</i>	Molybdate-binding periplasmic protein	2,0E+08	7,0	2,4E+08	10,0	1,2	0,04	0,15
BPP0695	<i>BPP0695</i>	Putative GntR-family transcriptional regulator	4,3E+06	22,3	5,1E+06	31,6	1,2	0,42	0,62
BPP0324	<i>cyaE</i>	Protein CyaE	1,0E+07	69,4	4,9E+06	28,7	0,5	0,20	0,40
BPP0321	<i>cyaA</i>	Bifunctional hemolysin-adenylate cyclase	1,0E+08	32,1	2,8E+08	24,6	2,6	0,00	0,04
BPP0314	<i>BPP0314</i>	LysR-family transcriptional regulator	1,2E+07	7,8	7,3E+06	37,1	0,6	0,02	0,09
BPP0313	<i>ispB</i>	Octaprenyl-diphosphate synthase	6,7E+07	29,9	6,5E+07	31,5	1,0	0,88	0,94
BPP0311	<i>rplU</i>	50S ribosomal protein L21	2,3E+08	23,3	1,1E+08	16,9	0,5	0,01	0,05
BPP0310	<i>rpmA</i>	50S ribosomal protein L27	1,1E+08	29,2	6,7E+07	3,8	0,6	0,04	0,15
BPP0309	<i>obg</i>	GTPase Obg	2,2E+07	23,9	1,6E+07	20,7	0,7	0,09	0,25
BPP0308	<i>proB</i>	Glutamate 5-kinase	5,9E+06	12,4	1,1E+07	50,6	1,9	0,12	0,30
BPP0306	<i>BPP0306</i>	Putative transcriptional regulator	5,0E+07	4,8	4,7E+07	6,8	1,0	0,30	0,52
BPP0305	<i>BPP0305</i>	Putative transcriptional regulator	2,0E+07	7,0	3,2E+07	78,2	1,6	0,39	0,59
BPP0302	<i>BPP0302</i>	Putative lipoprotein	8,4E+08	19,6	8,4E+08	5,3	1,0	0,98	0,99

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP0301	<i>thiC</i>	Phosphomethylpyrimidine synthase	1,6E+07	16,1	2,4E+07	14,0	1,5	0,01	0,06
BPP0298	<i>thiF</i>	Adenylyltransferase	2,8E+07	7,5	1,8E+07	12,9	0,7	0,00	0,02
BPP0297	<i>ctpA</i>	Putative carboxy-terminal processing protease	1,1E+08	15,3	1,3E+08	28,6	1,2	0,36	0,56
BPP0296	<i>BPP0296</i>	Putative peptidase	2,0E+07	12,8	2,5E+07	6,5	1,2	0,02	0,11
BPP0295	<i>gpmA</i>	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	1,4E+08	10,8	1,5E+08	10,6	1,1	0,44	0,63
BPP0294	<i>BPP0294</i>	Uncharacterized protein	5,1E+07	18,5	3,4E+07	10,8	0,7	0,01	0,08
BPP0293	<i>grxC</i>	Glutaredoxin 3	6,4E+06	104,5	na	na	OFF	na	na
BPP0292	<i>secB</i>	Protein-export protein SecB	2,0E+08	45,5	1,8E+08	44,7	0,9	0,78	0,88
BPP0291	<i>gpsA</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]	3,9E+07	15,5	3,3E+07	5,6	0,9	0,12	0,31
BPP0290	<i>BPP0290</i>	Putative exported protein	1,4E+08	12,2	1,8E+08	14,6	1,3	0,05	0,17
BPP0285	<i>BPP0285</i>	Putative membrane protein	5,2E+07	29,5	3,3E+07	62,3	0,6	0,18	0,38
BPP0284	<i>BPP0284</i>	Putative membrane protein	1,2E+08	17,1	8,4E+07	12,1	0,7	0,02	0,09
BPP0280	<i>BPP0280</i>	Putative iron-sulfur binding protein	3,4E+07	25,2	na	na	OFF	na	na
BPP0277	<i>BPP0277</i>	Putative exported protein	4,5E+07	22,4	na	na	OFF	na	na
BPP0276	<i>BPP0276</i>	Ferredoxin	2,3E+07	31,9	na	na	OFF	na	na
BPP0273	<i>BPP0273</i>	Probable ring hydroxylating beta subunit	7,1E+07	22,4	1,8E+07	9,6	0,2	0,00	0,01
BPP0268	<i>BPP0268</i>	Uncharacterized protein	6,8E+07	20,0	2,5E+07	19,4	0,4	0,00	0,02
BPP0263	<i>trkA</i>	Trk system potassium uptake protein	7,9E+06	16,1	7,4E+06	13,1	0,9	0,54	0,72
BPP0262	<i>BPP0262</i>	Putative two-component response regulator	1,4E+08	26,0	1,8E+08	7,8	1,2	0,14	0,33

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP0261	<i>BPP0261</i>	Putative two-component sensor kinase	2,9E+07	12,2	3,0E+07	41,3	1,0	0,85	0,92
BPP0260	<i>BPP0260</i>	Putative exported protein	1,5E+07	8,7	1,8E+07	14,7	1,2	0,15	0,35
BPP0254	<i>BPP0254</i>	Probable transcriptional regulator	1,7E+07	25,2	1,7E+07	8,6	1,0	0,81	0,90
BPP0248	<i>BPP0248</i>	Putative lysine decarboxylase	1,0E+07	42,4	9,7E+06	38,7	0,9	0,84	0,91
BPP0244	<i>fmt</i>	Methionyl-tRNA formyltransferase	4,3E+07	74,2	3,2E+07	108,3	0,8	0,67	0,81
BPP0243	<i>defl</i>	Peptide deformylase 1	4,3E+07	9,2	5,1E+07	9,9	1,2	0,04	0,16
BPP0240	<i>smf</i>	Uncharacterized protein	2,4E+07	5,7	na	na	OFF	na	na
BPP0239	<i>hmgcL</i>	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	2,6E+07	7,8	1,4E+07	41,8	0,5	0,01	0,06
BPP0237	<i>BPP0237</i>	Amino acid-binding periplasmic protein	2,2E+08	34,9	1,2E+08	8,1	0,6	0,05	0,17
BPP0236	<i>BPP0236</i>	Probable aminotransferase	2,1E+07	37,0	1,7E+07	12,4	0,8	0,42	0,62
BPP0235	<i>BPP0235</i>	Uncharacterized protein	1,2E+07	28,3	6,3E+06	37,9	0,5	0,04	0,16
BPP0234	<i>BPP0234</i>	Putative exported protein	3,9E+07	40,1	4,8E+07	19,4	1,2	0,36	0,56
BPP0233	<i>BPP0233</i>	Putative exported protein	3,0E+08	19,6	1,5E+08	11,3	0,5	0,00	0,04
BPP0219	<i>BPP0219</i>	Metallo-beta-lactamase superfamily protein	2,1E+07	42,3	9,4E+06	72,2	0,4	0,08	0,23
BPP0217	<i>BPP0217</i>	Acetyltransferase (GNAT) family protein	4,1E+07	20,6	3,9E+07	19,9	1,0	0,76	0,86
BPP0214	<i>BPP0214</i>	Uncharacterized protein	1,2E+07	14,5	5,8E+06	24,1	0,5	0,00	0,02
BPP0213	<i>nhaA</i>	Na(+)/H(+) antiporter NhaA	8,3E+06	16,5	1,1E+07	36,9	1,3	0,27	0,49
BPP0205	<i>BPP0205</i>	Putative ATP-dependent RNA helicase	8,8E+06	52,4	na	na	OFF	na	na
BPP0204	<i>BPP0204</i>	Uncharacterized protein	5,4E+06	12,5	5,2E+06	28,2	1,0	0,78	0,88
BPP0199	<i>BPP0199</i>	Putative aminohydrolase	7,3E+07	14,1	6,8E+07	26,8	0,9	0,61	0,77
BPP0197	<i>BPP0197</i>	Methylenetetrahydrofolate reductase	3,2E+07	23,3	1,4E+07	9,6	0,4	0,00	0,04
BPP0195	<i>ahcY</i>	Adenosylhomocysteinase	1,7E+08	23,1	1,7E+08	4,1	1,0	0,83	0,91

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP0192	<i>metK</i>	S-adenosylmethionine synthase	2,8E+08	11,6	3,5E+08	15,8	1,2	0,09	0,26
BPP0190	<i>BPP0190</i>	Putative acyltransferase	1,1E+07	40,6	1,1E+07	28,0	1,0	0,92	0,96
BPP0180	<i>BPP0180</i>	Putative regulatory protein	5,9E+06	7,0	na	na	OFF	na	na
BPP0179	<i>BPP0179</i>	Uncharacterized protein	1,1E+08	50,7	6,3E+07	63,3	0,6	0,25	0,47
BPP0178	<i>dksA</i>	RNA polymerase-binding transcription factor DksA	5,0E+08	9,0	4,7E+08	12,1	0,9	0,42	0,62
BPP0176	<i>hslU</i>	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU	9,9E+07	18,8	7,9E+07	12,9	0,8	0,10	0,27
BPP0174	<i>BPP0174</i>	Uncharacterized protein	2,9E+07	20,9	3,0E+07	14,8	1,1	0,65	0,80
BPP0168	<i>BPP0168</i>	UPF0250 protein BPP0168	na	na	4,5E+06	19,1	ON	na	na
BPP0167	<i>BPP0167</i>	Probable class IV aminotransferase	1,5E+08	47,2	2,3E+08	39,9	1,6	0,19	0,40
BPP0166	<i>BPP0166</i>	Putative penicillin-binding protein	3,3E+07	17,5	2,8E+07	19,8	0,9	0,27	0,48
BPP0165	<i>BPP0165</i>	Uncharacterized protein	3,8E+07	20,9	4,0E+07	5,4	1,0	0,75	0,86
BPP0164	<i>BPP0164</i>	Putative exported protein	3,8E+07	24,8	4,6E+07	16,3	1,2	0,20	0,41
BPP0163	<i>BPP0163</i>	Putative exported protein	2,1E+07	29,8	2,4E+07	15,2	1,2	0,35	0,56
BPP0160	<i>birA</i>	Putative biotin protein ligase	4,5E+06	20,3	3,6E+06	46,9	0,8	0,46	0,65
BPP0157	<i>kdtA</i>	3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase	4,9E+06	11,4	5,3E+06	36,2	1,1	0,75	0,86
BPP0156	<i>rfaC</i>	Probable heptosyltransferase	1,5E+07	16,3	1,7E+07	10,6	1,1	0,26	0,47
BPP0155	<i>bplA</i>	Probable oxidoreductase	3,0E+07	74,8	1,5E+07	48,5	0,5	0,25	0,46
BPP0153	<i>bplC</i>	Lipopolysaccharide biosynthesis protein	5,4E+07	21,3	4,8E+07	21,1	0,9	0,43	0,63
BPP0152	<i>bplD</i>	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase	4,1E+07	43,9	2,5E+07	13,7	0,6	0,13	0,32
BPP0150	<i>bplF</i>	Lipopolysaccharide biosynthesis protein	2,3E+07	15,4	2,8E+07	10,8	1,2	0,06	0,20

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP0139	<i>wbmF</i>	Nucleotide sugar epimerase/dehydratase	9,8E+07	7,7	9,8E+07	8,4	1,0	0,95	0,98
BPP0138	<i>wbmG</i>	Nucleotide sugar epimerase/dehydratase	3,4E+07	10,3	2,3E+07	8,3	0,7	0,00	0,02
BPP0137	<i>wbmH</i>	Nucleotide sugar epimerase/dehydratase	1,3E+08	2,8	9,8E+07	11,8	0,8	0,00	0,03
BPP0136	<i>wbmI</i>	Putative asparagine synthetase	1,8E+07	8,7	1,3E+07	17,1	0,7	0,01	0,07
BPP0133	<i>wbmL</i>	Transport permease protein	6,6E+06	66,5	4,1E+06	44,1	0,6	0,42	0,62
BPP0128	<i>wbmQ</i>	Putative formyl transferase	6,9E+06	23,8	na	na	OFF	na	na
BPP0123	<i>BPP0123</i>	Putative asparagine synthetase	4,8E+06	30,5	na	na	OFF	na	na
BPP0122	<i>BPP0122</i>	DegT/DnrJ/EryC1/StrS aminotransferase family protein	3,4E+07	10,5	1,5E+07	36,7	0,5	0,00	0,02
BPP0121	<i>BPP0121</i>	NAD dependent epimerase/dehydratase family protein	7,6E+07	12,3	6,0E+07	8,6	0,8	0,02	0,11
BPP0115	<i>aspS</i>	Aspartate--tRNA(Asp/Asn) ligase	1,5E+08	15,6	8,6E+07	29,7	0,6	0,01	0,08
BPP0110	<i>BPP0110</i>	Putative methyltransferase	9,7E+07	32,1	1,3E+08	16,6	1,3	0,14	0,33
BPP0104	<i>BPP0104</i>	Putative adhesin	5,2E+08	6,5	4,9E+08	7,3	0,9	0,22	0,43
BPP0103	<i>dapA</i>	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	1,1E+07	27,6	na	na	OFF	na	na
BPP0102	<i>BPP0102</i>	Uncharacterized protein	2,6E+07	57,2	3,2E+07	36,1	1,2	0,53	0,71
BPP0101	<i>BPP0101</i>	Putative aminotransferase	1,7E+07	17,8	1,7E+07	22,9	1,0	0,95	0,98
BPP0099	<i>BPP0099</i>	Putative exported protein	1,1E+08	17,6	1,3E+08	19,5	1,2	0,27	0,48
BPP0098	<i>BPP0098</i>	Putative dehydrogenase	7,7E+06	32,5	6,4E+06	37,2	0,8	0,56	0,73
BPP0096	<i>glcB</i>	Malate synthase G	1,9E+08	12,7	1,9E+08	4,7	1,0	0,77	0,87
BPP0079	<i>bfrC</i>	Ferric siderophore receptor	na	na	1,2E+08	16,8	ON	na	na
BPP0075	<i>uvrA</i>	UvrABC system protein A	1,5E+07	24,8	2,7E+06	17,8	0,2	0,00	0,04
BPP0073	<i>BPP0073</i>	Deoxyguanosinetriphosphate	6,0E+06	44,2	2,4E+06	59,4	0,4	0,09	0,25

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
		triphosphohydrolase-like protein							
BPP0072	<i>aroB</i>	3-dehydroquinate synthase	3,6E+07	9,1	2,7E+07	12,4	0,8	0,01	0,07
BPP0070	<i>BPP0070</i>	Penicillin-binding protein 1A	3,7E+07	15,5	3,1E+07	9,7	0,8	0,11	0,29
BPP0068	<i>lysA</i>	Diaminopimelate decarboxylase	3,5E+07	23,9	5,2E+07	10,5	1,5	0,01	0,08
BPP0066	<i>BPP0066</i>	Putative membrane protein	3,2E+07	10,7	9,9E+06	20,0	0,3	0,00	0,00
BPP0064	<i>engB</i>	Probable GTP-binding protein EngB	4,7E+07	16,0	3,3E+07	46,7	0,7	0,14	0,33
BPP0063	<i>hemB</i>	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	1,5E+08	8,5	1,4E+08	5,7	0,9	0,12	0,30
BPP0061	<i>dsbD</i>	Thiol:disulfide interchange protein DsbD	1,0E+08	13,4	9,6E+07	5,1	0,9	0,37	0,58
BPP0060	<i>cutA</i>	Putative periplasmic divalent cation tolerance protein	5,7E+07	11,5	4,0E+07	16,6	0,7	0,01	0,07
BPP0059	<i>BPP0059</i>	Histidine triad protein	8,5E+07	16,4	6,9E+07	9,3	0,8	0,08	0,23
BPP0058	<i>rplQ</i>	50S ribosomal protein L17	1,1E+08	60,0	7,9E+07	27,9	0,7	0,45	0,64
BPP0055	<i>rpsK</i>	30S ribosomal protein S11	1,2E+08	37,9	7,1E+07	51,6	0,6	0,17	0,36
BPP0054	<i>rpsM</i>	30S ribosomal protein S13	1,1E+08	22,5	6,7E+07	8,4	0,6	0,01	0,08
BPP0052	<i>infA1</i>	Translation initiation factor IF-1 1	7,7E+07	18,9	8,0E+07	6,5	1,0	0,66	0,81
BPP0051	<i>secY</i>	Protein translocase subunit SecY	5,0E+07	55,2	3,8E+07	39,6	0,7	0,45	0,64
BPP0048	<i>rpsE</i>	30S ribosomal protein S5	2,6E+08	8,9	1,5E+08	11,2	0,6	0,00	0,01
BPP0047	<i>rplR</i>	50S ribosomal protein L18	2,7E+08	20,0	1,3E+08	17,6	0,5	0,00	0,04
BPP0046	<i>rplF</i>	50S ribosomal protein L6	1,9E+08	20,1	1,2E+08	7,1	0,7	0,02	0,09
BPP0045	<i>rpsH</i>	30S ribosomal protein S8	5,4E+07	26,4	4,2E+07	43,5	0,8	0,34	0,55
BPP0044	<i>rpsN</i>	30S ribosomal protein S14	2,2E+07	23,2	1,4E+07	55,8	0,7	0,18	0,38
BPP0043	<i>rplE</i>	50S ribosomal protein L5	2,4E+08	37,9	1,2E+08	39,8	0,5	0,07	0,21
BPP0042	<i>rplX</i>	50S ribosomal protein L24	2,9E+08	24,1	1,5E+08	11,0	0,5	0,01	0,06

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP0041	<i>rplN</i>	50S ribosomal protein L14	1,2E+08	27,9	7,4E+07	4,1	0,6	0,03	0,13
BPP0038	<i>rpsQ</i>	30S ribosomal protein S17	6,0E+07	32,0	4,4E+07	66,6	0,7	0,40	0,60
BPP0037	<i>rpmC</i>	50S ribosomal protein L29	2,0E+08	16,4	1,2E+08	14,7	0,6	0,01	0,06
BPP0036	<i>rplP</i>	50S ribosomal protein L16	2,0E+08	23,8	1,2E+08	2,1	0,6	0,01	0,08
BPP0035	<i>rpsC</i>	30S ribosomal protein S3	2,2E+08	9,9	1,6E+08	12,0	0,7	0,00	0,04
BPP0034	<i>rplV</i>	50S ribosomal protein L22	1,0E+08	30,9	8,9E+07	6,0	0,9	0,50	0,68
BPP0033	<i>rpsS</i>	30S ribosomal protein S19	8,4E+07	17,7	5,1E+07	15,4	0,6	0,01	0,06
BPP0032	<i>rplB</i>	50S ribosomal protein L2	9,5E+07	26,8	6,5E+07	46,4	0,7	0,17	0,37
BPP0031	<i>rplW</i>	50S ribosomal protein L23	2,1E+08	17,8	1,3E+08	6,2	0,6	0,00	0,05
BPP0030	<i>rplD</i>	50S ribosomal protein L4	3,0E+08	30,4	1,5E+08	20,6	0,5	0,02	0,10
BPP0029	<i>rplC</i>	50S ribosomal protein L3	2,7E+08	35,7	1,3E+08	10,1	0,5	0,03	0,12
BPP0028	<i>rpsJ</i>	30S ribosomal protein S10	2,0E+08	10,0	1,4E+08	5,8	0,7	0,00	0,02
BPP0026	<i>fusA1</i>	Elongation factor G 1	9,2E+08	6,8	7,8E+08	13,4	0,9	0,08	0,22
BPP0025	<i>rpsG</i>	30S ribosomal protein S7	1,9E+08	12,0	7,9E+07	35,1	0,4	0,00	0,02
BPP0024	<i>rpsL</i>	30S ribosomal protein S12	9,6E+07	27,3	8,9E+07	73,4	0,9	0,84	0,91
BPP0020	<i>BPP0020</i>	Probable two-component response regulator	4,6E+06	21,3	3,9E+06	28,0	0,9	0,39	0,59
BPP0019	<i>BPP0019</i>	Putative peptidoglycan binding protein	2,8E+07	13,0	3,2E+07	6,0	1,2	0,06	0,20
BPP0017	<i>BPP0017</i>	Putative membrane protein	4,4E+07	27,8	4,1E+07	22,3	0,9	0,70	0,83
BPP0015	<i>rpoC</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	3,0E+08	29,7	2,8E+08	10,7	0,9	0,61	0,77
BPP0014	<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	4,5E+08	25,3	4,0E+08	9,4	0,9	0,46	0,65

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP0013	<i>rplL</i>	50S ribosomal protein L7/L12	1,3E+09	23,1	1,0E+09	26,8	0,8	0,21	0,42
BPP0012	<i>rplJ</i>	50S ribosomal protein L10	2,1E+08	25,3	1,6E+08	8,6	0,8	0,15	0,34
BPP0011	<i>rplA</i>	50S ribosomal protein L1	2,7E+08	37,1	1,3E+08	9,7	0,5	0,03	0,14
BPP0010	<i>rplK</i>	50S ribosomal protein L11	2,5E+08	30,0	1,5E+08	8,5	0,6	0,04	0,15
BPP0009	<i>nusG</i>	Transcription termination/antitermination protein NusG	2,8E+08	7,7	2,9E+08	10,9	1,0	0,53	0,71
BPP0008	<i>secE</i>	Preprotein translocase SecE subunit	4,8E+07	28,3	4,6E+07	20,3	1,0	0,79	0,88
BPP0005	<i>parB</i>	Probable chromosome partitioning protein ParB	6,2E+07	18,4	4,9E+07	8,5	0,8	0,08	0,23
BPP0003	<i>parA</i>	ParA family protein	6,1E+07	12,3	6,3E+07	7,8	1,0	0,75	0,86
BPP4424	<i>BPP4424</i>	Probable aminotransferase	6,6E+07	63,4	4,9E+07	58,6	0,7	0,51	0,69
BPP4421	<i>BPP4421</i>	Putative exported protein	2,8E+07	19,6	2,7E+07	10,4	1,0	0,86	0,92
BPP4419	<i>BPP4419</i>	Putative response regulator protein	1,3E+07	55,6	na	na	OFF	na	na
BPP4410	<i>BPP4410</i>	Putative taurine catabolism dioxygenase	1,4E+07	28,7	1,0E+07	68,0	0,7	0,37	0,58
BPP4409	<i>BPP4409</i>	Putative periplasmic protein	2,2E+08	34,6	2,8E+08	21,1	1,3	0,27	0,48
BPP4405	<i>yidC</i>	Membrane protein insertase YidC	1,4E+08	17,3	1,2E+08	7,3	0,8	0,15	0,34
BPP4401	<i>dnaA</i>	Chromosomal replication initiator protein DnaA	1,8E+07	16,1	1,2E+07	6,9	0,7	0,01	0,06
BPP4400	<i>dnaN</i>	DNA polymerase III subunit beta	2,9E+08	26,0	2,4E+08	26,2	0,8	0,36	0,57
BPP4399	<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit B	4,7E+07	3,0	5,7E+07	12,4	1,2	0,04	0,15
BPP4396	<i>BPP4396</i>	Putative exported protein	5,6E+06	14,2	3,4E+06	42,8	0,6	0,04	0,16
BPP4394	<i>lldD</i>	L-lactate dehydrogenase	2,1E+08	4,4	2,2E+08	10,3	1,0	0,47	0,65
BPP4389	<i>BPP4389</i>	2-dehydropantoate 2-reductase	4,8E+07	28,0	2,5E+07	55,6	0,5	0,05	0,17

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP4380	<i>BPP4380</i>	Alcohol dehydrogenase	1,7E+07	63,1	8,6E+06	64,7	0,5	0,21	0,41
BPP4379	<i>BPP4379</i>	Probable aldehyde dehydrogenase	4,0E+07	6,9	4,3E+07	18,3	1,1	0,56	0,73
BPP4378	<i>idnO</i>	Gluconate 5-dehydrogenase	1,1E+07	12,1	1,2E+07	21,2	1,1	0,52	0,70
BPP4374	<i>topB</i>	DNA topoisomerase	1,3E+08	13,2	1,2E+08	20,7	0,9	0,41	0,62
BPP4373	<i>BPP4373</i>	Putative membrane protein	1,2E+07	22,9	1,3E+07	15,4	1,1	0,40	0,61
BPP4372	<i>gluQ</i>	Glutamyl-Q tRNA(Asp) synthetase	6,6E+06	17,2	6,6E+06	9,5	1,0	0,95	0,98
BPP4369	<i>BPP4369</i>	Putative membrane protein	9,6E+06	15,5	3,1E+07	84,2	3,2	0,15	0,35
BPP4368	<i>BPP4368</i>	Putative exported protein	2,5E+08	14,6	3,4E+08	16,9	1,3	0,05	0,17
BPP4366	<i>BPP4366</i>	Putative exported protein	3,9E+07	2,5	3,4E+07	7,5	0,9	0,02	0,10
BPP4365	<i>argD2</i>	Acetylornithine aminotransferase 2	1,7E+08	20,0	1,8E+08	11,6	1,1	0,60	0,76
BPP4364	<i>BPP4364</i>	Uncharacterized protein	1,5E+07	16,2	1,6E+07	25,4	1,1	0,59	0,75
BPP4363	<i>accA</i>	Biotin carboxylase subunit of acetyl-CoA carboxylase	1,8E+07	15,2	1,5E+07	9,5	0,8	0,12	0,30
BPP4361	<i>BPP4361</i>	Acetyl-CoA acetyltransferase	5,5E+08	9,6	4,9E+08	24,4	0,9	0,43	0,62
BPP4358	<i>BPP4358</i>	MerR-family transcriptional regulator	7,1E+06	9,3	7,2E+06	15,3	1,0	0,91	0,95
BPP4357	<i>BPP4357</i>	Metallo-beta-lactamase family protein	6,8E+07	32,2	1,0E+07	31,2	0,1	0,01	0,06
BPP4355	<i>metC</i>	Cystathionine beta-lyase	1,5E+07	62,6	2,3E+07	39,8	1,5	0,27	0,48
BPP4354	<i>dsbA</i>	Thiol:disulfide interchange protein DsbA	6,0E+08	12,6	6,1E+08	17,0	1,0	0,98	0,99
BPP4352	<i>argS</i>	Arginine--tRNA ligase	7,4E+07	17,2	8,3E+07	13,4	1,1	0,31	0,52
BPP4351	<i>BPP4351</i>	Uncharacterized protein	6,1E+07	14,9	7,2E+07	14,8	1,2	0,16	0,36
BPP4350	<i>BPP4350</i>	Uncharacterized protein	2,9E+07	18,5	3,4E+07	7,8	1,2	0,14	0,34
BPP4349	<i>BPP4349</i>	Inner membrane component of binding-protein-dependent transport system	1,1E+07	25,7	4,6E+06	46,6	0,4	0,01	0,07

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP4347	<i>BPP4347</i>	Probable extracellular solute-binding protein	2,7E+07	60,7	na	na	OFF	na	na
BPP4346	<i>BPP4346</i>	Sugar ABC transporter, ATP-binding protein	5,8E+07	28,0	3,4E+07	9,5	0,6	0,03	0,13
BPP4345	<i>cpdA</i>	3',5'-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase CpdA	6,9E+07	14,3	2,6E+07	7,4	0,4	0,00	0,01
BPP4341	<i>BPP4341</i>	Probable periplasmic solute-binding protein	1,2E+08	8,4	5,7E+07	20,0	0,5	0,00	0,01
BPP4338	<i>leuA</i>	2-isopropylmalate synthase	8,9E+07	9,8	1,1E+08	12,7	1,3	0,03	0,13
BPP4332	<i>bfr</i>	Bacterioferritin	5,0E+08	70,0	1,2E+08	35,0	0,2	0,08	0,23
BPP4331	<i>BPP4331</i>	Putative exported protein	2,6E+07	19,1	2,4E+07	9,3	0,9	0,49	0,67
BPP4328	<i>rhlE</i>	Putative ATP-dependent RNA helicase	1,6E+07	15,8	2,4E+07	6,5	1,5	0,00	0,03
BPP4327	<i>BPP4327</i>	Putative exported protein	8,6E+07	12,5	9,6E+07	5,1	1,1	0,18	0,37
BPP4326	<i>BPP4326</i>	Putative membrane protein	8,1E+06	13,1	8,4E+06	8,4	1,0	0,59	0,75
BPP4322	<i>BPP4322</i>	Putative extracellular solute-binding protein	7,4E+06	15,8	7,5E+06	29,6	1,0	0,96	0,98
BPP4286	<i>sspA</i>	Stringent starvation protein A	8,7E+08	7,5	7,7E+08	23,4	0,9	0,37	0,58
BPP4283	<i>petA</i>	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	1,8E+07	17,0	na	na	OFF	na	na
BPP4282	<i>mscL</i>	Large-conductance mechanosensitive channel	8,0E+07	29,7	7,3E+07	67,4	0,9	0,80	0,88
BPP4281	<i>BPP4281</i>	GTP cyclohydrolase 1 type 2 homolog	5,1E+07	14,6	3,2E+07	6,3	0,6	0,00	0,04
BPP4280	<i>degQ</i>	Protease	1,2E+07	30,7	1,4E+07	38,5	1,1	0,69	0,83
BPP4277	<i>tatB</i>	Sec-independent protein translocase protein TatB	3,1E+07	31,0	2,8E+07	15,4	0,9	0,60	0,76

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP4276	<i>tatA</i>	Sec-independent protein translocase protein TatA	1,3E+08	14,3	1,3E+08	10,2	1,0	0,95	0,98
BPP4275	<i>BPP4275</i>	MttA/Hcf106 family protein	1,4E+07	25,9	1,4E+07	21,0	1,0	0,91	0,95
BPP4274	<i>hisE</i>	Phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase	2,7E+07	22,7	2,3E+07	29,1	0,9	0,43	0,63
BPP4272	<i>hisF</i>	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF	3,9E+07	13,5	2,9E+07	17,4	0,7	0,03	0,14
BPP4271	<i>hisA</i>	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase	2,2E+08	9,4	1,8E+08	31,2	0,8	0,25	0,46
BPP4270	<i>hisH</i>	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH	4,4E+07	10,3	3,7E+07	8,2	0,8	0,04	0,16
BPP4269	<i>hisB</i>	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	1,1E+08	40,9	8,4E+07	19,4	0,8	0,38	0,58
BPP4267	<i>hisD</i>	Histidinol dehydrogenase	7,8E+07	10,4	6,2E+07	17,1	0,8	0,05	0,18
BPP4266	<i>hisG</i>	ATP phosphoribosyltransferase	3,8E+07	6,2	3,6E+07	9,1	0,9	0,34	0,55
BPP4265	<i>murA</i>	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	1,7E+07	41,1	1,1E+07	41,7	0,7	0,22	0,42
BPP4262	<i>BPP4262</i>	Probable ATP-binding ABC transporter protein	1,4E+07	38,4	5,3E+06	57,6	0,4	0,03	0,14
BPP4261	<i>BPP4261</i>	Putative exported protein	4,3E+08	7,2	5,0E+08	9,2	1,2	0,04	0,16
BPP4260	<i>BPP4260</i>	Putative lipoprotein	1,0E+08	16,7	1,3E+08	9,9	1,3	0,04	0,15
BPP4259	<i>BPP4259</i>	Mce related protein	1,2E+08	9,7	1,1E+08	22,9	0,9	0,28	0,50
BPP4258	<i>BPP4258</i>	Putative membrane protein	5,0E+07	5,0	5,8E+07	17,5	1,2	0,16	0,36
BPP4257	<i>BPP4257</i>	Putative ABC transporter, ATP-binding protein	1,0E+08	5,6	1,1E+08	9,4	1,1	0,26	0,48

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP4256	<i>BPP4256</i>	Putative exported protein	4,1E+07	44,5	3,9E+07	28,7	1,0	0,89	0,94
BPP4253	<i>gltB</i>	Glutamate synthase [NADPH] large chain	2,4E+07	25,9	na	na	OFF	na	na
BPP4252	<i>BPP4252</i>	Uncharacterized protein	8,5E+07	11,2	1,0E+08	12,7	1,2	0,07	0,20
BPP4251	<i>adhI</i>	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	5,8E+07	11,0	5,3E+07	2,1	0,9	0,23	0,44
BPP4250	<i>BPP4250</i>	Putative esterase	6,1E+06	30,7	7,0E+06	17,5	1,1	0,48	0,67
BPP4243	<i>BPP4243</i>	Cytochrome c oxidase subunit 2	1,7E+08	10,8	7,2E+07	14,2	0,4	0,00	0,00
BPP4233	<i>BPP4233</i>	SCO1/SenC family protein	9,5E+07	25,0	6,4E+07	9,8	0,7	0,05	0,17
BPP4231	<i>BPP4231</i>	Putative exported protein	1,9E+07	13,9	na	na	OFF	na	na
BPP4230	<i>BPP4230</i>	Uncharacterized protein	1,6E+07	49,4	1,7E+07	81,3	1,0	0,93	0,97
BPP4229	<i>glmU</i>	Bifunctional protein GlmU	9,5E+07	27,3	7,5E+07	21,6	0,8	0,23	0,45
BPP4227	<i>rkpK</i>	Putative UDP-glucose 6-dehydrogenase	2,1E+07	23,3	2,3E+07	21,0	1,1	0,68	0,82
BPP4214	<i>glmS</i>	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing]	4,1E+07	11,0	3,7E+07	7,5	0,9	0,21	0,41
BPP4199	<i>BPP4199</i>	Metallo-beta-lactamase family protein	1,2E+07	14,5	8,9E+06	8,8	0,8	0,03	0,12
BPP4198	<i>BPP4198</i>	Putative exported protein	2,6E+07	34,9	2,7E+07	23,3	1,0	0,95	0,98
BPP4187	<i>bhuT</i>	Putative hemin binding protein	na	na	7,6E+06	22,0	ON	na	na
BPP4186	<i>bhuS</i>	Putative hemin transport protein	na	na	8,5E+07	17,6	ON	na	na
BPP4185	<i>bhuR</i>	Outer membrane heme receptor	na	na	2,6E+07	24,9	ON	na	na
BPP4177	<i>BPP4177</i>	GntR-family transcription regulator	2,1E+07	14,1	2,5E+07	2,5	1,2	0,03	0,14
BPP4159	<i>trpC</i>	Indole-3-glycerol phosphate synthase	1,0E+08	26,2	1,5E+08	27,4	1,5	0,10	0,27
BPP4158	<i>trpD</i>	Anthranilate phosphoribosyltransferase	1,0E+08	20,0	2,6E+08	19,8	2,5	0,00	0,02
BPP4157	<i>trpG</i>	Anthranilate synthase component II	6,2E+07	41,1	8,0E+07	9,6	1,3	0,22	0,43

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP4156	<i>trpE</i>	Anthranilate synthase component I	8,1E+07	20,9	2,4E+08	8,3	3,0	0,00	0,00
BPP4155	<i>gph</i>	Putative phosphoglycolate phosphatase	1,3E+07	38,8	1,3E+07	43,6	1,0	0,92	0,96
BPP4154	<i>rpe</i>	Ribulose-phosphate 3-epimerase	4,1E+07	12,1	3,4E+07	6,3	0,8	0,04	0,16
BPP4153	<i>apaG</i>	Protein ApaG	1,2E+07	22,6	1,0E+07	47,3	0,9	0,57	0,74
BPP4152	<i>BPP4152</i>	Putative membrane-bound transglycolase	2,3E+08	169,4	3,7E+07	14,6	0,2	0,36	0,57
BPP4151	<i>BPP4151</i>	Putative monooxygenase	4,2E+06	72,0	3,4E+06	33,0	0,8	0,69	0,83
BPP4150	<i>dsbC</i>	Probable thiol:disulfide interchange protein DsbC	1,5E+07	23,5	1,6E+07	34,7	1,1	0,84	0,91
BPP4149	<i>BPP4149</i>	Putative 2-hydroxyacid dehydrogenase	1,2E+07	16,0	1,4E+07	29,9	1,2	0,35	0,56
BPP4147	<i>folB</i>	7,8-dihydroneopterin aldolase	1,8E+07	33,2	2,3E+07	74,6	1,3	0,57	0,74
BPP4146	<i>BPP4146</i>	Putative oxidoreductase	7,6E+06	16,9	8,4E+06	9,7	1,1	0,34	0,55
BPP4145	<i>BPP4145</i>	Uncharacterized protein	7,6E+07	15,3	8,7E+07	5,3	1,1	0,15	0,35
BPP4144	<i>BPP4144</i>	Putative enoyl-CoA hydratase	1,3E+08	18,0	1,0E+08	17,5	0,8	0,08	0,23
BPP4140	<i>atpE</i>	ATP synthase subunit c	4,4E+08	16,4	8,3E+08	16,6	1,9	0,00	0,04
BPP4139	<i>atpF</i>	ATP synthase subunit b	2,9E+08	20,7	4,0E+08	3,6	1,4	0,01	0,07
BPP4138	<i>atpH</i>	ATP synthase subunit delta	1,0E+08	22,8	1,5E+08	5,0	1,4	0,01	0,08
BPP4137	<i>atpA</i>	ATP synthase subunit alpha	4,4E+08	6,3	6,7E+08	6,6	1,5	0,00	0,01
BPP4136	<i>atpG</i>	ATP synthase gamma chain	1,5E+08	26,0	2,1E+08	34,1	1,3	0,24	0,45
BPP4135	<i>atpD</i>	ATP synthase subunit beta	5,1E+08	7,1	7,5E+08	9,9	1,5	0,00	0,02
BPP4134	<i>atpC</i>	ATP synthase epsilon chain	8,8E+07	49,1	3,7E+08	4,3	4,2	0,00	0,00
BPP4132	<i>hemE</i>	Uroporphyrinogen decarboxylase	2,6E+07	11,8	1,9E+07	23,6	0,8	0,07	0,21
BPP4131	<i>priA</i>	Primosomal protein N'	4,0E+06	38,0	4,3E+06	49,6	1,1	0,82	0,90
BPP4122	<i>BPP4122</i>	Putative binding-protein-dependent	8,9E+07	16,9	9,2E+07	9,0	1,0	0,71	0,84

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
		transport protein							
BPP4120	<i>nmrD</i>	ADP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase	8,7E+07	12,6	8,0E+07	61,3	0,9	0,81	0,89
BPP4117	<i>BPP4117</i>	Uncharacterized protein	2,3E+07	15,3	2,4E+07	6,6	1,0	0,87	0,93
BPP4111	<i>BPP4111</i>	Putative cytochrome c	1,9E+08	15,7	7,8E+07	13,6	0,4	0,00	0,01
BPP4089	<i>gshA</i>	Glutamate--cysteine ligase	2,1E+07	50,5	2,3E+07	36,7	1,1	0,84	0,91
BPP4083	<i>metX</i>	Homoserine O-acetyltransferase	1,3E+07	55,0	1,7E+07	55,3	1,3	0,60	0,76
BPP4064	<i>BPP4064</i>	Putative universal stress protein	3,4E+07	14,8	2,8E+07	8,7	0,8	0,10	0,28
BPP4061	<i>BPP4061</i>	Putative endonuclease	1,2E+07	23,6	7,6E+06	11,5	0,6	0,03	0,13
BPP4060	<i>pyrE</i>	Orotate phosphoribosyltransferase	1,1E+08	37,4	1,0E+08	36,2	0,9	0,84	0,91
BPP4059	<i>gatB</i>	Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B	9,8E+07	11,6	8,5E+07	11,7	0,9	0,13	0,32
BPP4058	<i>gatA</i>	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	9,8E+07	17,5	9,8E+07	20,1	1,0	0,97	0,98
BPP4057	<i>gatC</i>	Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit C	8,8E+07	5,2	9,5E+07	17,5	1,1	0,47	0,65
BPP4056	<i>mreB</i>	Rod shape-determining protein	2,2E+08	5,9	2,8E+08	12,5	1,3	0,01	0,08
BPP4055	<i>mreC</i>	Cell shape-determining protein MreC	1,8E+07	24,4	1,7E+07	9,5	0,9	0,66	0,81
BPP4053	<i>mrda</i>	Penicillin-binding protein 2	8,7E+06	9,3	7,3E+06	15,6	0,8	0,12	0,30
BPP4051	<i>ldh</i>	Putative L-lactate dehydrogenase	4,5E+08	12,7	4,8E+08	15,0	1,1	0,50	0,68
BPP4047	<i>argB</i>	Acetylglutamate kinase	7,4E+07	21,6	6,6E+07	10,6	0,9	0,36	0,57
BPP4046	<i>BPP4046</i>	Putative exported protein	2,9E+08	14,9	5,8E+08	22,0	2,0	0,01	0,05
BPP4044	<i>BPP4044</i>	Putative exported protein	2,4E+08	12,8	3,4E+08	6,5	1,4	0,00	0,03

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP4041	<i>rsmI</i>	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase I	1,9E+07	22,5	2,2E+07	3,7	1,1	0,31	0,53
BPP4039	<i>BPP4039</i>	Putative lipoprotein	na	na	3,4E+06	10,6	ON	na	na
BPP4038	<i>BPP4038</i>	Nucleotide-binding protein BPP4038	4,3E+07	10,8	5,3E+07	7,6	1,2	0,02	0,11
BPP4034	<i>rpoP</i>	Nitrogen regulatory IIA protein	4,8E+07	12,2	4,9E+07	3,9	1,0	0,75	0,86
BPP4032	<i>BPP4032</i>	ABC transporter	3,1E+07	56,6	3,5E+07	47,6	1,1	0,77	0,87
BPP4031	<i>lptA</i>	Lipopolysaccharide export system protein LptA	4,2E+07	17,1	5,6E+07	17,5	1,3	0,06	0,20
BPP4030	<i>BPP4030</i>	Putative exported protein	2,6E+07	13,7	2,1E+07	10,8	0,8	0,05	0,17
BPP4029	<i>BPP4029</i>	Probable hydrolase	5,9E+07	9,3	6,5E+07	20,7	1,1	0,45	0,64
BPP4028	<i>BPP4028</i>	Uncharacterized protein	3,1E+07	6,5	3,1E+07	10,0	1,0	0,74	0,86
BPP4027	<i>purT</i>	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2	7,6E+07	11,9	1,1E+08	1,6	1,4	0,00	0,01
BPP4025	<i>cydA</i>	Cytochrome D ubiquinol oxidase subunit I	3,0E+07	21,5	1,5E+07	8,9	0,5	0,01	0,08
BPP4020	<i>apt</i>	Adenine phosphoribosyltransferase	2,2E+07	56,0	2,0E+07	51,1	0,9	0,88	0,93
BPP4018	<i>BPP4018</i>	Putative exported protein	1,4E+07	61,3	2,9E+07	19,7	2,0	0,03	0,14
BPP4016	<i>ilvA</i>	L-threonine dehydratase	3,3E+07	14,2	3,2E+07	15,3	1,0	0,68	0,82
BPP4006	<i>BPP4006</i>	UPF0271 protein BPP4006	3,3E+06	97,0	2,6E+06	92,6	0,8	0,74	0,86
BPP4001	<i>serA</i>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	9,5E+07	9,2	1,1E+08	19,2	1,2	0,24	0,45
BPP3997	<i>phoR</i>	Phosphate regulon sensor protein	7,2E+06	51,3	3,1E+06	29,5	0,4	0,14	0,33
BPP3995	<i>ubiE</i>	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis C-methyltransferase UbiE	2,5E+07	12,4	2,7E+07	13,0	1,1	0,42	0,62
BPP3994	<i>BPP3994</i>	Putative membrane protein	1,2E+08	14,1	1,5E+08	9,1	1,3	0,01	0,09

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP3993	<i>BPP3993</i>	Uncharacterized protein	9,0E+06	27,2	7,4E+06	18,2	0,8	0,29	0,50
BPP3992	<i>ubiB</i>	Probable protein kinase UbiB	1,1E+07	12,7	1,3E+07	10,1	1,2	0,12	0,31
BPP3990	<i>BPP3990</i>	Putative cytidyltransferase	4,4E+07	30,8	4,6E+07	4,0	1,1	0,73	0,85
BPP3988	<i>BPP3988</i>	Uncharacterized protein	7,8E+07	13,0	6,6E+07	15,8	0,8	0,16	0,35
BPP3987	<i>thiD</i>	Putative phosphomethylpyrimidine kinase	2,7E+07	34,4	2,7E+07	22,3	1,0	0,96	0,98
BPP3986	<i>thiG</i>	Thiazole synthase	4,2E+07	11,9	4,6E+07	5,7	1,1	0,24	0,45
BPP3984	<i>BPP3984</i>	Putative outer membrane protein	2,5E+07	12,4	1,8E+07	17,8	0,7	0,02	0,10
BPP3983	<i>metH</i>	5-methyltetrahydrofolate--homocysteine methyltransferase	8,6E+06	11,9	5,8E+06	3,8	0,7	0,01	0,05
BPP3977	<i>BPP3977</i>	Cell division protein FtsX	1,1E+07	90,0	1,6E+07	76,8	1,4	0,57	0,74
BPP3976	<i>ftsE</i>	Cell division ATP-binding protein	9,9E+06	36,0	1,5E+07	7,6	1,5	0,04	0,16
BPP3975	<i>BPP3975</i>	Putative ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein	2,0E+08	13,3	1,7E+08	10,0	0,9	0,12	0,30
BPP3974	<i>BPP3974</i>	Putative amino acid ABC transporter permease protein	3,0E+07	9,6	2,2E+07	10,2	0,8	0,01	0,06
BPP3972	<i>BPP3972</i>	Putative amino acid ABC transporter ATP-binding protein	5,0E+07	15,1	4,4E+07	6,1	0,9	0,17	0,37
BPP3971	<i>BPP3971</i>	Putative exported protein	8,1E+07	26,8	9,0E+07	16,4	1,1	0,49	0,68
BPP3969	<i>glpK</i>	Glycerol kinase	1,1E+07	8,7	1,2E+07	6,7	1,1	0,16	0,36
BPP3965	<i>panC</i>	Pantothenate synthetase	1,6E+07	39,0	6,0E+06	58,0	0,4	0,03	0,13
BPP3963	<i>BPP3963</i>	Uncharacterized protein	7,6E+07	9,9	1,0E+08	8,1	1,4	0,00	0,04
BPP3959	<i>BPP3959</i>	HlyD family secretion protein	7,1E+06	26,7	9,1E+06	14,7	1,3	0,13	0,32
BPP3955	<i>BPP3955</i>	Uncharacterized protein	2,3E+07	68,9	9,0E+06	17,5	0,4	0,13	0,31

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP3953	<i>argJ</i>	Arginine biosynthesis bifunctional protein ArgJ	9,5E+07	9,7	1,0E+08	4,4	1,1	0,19	0,39
BPP3949	<i>BPP3949</i>	Putative ABC transporter substrate binding protein	4,8E+07	4,4	3,7E+07	3,8	0,8	0,00	0,01
BPP3936	<i>hemL</i>	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	9,4E+07	2,5	8,1E+07	13,2	0,9	0,06	0,20
BPP3934	<i>thiD</i>	Phosphomethylpyrimidine kinase	2,8E+06	89,3	5,5E+06	78,5	1,9	0,33	0,54
BPP3932	<i>BPP3932</i>	UPF0301 protein BPP3932	1,3E+07	16,5	2,0E+07	23,5	1,5	0,04	0,16
BPP3924	<i>aroE</i>	Shikimate dehydrogenase (NADP(+))	6,5E+06	18,5	9,1E+06	29,5	1,4	0,13	0,32
BPP3923	<i>BPP3923</i>	Putative membrane protein	1,7E+07	12,3	1,9E+07	46,3	1,1	0,70	0,83
BPP3921	<i>BPP3921</i>	Uncharacterized protein	9,9E+06	33,1	1,2E+07	23,5	1,2	0,42	0,62
BPP3920	<i>mpl</i>	UDP-N-acetylmuramate--L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminoheptandioate ligase	2,8E+07	8,0	2,8E+07	13,5	1,0	0,87	0,93
BPP3918	<i>aroQ</i>	3-dehydroquinate dehydratase	9,8E+06	44,3	1,6E+07	23,3	1,6	0,15	0,34
BPP3917	<i>fabE</i>	Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase	3,5E+08	49,9	3,7E+08	43,9	1,1	0,85	0,92
BPP3916	<i>fabG</i>	Biotin carboxylase	1,4E+08	14,2	1,6E+08	0,6	1,2	0,05	0,18
BPP3915	<i>prmA</i>	Ribosomal protein L11 methyltransferase	2,0E+07	61,3	2,5E+07	64,0	1,2	0,67	0,81
BPP3913	<i>BPP3913</i>	Putative carbohydrate kinase	7,8E+07	15,6	6,3E+07	10,2	0,8	0,07	0,22
BPP3912	<i>pcp</i>	Putative lipoprotein	4,3E+08	21,6	6,3E+08	11,1	1,5	0,01	0,09
BPP3905	<i>bphI</i>	Histone protein	1,4E+09	9,3	1,4E+09	16,1	1,1	0,57	0,74
BPP3904	<i>nrdB</i>	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta	5,1E+07	13,6	7,9E+07	12,2	1,5	0,00	0,04

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP3903	<i>nrdA</i>	Ribonucleoside-diphosphate reductase	6,7E+07	4,7	7,2E+07	7,4	1,1	0,15	0,35
BPP3901	<i>BPP3901</i>	Putative AsnC-family transcriptional regulator	1,9E+06	17,4	2,7E+06	48,7	1,4	0,32	0,53
BPP3898	<i>gltX</i>	Glutamate--tRNA ligase	4,7E+07	8,7	6,0E+07	3,2	1,3	0,00	0,03
BPP3888	<i>BPP3888</i>	Probable carboxylesterase	3,2E+07	11,8	2,8E+07	32,5	0,9	0,43	0,63
BPP3887	<i>BPP3887</i>	UPF0307 protein BPP3887	2,0E+07	41,8	1,8E+07	81,9	0,9	0,82	0,90
BPP3886	<i>BPP3886</i>	Uncharacterized protein	8,0E+07	50,8	9,1E+07	40,6	1,1	0,70	0,83
BPP3885	<i>BPP3885</i>	Putative exported solute binding protein	3,5E+08	16,8	2,9E+08	1,7	0,8	0,08	0,23
BPP3884	<i>rplM</i>	50S ribosomal protein L13	4,9E+07	43,9	2,7E+07	20,0	0,5	0,09	0,25
BPP3883	<i>rpsI</i>	30S ribosomal protein S9	1,6E+08	17,7	7,7E+07	10,3	0,5	0,00	0,02
BPP3882	<i>argC</i>	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	3,4E+08	19,1	4,3E+08	17,3	1,3	0,11	0,28
BPP3880	<i>erpA</i>	Putative iron-sulfur cluster insertion protein ErpA	4,6E+07	46,8	4,8E+07	47,2	1,0	0,91	0,95
BPP3879	<i>anmK</i>	Anhydro-N-acetylmuramic acid kinase	2,3E+07	6,4	2,8E+07	12,3	1,2	0,05	0,17
BPP3877	<i>tyrS</i>	Tyrosine--tRNA ligase	3,9E+07	20,9	4,6E+07	19,2	1,2	0,28	0,49
BPP3876	<i>BPP3876</i>	Uncharacterized protein	3,7E+08	8,4	4,0E+08	7,0	1,1	0,29	0,50
BPP3875	<i>glyA2</i>	Serine hydroxymethyltransferase 2	3,4E+08	2,2	4,3E+08	10,3	1,3	0,01	0,06
BPP3874	<i>nrdR</i>	Transcriptional repressor NrdR	1,2E+07	21,9	1,6E+07	9,0	1,3	0,06	0,19
BPP3871	<i>BPP3871</i>	Riboflavin biosynthesis protein RibD	9,5E+06	9,0	2,1E+07	59,4	2,2	0,12	0,30
BPP3870	<i>BPP3870</i>	Uncharacterized protein	na	na	4,4E+06	31,8	ON	na	na
BPP3865	<i>BPP3865</i>	Putative exported protein	1,2E+07	32,7	3,7E+06	41,0	0,3	0,01	0,06
BPP3863	<i>BPP3863</i>	Probable GntR-family transcriptional	4,3E+06	73,6	5,5E+06	13,4	1,3	0,57	0,74

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
		regulator							
BPP3862	<i>BPP3862</i>	Uncharacterized protein	1,4E+07	20,8	9,3E+06	5,3	0,7	0,02	0,10
BPP3845	<i>BPP3845</i>	GntR family transcriptional regulator	1,1E+07	15,5	1,4E+07	14,0	1,3	0,08	0,22
BPP3840	<i>BPP3840</i>	Putative membrane protein	2,1E+08	12,0	3,4E+08	13,1	1,6	0,00	0,04
BPP3839	<i>BPP3839</i>	Uncharacterized protein	1,6E+07	9,9	2,0E+07	30,7	1,2	0,30	0,51
BPP3838	<i>fabI</i>	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]	9,1E+07	16,3	9,2E+07	5,7	1,0	0,88	0,94
BPP3836	<i>gloB</i>	Hydroxyacylglutathione hydrolase	1,2E+07	18,5	4,6E+06	8,2	0,4	0,00	0,02
BPP3832	<i>BPP3832</i>	Probable membrane protein	4,5E+06	34,8	2,6E+06	5,8	0,6	0,10	0,27
BPP3828	<i>BPP3828</i>	Putative exported protein	2,2E+07	24,0	2,8E+07	14,4	1,3	0,10	0,27
BPP3816	<i>BPP3816</i>	Putative universal stress protein	3,4E+07	53,5	2,7E+07	27,9	0,8	0,46	0,65
BPP3814	<i>fusA2</i>	Elongation factor G 2	1,9E+07	29,3	2,5E+07	31,2	1,3	0,24	0,46
BPP3797	<i>BPP3797</i>	Putative exported protein	8,1E+06	33,0	2,1E+06	16,1	0,3	0,01	0,08
BPP3794	<i>BPP3794</i>	Putative periplasmic protein	1,7E+08	8,8	2,0E+08	16,1	1,2	0,16	0,35
BPP3793	<i>BPP3793</i>	Putative peptidoglycan-associated lipoprotein	9,5E+08	10,4	1,3E+09	8,2	1,3	0,00	0,04
BPP3792	<i>tolB</i>	Protein TolB	3,3E+08	6,4	4,3E+08	12,0	1,3	0,01	0,07
BPP3791	<i>BPP3791</i>	Proline-rich inner membrane protein	3,1E+07	35,0	3,4E+07	38,7	1,1	0,75	0,86
BPP3790	<i>BPP3790</i>	Putative TolR-like translocation protein	7,5E+07	12,3	9,6E+07	7,0	1,3	0,01	0,07
BPP3789	<i>BPP3789</i>	Putative TolQ-like translocation protein	1,4E+08	17,1	1,5E+08	9,5	1,1	0,61	0,77
BPP3788	<i>BPP3788</i>	Uncharacterized protein	1,0E+07	8,5	8,4E+06	10,6	0,8	0,05	0,17
BPP3787	<i>proS</i>	Proline--tRNA ligase	1,1E+08	6,8	1,0E+08	21,5	0,9	0,64	0,79
BPP3786	<i>rppH</i>	RNA pyrophosphohydrolase	2,1E+06	100,7	1,3E+06	55,0	0,6	0,58	0,74

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP3785	<i>BPP3785</i>	Two component response regulator	1,6E+07	60,0	1,8E+07	33,4	1,1	0,76	0,86
BPP3782	<i>BPP3782</i>	Uncharacterized protein	2,8E+08	20,9	4,4E+08	14,2	1,6	0,01	0,07
BPP3781	<i>BPP3781</i>	LysR-family transcriptional regulator	6,2E+06	7,3	5,3E+06	11,6	0,9	0,10	0,27
BPP3779	<i>BPP3779</i>	Putative oxidoreductase	2,3E+07	16,4	2,3E+07	17,8	1,0	0,97	0,98
BPP3778	<i>BPP3778</i>	Putative gamma-glutamyltranspeptidase	9,4E+06	25,6	8,4E+06	13,1	0,9	0,49	0,67
BPP3774	<i>BPP3774</i>	Uncharacterized protein	2,9E+07	15,5	3,2E+07	15,5	1,1	0,36	0,56
BPP3773	<i>BPP3773</i>	Cell division protein ZapA	8,5E+07	7,9	1,1E+08	22,7	1,3	0,11	0,28
BPP3772	<i>BPP3772</i>	Putative exported protein	1,1E+07	40,5	2,0E+07	17,4	1,8	0,02	0,09
BPP3769	<i>cyt</i>	Cytochrome C552	4,4E+07	19,5	2,4E+07	8,8	0,5	0,00	0,04
BPP3768	<i>msrA</i>	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA	2,1E+07	22,5	2,1E+07	34,2	1,0	0,98	0,99
BPP3767	<i>blyY</i>	Putative hemolysin	2,8E+08	22,5	4,2E+08	23,5	1,5	0,06	0,20
BPP3764	<i>BPP3764</i>	Uncharacterized protein	2,6E+07	126,8	2,2E+07	147,7	0,8	0,84	0,91
BPP3762	<i>pyrC</i>	Dihydroorotase	8,0E+07	5,8	6,0E+07	30,3	0,8	0,08	0,23
BPP3761	<i>BPP3761</i>	Putative ABC transporter ATP-binding protein	3,4E+07	46,3	4,6E+07	20,9	1,3	0,25	0,46
BPP3760	<i>mraZ</i>	Transcriptional regulator MraZ	1,1E+08	13,5	1,0E+08	8,6	0,9	0,53	0,70
BPP3759	<i>rsmH</i>	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase H	5,2E+07	7,0	4,6E+07	12,3	0,9	0,10	0,26
BPP3757	<i>ftsI</i>	Peptidoglycan synthetase	1,3E+07	34,5	7,7E+06	43,5	0,6	0,11	0,28
BPP3756	<i>murE</i>	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase	5,1E+07	33,8	3,7E+07	13,7	0,7	0,16	0,35
BPP3755	<i>mraY</i>	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	6,7E+06	18,9	8,1E+06	21,9	1,2	0,25	0,46

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP3754	<i>murD</i>	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	8,8E+07	56,8	1,0E+08	61,1	1,1	0,77	0,87
BPP3752	<i>murG</i>	UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase	9,4E+06	26,0	3,7E+06	69,2	0,4	0,05	0,17
BPP3751	<i>murC</i>	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase	3,9E+07	29,8	3,1E+07	8,0	0,8	0,22	0,43
BPP3750	<i>ddl</i>	D-alanine--D-alanine ligase	7,0E+07	7,3	6,7E+07	21,7	1,0	0,75	0,86
BPP3748	<i>ftsA</i>	Cell division protein FtsA	1,4E+08	2,3	1,3E+08	4,2	0,9	0,04	0,16
BPP3747	<i>ftsZ</i>	Cell division protein FtsZ	3,6E+07	36,4	1,5E+07	33,3	0,4	0,03	0,12
BPP3746	<i>lpxC</i>	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] N-acetylglucosamine deacetylase	1,1E+07	18,8	2,7E+07	21,7	2,5	0,00	0,03
BPP3743	<i>secA</i>	Protein translocase subunit SecA	1,3E+08	16,3	1,3E+08	9,7	1,0	0,95	0,98
BPP3742	<i>BPP3742</i>	Uncharacterized protein	2,6E+07	11,1	3,0E+07	7,4	1,1	0,08	0,23
BPP3741	<i>BPP3741</i>	Putative membrane protein	2,5E+07	37,5	3,7E+07	9,2	1,5	0,06	0,19
BPP3739	<i>BPP3739</i>	Putative oxidoreductase	3,1E+07	26,8	1,0E+07	29,3	0,3	0,00	0,04
BPP3735	<i>pagP</i>	Lipid A palmitoyltransferase PagP	8,0E+07	18,5	6,3E+07	9,0	0,8	0,07	0,22
BPP3734	<i>BPP3734</i>	Magnesium transporter MgtE	2,7E+07	8,5	2,3E+07	17,1	0,8	0,09	0,25
BPP3730	<i>BPP3730</i>	Putative hydrolase	2,7E+07	13,7	2,6E+07	4,6	1,0	0,65	0,80
BPP3729	<i>fadD2</i>	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase	2,8E+07	7,3	1,6E+07	15,0	0,6	0,00	0,02
BPP3728	<i>BPP3728</i>	Inositol monophosphatase-family protein	2,5E+07	9,5	3,8E+07	15,8	1,5	0,01	0,06
BPP3726	<i>BPP3726</i>	Uncharacterized protein	1,6E+08	13,0	1,6E+08	12,2	1,0	0,84	0,91
BPP3725	<i>metN</i>	Methionine import ATP-binding protein MetN	3,5E+08	17,1	2,1E+08	24,7	0,6	0,01	0,07

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP3724	<i>BPP3724</i>	ABC transport protein, inner membrane component	1,0E+08	35,7	8,9E+07	26,4	0,9	0,56	0,73
BPP3723	<i>BPP3723</i>	Lipoprotein	6,6E+08	15,5	1,2E+09	13,9	1,8	0,00	0,02
BPP3722	<i>BPP3722</i>	Putative alcohol dehydrogenase	3,0E+06	21,1	na	na	OFF	na	na
BPP3704	<i>BPP3704</i>	Putative short-chain dehydrogenase	6,5E+06	17,1	1,0E+07	32,6	1,6	0,08	0,23
BPP3684	<i>nspC</i>	Carboxynorspermidine/carboxyspermidine decarboxylase	1,1E+08	6,5	8,2E+07	8,9	0,7	0,00	0,02
BPP3681	<i>BPP3681</i>	Probable transcriptional regulator	4,2E+06	32,1	3,7E+06	39,0	0,9	0,70	0,83
BPP3673	<i>BPP3673</i>	Carboxyvinyl-carboxyphosphonate phosphorylmutase	2,8E+07	11,3	3,2E+07	34,4	1,2	0,47	0,66
BPP3672	<i>BPP3672</i>	Putative outer membrane protein	5,9E+07	15,1	5,6E+07	29,1	1,0	0,80	0,88
BPP3670	<i>BPP3670</i>	Putative inner membrane protein	9,5E+07	27,6	1,1E+08	8,5	1,1	0,43	0,63
BPP3668	<i>BPP3668</i>	Uncharacterized protein	1,2E+07	17,1	1,3E+07	12,7	1,0	0,89	0,94
BPP3667	<i>lptD</i>	LPS-assembly protein LptD	9,9E+06	33,4	1,1E+07	41,4	1,1	0,70	0,83
BPP3666	<i>surA</i>	Chaperone SurA	1,4E+08	15,2	1,7E+08	10,3	1,2	0,06	0,20
BPP3665	<i>rsmA</i>	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase A	1,5E+07	15,3	1,9E+07	13,8	1,2	0,11	0,28
BPP3663	<i>pykA</i>	Pyruvate kinase	6,0E+07	14,3	4,4E+07	14,1	0,7	0,02	0,11
BPP3661	<i>BPP3661</i>	Putative oxidoreductase	3,1E+07	15,9	3,4E+07	11,3	1,1	0,30	0,52
BPP3660	<i>def2</i>	Peptide deformylase 2	1,6E+08	14,1	9,2E+07	14,1	0,6	0,00	0,03
BPP3659	<i>gloA</i>	Lactoylglutathione lyase	5,4E+08	26,3	1,3E+08	67,2	0,2	0,00	0,04
BPP3657	<i>BPP3657</i>	Probable acyltransferase	4,7E+06	15,5	4,3E+06	18,2	0,9	0,59	0,75
BPP3655	<i>glyS</i>	Glycine--tRNA ligase beta subunit	6,9E+07	13,0	6,5E+07	2,5	0,9	0,43	0,62
BPP3654	<i>glyQ</i>	Glycine--tRNA ligase alpha subunit	2,2E+07	9,0	2,2E+07	6,9	1,0	0,56	0,73

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP3647	<i>BPP3647</i>	Carnitiny-CoA dehidratase	na	na	6,9E+06	16,8	ON	na	na
BPP3645	<i>BPP3645</i>	Uncharacterized protein	1,8E+07	93,9	5,6E+07	113,0	3,2	0,37	0,58
BPP3643	<i>BPP3643</i>	Putative citrate lyase beta subunit	2,4E+07	20,2	2,6E+07	6,2	1,1	0,38	0,58
BPP3634	<i>BPP3634</i>	GntR family transcriptional regulator	2,2E+07	13,1	2,0E+07	14,2	0,9	0,33	0,54
BPP3629	<i>folK</i>	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropteridone pyrophosphokinase	na	na	1,0E+07	26,7	ON	na	na
BPP3628	<i>pcnB</i>	Poly(A) polymerase I	4,8E+07	19,1	4,5E+07	11,2	0,9	0,63	0,79
BPP3627	<i>BPP3627</i>	Uncharacterized protein	2,9E+07	18,2	2,4E+07	40,7	0,8	0,38	0,58
BPP3626	<i>BPP3626</i>	Uncharacterized protein	1,4E+07	27,3	1,2E+07	21,0	0,9	0,44	0,63
BPP3625	<i>purM</i>	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	6,3E+07	20,3	7,1E+07	9,3	1,1	0,27	0,49
BPP3623	<i>mutL</i>	DNA mismatch repair protein MutL	2,1E+07	11,2	2,2E+07	12,4	1,1	0,39	0,59
BPP3619	<i>fumC</i>	Fumarate hydratase class II	1,3E+08	14,3	4,0E+08	12,2	3,0	0,00	0,00
BPP3617	<i>BPP3617</i>	Putative exported protein	1,8E+09	16,8	1,3E+09	5,0	0,7	0,02	0,10
BPP3615	<i>ggt</i>	Gamma-glutamyltranspeptidase	4,1E+07	8,8	4,0E+07	4,9	1,0	0,94	0,98
BPP3610	<i>purU</i>	Formyltetrahydrofolate deformylase	1,7E+07	11,5	3,4E+07	46,2	2,0	0,08	0,23
BPP3607	<i>pdxH</i>	Pyridoxine/pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	3,4E+07	9,4	4,3E+07	9,4	1,2	0,02	0,10
BPP3597	<i>uvrA2</i>	UvrABC system protein A	1,7E+07	31,4	9,1E+06	14,3	0,5	0,03	0,14
BPP3594	<i>BPP3594</i>	Putative glycosyl transferase	5,0E+07	38,7	3,1E+07	81,6	0,6	0,30	0,52
BPP3587	<i>BPP3587</i>	Probable hydrolase	2,0E+06	73,0	2,9E+06	81,9	1,4	0,56	0,73
BPP3584	<i>BPP3584</i>	Putative ABC transport ATP-binding subunit	5,9E+07	8,5	7,1E+07	5,1	1,2	0,01	0,06

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP3581	<i>minE</i>	Cell division topological specificity factor	1,1E+08	18,7	1,1E+08	16,1	0,9	0,68	0,82
BPP3580	<i>minD</i>	Site-determining protein	2,4E+08	5,7	2,5E+08	12,3	1,0	0,55	0,72
BPP3579	<i>minC</i>	Probable septum site-determining protein MinC	5,3E+07	35,9	5,8E+07	46,1	1,1	0,77	0,87
BPP3578	<i>glnS</i>	Glutamine--tRNA ligase	1,4E+07	24,3	2,1E+07	16,8	1,5	0,02	0,11
BPP3577	<i>BPP3577</i>	Putative transmembrane cytochrome oxidase	2,1E+07	14,1	2,3E+07	20,4	1,1	0,50	0,68
BPP3576	<i>BPP3576</i>	Putative cytochrome oxidase	8,7E+06	10,9	9,6E+06	8,6	1,1	0,24	0,45
BPP3574	<i>ompR</i>	Transcriptional regulatory protein OmpR	2,0E+07	16,0	2,1E+07	7,3	1,0	0,69	0,83
BPP3571	<i>ruvB</i>	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase RuvB	3,4E+07	24,0	3,6E+07	7,9	1,1	0,69	0,82
BPP3570	<i>BPP3570</i>	Putative serine/threonine dehydratase	2,8E+07	21,7	4,0E+07	13,4	1,4	0,03	0,13
BPP3565	<i>fis</i>	DNA-binding protein	5,9E+07	4,2	3,5E+07	47,2	0,6	0,03	0,14
BPP3558	<i>ompQ</i>	Outer membrane porin protein OmpQ	9,0E+07	39,2	1,4E+08	35,4	1,6	0,14	0,33
BPP3556	<i>BPP3556</i>	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	2,9E+07	10,8	3,8E+07	7,4	1,3	0,00	0,04
BPP3555	<i>BPP3555</i>	Putative exported protein	5,2E+07	11,3	7,5E+07	10,0	1,4	0,00	0,04
BPP3554	<i>BPP3554</i>	Uncharacterized protein	7,5E+06	23,7	4,5E+06	25,9	0,6	0,07	0,22
BPP3551	<i>ilvE</i>	Branched-chain amino acid aminotransferase	5,4E+07	12,1	6,7E+07	3,9	1,2	0,01	0,07
BPP3548	<i>BPP3548</i>	Putative ATP-dependent RNA helicase	2,1E+07	11,7	2,2E+07	17,9	1,0	0,73	0,85
BPP3545	<i>BPP3545</i>	Uncharacterized protein	1,2E+07	31,9	1,4E+07	17,3	1,1	0,50	0,68
BPP3544	<i>BPP3544</i>	IclR family transcriptional regulator	2,8E+07	11,0	1,6E+07	69,9	0,6	0,09	0,26
BPP3543	<i>dnt</i>	Dermonecrotic toxin	6,0E+07	116,2	2,5E+07	106,6	0,4	0,39	0,59

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP3542	<i>BPP3542</i>	Putative exported protein	3,2E+07	35,2	2,2E+07	73,1	0,7	0,33	0,54
BPP3541	<i>BPP3541</i>	Uncharacterized protein	6,4E+08	49,9	1,3E+09	16,1	2,0	0,02	0,09
BPP3540	<i>pyrD</i>	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	6,6E+07	5,5	7,5E+07	20,4	1,1	0,32	0,53
BPP3537	<i>BPP3537</i>	Putative NUDIX hydrolase	2,2E+07	21,0	2,3E+07	18,7	1,0	0,81	0,90
BPP3534	<i>BPP3534</i>	Uncharacterized protein	5,5E+06	41,3	7,4E+06	10,1	1,4	0,15	0,35
BPP3496	<i>dapB</i>	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	1,1E+08	7,4	1,2E+08	2,8	1,1	0,03	0,13
BPP3495	<i>omlA</i>	Outer membrane protein assembly factor BamE	2,3E+08	30,9	2,4E+08	6,5	1,1	0,74	0,85
BPP3492	<i>BPP3492</i>	DNA repair protein RecN	9,4E+06	11,8	1,9E+07	52,4	2,0	0,10	0,27
BPP3491	<i>nadK</i>	NAD kinase	2,4E+07	33,2	4,3E+07	5,8	1,8	0,00	0,04
BPP3490	<i>hrcA</i>	Heat-inducible transcription repressor HrcA	1,0E+07	6,2	8,7E+06	104,9	0,8	0,76	0,87
BPP3488	<i>BPP3488</i>	Uncharacterized protein	2,0E+07	35,9	2,5E+07	18,5	1,3	0,33	0,54
BPP3487	<i>grpE</i>	Protein GrpE	7,7E+07	22,1	9,5E+07	20,7	1,2	0,23	0,43
BPP3485	<i>dnaK</i>	Chaperone protein DnaK	6,6E+08	9,5	7,5E+08	5,5	1,1	0,04	0,16
BPP3484	<i>dnaJ</i>	Chaperone protein DnaJ	5,7E+07	13,6	5,7E+07	17,6	1,0	0,89	0,94
BPP3483	<i>BPP3483</i>	Putative zinc protease	2,5E+08	5,4	2,8E+08	18,2	1,1	0,31	0,52
BPP3479	<i>BPP3479</i>	Putative ATP-binding protein	1,9E+07	46,4	1,7E+07	25,1	0,9	0,70	0,83
BPP3478	<i>BPP3478</i>	Putative cytochrome	1,5E+08	7,9	4,2E+07	21,9	0,3	0,00	0,00
BPP3475	<i>icd</i>	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	1,1E+09	13,6	1,1E+09	10,2	1,0	0,71	0,83
BPP3463	<i>trxB</i>	Thioredoxin reductase	1,5E+08	11,2	1,5E+08	16,8	1,0	0,86	0,93
BPP3462	<i>ftsK</i>	Putative cell division protein	2,1E+07	13,7	1,9E+07	30,4	0,9	0,47	0,65

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP3461	<i>lolA</i>	Outer-membrane lipoprotein carrier protein	8,6E+07	50,0	7,7E+07	51,8	0,9	0,78	0,88
BPP3460	<i>BPP3460</i>	Uncharacterized protein	2,7E+07	7,0	2,0E+07	11,8	0,8	0,01	0,05
BPP3459	<i>serS</i>	Serine--tRNA ligase	8,8E+07	15,3	8,3E+07	12,5	0,9	0,58	0,75
BPP3454	<i>BPP3454</i>	Uncharacterized protein	4,4E+07	132,0	1,5E+07	33,2	0,3	0,36	0,56
BPP3441	<i>BPP3441</i>	Putative oxidoreductase	8,8E+07	11,9	1,1E+08	2,7	1,3	0,00	0,04
BPP3440	<i>BPP3440</i>	UPF0246 protein BPP3440	6,6E+07	12,5	9,0E+07	9,1	1,4	0,01	0,05
BPP3438	<i>BPP3438</i>	Putative membrane protein	3,9E+06	38,7	4,4E+06	12,0	1,1	0,54	0,71
BPP3437	<i>ilvI</i>	Acetolactate synthase	5,7E+07	22,0	6,4E+07	8,5	1,1	0,39	0,59
BPP3436	<i>ilvH</i>	Acetolactate synthase small subunit	3,2E+07	20,3	3,6E+07	4,9	1,1	0,21	0,42
BPP3435	<i>ilvC</i>	Ketol-acid reductoisomerase	3,4E+08	20,1	3,9E+08	10,1	1,1	0,28	0,49
BPP3433	<i>BPP3433</i>	Putative lipoprotein	2,3E+07	51,0	3,9E+07	7,1	1,7	0,04	0,16
BPP3432	<i>rpsO</i>	30S ribosomal protein S15	4,6E+08	18,3	2,0E+08	41,9	0,4	0,01	0,05
BPP3431	<i>pnp</i>	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	3,5E+08	2,8	3,3E+08	10,2	1,0	0,45	0,64
BPP3429	<i>tdcB</i>	Threonine dehydratase catabolic	1,0E+07	50,5	1,9E+07	3,9	1,9	0,01	0,09
BPP3427	<i>BPP3427</i>	Probable zinc-binding dehydrogenase	2,3E+08	11,1	1,1E+08	14,4	0,5	0,00	0,01
BPP3426	<i>tpiA</i>	Triosephosphate isomerase	2,1E+08	12,6	2,2E+08	9,5	1,1	0,43	0,63
BPP3425	<i>secG</i>	Protein-export membrane protein	1,2E+08	16,2	1,3E+08	19,8	1,2	0,29	0,51
BPP3417	<i>BPP3417</i>	Probable short-chain dehydrogenase	na	na	5,2E+06	4,4	ON	na	na
BPP3400	<i>betT</i>	High-affinity choline transport protein	3,4E+07	13,7	2,6E+07	7,6	0,8	0,02	0,12
BPP3394	<i>BPP3394</i>	Uncharacterized protein	1,5E+07	14,5	1,8E+07	21,1	1,2	0,25	0,46
BPP3392	<i>BPP3392</i>	Outer membrane porin protein	4,0E+08	35,2	6,7E+08	30,8	1,7	0,07	0,22
BPP3390	<i>nuoB</i>	NADH-quinone oxidoreductase subunit B	9,2E+06	17,9	na	na	OFF	na	na

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP3389	<i>nuoC</i>	NADH-quinone oxidoreductase subunit C	5,0E+07	11,9	8,6E+06	14,7	0,2	0,00	0,00
BPP3388	<i>nuoD</i>	NADH-quinone oxidoreductase subunit D	7,9E+07	3,7	2,9E+07	22,4	0,4	0,00	0,00
BPP3386	<i>nuoF</i>	Respiratory-chain NADH dehydrogenase, 51 kDa subunit	6,3E+07	13,5	1,7E+07	20,1	0,3	0,00	0,00
BPP3385	<i>nuoG</i>	NADH-quinone oxidoreductase	2,7E+07	32,9	na	na	OFF	na	na
BPP3384	<i>nuoH</i>	NADH-quinone oxidoreductase subunit H	3,5E+07	12,4	1,8E+07	65,8	0,5	0,05	0,17
BPP3383	<i>nuoI</i>	NADH-quinone oxidoreductase subunit I	9,4E+05	93,0	na	na	OFF	na	na
BPP3380	<i>nuoL</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase, chain L	4,7E+07	23,0	2,5E+07	27,5	0,5	0,01	0,08
BPP3379	<i>nuoM</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase, chain M	7,9E+07	22,3	7,6E+07	7,6	1,0	0,74	0,86
BPP3378	<i>nuoN</i>	NADH-quinone oxidoreductase subunit N	3,0E+07	38,1	2,8E+07	14,1	0,9	0,68	0,82
BPP3376	<i>bfrD</i>	Probable TonB-dependent receptor for iron transport	3,0E+08	19,2	3,6E+08	9,1	1,2	0,11	0,29
BPP3368	<i>serB</i>	Phosphoserine phosphatase	3,3E+07	7,7	3,5E+07	3,4	1,1	0,13	0,31
BPP3367	<i>mfd</i>	Transcription-repair-coupling factor	1,5E+07	42,4	1,8E+07	6,9	1,2	0,39	0,59
BPP3365	<i>ispF</i>	2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase	2,3E+07	14,5	1,4E+07	54,6	0,6	0,14	0,32
BPP3362	<i>ahpD</i>	Alkyl hydroperoxide reductase AhpD	1,5E+08	6,9	4,3E+08	127,9	2,9	0,35	0,56
BPP3361	<i>ahpC</i>	Alkyl hydroperoxide reductase	4,3E+09	6,1	4,2E+09	16,8	1,0	0,86	0,92
BPP3357	<i>BPP3357</i>	Bacteriophage-related DNA polymerase	1,7E+06	103,6	3,0E+05	56,6	0,2	0,17	0,36
BPP3355	<i>smc</i>	Chromosome partition protein Smc	6,1E+07	17,2	5,5E+07	5,3	0,9	0,30	0,52
BPP3354	<i>BPP3354</i>	Cell division protein ZipA	1,3E+08	7,6	1,5E+08	5,0	1,2	0,01	0,08
BPP3352	<i>BPP3352</i>	Probable parvulin-type peptidyl-prolyl cis-	2,6E+09	7,6	2,8E+09	10,5	1,1	0,16	0,36

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
		trans isomerase							
BPP3349	<i>msrB</i>	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrB	3,0E+07	19,4	3,2E+07	41,4	1,1	0,75	0,86
BPP3345	<i>BPP3345</i>	Putative exported protein	2,4E+08	34,9	1,0E+08	14,7	0,4	0,02	0,09
BPP3342	<i>BPP3342</i>	Putative branched-chain amino acid transport system protein	1,6E+07	42,5	4,8E+06	51,5	0,3	0,06	0,19
BPP3340	<i>BPP3340</i>	Putative solute-binding periplasmic protein	1,1E+07	9,4	1,5E+07	30,2	1,4	0,14	0,33
BPP3336	<i>BPP3336</i>	ABC transporter ATP-binding protein	1,7E+07	14,0	5,2E+06	49,4	0,3	0,00	0,01
BPP3334	<i>nth</i>	Endonuclease III	1,3E+07	7,8	na	na	OFF	na	na
BPP3331	<i>BPP3331</i>	Putative ferredoxin--NADP reductase	8,6E+07	11,1	9,5E+07	7,4	1,1	0,18	0,38
BPP3329	<i>pncB</i>	Nicotinate phosphoribosyltransferase	2,9E+07	20,4	4,1E+07	9,3	1,4	0,01	0,09
BPP3328	<i>BPP3328</i>	Uncharacterized protein	4,6E+08	14,5	7,0E+08	5,2	1,5	0,00	0,02
BPP3323	<i>trpB</i>	Tryptophan synthase beta chain	7,8E+07	3,6	8,9E+07	13,4	1,1	0,14	0,33
BPP3322	<i>trpA</i>	Tryptophan synthase alpha chain	7,0E+07	8,6	6,9E+07	11,3	1,0	0,81	0,89
BPP3321	<i>accD</i>	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta	3,9E+07	17,0	3,9E+07	17,4	1,0	0,87	0,93
BPP3320	<i>BPP3320</i>	Lipid A deacylase	6,3E+07	17,0	8,9E+07	14,0	1,4	0,02	0,09
BPP3318	<i>rne</i>	Ribonuclease E	8,7E+07	4,7	7,2E+07	8,0	0,8	0,01	0,05
BPP3315	<i>yedY</i>	Sulfoxide reductase catalytic subunit YedY	1,9E+07	46,2	1,5E+07	43,0	0,8	0,57	0,74
BPP3313	<i>BPP3313</i>	Putative exported hydrolase	1,1E+07	19,0	1,0E+07	19,8	1,0	0,84	0,91
BPP3312	<i>BPP3312</i>	Uncharacterized protein	2,1E+07	70,3	2,2E+07	4,8	1,0	0,89	0,94
BPP3311	<i>BPP3311</i>	Maf-like protein BPP3311	2,3E+07	27,0	2,0E+07	9,1	0,9	0,41	0,61

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP3310	<i>BPP3310</i>	Uncharacterized protein	2,3E+07	50,3	1,1E+07	59,0	0,5	0,18	0,37
BPP3309	<i>rpmF</i>	50S ribosomal protein L32	5,0E+07	20,5	3,2E+07	29,3	0,6	0,04	0,15
BPP3308	<i>plsX</i>	Phosphate acyltransferase	5,4E+07	65,6	3,2E+07	21,6	0,6	0,26	0,47
BPP3307	<i>fabH</i>	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3	1,2E+08	26,2	1,3E+08	9,8	1,1	0,64	0,79
BPP3306	<i>fabD</i>	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	4,6E+07	57,6	3,8E+07	59,0	0,8	0,66	0,81
BPP3305	<i>fabG</i>	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	1,7E+08	9,0	1,8E+08	20,2	1,0	0,77	0,87
BPP3304	<i>acpP</i>	Acyl carrier protein	1,5E+09	20,0	2,4E+09	5,8	1,6	0,00	0,02
BPP3303	<i>fabF</i>	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2	2,1E+08	9,8	1,9E+08	9,4	0,9	0,45	0,64
BPP3301	<i>sigE</i>	RNA polymerase sigma factor	3,5E+06	19,7	4,9E+06	64,8	1,4	0,42	0,62
BPP3299	<i>mucB</i>	Putative sigma factor regulatory protein	3,3E+07	39,6	5,5E+07	35,3	1,7	0,11	0,28
BPP3298	<i>mucD</i>	Serine protease	7,5E+08	12,5	1,2E+09	7,6	1,7	0,00	0,01
BPP3297	<i>lepA</i>	Elongation factor 4	7,6E+07	13,1	8,3E+07	13,8	1,1	0,43	0,63
BPP3296	<i>lep</i>	Signal peptidase I	4,7E+07	21,1	4,9E+07	8,7	1,0	0,78	0,87
BPP3295	<i>rnc</i>	Ribonuclease 3	2,1E+07	16,9	2,5E+07	13,5	1,2	0,16	0,35
BPP3294	<i>era</i>	GTPase Era	4,0E+07	64,6	2,3E+07	53,1	0,6	0,27	0,49
BPP3287	<i>BPP3287</i>	Uncharacterized protein	3,9E+07	14,8	5,3E+07	16,7	1,4	0,04	0,15
BPP3285	<i>pepA</i>	Probable cytosol aminopeptidase	2,6E+08	13,3	2,5E+08	8,0	1,0	0,73	0,85
BPP3284	<i>BPP3284</i>	Putative integral membrane protein	2,1E+07	56,0	3,5E+07	51,2	1,7	0,24	0,45
BPP3280	<i>BPP3280</i>	Putative LysR-family transcriptional regulator	1,3E+08	51,5	8,9E+07	21,1	0,7	0,31	0,53

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP3277	<i>prpE</i>	Propionate--CoA ligase	1,8E+07	20,8	9,3E+06	27,8	0,5	0,01	0,07
BPP3276	<i>BPP3276</i>	Uncharacterized protein	3,1E+07	64,5	4,4E+07	20,1	1,4	0,28	0,50
BPP3274	<i>acsA</i>	Acetyl-coenzyme A synthetase	1,0E+08	18,8	5,8E+07	16,9	0,6	0,01	0,05
BPP3268	<i>BPP3268</i>	Putative electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	7,3E+07	46,4	3,8E+07	37,6	0,5	0,10	0,27
BPP3267	<i>BPP3267</i>	Uncharacterized protein	9,8E+06	45,1	8,0E+06	80,3	0,8	0,67	0,81
BPP3266	<i>BPP3266</i>	Putative coenzyme A transferase subunit	1,2E+08	11,4	1,2E+08	11,0	1,0	0,90	0,94
BPP3265	<i>BPP3265</i>	Putative coenzyme A transferase subunit	2,0E+08	12,9	2,0E+08	14,0	1,0	0,67	0,81
BPP3263	<i>BPP3263</i>	Putative L-asparaginase	3,1E+07	7,9	1,6E+07	3,6	0,5	0,00	0,00
BPP3262	<i>BPP3262</i>	Putative ABC transporter ATP-binding subunit	1,3E+07	30,0	4,9E+06	46,9	0,4	0,01	0,07
BPP3259	<i>BPP3259</i>	Putative binding-protein-dependent transport permease	5,4E+06	95,2	2,9E+06	19,4	0,5	0,45	0,64
BPP3256	<i>BPP3256</i>	Putative aminopeptidase	6,0E+06	17,1	5,1E+06	7,1	0,9	0,16	0,35
BPP3255	<i>pyrG</i>	CTP synthase	8,4E+07	16,0	7,3E+07	13,5	0,9	0,21	0,41
BPP3254	<i>kdsA</i>	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	3,3E+07	4,9	2,1E+07	14,4	0,6	0,00	0,02
BPP3252	<i>eno</i>	Enolase	2,3E+08	17,4	2,3E+08	1,1	1,0	0,91	0,95
BPP3245	<i>BPP3245</i>	33 kDa chaperonin	3,0E+07	10,0	2,9E+07	14,5	1,0	0,74	0,86
BPP3243	<i>BPP3243</i>	Putative AMP-binding protein	3,7E+07	5,4	3,9E+07	7,1	1,1	0,21	0,42
BPP3234	<i>prpC</i>	Citrate synthase	2,2E+07	19,2	1,4E+07	29,4	0,6	0,04	0,15
BPP3233	<i>prpB</i>	2-methylisocitrate lyase	9,2E+07	24,8	6,2E+07	21,8	0,7	0,06	0,20
BPP3232	<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase	4,6E+08	14,8	3,6E+08	10,5	0,8	0,05	0,17

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP3231	<i>BPP3231</i>	Putative GntR-family transcriptional regulator	1,1E+07	53,8	1,0E+07	24,4	0,9	0,86	0,92
BPP3228	<i>sdhA</i>	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	3,6E+08	41,8	1,4E+08	33,1	0,4	0,03	0,14
BPP3227	<i>sdhB</i>	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	2,1E+08	15,8	6,2E+07	21,5	0,3	0,00	0,01
BPP3226	<i>BPP3226</i>	Uncharacterized protein	1,4E+07	32,9	5,3E+06	60,2	0,4	0,04	0,15
BPP3225	<i>gltA</i>	Citrate synthase	6,6E+08	2,6	5,2E+08	2,5	0,8	0,00	0,00
BPP3223	<i>BPP3223</i>	Putative inner membrane protein	2,3E+07	22,3	1,3E+07	10,4	0,6	0,01	0,08
BPP3221	<i>maeB</i>	NADP-dependent malic enzyme	2,4E+08	7,9	2,3E+08	18,8	1,0	0,68	0,82
BPP3217	<i>odhA</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	2,9E+08	16,8	4,5E+08	15,9	1,6	0,01	0,06
BPP3216	<i>odhB</i>	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	5,2E+08	8,9	7,0E+08	8,1	1,3	0,00	0,04
BPP3215	<i>odhL</i>	Dihydrolipoyl dehydrogenase	1,3E+08	5,0	2,0E+08	9,9	1,5	0,00	0,02
BPP3214	<i>BPP3214</i>	Uncharacterized protein	7,9E+06	14,6	9,8E+06	8,6	1,2	0,06	0,20
BPP3202	<i>trpS</i>	Tryptophan--tRNA ligase	6,0E+07	24,9	9,8E+07	12,3	1,6	0,01	0,06
BPP3201	<i>tex</i>	Transcription accessory protein	9,4E+07	10,9	7,7E+07	16,7	0,8	0,09	0,26
BPP3199	<i>comL</i>	Outer membrane protein assembly factor BamD	1,7E+08	7,4	2,2E+08	2,6	1,3	0,00	0,01
BPP3195	<i>phbB</i>	Acetoacetyl-CoA reductase	1,4E+08	10,8	1,1E+08	19,9	0,8	0,04	0,16
BPP3194	<i>BPP3194</i>	Uncharacterized protein	1,7E+08	13,8	1,8E+08	7,1	1,1	0,43	0,63
BPP3193	<i>BPP3193</i>	Putative exported protein	3,9E+07	38,7	2,0E+08	81,9	5,0	0,16	0,36

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP3187	<i>BPP3187</i>	Putative exported protein	6,1E+07	11,2	5,5E+07	6,2	0,9	0,22	0,43
BPP3185	<i>BPP3185</i>	UPF0337 protein BPP3185	2,0E+07	13,9	1,6E+07	8,4	0,8	0,06	0,19
BPP3178	<i>BPP3178</i>	Putative peptidoglycan-binding protein	1,4E+07	17,9	1,6E+07	7,9	1,1	0,23	0,44
BPP3176	<i>BPP3176</i>	Uncharacterized protein	9,5E+06	17,3	1,1E+07	17,0	1,2	0,21	0,42
BPP3156	<i>BPP3156</i>	Uncharacterized protein	4,7E+07	22,0	7,2E+07	7,7	1,5	0,01	0,05
BPP3155	<i>BPP3155</i>	Putative transcriptional regulator	4,0E+07	18,7	4,0E+07	34,0	1,0	1,00	1,00
BPP3139	<i>BPP3139</i>	Transposase	5,5E+07	21,8	4,5E+07	32,8	0,8	0,32	0,53
BPP3135	<i>ompA</i>	Outer membrane protein A	2,3E+09	16,0	2,7E+09	18,4	1,2	0,30	0,51
BPP3134	<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A	1,0E+08	26,4	9,5E+07	4,5	0,9	0,69	0,83
BPP3133	<i>serC</i>	Phosphoserine aminotransferase	3,9E+07	39,4	5,3E+07	15,0	1,4	0,14	0,33
BPP3132	<i>pheA</i>	p-protein [includes: chorismate mutase and prephenate dehydratase]	6,0E+07	25,4	6,2E+07	6,9	1,0	0,86	0,93
BPP3131	<i>tyrA</i>	Prephenate dehydrogenase	1,6E+07	12,3	7,2E+07	170,2	4,5	0,40	0,60
BPP3130	<i>aroA</i>	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	3,5E+07	13,8	2,9E+07	8,1	0,8	0,08	0,23
BPP3129	<i>cmk</i>	Cytidylate kinase	1,2E+07	53,9	7,4E+06	18,1	0,6	0,19	0,39
BPP3128	<i>rpsA</i>	30S ribosomal protein S1	2,6E+08	11,1	2,0E+08	7,8	0,8	0,02	0,09
BPP3127	<i>ihfB</i>	Integration host factor subunit beta	1,5E+07	16,6	1,5E+07	21,5	1,0	0,79	0,88
BPP3126	<i>BPP3126</i>	Putative membrane protein	2,7E+07	12,4	2,8E+07	21,1	1,1	0,63	0,79
BPP3125	<i>lapB</i>	Lipopolysaccharide assembly protein B	1,7E+07	9,7	1,7E+07	11,9	1,0	0,76	0,86
BPP3124	<i>rfaE</i>	ADP-heptose synthase	3,0E+07	63,5	4,7E+07	19,2	1,6	0,16	0,36
BPP3123	<i>hldD</i>	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase	7,6E+07	5,9	6,8E+07	6,3	0,9	0,04	0,16

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP3120	<i>cysM</i>	Cysteine synthase	2,9E+08	16,0	2,7E+08	12,1	0,9	0,50	0,68
BPP3117	<i>etfB</i>	Electron transfer flavoprotein beta-subunit	4,1E+08	7,6	5,4E+08	8,7	1,3	0,00	0,05
BPP3116	<i>etfA</i>	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	4,4E+08	10,0	6,1E+08	9,1	1,4	0,00	0,04
BPP3115	<i>BPP3115</i>	Probable acyl-CoA dehydrogenase	2,4E+07	10,7	1,9E+07	12,6	0,8	0,05	0,17
BPP3114	<i>BPP3114</i>	Antioxidant protein	9,8E+09	22,3	9,8E+09	5,9	1,0	0,97	0,99
BPP3113	<i>BPP3113</i>	Transposase	5,5E+07	21,8	4,5E+07	32,8	0,8	0,32	0,53
BPP3103	<i>BPP3103</i>	Uncharacterized protein	1,6E+08	109,0	2,7E+08	63,4	1,6	0,44	0,64
BPP3101	<i>BPP3101</i>	Uncharacterized protein	3,4E+07	17,8	3,0E+07	50,3	0,9	0,61	0,77
BPP3100	<i>BPP3100</i>	Putative exported protein	1,8E+07	30,6	3,9E+06	36,4	0,2	0,00	0,03
BPP3097	<i>BPP3097</i>	Putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	9,3E+06	14,7	1,1E+07	22,4	1,1	0,38	0,59
BPP3088	<i>BPP3088</i>	Putative exported protein	1,8E+07	16,4	1,8E+07	42,5	1,0	0,99	0,99
BPP3085	<i>BPP3085</i>	Possible exonuclease	3,2E+06	16,7	5,0E+06	10,4	1,5	0,00	0,04
BPP3075	<i>BPP3075</i>	Uncharacterized protein	1,8E+07	10,6	2,0E+07	10,3	1,1	0,27	0,48
BPP3073	<i>ldcA</i>	Muramoyltetrapeptide carboxypeptidase	1,9E+07	38,3	2,6E+07	37,3	1,3	0,32	0,53
BPP3072	<i>BPP3072</i>	Probable enoyl-CoA hydratase/isomerase	1,6E+08	25,3	1,6E+08	11,3	1,0	0,90	0,94
BPP3068	<i>BPP3068</i>	Probable ATP-binding ABC transporter protein	1,8E+08	10,1	1,5E+08	3,8	0,8	0,01	0,07
BPP3067	<i>BPP3067</i>	Putative ABC-transport protein, ATP-binding component	9,7E+07	9,7	3,9E+07	49,5	0,4	0,00	0,02
BPP3065	<i>BPP3065</i>	Putative permease of ABC transporter	9,0E+07	6,2	6,0E+07	66,4	0,7	0,18	0,37
BPP3062	<i>trxC</i>	Thioredoxin 2	9,4E+07	15,0	1,0E+08	13,9	1,1	0,38	0,59

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP3061	<i>BPP3061</i>	Uncharacterized protein	5,1E+07	12,5	6,0E+07	27,0	1,2	0,35	0,56
BPP3058	<i>plsY</i>	Glycerol-3-phosphate acyltransferase	5,1E+07	21,1	6,1E+07	5,9	1,2	0,15	0,34
BPP3057	<i>surE</i>	5'-nucleotidase SurE	3,3E+07	9,8	3,2E+07	53,9	1,0	0,93	0,96
BPP3056	<i>pcm</i>	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	2,5E+07	31,6	2,7E+07	4,6	1,0	0,77	0,87
BPP3055	<i>BPP3055</i>	Putative peptidase	2,0E+08	46,1	2,8E+08	28,2	1,4	0,20	0,41
BPP3054	<i>BPP3054</i>	Uncharacterized protein	5,6E+07	20,2	5,9E+07	10,6	1,1	0,61	0,78
BPP3053	<i>BPP3053</i>	Putative exported protein	2,2E+05	13,8	1,2E+07	9,3	55,9	0,00	0,00
BPP3049	<i>BPP3049</i>	Putative exported protein	5,1E+07	27,4	4,2E+07	31,5	0,8	0,40	0,60
BPP3044	<i>ppiD</i>	Peptidylprolyl isomerase	1,5E+08	15,3	1,6E+08	5,4	1,1	0,55	0,72
BPP3043	<i>tesA</i>	Acyl-CoA thioesterase I	9,1E+06	27,2	6,4E+06	19,0	0,7	0,10	0,27
BPP3042	<i>BPP3042</i>	Probable ATP-binding ABC transporter protein	3,7E+07	27,7	6,3E+07	43,8	1,7	0,13	0,31
BPP3030	<i>bvgR</i>	Regulatory protein BvgR	2,1E+08	4,5	2,2E+08	6,9	1,1	0,26	0,47
BPP3027	<i>phaB</i>	Filamentous hemagglutinin/adhesin	3,4E+08	10,9	4,5E+08	17,3	1,3	0,04	0,16
BPP3025	<i>fimB</i>	Chaperone protein	1,6E+08	17,1	1,1E+08	14,6	0,7	0,03	0,14
BPP3024	<i>fimC</i>	Outer membrane usher protein	2,9E+07	50,4	2,9E+07	53,6	1,0	0,99	1,00
BPP3023	<i>fimD</i>	Fimbrial adhesin	1,3E+07	25,4	9,6E+06	28,4	0,7	0,22	0,43
BPP3022	<i>phaC</i>	Hemolysin activator-like protein	9,5E+07	37,4	4,8E+07	47,3	0,5	0,07	0,21
BPP3019	<i>BPP3019</i>	Putative exported protein	2,1E+07	62,4	2,7E+07	32,9	1,3	0,51	0,69
BPP3010	<i>glnH</i>	Glutamine-binding periplasmic protein	2,4E+08	27,4	6,3E+08	33,2	2,6	0,01	0,08
BPP3009	<i>glnP</i>	Glutamine transport system permease protein	4,5E+07	22,9	4,2E+07	9,4	0,9	0,53	0,71

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP3008	<i>glnQ</i>	Glutamine transport ATP-binding protein	1,2E+08	31,2	9,3E+07	14,1	0,8	0,28	0,49
BPP3006	<i>rpoZ</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit omega	1,3E+08	6,8	1,2E+08	11,9	0,9	0,34	0,55
BPP3005	<i>gmk</i>	Guanylate kinase	4,6E+07	20,3	5,4E+07	33,0	1,2	0,49	0,68
BPP3002	<i>BPP3002</i>	Putative oxidoreductase	4,6E+07	19,9	4,4E+07	14,2	1,0	0,72	0,84
BPP3000	<i>amn</i>	AMP nucleosidase	1,1E+07	12,4	1,4E+07	8,7	1,3	0,01	0,08
BPP2995	<i>rph</i>	Ribonuclease PH	5,3E+07	27,7	5,1E+07	19,0	1,0	0,83	0,91
BPP2988	<i>glnA</i>	Glutamine synthetase	4,7E+07	37,9	5,7E+07	7,1	1,2	0,31	0,53
BPP2987	<i>glnL</i>	Nitrogen regulation protein NR(II)	na	na	7,9E+06	22,4	ON	na	na
BPP2986	<i>glnG</i>	Nitrogen regulation protein NR(I)	4,0E+06	20,6	4,0E+06	8,5	1,0	0,87	0,93
BPP2982	<i>BPP2982</i>	Probable ATP-binding component of ABC transporter	1,2E+07	36,6	8,6E+07	11,8	7,4	0,00	0,00
BPP2980	<i>BPP2980</i>	Putative iron binding protein	9,4E+07	9,4	9,8E+08	8,9	10,5	0,00	0,00
BPP2979	<i>fpr</i>	Ferredoxin--NADP reductase	5,5E+08	10,2	1,2E+09	8,3	2,2	0,00	0,00
BPP2976	<i>BPP2976</i>	Probable aldehyde reductase	2,9E+07	51,2	5,1E+07	16,2	1,7	0,04	0,16
BPP2974	<i>BPP2974</i>	Putative translational inhibitor	8,7E+07	8,3	1,1E+08	13,5	1,2	0,07	0,20
BPP2972	<i>BPP2972</i>	Probable LysR-family transcriptional regulator	3,1E+07	33,2	1,7E+07	15,2	0,5	0,04	0,15
BPP2969	<i>dps</i>	Putative DNA-binding protein	8,2E+08	21,9	9,0E+08	9,5	1,1	0,46	0,65
BPP2957	<i>wbpO</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein	1,3E+08	36,1	1,3E+08	10,3	1,0	1,00	1,00
BPP2956	<i>wbpP</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein	3,0E+07	11,8	3,4E+07	16,8	1,1	0,27	0,48
BPP2948	<i>livJ</i>	Leu/ile/val-binding protein	5,6E+08	13,0	6,6E+08	12,2	1,2	0,12	0,30

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP2944	<i>ugpB</i>	Glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein	1,6E+08	25,5	1,4E+08	9,8	0,9	0,56	0,73
BPP2943	<i>proC</i>	Pyrroline-5-carboxylate reductase	2,8E+07	29,4	3,1E+07	37,9	1,1	0,75	0,86
BPP2941	<i>livJ</i>	Leu/ile/val-binding protein	2,3E+07	13,3	2,0E+07	18,8	0,8	0,19	0,38
BPP2935	<i>gst</i>	Glutathione S-transferase	1,6E+07	14,6	2,0E+07	16,3	1,3	0,06	0,20
BPP2928	<i>BPP2928</i>	Uncharacterized protein	2,8E+07	9,5	3,4E+07	12,9	1,2	0,06	0,19
BPP2926	<i>BPP2926</i>	Putative exported protein	4,2E+06	17,7	6,6E+06	36,9	1,6	0,17	0,36
BPP2925	<i>lldD</i>	Putative L-lactate dehydrogenase	2,1E+07	55,0	2,6E+07	24,2	1,2	0,47	0,66
BPP2924	<i>psd</i>	Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme	1,1E+07	9,6	1,2E+07	16,8	1,1	0,58	0,75
BPP2922	<i>BPP2922</i>	Putative lipoprotein	3,6E+07	34,2	4,2E+07	9,4	1,2	0,40	0,61
BPP2920	<i>BPP2920</i>	Uncharacterized protein	1,2E+07	17,6	2,8E+07	34,1	2,3	0,02	0,10
BPP2918	<i>BPP2918</i>	Putative glutathione transferase	1,3E+08	15,0	1,8E+08	37,7	1,4	0,16	0,36
BPP2917	<i>BPP2917</i>	Glutathione peroxidase	9,9E+06	11,6	1,5E+07	13,6	1,6	0,00	0,04
BPP2914	<i>BPP2914</i>	Uncharacterized protein	1,1E+07	3,0	2,1E+07	5,4	1,9	0,00	0,01
BPP2912	<i>arsC</i>	Arsenate reductase	8,0E+07	7,7	1,0E+08	10,4	1,3	0,01	0,06
BPP2911	<i>BPP2911</i>	Putative bacterioferritin comigratory protein	3,6E+07	19,8	3,8E+07	25,9	1,1	0,72	0,84
BPP2905	<i>BPP2905</i>	Universal stress family protein	3,5E+07	22,8	4,1E+07	5,9	1,2	0,23	0,45
BPP2886	<i>BPP2886</i>	Transposase	5,5E+07	21,8	4,5E+07	32,8	0,8	0,32	0,53
BPP2870	<i>alaS</i>	Alanine--tRNA ligase	1,0E+08	11,5	7,6E+07	10,4	0,7	0,01	0,07
BPP2869	<i>BPP2869</i>	Uncharacterized protein	2,0E+07	16,1	1,1E+07	23,2	0,6	0,00	0,05
BPP2867	<i>rpsP</i>	30S ribosomal protein S16	2,5E+08	19,9	1,5E+08	7,6	0,6	0,01	0,06

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP2866	<i>rimM</i>	Ribosome maturation factor RimM	1,6E+07	26,5	1,1E+07	9,8	0,7	0,07	0,22
BPP2863	<i>BPP2863</i>	Uncharacterized protein	6,4E+07	5,0	6,9E+07	12,6	1,1	0,39	0,59
BPP2859	<i>valS</i>	Valine--tRNA ligase	9,1E+07	7,7	7,4E+07	7,4	0,8	0,01	0,06
BPP2858	<i>ndk</i>	Nucleoside diphosphate kinase	4,8E+08	19,0	4,9E+08	12,5	1,0	0,88	0,94
BPP2854	<i>hisS</i>	Histidine--tRNA ligase	2,8E+07	5,4	2,1E+07	23,0	0,7	0,03	0,12
BPP2853	<i>BPP2853</i>	Putative membrane protein	8,2E+07	7,0	9,3E+07	10,2	1,1	0,11	0,28
BPP2852	<i>bamB</i>	Outer membrane protein assembly factor BamB	1,6E+08	15,5	2,4E+08	30,2	1,5	0,09	0,24
BPP2851	<i>der</i>	GTPase Der	1,4E+08	5,3	1,4E+08	14,6	1,0	1,00	1,00
BPP2850	<i>hisC1</i>	Histidinol-phosphate aminotransferase 1	7,4E+07	18,4	8,8E+07	16,0	1,2	0,22	0,43
BPP2849	<i>hfq</i>	RNA-binding protein Hfq	1,3E+08	18,3	1,7E+08	14,1	1,3	0,05	0,17
BPP2848	<i>hflX</i>	GTPase HflX	6,5E+06	17,8	6,2E+06	26,4	1,0	0,83	0,91
BPP2847	<i>hflK</i>	Putative membrane protein	2,5E+08	11,9	2,8E+08	5,1	1,1	0,14	0,33
BPP2846	<i>hflC</i>	Protein HflC	1,7E+08	20,1	1,8E+08	8,2	1,0	0,82	0,90
BPP2845	<i>hisZ</i>	ATP phosphoribosyltransferase regulatory subunit	3,5E+07	43,6	2,6E+07	8,9	0,8	0,30	0,52
BPP2844	<i>purA</i>	Adenylosuccinate synthetase	1,8E+08	10,8	1,1E+08	8,8	0,6	0,00	0,02
BPP2842	<i>rpsU</i>	30S ribosomal protein S21	1,0E+08	17,9	7,5E+07	4,7	0,7	0,02	0,11
BPP2840	<i>rpoD</i>	RNA polymerase sigma factor RpoD	1,8E+08	14,7	1,9E+08	9,1	1,0	0,71	0,84
BPP2833	<i>BPP2833</i>	Putative TetR-family transcriptional regulator	2,8E+07	41,8	2,5E+07	31,6	0,9	0,65	0,80
BPP2783	<i>BPP2783</i>	Carboxymethylenebutenolidase	5,5E+07	8,1	5,5E+07	4,1	1,0	0,76	0,86
BPP2740	<i>BPP2740</i>	Putative exported protein	6,7E+06	20,2	4,9E+06	12,4	0,7	0,08	0,23

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP2737	<i>BPP2737</i>	Putative transcriptional regulatory protein	7,2E+06	21,8	1,2E+07	18,7	1,7	0,01	0,07
BPP2719	<i>BPP2719</i>	Putative exported protein	7,3E+07	26,2	5,6E+07	18,0	0,8	0,17	0,37
BPP2704	<i>BPP2704</i>	Putative membrane protein	1,4E+07	22,3	1,6E+07	21,3	1,1	0,41	0,61
BPP2690	<i>BPP2690</i>	Uncharacterized protein	2,1E+07	22,2	3,0E+07	9,9	1,5	0,02	0,10
BPP2647	<i>BPP2647</i>	Uncharacterized protein	1,0E+08	13,2	7,5E+07	15,3	0,7	0,02	0,11
BPP2646	<i>ppa</i>	Inorganic pyrophosphatase	1,7E+08	19,9	2,0E+08	1,4	1,2	0,11	0,28
BPP2645	<i>BPP2645</i>	Putative exported protein	8,4E+07	46,4	9,5E+07	7,7	1,1	0,58	0,75
BPP2644	<i>BPP2644</i>	Putative exported protein	8,1E+07	13,7	8,8E+07	9,0	1,1	0,30	0,52
BPP2642	<i>hemC</i>	Porphobilinogen deaminase	4,0E+07	7,8	3,4E+07	12,4	0,9	0,07	0,22
BPP2639	<i>sucD</i>	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha	1,9E+08	24,9	2,4E+08	21,6	1,2	0,23	0,45
BPP2638	<i>sucC</i>	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	5,1E+08	7,6	4,9E+08	4,5	1,0	0,54	0,71
BPP2636	<i>metE</i>	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	1,9E+08	36,5	2,1E+08	13,4	1,1	0,66	0,81
BPP2630	<i>BPP2630</i>	Putative sugar transport protein	1,3E+07	31,0	7,7E+06	12,4	0,6	0,05	0,17
BPP2618	<i>rdgC</i>	Recombination-associated protein RdgC	2,9E+07	19,9	2,6E+07	11,9	0,9	0,32	0,53
BPP2617	<i>pyrB</i>	Aspartate transcarbamoylase	2,8E+07	78,3	2,1E+07	26,3	0,7	0,56	0,73
BPP2615	<i>BPP2615</i>	Putative lipoprotein	4,2E+08	9,3	3,7E+08	10,5	0,9	0,11	0,28
BPP2602	<i>BPP2602</i>	Putative lipoprotein	1,5E+07	28,1	6,3E+06	60,1	0,4	0,06	0,19
BPP2601	<i>BPP2601</i>	Putative MerR-family transcriptional regulator	4,2E+07	10,8	4,2E+07	19,7	1,0	0,97	0,99
BPP2600	<i>ihfA</i>	Integration host factor subunit alpha	1,3E+07	17,1	1,1E+07	11,2	0,9	0,23	0,44

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP2599	<i>pheT</i>	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	3,4E+07	2,9	2,6E+07	7,6	0,8	0,00	0,01
BPP2598	<i>pheS</i>	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	9,3E+07	12,5	6,3E+07	46,2	0,7	0,10	0,27
BPP2596	<i>rpmI</i>	50S ribosomal protein L35	1,2E+07	32,5	7,3E+06	16,8	0,6	0,07	0,21
BPP2594	<i>BPP2594</i>	Uncharacterized protein	7,2E+07	4,3	7,1E+07	28,6	1,0	0,87	0,93
BPP2584	<i>BPP2584</i>	Putative ABC transport protein, ATP-binding component	3,4E+07	12,5	3,0E+07	10,1	0,9	0,21	0,42
BPP2583	<i>BPP2583</i>	Putative ABC transport protein, ATP-binding component	3,6E+07	72,4	1,6E+07	31,2	0,5	0,19	0,39
BPP2582	<i>BPP2582</i>	Putative ABC transport protein, ATP-binding component	2,8E+07	47,0	2,8E+07	29,2	1,0	0,98	0,99
BPP2581	<i>BPP2581</i>	Putative ABC transport protein, inner membrane component	1,6E+07	34,2	1,8E+07	49,4	1,1	0,78	0,88
BPP2580	<i>BPP2580</i>	Putative ABC transport solute-binding protein	1,4E+09	9,0	1,2E+09	16,8	0,8	0,05	0,17
BPP2579	<i>putA</i>	Bifunctional protein PutA	6,9E+07	12,9	8,2E+07	99,7	1,2	0,75	0,86
BPP2578	<i>BPP2578</i>	Lipoprotein	2,0E+07	75,3	2,0E+07	32,5	1,0	0,98	0,99
BPP2577	<i>BPP2577</i>	Putative membrane protein	2,5E+07	30,6	2,9E+07	21,9	1,2	0,43	0,63
BPP2575	<i>clpA</i>	ATP-dependent clp protease ATP-binding	7,6E+06	6,4	7,9E+06	42,2	1,0	0,84	0,91
BPP2573	<i>BPP2573</i>	Putative exported protein	3,9E+07	21,8	3,4E+07	11,7	0,9	0,33	0,54
BPP2571	<i>BPP2571</i>	Putative cold-shock protein	2,8E+08	15,2	2,9E+08	3,9	1,0	0,69	0,83
BPP2570	<i>BPP2570</i>	Exported protein	7,1E+06	49,5	na	na	OFF	na	na
BPP2569	<i>BPP2569</i>	Putative thiolase	7,9E+07	11,9	1,1E+08	62,9	1,4	0,42	0,62
BPP2567	<i>sodB</i>	Superoxide dismutase	1,2E+09	13,4	4,1E+08	8,0	0,3	0,00	0,00
BPP2565	<i>BPP2565</i>	Putative biopolymer transport protein	8,2E+07	20,2	7,6E+07	13,8	0,9	0,56	0,73

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP2564	<i>BPP2564</i>	Putative biopolymer transport protein	3,8E+07	53,3	3,0E+07	39,6	0,8	0,54	0,71
BPP2563	<i>lpxK</i>	Tetraacyldisaccharide 4'-kinase	2,6E+07	12,4	2,1E+07	8,1	0,8	0,03	0,13
BPP2560	<i>adk</i>	Adenylate kinase	1,1E+08	23,9	1,3E+08	8,2	1,1	0,38	0,58
BPP2559	<i>BPP2559</i>	Probable short-chain dehydrogenase	1,9E+08	13,6	2,8E+08	10,1	1,5	0,00	0,04
BPP2556	<i>rpsT</i>	30S ribosomal protein S20	6,2E+07	48,8	2,9E+07	29,6	0,5	0,08	0,23
BPP2547	<i>BPP2547</i>	Putative D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase	1,1E+08	17,6	1,1E+08	15,0	1,0	0,89	0,94
BPP2543	<i>argD1</i>	Acetylornithine aminotransferase 1	2,2E+07	33,6	3,8E+07	7,7	1,7	0,01	0,06
BPP2542	<i>argF</i>	Ornithine carbamoyltransferase	5,2E+07	11,4	4,9E+07	12,7	0,9	0,42	0,62
BPP2541	<i>argG</i>	Argininosuccinate synthase	1,6E+08	3,6	1,5E+08	7,3	0,9	0,11	0,28
BPP2538	<i>basR</i>	Response regulator protein	1,2E+08	15,9	1,5E+08	10,0	1,3	0,05	0,17
BPP2537	<i>exbD</i>	Biopolymer transport protein ExbD/TolR	na	na	7,2E+07	11,4	ON	na	na
BPP2536	<i>exbB</i>	MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein	na	na	1,1E+08	17,5	ON	na	na
BPP2534	<i>hupB</i>	DNA-binding protein Hu-beta	9,4E+08	14,0	9,6E+08	17,5	1,0	0,83	0,91
BPP2532	<i>BPP2532</i>	Cys/Met metabolism PLP-dependent enzyme	3,5E+07	12,4	3,0E+07	12,1	0,9	0,13	0,32
BPP2531	<i>rlmB</i>	23S rRNA (guanosine-2'-O-)-methyltransferase RlmB	3,1E+07	17,7	3,4E+07	7,7	1,1	0,25	0,47
BPP2530	<i>rnr</i>	Ribonuclease R	6,5E+07	8,9	6,6E+07	14,2	1,0	0,96	0,98
BPP2522	<i>BPP2522</i>	Uncharacterized protein	6,2E+06	15,9	na	na	OFF	na	na
BPP2512	<i>BPP2512</i>	Putative exported protein	na	na	9,9E+06	7,6	ON	na	na
BPP2507	<i>BPP2507</i>	Putative c'cytochrome	1,6E+08	25,4	2,0E+07	19,3	0,1	0,00	0,01

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP2506	<i>purB</i>	Adenylosuccinate lyase	8,1E+07	6,2	7,7E+07	12,0	1,0	0,48	0,66
BPP2505	<i>BPP2505</i>	Uncharacterized protein	1,5E+08	8,2	1,6E+08	7,9	1,1	0,34	0,55
BPP2501	<i>BPP2501</i>	Putative exported protein	5,4E+06	31,4	1,4E+07	30,4	2,6	0,01	0,07
BPP2500	<i>BPP2500</i>	Putative hydrolase	2,3E+07	25,9	3,1E+07	15,2	1,3	0,08	0,23
BPP2499	<i>pntaA</i>	NAD(P) transhydrogenase, subunit alpha part 1	6,8E+07	4,4	6,1E+07	4,9	0,9	0,02	0,10
BPP2497	<i>pntB</i>	NAD(P) transhydrogenase subunit beta	3,1E+07	41,4	2,0E+07	20,9	0,6	0,15	0,34
BPP2489	<i>fhaL</i>	Adhesin	6,4E+06	23,9	4,8E+06	41,1	0,8	0,26	0,47
BPP2488	<i>aroG</i>	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	9,6E+07	10,9	9,9E+07	11,8	1,0	0,70	0,83
BPP2487	<i>BPP2487</i>	Uncharacterized protein	4,4E+07	12,4	4,9E+07	15,3	1,1	0,34	0,55
BPP2486	<i>BPP2486</i>	Putative hydrolase	3,0E+07	7,8	2,2E+07	22,1	0,7	0,03	0,13
BPP2485	<i>bph3</i>	Putative DNA-binding protein (Histone)	7,4E+08	4,7	8,2E+08	6,1	1,1	0,05	0,17
BPP2484	<i>BPP2484</i>	Putative exported protein	7,4E+07	6,2	1,0E+08	12,6	1,4	0,01	0,06
BPP2483	<i>pepN</i>	Aminopeptidase N	9,8E+06	21,7	9,7E+06	17,4	1,0	0,97	0,98
BPP2482	<i>fbp</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase class 1	6,2E+07	5,0	6,7E+07	27,6	1,1	0,64	0,79
BPP2480	<i>thrC</i>	Threonine synthase	8,7E+07	16,7	8,2E+07	3,5	0,9	0,52	0,70
BPP2479	<i>BPP2479</i>	Homoserine dehydrogenase	1,2E+08	8,8	1,1E+08	7,8	0,9	0,30	0,52
BPP2478	<i>BPP2478</i>	Putative aminotransferase	8,3E+07	6,8	6,9E+07	16,5	0,8	0,07	0,21
BPP2477	<i>BPP2477</i>	Uncharacterized protein	1,4E+07	13,0	1,0E+07	68,3	0,7	0,43	0,63
BPP2476	<i>BPP2476</i>	Uncharacterized protein	5,0E+06	83,9	4,0E+06	72,6	0,8	0,70	0,83
BPP2475	<i>BPP2475</i>	Uncharacterized protein	5,3E+07	6,8	5,0E+07	7,7	0,9	0,28	0,50
BPP2470	<i>BPP2470</i>	Transposase	5,5E+07	21,8	4,5E+07	32,8	0,8	0,32	0,53

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP2469	<i>rplI</i>	50S ribosomal protein L9	1,9E+08	34,8	1,7E+08	35,1	0,9	0,62	0,78
BPP2468	<i>rpsR</i>	30S ribosomal protein S18	1,0E+08	28,0	4,9E+07	20,9	0,5	0,01	0,07
BPP2466	<i>rpsF</i>	30S ribosomal protein S6	1,3E+08	9,3	7,6E+07	6,0	0,6	0,00	0,01
BPP2465	<i>folE2</i>	GTP cyclohydrolase FolE2	3,0E+07	16,9	4,0E+07	18,8	1,3	0,08	0,23
BPP2464	<i>dxs</i>	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	2,9E+07	14,7	2,5E+07	16,7	0,9	0,30	0,52
BPP2463	<i>BPP2463</i>	Probable geranyltranstransferase	1,6E+07	11,3	1,4E+07	16,3	0,9	0,34	0,55
BPP2462	<i>xseB</i>	Exodeoxyribonuclease 7 small subunit	1,4E+06	39,6	6,7E+05	24,4	0,5	0,10	0,27
BPP2460	<i>BPP2460</i>	Putative exported protein	5,3E+07	15,2	5,0E+07	29,3	0,9	0,69	0,83
BPP2458	<i>BPP2458</i>	Putative iron-sulfur protein	8,8E+06	30,5	7,7E+06	8,3	0,9	0,43	0,63
BPP2451	<i>BPP2451</i>	Putative ABC transport ATP-binding subunit	3,2E+07	17,3	2,3E+07	31,1	0,7	0,10	0,27
BPP2448	<i>BPP2448</i>	Putative sulfurtransferase	1,7E+07	38,9	2,7E+07	45,0	1,6	0,21	0,42
BPP2446	<i>htpX</i>	Protease HtpX homolog	6,2E+07	6,2	2,7E+07	37,1	0,4	0,00	0,01
BPP2445	<i>gor</i>	Quinone oxidoreductase	1,7E+08	3,8	2,1E+08	32,0	1,2	0,27	0,48
BPP2437	<i>BPP2437</i>	Tartrate dehydrogenase	4,4E+07	14,9	3,5E+07	4,4	0,8	0,03	0,14
BPP2425	<i>BPP2425</i>	Putative 2-hydroxyacid dehydrogenase	5,0E+07	12,2	5,9E+07	6,9	1,2	0,04	0,16
BPP2424	<i>BPP2424</i>	Putative aminotransferase	4,8E+07	11,9	5,2E+07	7,3	1,1	0,29	0,50
BPP2422	<i>BPP2422</i>	Probable transcriptional regulatory protein BPP2422	2,0E+08	17,5	1,2E+08	10,4	0,6	0,00	0,04
BPP2421	<i>purD</i>	Phosphoribosylamine--glycine ligase	6,3E+07	9,8	5,9E+07	6,7	0,9	0,33	0,54
BPP2420	<i>hemF</i>	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase	3,1E+07	31,8	3,9E+07	31,6	1,2	0,38	0,58
BPP2418	<i>rsfS</i>	Ribosomal silencing factor RsfS	2,1E+07	17,6	1,2E+07	26,6	0,6	0,02	0,10

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP2404	<i>BPP2404</i>	Uncharacterized protein	7,7E+06	24,0	1,3E+07	11,5	1,7	0,00	0,04
BPP2400	<i>acnB</i>	Aconitate hydratase B	5,4E+07	5,7	1,8E+07	18,7	0,3	0,00	0,00
BPP2396	<i>brfB</i>	Putative ferric siderophore receptor	na	na	1,6E+08	21,4	ON	na	na
BPP2394	<i>acnA</i>	Aconitate hydratase	3,0E+08	11,4	4,1E+07	19,8	0,1	0,00	0,00
BPP2392	<i>BPP2392</i>	Uncharacterized protein	8,4E+07	15,6	5,2E+07	21,4	0,6	0,01	0,07
BPP2390	<i>efp</i>	Elongation factor P	1,2E+08	10,6	1,1E+08	17,9	0,9	0,23	0,43
BPP2363	<i>BPP2363</i>	Putative extracellular solute-binding protein	9,5E+06	44,3	1,3E+07	36,7	1,3	0,37	0,58
BPP2358	<i>BPP2358</i>	Probable GntR-family transcriptional regulator	6,8E+06	16,9	5,9E+06	20,6	0,9	0,38	0,59
BPP2357	<i>goaG</i>	4-aminobutyrate aminotransferase	1,3E+07	21,4	1,3E+07	9,3	1,1	0,62	0,78
BPP2356	<i>gabD</i>	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+]	1,8E+08	23,3	1,4E+08	8,0	0,8	0,12	0,30
BPP2351	<i>srpH</i>	Serine acetyltransferase	1,6E+07	93,5	4,5E+06	26,4	0,3	0,26	0,47
BPP2344	<i>BPP2344</i>	Putative thiolase	2,7E+07	20,5	1,6E+07	44,6	0,6	0,06	0,20
BPP2321	<i>BPP2321</i>	Branched-chain amino acid-binding protein	4,5E+07	5,7	4,1E+07	9,5	0,9	0,15	0,34
BPP2320	<i>BPP2320</i>	MarR-family transcriptional regulator	1,3E+07	15,3	1,4E+07	7,1	1,0	0,66	0,81
BPP2314	<i>nemA</i>	N-ethylmaleimide reductase	6,1E+07	13,2	3,8E+07	15,1	0,6	0,00	0,04
BPP2297	<i>BPP2297</i>	Probable TetR-family transcriptional regulator	6,2E+06	9,1	4,9E+06	33,7	0,8	0,29	0,51
BPP2287	<i>ask</i>	Aspartokinase	1,6E+08	8,3	1,4E+08	10,4	0,9	0,07	0,22
BPP2285	<i>accA</i>	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha	6,9E+07	12,8	7,1E+07	8,7	1,0	0,69	0,83

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP2284	<i>BPP2284</i>	DNA-3-methyladenine glycosylase	1,4E+07	17,0	1,2E+07	41,5	0,9	0,64	0,80
BPP2283	<i>cysS</i>	Cysteine--tRNA ligase	7,0E+07	16,7	6,4E+07	11,6	0,9	0,48	0,66
BPP2282	<i>BPP2282</i>	Putative exported protein	1,1E+07	70,4	1,3E+07	63,7	1,2	0,79	0,88
BPP2281	<i>ppiB</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	3,8E+08	7,0	4,8E+08	17,2	1,3	0,06	0,20
BPP2278	<i>BPP2278</i>	Putative membrane protein	3,8E+07	10,9	3,7E+07	10,8	1,0	0,77	0,87
BPP2277	<i>suhB</i>	Inositol-1-monophosphatase	2,9E+07	23,0	5,0E+07	4,5	1,7	0,00	0,02
BPP2275	<i>BPP2275</i>	Putative exported protein	3,4E+07	10,5	na	na	OFF	na	na
BPP2273	<i>BPP2273</i>	Putative membrane protein	5,7E+07	11,6	9,4E+07	44,8	1,6	0,13	0,32
BPP2267	<i>BPP2267</i>	Putative chromate reductase	1,6E+08	17,3	1,9E+08	66,8	1,2	0,68	0,82
BPP2266	<i>BPP2266</i>	Uncharacterized protein	4,2E+07	30,8	5,4E+07	44,1	1,3	0,42	0,62
BPP2265	<i>mutS</i>	DNA mismatch repair protein MutS	1,5E+07	7,3	1,5E+07	6,0	1,0	0,96	0,98
BPP2264	<i>BPP2264</i>	Uncharacterized protein	8,3E+06	62,7	1,0E+07	80,3	1,2	0,72	0,84
BPP2261	<i>BPP2261</i>	Putative lipoprotein	4,5E+08	14,6	5,1E+08	8,4	1,1	0,18	0,38
BPP2260	<i>dapA</i>	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	4,6E+08	3,7	2,7E+08	6,0	0,6	0,00	0,00
BPP2259	<i>BPP2259</i>	Uncharacterized protein	1,2E+07	26,8	1,5E+07	4,3	1,2	0,27	0,49
BPP2258	<i>BPP2258</i>	Uncharacterized protein	1,7E+07	27,3	2,6E+07	44,6	1,6	0,24	0,45
BPP2257	<i>BPP2257</i>	Putative membrane protein	2,8E+07	25,9	2,5E+07	10,9	0,9	0,39	0,59
BPP2240	<i>bscC</i>	Putative type III secretion protein	7,3E+06	22,2	4,9E+06	29,3	0,7	0,07	0,21
BPP2238	<i>bscU</i>	Putative type III secretion protein	1,6E+07	19,0	1,5E+07	15,6	1,0	0,89	0,94
BPP2203	<i>BPP2203</i>	Putative GntR-family transcriptional regulator	1,2E+07	11,2	1,3E+07	9,8	1,1	0,12	0,30
BPP2202	<i>BPP2202</i>	Putative exported protein	3,8E+07	10,4	4,7E+07	29,4	1,3	0,24	0,45
BPP2201	<i>BPP2201</i>	Putative glutamyltransferase	5,7E+07	17,6	8,0E+07	5,9	1,4	0,01	0,05

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP2176	<i>BPP2176</i>	Putative acyl-CoA carboxylase	1,4E+07	23,9	1,0E+07	22,3	0,7	0,12	0,30
BPP2172	<i>BPP2172</i>	Uncharacterized protein	3,5E+07	13,6	1,5E+07	17,9	0,4	0,00	0,01
BPP2169	<i>BPP2169</i>	Biotin carboxyl carrier protein	2,9E+07	22,8	3,1E+07	22,6	1,1	0,65	0,80
BPP2168	<i>BPP2168</i>	Uncharacterized protein	3,1E+07	21,7	3,0E+07	21,2	1,0	0,90	0,94
BPP2166	<i>BPP2166</i>	Probable aldehyde dehydrogenase	2,2E+07	17,1	2,3E+07	16,8	1,1	0,59	0,75
BPP2160	<i>tpm</i>	Thiopurine S-methyltransferase	1,3E+07	26,4	1,5E+07	7,2	1,1	0,45	0,64
BPP2129	<i>BPP2129</i>	Putative ABC transport system, ATP-binding protein	5,0E+07	15,1	4,4E+07	6,1	0,9	0,17	0,37
BPP2114	<i>BPP2114</i>	Putative GntR-family transcriptional regulator	2,9E+07	33,2	3,5E+07	3,8	1,2	0,31	0,52
BPP2082	<i>BPP2082</i>	Carbonic anhydrase	5,0E+08	13,1	3,3E+08	6,6	0,7	0,00	0,04
BPP2077	<i>BPP2077</i>	Uncharacterized protein	5,5E+06	4,3	7,7E+06	16,7	1,4	0,04	0,15
BPP2072	<i>ppk</i>	Polyphosphate kinase	2,2E+07	14,6	1,7E+07	29,1	0,8	0,15	0,34
BPP2071	<i>ppx</i>	Exopolyphosphatase	2,2E+07	10,1	2,6E+07	3,4	1,1	0,04	0,15
BPP2069	<i>glmM</i>	Phosphoglucosamine mutase	1,3E+08	7,5	1,4E+08	8,5	1,0	0,47	0,66
BPP2068	<i>folP</i>	Dihydropteroate synthase	3,6E+07	15,0	3,7E+07	5,7	1,0	0,78	0,87
BPP2067	<i>ftsH</i>	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	6,2E+07	8,4	5,4E+07	4,1	0,9	0,03	0,13
BPP2066	<i>rlmE</i>	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase E	6,5E+07	14,7	4,6E+07	11,6	0,7	0,01	0,08
BPP2063	<i>greA</i>	Transcription elongation factor GreA	2,6E+08	35,0	1,5E+08	12,0	0,6	0,06	0,19
BPP2054	<i>BPP2054</i>	Transposase	5,5E+07	21,8	4,5E+07	32,8	0,8	0,32	0,53
BPP2050	<i>lolC</i>	Lipoprotein releasing system transmembrane protein	8,5E+06	15,9	7,7E+06	47,3	0,9	0,69	0,83

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP2049	<i>BPP2049</i>	Putative exported protein	8,9E+06	30,0	6,4E+06	92,2	0,7	0,47	0,65
BPP2047	<i>prfB</i>	Peptide chain release factor 2	2,0E+07	4,1	1,8E+07	11,5	0,9	0,11	0,28
BPP2046	<i>BPP2046</i>	Probable short chain dehydrogenase	5,3E+07	6,2	4,8E+07	12,1	0,9	0,20	0,40
BPP2045	<i>lysS</i>	Lysine--tRNA ligase	4,9E+07	24,5	3,7E+07	30,5	0,8	0,21	0,42
BPP2036	<i>paaG</i>	Probable enoyl-CoA hydratase	1,8E+07	33,5	1,3E+07	53,5	0,7	0,34	0,55
BPP2034	<i>BPP2034</i>	Uncharacterized protein	1,1E+08	23,3	6,0E+07	33,2	0,5	0,02	0,11
BPP2032	<i>hscA</i>	Chaperone protein HscA homolog	1,0E+08	11,2	5,6E+07	13,8	0,6	0,00	0,01
BPP2031	<i>hscB</i>	Co-chaperone protein HscB homolog	6,1E+07	60,6	8,3E+07	35,1	1,3	0,40	0,60
BPP2029	<i>iscU</i>	Iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU	1,5E+08	15,3	8,6E+07	31,3	0,6	0,01	0,07
BPP2028	<i>iscS</i>	Cysteine desulfurase IscS	3,5E+08	25,5	3,8E+08	10,8	1,1	0,58	0,75
BPP2027	<i>BPP2027</i>	Putative DNA-binding protein	4,6E+07	9,1	4,6E+07	29,8	1,0	1,00	1,00
BPP2026	<i>ptpA</i>	Low molecular weight protein-tyrosine-phosphatase	2,5E+06	29,2	1,4E+07	49,0	5,5	0,02	0,09
BPP2025	<i>uvrB</i>	UvrABC system protein B	3,6E+07	37,6	3,7E+07	26,1	1,0	0,87	0,93
BPP2024	<i>tyrB</i>	Aromatic-amino-acid aminotransferase	2,3E+08	10,5	3,6E+08	5,7	1,5	0,00	0,01
BPP2007	<i>clpX</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	3,8E+07	24,2	1,5E+07	22,7	0,4	0,00	0,04
BPP2006	<i>clpP</i>	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	4,6E+08	15,8	5,1E+08	4,6	1,1	0,29	0,50
BPP2005	<i>tig</i>	Trigger factor	2,3E+08	9,9	2,0E+08	11,1	0,9	0,08	0,23
BPP2003	<i>cspA</i>	Cold shock-like protein	3,7E+08	22,6	5,5E+08	10,3	1,5	0,01	0,09
BPP2000	<i>BPP2000</i>	Uncharacterized protein	3,9E+07	30,8	3,1E+07	13,2	0,8	0,32	0,53

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP1996	<i>dapC</i>	N-succinyl-L,L-diaminopimelate aminotransferase	5,1E+07	8,5	3,5E+07	6,5	0,7	0,00	0,01
BPP1995	<i>dapD</i>	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase	3,8E+08	10,5	3,9E+08	4,6	1,0	0,72	0,84
BPP1994	<i>dapE</i>	Succinyl-diaminopimelate desuccinylase	1,7E+07	37,9	1,0E+07	62,0	0,6	0,21	0,42
BPP1993	<i>prmB</i>	50S ribosomal protein L3 glutamine methyltransferase	2,5E+07	32,2	1,8E+07	20,8	0,7	0,20	0,41
BPP1992	<i>BPP1992</i>	Probable ABC transporter ATP-binding protein	8,5E+06	11,9	5,4E+06	9,9	0,6	0,00	0,03
BPP1991	<i>BPP1991</i>	Putative exported protein	na	na	2,7E+07	18,9	ON	na	na
BPP1988	<i>BPP1988</i>	Putative exported protein	4,7E+06	42,5	4,6E+06	21,9	1,0	0,91	0,95
BPP1987	<i>BPP1987</i>	Uncharacterized protein	4,3E+07	9,8	5,2E+07	7,7	1,2	0,03	0,12
BPP1986	<i>purN</i>	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	1,9E+07	20,3	1,5E+07	47,1	0,8	0,37	0,58
BPP1985	<i>ribF</i>	Riboflavin biosynthesis protein	7,9E+06	83,6	7,8E+06	45,3	1,0	0,97	0,98
BPP1984	<i>ileS</i>	Isoleucine--tRNA ligase	5,2E+07	7,9	5,4E+07	16,9	1,1	0,62	0,78
BPP1982	<i>dfp</i>	DNA/pantothenate metabolism flavoprotein	3,1E+07	7,1	2,5E+07	8,1	0,8	0,00	0,05
BPP1976	<i>dut</i>	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	1,5E+08	14,0	1,4E+08	4,3	1,0	0,67	0,81
BPP1972	<i>BPP1972</i>	Putative extracellular solute-binding protein	5,5E+06	68,2	na	na	OFF	na	na
BPP1971	<i>BPP1971</i>	Putative exported protein	1,4E+08	18,5	8,2E+07	10,5	0,6	0,00	0,05
BPP1970	<i>BPP1970</i>	Putative ornithine cyclodeaminase	1,6E+07	14,7	2,2E+07	7,8	1,4	0,01	0,06
BPP1969	<i>osmC</i>	Osmotically inducible protein C	9,0E+07	16,0	8,6E+07	17,0	1,0	0,71	0,83

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP1968	<i>ptsI</i>	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	1,7E+07	13,5	1,3E+07	29,0	0,8	0,17	0,37
BPP1966	<i>BPP1966</i>	Putative Iia component of sugar transport PTS system	1,5E+07	7,3	1,1E+07	9,8	0,7	0,00	0,04
BPP1965	<i>gshB</i>	Glutathione synthetase	4,2E+07	23,6	2,4E+07	35,7	0,6	0,03	0,14
BPP1964	<i>infC</i>	Translation initiation factor IF-3	1,1E+08	15,5	9,8E+07	5,3	0,9	0,26	0,47
BPP1963	<i>thrS</i>	Threonine--tRNA ligase	6,6E+07	16,0	4,2E+07	5,3	0,6	0,00	0,04
BPP1959	<i>BPP1959</i>	Uncharacterized protein	3,3E+07	51,8	2,4E+07	45,5	0,7	0,41	0,61
BPP1951	<i>trpF</i>	N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase	1,1E+08	14,3	6,1E+07	5,5	0,6	0,00	0,02
BPP1950	<i>BPP1950</i>	Putative membrane protein	5,4E+07	25,1	3,5E+07	50,2	0,7	0,14	0,33
BPP1949	<i>BPP1949</i>	Putative membrane protein	1,2E+08	17,1	8,4E+07	12,1	0,7	0,02	0,09
BPP1948	<i>smoM</i>	Putative periplasmic solute-binding protein	1,9E+09	14,2	1,3E+09	4,2	0,7	0,01	0,05
BPP1946	<i>BPP1946</i>	Putative membrane protein	1,6E+08	20,5	1,6E+08	3,2	1,0	0,85	0,92
BPP1945	<i>asd</i>	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	1,8E+08	15,2	1,8E+08	21,8	1,0	0,97	0,98
BPP1944	<i>leuB</i>	3-isopropylmalate dehydrogenase	1,2E+08	67,0	1,6E+08	46,5	1,3	0,51	0,69
BPP1941	<i>BPP1941</i>	Putative exported protein	2,2E+08	31,6	1,2E+08	60,9	0,5	0,09	0,25
BPP1940	<i>BPP1940</i>	Probable ATP-binding component of ABC transporter	4,9E+07	21,8	3,4E+07	13,7	0,7	0,05	0,17
BPP1939	<i>BPP1939</i>	Putative permease component of ABC transporter	1,2E+07	11,1	7,0E+06	35,4	0,6	0,03	0,14
BPP1938	<i>BPP1938</i>	Uncharacterized protein	6,2E+06	42,9	1,0E+07	37,1	1,6	0,13	0,32
BPP1932	<i>BPP1932</i>	Uncharacterized protein	2,3E+07	19,7	na	na	OFF	na	na

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP1931	<i>BPP1931</i>	Putative iron-sulfur binding protein	1,0E+07	54,9	na	na	OFF	na	na
BPP1928	<i>BPP1928</i>	Iron-sulfur cluster carrier protein	4,2E+07	19,0	2,1E+07	9,6	0,5	0,00	0,03
BPP1927	<i>mobA</i>	Molybdenum cofactor guanylyltransferase	1,8E+07	7,1	1,4E+07	15,8	0,8	0,02	0,11
BPP1926	<i>moeA</i>	Molybdopterin biosynthesis protein	2,0E+07	15,8	1,1E+07	36,3	0,5	0,01	0,06
BPP1924	<i>BPP1924</i>	Putative lipoprotein	5,9E+07	15,3	5,8E+07	5,4	1,0	0,78	0,88
BPP1923	<i>aroC</i>	Chorismate synthase	5,6E+07	24,9	3,7E+07	20,8	0,7	0,05	0,18
BPP1921	<i>BPP1921</i>	Probable two-component histidine kinase	1,4E+07	18,7	1,2E+07	20,0	0,8	0,30	0,52
BPP1917	<i>BPP1917</i>	UPF0761 membrane protein BPP1917	1,6E+06	38,0	2,1E+06	50,8	1,3	0,50	0,68
BPP1916	<i>BPP1916</i>	Uncharacterized protein	3,5E+07	18,5	2,9E+07	10,6	0,8	0,11	0,28
BPP1914	<i>thrB</i>	Homoserine kinase	1,3E+07	17,0	1,3E+07	21,0	1,0	0,92	0,96
BPP1901	<i>dadA</i>	D-amino acid dehydrogenase small subunit	3,5E+07	6,9	3,6E+07	6,9	1,0	0,75	0,86
BPP1900	<i>ascD</i>	CDP-6-deoxy-L-threo-D-glycero-4-hexulose-3-dehy drase reductase	3,1E+07	9,6	2,1E+07	12,6	0,7	0,00	0,03
BPP1899	<i>panD</i>	Aspartate 1-decarboxylase	na	na	1,6E+07	92,0	ON	na	na
BPP1894	<i>pdxA</i>	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase	1,1E+08	15,6	8,3E+07	16,6	0,8	0,05	0,18
BPP1893	<i>BPP1893</i>	Uncharacterized protein	5,2E+07	13,6	2,4E+07	6,2	0,5	0,00	0,01
BPP1892	<i>kdgT</i>	2-keto-3-deoxygluconate permease	1,5E+08	28,3	1,1E+08	16,8	0,8	0,16	0,36
BPP1888	<i>ectA</i>	L-2,4-diaminobutyric acid acetyltransferase	1,3E+08	30,0	3,8E+07	17,4	0,3	0,00	0,04
BPP1887	<i>BPP1887</i>	Putative MarR-family transcriptional regulator	1,2E+07	54,9	6,9E+06	22,2	0,6	0,21	0,41
BPP1884	<i>BPP1884</i>	Putative cell surface protein	2,1E+07	9,8	1,6E+07	47,5	0,8	0,27	0,48

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP1881	<i>parC</i>	DNA topoisomerase 4 subunit A	3,3E+07	7,1	3,2E+07	7,9	1,0	0,80	0,88
BPP1879	<i>parE</i>	DNA topoisomerase 4 subunit B	4,7E+07	6,1	4,8E+07	10,7	1,0	0,63	0,79
BPP1878	<i>trxA</i>	Thioredoxin 1	5,0E+08	22,3	5,2E+08	12,1	1,0	0,78	0,87
BPP1877	<i>rho</i>	Transcription termination factor Rho	1,6E+08	13,6	1,5E+08	4,4	1,0	0,71	0,84
BPP1875	<i>glnE</i>	Glutamate-ammonia-ligase adenylyltransferase	9,1E+06	20,1	1,2E+07	6,0	1,3	0,05	0,17
BPP1872	<i>BPP1872</i>	Putative membrane protein	9,3E+06	14,3	1,2E+07	18,5	1,3	0,16	0,36
BPP1869	<i>polA</i>	DNA polymerase I	5,9E+07	32,5	7,8E+07	11,9	1,3	0,12	0,30
BPP1867	<i>BPP1867</i>	Putative exported protein	6,4E+07	14,4	9,2E+07	6,5	1,4	0,00	0,03
BPP1865	<i>typA</i>	GTP-binding elongation factor	7,5E+07	31,0	4,6E+07	9,0	0,6	0,05	0,17
BPP1863	<i>rbfA</i>	Ribosome-binding factor A	6,0E+07	10,8	5,4E+07	14,6	0,9	0,23	0,45
BPP1862	<i>infB</i>	Translation initiation factor IF-2	2,7E+08	11,0	2,3E+08	14,1	0,8	0,07	0,22
BPP1861	<i>nusA</i>	Transcription termination/antitermination protein NusA	5,6E+08	29,3	5,3E+08	17,3	0,9	0,74	0,86
BPP1860	<i>rimP</i>	Ribosome maturation factor RimP	1,7E+08	28,0	1,4E+08	38,3	0,8	0,42	0,62
BPP1859	<i>BPP1859</i>	Pseudouridine synthase	8,6E+07	16,5	6,7E+07	5,4	0,8	0,04	0,16
BPP1858	<i>BPP1858</i>	Segregation and condensation protein B	5,3E+07	13,4	5,6E+07	6,2	1,1	0,45	0,64
BPP1857	<i>BPP1857</i>	Probable LysR-family transcriptional regulator	1,3E+07	16,2	1,3E+07	23,3	1,1	0,65	0,80
BPP1853	<i>BPP1853</i>	Putative glutathione-S-transferase	4,4E+07	19,8	2,8E+07	8,1	0,6	0,01	0,08
BPP1847	<i>rpmE2</i>	50S ribosomal protein L31 type B	1,6E+08	21,0	5,1E+07	41,9	0,3	0,00	0,02
BPP1846	<i>BPP1846</i>	Putative membrane protein	7,6E+06	6,3	7,9E+06	40,0	1,0	0,89	0,94
BPP1840	<i>radA</i>	DNA repair protein radA	7,6E+06	13,1	6,5E+06	25,8	0,9	0,33	0,55

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP1838	<i>BPP1838</i>	Putative Ecf-type RNA polymerase sigma factor	na	na	1,5E+06	49,0	ON	na	na
BPP1837	<i>BPP1837</i>	Putative membrane protein	4,3E+06	17,2	4,9E+06	27,6	1,1	0,45	0,64
BPP1833	<i>BPP1833</i>	Putative phytoene synthase	1,2E+07	9,0	9,5E+06	10,3	0,8	0,01	0,06
BPP1832	<i>BPP1832</i>	Putative exported protein	5,2E+06	48,4	3,3E+06	8,3	0,6	0,17	0,37
BPP1828	<i>nodI</i>	Nod factor export ATP-binding protein I	na	na	6,1E+06	79,2	ON	na	na
BPP1825	<i>BPP1825</i>	Putative exported protein	2,4E+07	4,5	3,0E+08	11,6	12,4	0,00	0,00
BPP1822	<i>BPP1822</i>	Putative exported protein	1,2E+07	16,1	3,4E+07	9,6	2,9	0,00	0,00
BPP1818	<i>BPP1818</i>	Uncharacterized protein	1,6E+07	17,3	1,8E+07	12,6	1,1	0,35	0,56
BPP1817	<i>BPP1817</i>	UPF0261 protein BPP1817	1,6E+07	7,4	1,4E+07	42,3	0,8	0,52	0,69
BPP1816	<i>BPP1816</i>	TetR-family transcriptional regulator	1,7E+07	43,9	2,8E+07	35,6	1,6	0,14	0,33
BPP1815	<i>bapB</i>	Autotransporter	4,4E+08	19,8	5,2E+08	11,3	1,2	0,17	0,37
BPP1814	<i>clpB</i>	Chaperone protein ClpB	2,5E+08	8,5	2,4E+08	11,7	1,0	0,65	0,80
BPP1810	<i>BPP1810</i>	Uncharacterized protein	1,2E+07	18,1	1,2E+07	14,5	1,0	0,95	0,98
BPP1808	<i>BPP1808</i>	Putative exported protein	4,3E+07	13,6	6,4E+07	29,6	1,5	0,07	0,22
BPP1805	<i>BPP1805</i>	Lipoprotein	4,9E+08	7,7	5,4E+08	5,1	1,1	0,09	0,25
BPP1801	<i>aspC</i>	Aspartate aminotransferase	na	na	4,1E+06	44,4	ON	na	na
BPP1797	<i>glnQ</i>	Amino acids ABC transporter, ATP-binding protein	1,1E+07	55,1	6,8E+06	7,7	0,6	0,21	0,42
BPP1768	<i>queF</i>	NADPH-dependent 7-cyano-7-deazaguanine reductase	2,8E+07	16,2	2,3E+07	22,8	0,8	0,15	0,34
BPP1764	<i>nagZ</i>	Beta-hexosaminidase	1,5E+07	8,7	1,8E+07	12,1	1,2	0,06	0,20
BPP1759	<i>BPP1759</i>	Putative efflux system inner membrane	1,2E+08	10,9	1,4E+08	4,6	1,1	0,12	0,30

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
		protein							
BPP1757	<i>BPP1757</i>	Uncharacterized protein	na	na	6,9E+06	9,3	ON	na	na
BPP1756	<i>BPP1756</i>	Putative lipoprotein	1,0E+07	12,6	3,8E+07	6,0	3,7	0,00	0,00
BPP1754	<i>BPP1754</i>	Putative ABC-transporter ATP-binding component	1,0E+07	10,2	7,7E+06	34,2	0,7	0,11	0,29
BPP1752	<i>BPP1752</i>	Putative exported protein	8,9E+07	22,8	7,2E+07	21,3	0,8	0,24	0,45
BPP1744	<i>BPP1744</i>	Putative thiolase	2,1E+08	11,4	1,8E+08	32,8	0,8	0,30	0,52
BPP1743	<i>BPP1743</i>	Putative tautomerase	4,2E+07	18,1	4,7E+07	10,9	1,1	0,35	0,56
BPP1742	<i>BPP1742</i>	Putative ABC-transporter ATP-binding protein	4,2E+07	15,5	2,1E+07	17,4	0,5	0,00	0,02
BPP1741	<i>BPP1741</i>	Putative binding-protein-dependent transport protein	1,9E+07	79,5	2,7E+06	44,7	0,1	0,08	0,22
BPP1740	<i>BPP1740</i>	Putative periplasmic substrate-binding protein	1,1E+08	71,3	5,4E+07	38,5	0,5	0,20	0,41
BPP1739	<i>BPP1739</i>	Putative cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	2,4E+08	12,8	2,9E+08	22,3	1,2	0,28	0,50
BPP1737	<i>rpmB</i>	50S ribosomal protein L28	6,2E+07	33,4	5,0E+07	61,2	0,8	0,55	0,73
BPP1736	<i>rpmG</i>	50S ribosomal protein L33	1,7E+07	69,6	8,4E+06	55,3	0,5	0,23	0,43
BPP1734	<i>bph2</i>	DNA-binding protein Bph2	1,2E+09	24,1	1,7E+09	8,1	1,4	0,03	0,12
BPP1731	<i>leuS</i>	Leucine--tRNA ligase	8,0E+07	14,7	8,1E+07	5,6	1,0	0,88	0,93
BPP1730	<i>lptE</i>	LPS-assembly lipoprotein LptE	3,5E+07	6,8	3,6E+07	20,8	1,0	0,78	0,87
BPP1729	<i>holA</i>	Putative DNA polymerase III, delta subunit	1,3E+07	27,4	8,3E+06	21,3	0,6	0,05	0,17
BPP1728	<i>proA</i>	Gamma-glutamyl phosphate reductase	4,4E+07	25,8	4,2E+07	13,4	1,0	0,76	0,86

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP1722	<i>BPP1722</i>	Putative ribonuclease	7,6E+06	66,6	1,2E+07	24,4	1,5	0,21	0,42
BPP1718	<i>msbA</i>	Lipid A export ATP-binding/permease protein MsbA	3,0E+07	16,7	2,1E+07	23,5	0,7	0,04	0,16
BPP1716	<i>BPP1716</i>	Conserved hypothetical membrane protein	2,9E+07	7,4	3,0E+07	10,7	1,0	0,59	0,76
BPP1714	<i>BPP1714</i>	Putative transferase	7,0E+06	8,0	7,6E+06	16,9	1,1	0,55	0,73
BPP1711	<i>BPP1711</i>	Putative transferase	8,0E+06	36,9	5,2E+06	14,1	0,6	0,11	0,28
BPP1708	<i>BPP1708</i>	Putative transferase	1,4E+07	37,0	1,0E+07	28,0	0,8	0,29	0,51
BPP1706	<i>BPP1706</i>	Putative dioxygenase	1,0E+07	31,0	3,8E+06	36,6	0,4	0,02	0,12
BPP1705	<i>BPP1705</i>	Putative ATP-dependent helicase	4,8E+06	41,6	6,6E+06	47,4	1,4	0,38	0,59
BPP1704	<i>argA</i>	Amino-acid acetyltransferase	3,6E+07	35,3	2,6E+07	19,1	0,7	0,17	0,37
BPP1703	<i>BPP1703</i>	Probable Fe(2+)-trafficking protein	2,7E+07	11,8	2,0E+07	45,1	0,7	0,20	0,41
BPP1701	<i>BPP1701</i>	Putative transport protein	2,5E+07	11,6	4,0E+07	9,1	1,6	0,00	0,02
BPP1700	<i>rpiA</i>	Ribose-5-phosphate isomerase A	3,6E+07	30,0	5,6E+07	14,7	1,5	0,03	0,13
BPP1695	<i>BPP1695</i>	Uncharacterized protein	4,5E+07	19,3	4,3E+07	31,4	1,0	0,81	0,89
BPP1692	<i>BPP1692</i>	Polyamine-transporting ATPase	2,4E+07	27,7	3,2E+07	21,0	1,3	0,15	0,34
BPP1691	<i>BPP1691</i>	Putrescine-binding periplasmic protein	2,4E+07	31,4	2,2E+07	26,2	0,9	0,58	0,75
BPP1690	<i>kdkA</i>	3-deoxy-D-manno-octulosonic acid kinase	1,4E+07	25,0	1,2E+07	15,4	0,9	0,48	0,66
BPP1689	<i>BPP1689</i>	Globin-like protein	2,5E+07	9,3	4,2E+07	59,9	1,7	0,22	0,43
BPP1688	<i>BPP1688</i>	Putative inner membrane transport permease	2,0E+07	19,1	2,9E+07	7,8	1,5	0,01	0,05
BPP1684	<i>BPP1684</i>	Fimbrial protein	1,1E+09	30,7	1,2E+09	54,1	1,0	0,95	0,98
BPP1679	<i>paaG</i>	Probable enoyl-CoA hydratase	5,1E+07	36,2	2,0E+07	17,7	0,4	0,02	0,09
BPP1678	<i>BPP1678</i>	Putative oxidoreductase	5,8E+06	10,6	na	na	OFF	na	na

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP1670	<i>orn</i>	Oligoribonuclease	8,3E+07	61,4	6,0E+07	44,8	0,7	0,45	0,64
BPP1667	<i>BPP1667</i>	Probable oxidoreductase	2,2E+07	40,9	2,3E+07	30,7	1,1	0,84	0,91
BPP1665	<i>rplS</i>	50S ribosomal protein L19	1,8E+08	25,9	9,1E+07	19,0	0,5	0,01	0,07
BPP1636	<i>BPP1636</i>	Uncharacterized protein	8,6E+07	9,2	9,2E+07	12,4	1,1	0,43	0,63
BPP1633	<i>BPP1633</i>	Putative lipoprotein	9,8E+07	18,1	1,3E+08	7,6	1,4	0,01	0,08
BPP1632	<i>BPP1632</i>	Putative peptidase	1,7E+08	10,3	1,6E+08	20,1	0,9	0,61	0,77
BPP1631	<i>mrcA</i>	Penicillin-binding protein 1A	na	na	8,1E+06	57,5	ON	na	na
BPP1626	<i>BPP1626</i>	Probable oxidoreductase	6,5E+07	6,6	6,1E+07	8,6	0,9	0,21	0,42
BPP1621	<i>pmi</i>	Putative mannose-6-phosphate isomerase	1,5E+07	14,5	1,6E+07	8,5	1,1	0,18	0,38
BPP1619	<i>BPP1619</i>	Uncharacterized protein	1,0E+07	19,9	1,3E+07	13,3	1,3	0,04	0,16
BPP1618	<i>BPP1618</i>	Autotransporter	1,4E+09	25,4	1,1E+09	18,6	0,8	0,15	0,34
BPP1617	<i>BPP1617</i>	Autotransporter	8,5E+06	30,2	9,1E+07	9,3	10,8	0,00	0,00
BPP1604	<i>BPP1604</i>	Probable short-chain dehydrogenase	4,4E+07	23,8	6,2E+07	25,2	1,4	0,10	0,27
BPP1592	<i>BPP1592</i>	Putative exported protein	3,8E+08	8,0	2,7E+08	12,6	0,7	0,00	0,04
BPP1590	<i>BPP1590</i>	Putative universal stress protein	3,8E+07	12,5	2,4E+07	15,7	0,6	0,00	0,04
BPP1585	<i>BPP1585</i>	Uncharacterized protein	4,5E+06	23,8	2,9E+06	31,0	0,7	0,09	0,26
BPP1579	<i>BPP1579</i>	Uncharacterized transporter BPP1579	3,3E+06	20,0	4,2E+06	14,1	1,3	0,08	0,23
BPP1568	<i>gdhA</i>	Glutamate dehydrogenase	5,9E+08	16,2	6,9E+08	12,3	1,2	0,17	0,37
BPP1562	<i>BPP1562</i>	Putative exported protein	8,7E+06	20,8	4,9E+06	35,6	0,6	0,04	0,15
BPP1561	<i>BPP1561</i>	Uncharacterized protein	3,6E+07	42,0	3,7E+07	12,2	1,0	0,97	0,98
BPP1559	<i>tmk</i>	Thymidylate kinase	5,1E+07	27,8	7,8E+07	15,7	1,5	0,03	0,12
BPP1557	<i>BPP1557</i>	Uncharacterized protein	9,5E+07	7,3	1,2E+08	8,7	1,3	0,01	0,05

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP1554	<i>mmsB</i>	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	1,3E+07	29,7	1,4E+07	23,0	1,1	0,51	0,69
BPP1553	<i>BPP1553</i>	Enoly-CoA hydratase	4,7E+07	13,7	4,6E+07	11,5	1,0	0,93	0,96
BPP1552	<i>BPP1552</i>	Probable acyl-CoA dehydrogenase	2,3E+07	17,2	1,0E+07	12,1	0,4	0,00	0,02
BPP1550	<i>BPP1550</i>	Uncharacterized protein	2,7E+07	14,0	2,4E+07	8,8	0,9	0,27	0,48
BPP1547	<i>BPP1547</i>	Putative membrane protein	8,7E+07	17,9	1,0E+08	5,2	1,2	0,13	0,32
BPP1544	<i>ppsA</i>	Phosphoenolpyruvate synthase	1,5E+08	6,9	1,9E+08	7,9	1,3	0,00	0,04
BPP1543	<i>BPP1543</i>	Putative phosphoenolpyruvate synthase regulatory protein	8,6E+07	12,3	7,9E+07	3,5	0,9	0,26	0,48
BPP1540	<i>lpxB</i>	Lipid-A-disaccharide synthase	2,5E+07	5,1	2,9E+07	5,9	1,2	0,01	0,07
BPP1539	<i>lpxA</i>	Acyl-[acyl-carrier-protein]--UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase	1,3E+08	20,1	9,1E+07	31,6	0,7	0,08	0,23
BPP1538	<i>fabZ</i>	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ	4,9E+07	25,0	4,4E+07	15,5	0,9	0,55	0,73
BPP1537	<i>lpxD</i>	UDP-3-O-acylglucosamine N-acyltransferase	4,0E+07	8,4	3,1E+07	14,2	0,8	0,01	0,09
BPP1536	<i>BPP1536</i>	Putative outer membrane protein	6,6E+08	8,7	8,3E+08	8,1	1,3	0,01	0,06
BPP1535	<i>bamA</i>	Outer membrane protein assembly factor BamA	8,2E+07	4,9	9,6E+07	5,5	1,2	0,01	0,05
BPP1534	<i>BPP1534</i>	Zinc metalloprotease	5,2E+06	38,1	7,6E+06	5,8	1,4	0,06	0,20
BPP1530	<i>frr</i>	Ribosome-recycling factor	4,2E+08	8,3	3,7E+08	13,3	0,9	0,14	0,32
BPP1529	<i>pyrH</i>	Uridylate kinase	1,9E+08	11,5	2,2E+08	9,6	1,2	0,06	0,20
BPP1528	<i>tsf</i>	Elongation factor Ts	6,1E+08	11,8	5,9E+08	3,2	1,0	0,52	0,69
BPP1527	<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	1,5E+08	7,8	9,9E+07	17,0	0,7	0,00	0,04
BPP1526	<i>map</i>	Methionine aminopeptidase	4,1E+07	17,4	2,7E+07	10,3	0,7	0,01	0,07

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP1522	<i>purF</i>	Amidophosphoribosyltransferase	3,3E+07	9,1	3,9E+07	15,8	1,2	0,13	0,31
BPP1520	<i>BPP1520</i>	Uncharacterized protein	1,7E+07	51,5	1,3E+07	67,1	0,7	0,50	0,68
BPP1519	<i>folC</i>	FolC bifunctional protein [includes: foylpolylglutamate synthase and dihydrofolate synthase]	2,7E+07	52,1	2,8E+07	30,7	1,1	0,87	0,93
BPP1464	<i>lpdA</i>	Dihydrolipoyl dehydrogenase	1,6E+08	10,4	1,4E+08	13,5	0,9	0,24	0,45
BPP1463	<i>aceF</i>	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	1,8E+08	19,5	1,5E+08	14,0	0,9	0,26	0,47
BPP1462	<i>aceE</i>	Pyruvate dehydrogenase E1 component	6,7E+07	6,0	7,3E+07	9,2	1,1	0,18	0,37
BPP1461	<i>BPP1461</i>	Two-component sensor kinase	3,1E+07	12,2	3,1E+07	4,3	1,0	0,93	0,97
BPP1460	<i>BPP1460</i>	Two-component response regulator	2,0E+08	8,1	2,1E+08	14,4	1,1	0,49	0,68
BPP1459	<i>fold1</i>	Bifunctional protein Fold 1	9,9E+07	20,9	1,2E+08	11,9	1,2	0,22	0,43
BPP1458	<i>prlC</i>	Oligopeptidase A	2,1E+07	24,4	3,0E+07	12,6	1,5	0,02	0,12
BPP1454	<i>acrB</i>	Acriflavine resistance protein B	1,5E+07	26,9	2,1E+07	26,7	1,3	0,17	0,37
BPP1442	<i>BPP1442</i>	Putative gamma-glutamyltranspeptidase	4,0E+07	20,1	2,2E+07	36,0	0,6	0,02	0,11
BPP1436	<i>glnB</i>	Nitrogen regulatory protein	3,4E+07	49,0	4,8E+07	62,4	1,4	0,47	0,65
BPP1435	<i>BPP1435</i>	Putative NAD synthetase	1,8E+07	44,8	3,0E+07	17,1	1,7	0,03	0,14
BPP1434	<i>BPP1434</i>	Putative membrane transport protein	1,6E+07	26,5	2,8E+07	8,7	1,8	0,00	0,03
BPP1433	<i>argH</i>	Argininosuccinate lyase	3,5E+07	41,7	3,9E+07	39,5	1,1	0,71	0,84
BPP1432	<i>BPP1432</i>	Uncharacterized protein	1,9E+07	9,0	4,2E+07	40,0	2,2	0,03	0,14
BPP1430	<i>BPP1430</i>	Putative membrane transport ATPase	3,8E+07	16,9	6,9E+07	52,9	1,8	0,15	0,35
BPP1429	<i>BPP1429</i>	Putative amino-acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein	3,2E+09	7,7	3,3E+09	31,9	1,0	0,86	0,93

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP1428	<i>BPP1428</i>	Putative amino-acid ABC transporter, permease protein	3,0E+07	40,0	3,3E+07	50,8	1,1	0,83	0,91
BPP1427	<i>BPP1427</i>	Putative amino-acid ABC transporter, ATP-binding protein	1,2E+08	12,9	1,5E+08	12,7	1,2	0,09	0,25
BPP1422	<i>BPP1422</i>	Putative exodeoxyribonuclease III	2,1E+07	12,8	1,5E+07	48,4	0,7	0,18	0,37
BPP1410	<i>linM18</i>	Bacteriocin	2,0E+08	4,8	1,2E+08	4,8	0,6	0,00	0,00
BPP1409	<i>BPP1409</i>	Uncharacterized protein	3,7E+07	37,0	1,4E+07	53,4	0,4	0,02	0,11
BPP1393	<i>BPP1393</i>	Putative lipoprotein	5,8E+07	6,0	5,2E+07	6,5	0,9	0,05	0,18
BPP1392	<i>BPP1392</i>	Probable short-chain dehydrogenase	2,4E+06	15,2	4,6E+06	25,5	1,9	0,03	0,13
BPP1384	<i>BPP1384</i>	Putative exported protein	6,0E+07	35,2	8,0E+06	39,5	0,1	0,01	0,07
BPP1376	<i>BPP1376</i>	Putative extracellular solute-binding protein	1,2E+07	56,2	na	na	OFF	na	na
BPP1373	<i>BPP1373</i>	Probable LysR-family transcriptional regulator	4,9E+06	40,1	5,8E+06	16,4	1,2	0,46	0,65
BPP1372	<i>BPP1372</i>	Probable 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	2,1E+07	28,0	2,0E+07	17,0	0,9	0,79	0,88
BPP1371	<i>BPP1371</i>	Putative exported protein	4,3E+07	13,7	3,5E+07	9,3	0,8	0,05	0,17
BPP1366	<i>amaB</i>	N-carbamoyl-L-amino acid amidohydrolase	1,1E+07	8,8	1,2E+07	7,1	1,0	0,48	0,67
BPP1358	<i>gor</i>	Glutathione reductase	1,4E+07	8,8	1,0E+07	29,3	0,7	0,10	0,27
BPP1356	<i>aroG</i>	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	2,7E+07	36,4	1,5E+07	36,7	0,6	0,08	0,23
BPP1338	<i>BPP1338</i>	Putative exported protein	4,6E+07	65,6	3,9E+07	56,7	0,8	0,72	0,84
BPP1332	<i>BPP1332</i>	Putative exported protein	2,3E+08	21,2	2,7E+08	14,5	1,2	0,18	0,38

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP1268	<i>BPP1268</i>	Putative TetR-family transcriptional regulator	3,4E+06	14,3	4,4E+06	31,5	1,3	0,23	0,45
BPP1259	<i>guaA</i>	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	8,5E+07	14,3	8,1E+07	11,0	0,9	0,55	0,72
BPP1258	<i>guaB</i>	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	2,2E+08	7,9	2,0E+08	15,6	0,9	0,28	0,49
BPP1245	<i>BPP1245</i>	Uncharacterized protein	2,6E+07	10,7	1,3E+07	15,7	0,5	0,00	0,01
BPP1244	<i>BPP1244</i>	Putative peptidase	1,5E+07	40,2	8,8E+06	38,7	0,6	0,13	0,31
BPP1243	<i>fhaS</i>	Adhesin	5,1E+07	160,2	7,4E+07	164,4	1,4	0,78	0,88
BPP1242	<i>purL</i>	Phosphoribosylformylglycinamidine synthase	4,4E+07	12,4	5,9E+07	16,1	1,3	0,03	0,14
BPP1238	<i>greB</i>	Transcription elongation factor GreB	8,3E+06	46,3	1,2E+07	11,4	1,5	0,15	0,34
BPP1236	<i>BPP1236</i>	Probable hydrolase	1,2E+07	37,1	2,3E+07	26,5	1,9	0,05	0,18
BPP1230	<i>carB</i>	Carbamoyl-phosphate synthase (glutamine-hydrolyzing)	8,7E+07	5,9	8,0E+07	15,9	0,9	0,34	0,55
BPP1229	<i>carA</i>	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	8,3E+07	25,7	9,6E+07	4,6	1,2	0,29	0,50
BPP1228	<i>tal</i>	Transaldolase	8,5E+07	16,1	1,0E+08	12,5	1,2	0,12	0,30
BPP1223	<i>recR</i>	Recombination protein RecR	7,7E+06	44,6	3,6E+06	37,2	0,5	0,12	0,29
BPP1222	<i>BPP1222</i>	Nucleoid-associated protein BPP1222	4,6E+07	64,2	8,1E+07	18,0	1,7	0,10	0,26
BPP1221	<i>dnaX</i>	DNA polymerase III subunit Tau	2,5E+07	5,9	2,3E+07	22,3	0,9	0,45	0,64
BPP1220	<i>BPP1220</i>	Putative nuclease/helicase	6,0E+06	6,0	8,1E+06	28,4	1,3	0,20	0,40
BPP1210	<i>ilvG</i>	Putative acetolactate synthase large subunit	7,4E+07	18,8	4,2E+07	51,7	0,6	0,05	0,17
BPP1209	<i>gcdH</i>	Glutaryl-CoA dehydrogenase	1,4E+07	42,4	na	na	OFF	na	na
BPP1206	<i>BPP1206</i>	Putative ATP-binding component of ABC	5,0E+07	15,1	4,4E+07	6,1	0,9	0,17	0,37

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
		transporter							
BPP1204	<i>BPP1204</i>	Putative amino acid-binding periplasmic protein	5,3E+06	8,5	na	na	OFF	na	na
BPP1198	<i>purE</i>	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide mutase	8,2E+07	12,8	9,1E+07	6,9	1,1	0,19	0,39
BPP1194	<i>purC</i>	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	6,7E+07	10,1	7,6E+07	9,4	1,1	0,14	0,33
BPP1192	<i>fba</i>	Fructose-bisphosphate aldolase	1,9E+08	4,2	1,3E+08	8,2	0,7	0,00	0,01
BPP1185	<i>BPP1185</i>	Uncharacterized protein	8,1E+06	33,4	1,2E+07	52,7	1,5	0,31	0,52
BPP1181	<i>BPP1181</i>	Putative exported protein	3,6E+07	29,4	4,3E+07	21,3	1,2	0,38	0,59
BPP1180	<i>mog</i>	Molybdopterin biosynthesis protein	2,9E+07	6,7	4,4E+07	12,9	1,5	0,00	0,03
BPP1179	<i>pitA</i>	Probable phosphate transporter	1,9E+07	103,5	1,1E+07	20,2	0,6	0,51	0,69
BPP1175	<i>cbpA</i>	Curved DNA-binding protein	4,5E+07	25,8	3,5E+07	8,8	0,8	0,15	0,34
BPP1170	<i>BPP1170</i>	Uncharacterized protein	4,1E+07	38,3	1,5E+08	11,6	3,7	0,00	0,00
BPP1169	<i>BPP1169</i>	Phosphate acetyl/butaryl transferase	2,0E+07	35,4	6,7E+07	38,3	3,4	0,01	0,08
BPP1168	<i>ackA</i>	Acetate kinase	1,5E+07	41,5	2,8E+07	28,8	1,9	0,06	0,20
BPP1167	<i>fabI</i>	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]	na	na	2,0E+07	50,2	ON	na	na
BPP1165	<i>gap</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2,7E+08	9,3	2,8E+08	8,9	1,0	0,68	0,82
BPP1164	<i>tktA</i>	Transketolase 1	9,1E+07	6,2	9,9E+07	5,5	1,1	0,07	0,22
BPP1162	<i>BPP1162</i>	Uncharacterized protein	3,1E+07	58,1	5,4E+07	3,1	1,8	0,04	0,16
BPP1160	<i>maeB</i>	NADP-dependent malic enzyme	1,9E+08	9,9	2,0E+08	14,0	1,0	0,68	0,82
BPP1158	<i>BPP1158</i>	Probable aminotransferase	2,3E+07	15,4	2,1E+07	7,6	0,9	0,45	0,64

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP1156	<i>ubiD</i>	3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxylase	4,2E+07	4,6	3,3E+07	17,9	0,8	0,02	0,11
BPP1155	<i>BPP1155</i>	Uncharacterized protein	3,5E+07	31,8	4,5E+07	13,6	1,3	0,18	0,37
BPP1154	<i>BPP1154</i>	Putative membrane protein	1,0E+07	48,4	1,4E+07	67,9	1,4	0,49	0,67
BPP1153	<i>BPP1153</i>	Putative membrane protein	1,2E+09	8,9	1,6E+09	7,1	1,3	0,00	0,04
BPP1152	<i>BPP1152</i>	Putative membrane protein	1,1E+08	21,2	8,5E+07	11,0	0,8	0,10	0,27
BPP1151	<i>cysG</i>	Siroheme synthase	1,5E+07	32,5	9,1E+06	64,8	0,6	0,20	0,40
BPP1149	<i>upp</i>	Uracil phosphoribosyltransferase	7,3E+07	8,0	5,6E+07	18,3	0,8	0,03	0,13
BPP1147	<i>queA</i>	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase	1,8E+07	13,9	1,7E+07	56,4	0,9	0,72	0,84
BPP1146	<i>tgt</i>	Queuine tRNA-ribosyltransferase	1,8E+07	21,5	2,1E+07	14,0	1,2	0,21	0,42
BPP1145	<i>BPP1145</i>	Putative secreted protein	1,7E+09	22,4	1,3E+09	16,0	0,8	0,11	0,28
BPP1144	<i>secD</i>	Protein translocase subunit SecD	1,4E+08	8,8	1,5E+08	2,8	1,1	0,09	0,26
BPP1143	<i>secF</i>	Protein-export membrane protein SecF	7,0E+07	5,6	7,1E+07	7,1	1,0	0,69	0,83
BPP1140	<i>BPP1140</i>	PhoH-like protein	3,5E+07	18,5	2,3E+07	15,7	0,7	0,02	0,10
BPP1138	<i>corC</i>	Magnesium and cobalt efflux protein	2,7E+07	34,8	2,5E+07	35,4	1,0	0,87	0,93
BPP1136	<i>BPP1136</i>	Putative aldo/keto reductase	1,7E+07	33,3	2,3E+07	11,3	1,4	0,10	0,27
BPP1123	<i>BPP1123</i>	Putative exported protein	5,7E+07	89,7	2,5E+08	9,6	4,4	0,00	0,01
BPP1122	<i>BPP1122</i>	Putative exported protein	5,2E+07	98,1	2,0E+08	37,8	3,9	0,03	0,14
BPP1118	<i>BPP1118</i>	AhpC/TSA-family protein	2,1E+07	25,7	4,1E+07	29,9	1,9	0,03	0,12
BPP1116	<i>BPP1116</i>	Putative hydrolase	2,3E+07	47,1	3,1E+07	44,6	1,4	0,39	0,59
BPP1113	<i>moaD</i>	Molybdopterin converting factor	3,8E+07	38,2	4,2E+07	56,3	1,1	0,77	0,87
BPP1112	<i>moaE</i>	Molybdopterin converting factor	3,5E+07	15,4	2,6E+07	33,6	0,7	0,13	0,31

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP1111	<i>moaB</i>	Molybdenum cofactor biosynthesis protein B	3,4E+07	6,2	3,7E+07	17,1	1,1	0,45	0,64
BPP1110	<i>moeA</i>	Molybdopterin cofactor biosynthesis protein	5,8E+07	4,2	5,6E+07	9,5	1,0	0,65	0,80
BPP1099	<i>BPP1099</i>	Putative universal stress protein	5,6E+07	10,5	5,8E+07	21,1	1,0	0,75	0,86
BPP1090	<i>BPP1090</i>	Exported SurF1-family protein	1,9E+06	12,5	1,2E+06	40,9	0,7	0,07	0,20
BPP1089	<i>BPP1089</i>	Putative oxidoreductase	7,2E+07	21,0	7,7E+07	9,2	1,1	0,59	0,75
BPP1085	<i>BPP1085</i>	Putative exported protein	3,5E+06	106,4	3,2E+07	74,9	9,1	0,10	0,27
BPP1084	<i>BPP1084</i>	UPF0234 protein BPP1084	7,4E+07	7,4	9,0E+07	29,0	1,2	0,26	0,48
BPP1076	<i>BPP1076</i>	Putative exported protein	6,4E+08	10,9	1,1E+09	35,1	1,7	0,06	0,20
BPP1067	<i>cyoA</i>	Putative ubiquinol oxidase polypeptide II	2,9E+07	13,4	2,3E+07	16,0	0,8	0,06	0,20
BPP1066	<i>BPP1066</i>	Putative two component system response regulator	3,9E+07	19,3	3,6E+07	30,6	0,9	0,63	0,79
BPP1064	<i>BPP1064</i>	Putative exported protein	6,2E+08	23,6	6,2E+08	9,6	1,0	0,95	0,98
BPP1048	<i>BPP1048</i>	Uncharacterized protein	5,1E+07	49,4	7,2E+07	45,5	1,4	0,36	0,56
BPP1047	<i>BPP1047</i>	Putative lipoprotein	2,6E+07	9,1	3,3E+07	30,6	1,3	0,24	0,45
BPP1038	<i>BPP1038</i>	Adenine deaminase	9,9E+06	12,9	7,2E+06	62,8	0,7	0,29	0,51
BPP1033	<i>lon</i>	Lon protease	2,2E+07	27,4	3,6E+07	18,2	1,6	0,02	0,10
BPP1031	<i>BPP1031</i>	Putative exported protein	8,9E+07	58,5	7,7E+07	40,2	0,9	0,70	0,83
BPP0985	<i>BPP0985</i>	Uncharacterized protein	3,1E+07	6,3	2,5E+07	2,9	0,8	0,00	0,02
BPP0984	<i>BPP0984</i>	Uncharacterized protein	2,1E+07	69,2	6,8E+06	8,9	0,3	0,10	0,26
BPP0983	<i>BPP0983</i>	Putative exported protein	1,4E+07	34,8	na	na	OFF	na	na
BPP0645	<i>BPP0645</i>	Uncharacterized protein	1,4E+07	14,5	1,1E+07	17,5	0,8	0,08	0,23

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP0640	<i>BPP0640</i>	Luciferase-like monooxygenase	6,9E+06	44,2	5,3E+06	31,3	0,8	0,37	0,58
BPP0629	<i>BPP0629</i>	Putative lipoprotein	6,2E+06	44,3	2,0E+06	15,8	0,3	0,02	0,11
BPP0621	<i>BPP0621</i>	Uncharacterized protein	3,4E+07	19,8	2,9E+07	24,1	0,9	0,40	0,60
BPP0615	<i>etfA</i>	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	2,0E+07	16,4	2,9E+07	17,9	1,5	0,02	0,12
BPP0613	<i>BPP0613</i>	Putative acyl-CoA dehydrogenase	8,5E+07	22,5	5,2E+07	8,8	0,6	0,02	0,09
BPP0570	<i>BPP0570</i>	TetR family regulatory protein	3,8E+07	21,3	3,9E+07	11,0	1,0	0,87	0,93
BPP0523	<i>BPP0523</i>	Putative DNA-binding protein	3,7E+06	20,3	3,0E+06	50,0	0,8	0,53	0,70
BPP0505	<i>trmB</i>	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase	8,3E+06	28,8	1,1E+07	52,8	1,4	0,38	0,58
BPP0503	<i>BPP0503</i>	Uncharacterized protein	1,3E+07	54,4	1,6E+07	40,9	1,2	0,55	0,73
BPP0502	<i>BPP0502</i>	Putative membrane protein	1,5E+08	17,7	4,2E+08	75,0	2,8	0,14	0,32
BPP0501	<i>ffh</i>	Signal recognition particle protein	3,2E+07	3,3	3,4E+07	10,7	1,1	0,32	0,53
BPP0500	<i>BPP0500</i>	Putative membrane protein	1,0E+07	39,0	2,3E+07	18,2	2,3	0,00	0,04
BPP0497	<i>BPP0497</i>	Probable glutathione S-transferase	6,0E+07	17,2	7,9E+07	23,0	1,3	0,12	0,30
BPP0496	<i>htpG</i>	Chaperone protein HtpG	6,8E+08	73,7	7,7E+08	53,5	1,1	0,79	0,88
BPP0481	<i>BPP0481</i>	Putative TetR-family transcriptional regulator	3,3E+06	31,1	4,1E+06	26,4	1,2	0,32	0,53
BPP0480	<i>BPP0480</i>	Uncharacterized protein	9,7E+06	42,8	8,9E+06	55,2	0,9	0,80	0,88
BPP0470	<i>BPP0470</i>	Putative GntR-family transcriptional regulator	9,4E+06	31,2	1,2E+07	27,8	1,3	0,32	0,53
BPP0460	<i>BPP0460</i>	Zinc-binding dehydrogenase	2,5E+07	6,4	2,5E+07	8,6	1,0	0,71	0,83
BPP0458	<i>BPP0458</i>	Alkyl hydroperoxide reductase AhpD	1,8E+09	12,2	2,3E+09	6,2	1,2	0,02	0,09
BPP0452	<i>BPP0452</i>	Autotransporter	1,7E+09	16,2	1,6E+09	15,0	1,0	0,74	0,86

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP0444	<i>BPP0444</i>	UPF0339 protein BPP0444	8,9E+05	40,2	8,4E+05	61,2	0,9	0,90	0,95
BPP0439	<i>BPP0439</i>	Putative potassium channel protein	7,5E+06	60,5	8,8E+06	49,2	1,2	0,70	0,83
BPP0436	<i>BPP0436</i>	LysR family regulatory protein	4,0E+06	20,3	na	na	OFF	na	na
BPP0429	<i>ilvD1</i>	Dihydroxy-acid dehydratase 1	6,3E+07	21,8	2,8E+07	9,6	0,4	0,00	0,03
BPP0419	<i>queC</i>	7-cyano-7-deazaguanine synthase	2,1E+07	23,9	1,4E+07	46,6	0,6	0,14	0,33
BPP0418	<i>ppc</i>	Phosphoenolpyruvate carboxylase	1,7E+07	17,2	1,8E+07	13,7	1,1	0,38	0,59
BPP0417	<i>sphB1</i>	Autotransporter subtilisin-like protease	6,4E+07	35,2	5,5E+07	13,7	0,9	0,47	0,66
BPP0413	<i>BPP0413</i>	Probable transcriptional regulator	1,2E+07	16,1	1,1E+07	17,1	0,9	0,43	0,63
BPP0411	<i>catJ</i>	3-oxoadipate CoA-transferase subunit B	1,6E+07	10,1	8,8E+06	16,3	0,5	0,00	0,02
BPP0409	<i>BPP0409</i>	Uncharacterized protein	3,8E+07	28,1	2,4E+07	59,8	0,6	0,20	0,41
BPP0408	<i>catD2</i>	3-oxoadipate enol-lactone hydrolase	2,8E+07	10,8	1,9E+07	20,7	0,7	0,01	0,06
BPP0405	<i>BPP0405</i>	Putative exported protein	7,0E+07	147,1	1,7E+08	83,5	2,4	0,38	0,59
BPP0404	<i>BPP0404</i>	Carbonic anhydrase	8,8E+07	18,8	4,8E+07	14,8	0,5	0,00	0,04
BPP0402	<i>BPP0402</i>	Putative branched-chain amino acid binding protein	3,4E+07	15,7	3,0E+07	6,2	0,9	0,18	0,37
BPP0401	<i>BPP0401</i>	Putative LysR-family transcriptional regulator	1,7E+07	29,2	na	na	OFF	na	na
BPP0395	<i>cysI</i>	Putative sulfite reductase	1,4E+08	40,8	1,8E+07	44,1	0,1	0,01	0,05
BPP0392	<i>BPP0392</i>	Uncharacterized protein	6,6E+07	10,9	7,1E+07	6,2	1,1	0,31	0,52
BPP0385	<i>ubiX</i>	Flavin prenyltransferase UbiX	9,4E+06	57,4	6,1E+06	60,8	0,6	0,38	0,58
BPP0384	<i>BPP0384</i>	Glutaredoxin	5,5E+07	27,3	4,6E+07	10,3	0,8	0,33	0,54
BPP0382	<i>prfA</i>	Peptide chain release factor 1	5,0E+07	35,4	2,6E+07	48,4	0,5	0,07	0,21
BPP0378	<i>BPP0378</i>	Uncharacterized protein	7,4E+06	37,0	6,5E+06	37,9	0,9	0,65	0,80

Locus	Gen	Descripción	Promedio SS	Coefficiente de variación [%] SS	Promedio SS-Fe	Coefficiente de variación [%] SS-Fe	Veces de cambio SS-Fe/SS	p-valor SS-Fe/SS	q-valor SS-Fe/SS
BPP0376	<i>BPP0376</i>	Transcriptional regulatory protein	2,6E+07	19,5	1,7E+07	22,4	0,7	0,04	0,16
BPP0360	<i>BPP0360</i>	LysR family regulatory protein	8,9E+06	17,9	1,1E+07	12,2	1,2	0,18	0,37
BPP0357	<i>BPP0357</i>	Transcriptional regulator	na	na	4,0E+06	16,1	ON	na	na

Las proteínas con niveles modificados entre las muestras se encuentran sombreadas.

Na = No detectado

Capítulo 3

Evaluación de la capacidad protectora de AfuA e

IRP1-3 contra infecciones de *B. parapertussis*

3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE AFUA E IRP1-3 CONTRA INFECCIONES DE *B. PARAPERTUSSIS*

3.1. Introducción

El estudio de las proteínas expresadas por un patógeno en condiciones de entorno que simulan las condiciones enfrentadas por la bacteria durante la infección, ha sido utilizada con éxito tanto para la identificación de factores de virulencia como de proteínas antigénicas que podrían ser utilizadas como candidatos vacunales [1].

Particularmente, en la búsqueda candidatos vacunales contra *Bordetella pertussis* nuestro grupo recurrió al estudio del fenotipo inducido por la limitación en hierro, que es la condición de estrés más importante *in vivo* y que induce cambios significativos en el fenotipo bacteriano [2–5]. Para ello, se estudiaron proteínas de membrana externa cuya expresión se vio aumentada en respuesta a la limitación de hierro y se seleccionaron aquellas reconocidas por sueros de humanos infectados con el fin de seleccionar solo aquellas que se expresan durante la infección e inducen anticuerpos en el hospedador [2]. La selección de proteínas de membrana externa está relacionada con la necesidad de introducir antígenos que induzcan anticuerpos opsonizantes con el fin de mejorar la protección brindada por las nuevas vacunas. Cabe recordar que la opsonización mediada por anticuerpos es crítica para inducir actividad celular bactericida en las células inmunes y evitar en establecimiento de nichos de persistencia intracelular [6,7]. Las proteínas que cumplieron con esta condición fueron clonadas y expresadas en *Escherichia coli* para su posterior evaluación. De las tres seleccionadas solo dos resultaron buenos candidatos

vacunales, con capacidad tanto para proteger en formulaciones monovalentes como para incrementar la capacidad protectora de las vacunas acelulares actualmente en uso. Estas dos proteínas tienen homólogos en *B. parapertussis* y reciben los nombres de, AfuA (BP1605/BPP2980) e IRP1-3 (BP1152/BPP3193).

Como ya se ha mencionado, el aumento en la vigilancia de la tos convulsa ha demostrado que existe una mayor prevalencia de infecciones de *B. parapertussis* de lo previamente documentado, causando entre el 1 y el 35% de los casos de tos convulsa [8] y siendo muy frecuente en niños en edad escolar [9]. La enfermedad se ha vuelto más prevalente en los últimos años en algunos países con altas tasas de vacunación, países que han incorporado la vacuna acelular casi exclusivamente en sus calendarios de vacunación. En particular se ha observado que *B. parapertussis* fue la principal causante de diversos brotes de tos convulsa en Estados Unidos [8,10]. En este contexto el control de la tos convulsa requiere de nuevas vacunas que sean seguras como lo son las acelulares pero que protejan mejor no solo contra *B. pertussis* sino también contra *B. parapertussis*.

Como se ha mencionado previamente las vacunas acelulares actualmente en uso en todo el mundo se componen de entre 3 y 5 antígenos de *B. pertussis* purificados. La aparición de variantes polimórficas de estos antígenos vacunales e incluso la desaparición de algunos de ellos en cepas circulantes de *B. pertussis* ha confirmado la inmunoselección de cepas dirigida por vacunación [11]. El ejemplo más paradigmático es el caso de pertactina (prn), un autotransportador que ha sido descrito como el único antígeno blanco de opsoninas entre los incluidos en las formulaciones y que tiene una función discutida en la patogenicidad de la bacteria [12,13]. En primer lugar, se observaron cambios de secuencia en regiones inmunodominantes [11,14] y, posteriormente, la aparición de cepas que no expresan dicho antígeno [15]. Con el tiempo, éstas cepas se volvieron prevalentes en

aquellos países donde sólo se aplica la vacuna acelular [16] y hoy son prevalentes en todo el mundo [15–19].

Las vacunas acelulares están formuladas por una combinación de PT, Prn, FHA y Fim. *B. parapertussis* expresa homólogos de Prn, FHA y Fim pero que presentan diferencias en regiones inmunodominante [20] lo cual, sumado al efecto de apantallamiento del antígeno O [21], ha dado como resultado la falta de protección cruzada de estas vacunas contra *B. parapertussis*. A esto se le suma la reciente aparición de aislados clínicos de *B. parapertussis* que no expresan pertactina [15] y que tendrían, entonces, mayor capacidad para sobrevivir en la población vacunada.

AfuA e IRP1-3, los dos nuevos antígenos previamente mencionados, a diferencia de pertactina y FHA tienen un grado de similitud muy alto a nivel de secuencia entre *B. pertussis* Tohama I y *B. parapertussis* 12822 (más del 99%). Se ha observado que estas proteínas se han conservado en todas las cepas circulantes de *B. pertussis* [22,23], probablemente porque ambas son parte de sistemas de captura de hierro de alta afinidad, vitales para la bacteria durante la infección. AfuA es homóloga a las proteínas HitA de *Haemophilus influenzae*, y FbpA de *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*. Predicciones bioinformáticas sugirieron que AfuA es una proteína transportadora y parte de un sistema tripartito junto con BPP2981 y BPP2982. De acuerdo a Armstrong y col. [24] el sistema AfuABC, no es específico para una sola fuente de hierro, sino que es necesario para la utilización de hierro férrico inorgánico y complejos férricos de alcaligina, enterobactina, ferricromo y desferrioxamina B en *B. pertussis* [25]. Al estudiar el entorno genómico de estos marcos de lectura se observa que existe, tanto en el genoma de *B. pertussis* como en el de *B. parapertussis*, un sitio de unión a la proteína Fur cerca del promotor, que explica la regulación por hierro de este operón. El transporte de hierro por FbpA en *Neisseria* ocurre

de la siguiente manera. TbpAB, un receptor de transferrina de superficie dependiente de TonB, se une a la transferrina, remueve el hierro y lo transporta a través de la membrana externa hacia el periplasma, donde se une a la proteína FbpA. El receptor TbpA interactúa preferentemente con apo-FbpA en el lado interno de la membrana externa y libera holo-FbpA, que transporta el hierro al transportador de membrana interno FbpBC para la captación citosólica [26]. La lactoferrina está presente en la mucosa respiratoria y es la proteína que vehiculiza el hierro complejado evitando concentraciones de hierro libre en mucosa compatibles con la proliferación de bacterias incapaces de capturar hierro complejados por proteínas como la lactoferrina [27]. La mucosa es ambiente de colonización de los patógenos que, como *B. parapertussis*, infectan el tracto respiratorio, por lo que AfuA es una proteína clave en la infección.

El antígeno IRP1-3, en cambio, corresponde al primer marco de lectura del operón denominado *fr*ABCD, que está involucrado en el transporte de iones ferrosos de manera TonB independiente. El transporte de hierro ferroso se asocia generalmente con condiciones ambientales como baja concentración de oxígeno y bajo pH. *fr*A (o IRP1-3) es una proteína exportada putativa de 19,3 kDa anotada como un miembro de una familia de proteínas periplásmicas bacterianas que se cree que funcionan en el transporte de hierro ferroso de alta afinidad (Pfam PF10634). Un análisis de secuencia más profundo muestra que esta proteína conserva los residuos de coordinación de cobre y hierro identificados en estructuras cristalinas de un homólogo, la proteína P19 de *Campylobacter jejuni*. *B. pertussis* necesita el operón *fr*ABCDE para crecer en condiciones de acidez leve (pH 6) [28]. La función de este transportador en la infección podría estar dada por la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* y *B. parapertussis*, ya que según resultados previos [6,29],

ambas especies persisten intracelularmente en endosomas tempranos cuyo pH es levemente ácido [6,29,30].

En el capítulo anterior, al estudiar el proteoma de *B. parapertussis* limitada en hierro encontramos la proteína AfuA significativamente aumentada. El aumento de IRP1-3, por su parte, no resultó significativo, algo sorprendente porque en el caso de *B. pertussis* el aumento de IRP1-3 en limitación de hierro fue superior a 50 veces la abundancia de ésta proteína en bacterias cultivadas en exceso de hierro [2]. Es posible que la funcionalidad de este sistema esté ligada a la especie.

Debido a que nuestro grupo de investigación trabaja en la formulación de una vacuna acelular que brinde mayor protección contra *B. pertussis* pero también proteja contra *B. parapertussis*, y que tanto AfuA e IRP1-3 tiene una muy alta homología de secuencia entre ambas especies, ambas proteínas recombinantes producidas en *E. coli* a partir de genes clonados de *B. pertussis* fueron evaluadas en su capacidad de brindar protección contra *B. parapertussis*.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y limitación

Para los estudios realizados en este capítulo, se empleó la cepa *Bordetella parapertussis* CN2591 y una cepa isogénica defectiva en la expresión de antígeno O (Bpp Δ wbm) [31]. Las bacterias fueron cultivadas en placas de Agar Bordet Gengou (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan), suplementada con 15% v/v de sangre desfibrinada de carnero (ABGs), por 2 días a 37°C. Al cabo de este tiempo se repicó en una nueva placa ABGs y se cultivó a 37°C durante 20 hs. Del cultivo en medio sólido se extrajo el inóculo para el cultivo en medio líquido Stainer-Scholte (SS).

Para obtener *B. parapertussis* limitada en hierro, la misma se cultivó en medio SS en condiciones de exceso de hierro (SS) y de limitación de hierro (SS-Fe), como se describió previamente [32]. Brevemente, después de 20 horas en placa, las bacterias se subcultivaron en medio líquido SS y se mantuvieron en condiciones de agitación a 37°C durante 24 h. Luego, las células se recolectaron mediante centrifugación (10000 \times g durante 15 minutos a temperatura ambiente), se lavaron con solución salina estéril libre de hierro y se usaron para inocular SS (36 μ M de hierro) y SS sin adición de FeSO₄.7H₂O. Las bacterias se cultivaron a 37°C durante 20 h, se subcultivaron una vez en los medios de cultivo respectivos hasta la fase exponencial tardía. La presencia de sideróforos en los sobrenadantes de cultivo de *B. parapertussis* cultivados en medio sin hierro se estudiaron mediante el ensayo de cromo azurol S (CAS) y se usaron para confirmar el crecimiento limitado en hierro [33].

Para la obtención de proteínas recombinante se empleó la cepa *de E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL transformada con los plásmidos pET28a con los marcos de lectura de AfuA o IRP1-3 obtenidos como se describió previamente [22,23]. La misma fue

cultivada en medio Luria Bertani (LB) a 37°C suplementada con 50 µg/ml de kanamicina y 50 µg/ml de cloranfenicol.

3.2.2. Sueros y anticuerpos

Además de los anticuerpos obtenidos como se describe en apartados siguientes, en este capítulo se utilizaron sueros de ratones infectados con *B. parapertussis* obtenidos como se describió en el capítulo anterior y sueros de ratones vacunados con rAfuA o rIRP1-3 obtenidos como se describió previamente [22,23]. Se utilizaron también anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con HRP (Jackson Immuno Research, Baltimore Pike, Pensilvania) para ELISA y anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con ficoeritrina (PE) (Jackson Immuno Research) para la citometría. Los sueros de conejo contra *B. parapertussis* fueron obtenidos se describió en [34]. Fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con Cy3 y fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC (ambos de Jackson ImmunoResearch) fueron utilizados para doble marcación. Para los ensayos de inmunoblot, anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research) fueron utilizados.

3.2.3. Células

Neutrófilos de sangre periférica fueron aislados de sangre humana utilizando gradientes de centrifugación Ficoll-Histopaque (Sigma, St. Louis, Misuri). Los glóbulos rojos remanentes en la suspensión de polimorfonucleares (PMN) fueron removidos por lisis

hipotónica. Los neutrófilos fueron lavados dos veces con DMEM suplementado con 0,2% p/v de BSA (Sigma) y utilizados inmediatamente.

3.2.4. Producción de proteínas recombinantes

La inducción y purificación de cada una de las proteínas recombinantes se llevó a cabo según se describió previamente [22,23]. Para la inducción de la expresión de rAfuA y rIRP1-3, las bacterias *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL transformadas con pET28acon el marco de lectura de AfuA o IRP1-3 fueron cultivadas a 37°C hasta alcanzar una DO₆₅₀ 0,4, momento en el cual se agregó isopropil-β-D tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final 0,5 mM y se continuó el cultivo durante 3 hs. Debido a que las proteínas se encuentran formando cuerpos de inclusión, se procedió de la siguiente manera para su purificación. Las bacterias fueron centrifugadas y resuspendidas en un buffer conteniendo tris 50 mM, EDTA 5 mM, sacarosa 5% p/v a pH 8 y lisadas mediante tres pasajes por prensa francesa. Los restos celulares se lavaron con un buffer con 2% de tritón X-100 y se resuspendieron en PBS. Después de homogeneizar la muestra, se agregó tritón X-114 a una concentración final de 1% v/v para eliminar una posible contaminación con LPS, y se agitó por 1 minuto. Luego, la muestra se colocó en hielo por 5 minutos y se pasó a un baño termostático a 56°C por un minuto. Finalmente, se centrifugó a 13000 rpm por 7 min para separar las fases, encontrándose los cuerpos de inclusión en el precipitado. Estos se lavaron con una solución de tris 50mM, EDTA 5mM y urea 2M. Para facilitar la solubilización de las proteínas, los cuerpos de inclusión fueron recuperados por centrifugación y suspendidos en buffer desnaturalizante conteniendo 50 mM Na₂HPO₄.2H₂O, 300 mM NaCl, 8 M urea, 10 mM imidazol, pH 7,4. Los restos fueron

eliminados por centrifugación a 10000 x g por 20 min. Cada una de las proteínas recombinantes (en el sobrenadante) fue luego purificada por afinidad en una columna cargada con una resina de cobalto (HisPur™ Cobalt Resin, Pierce, Rockford, Illinois) previamente equilibrada con buffer desnaturizante. La columna fue lavada con el mismo buffer para eliminar las proteínas no unidas y la elución de las proteínas recombinantes fue realizada con buffer 50 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 300 mM NaCl, 8 M urea, 150 mM imidazol, pH 7,4. La pureza de cada una de las proteínas fue analizada mediante SDS-PAGE 10%. Las proteínas fueron dializadas y liofilizadas. La concentración de LPS en las proteínas purificadas, determinada mediante Limulus amoebocyte lysate (Sigma), indicó que todas las preparaciones contenían menos de 0,25 unidades de endotoxina/μg de proteína.

3.2.5. Inmunización de ratones

En los ensayos con animales se utilizaron ratones hembras BALB/c de entre 3 y 5 semanas obtenidas y criadas en salas de cría libres de patógenos de las instalaciones del Bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata. El manejo de animales y todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de conformidad con las directrices de ARRIVE y de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE de la Unión Europea para Experimentos con Animales por personal capacitado para la manipulación de animales. Los protocolos descritos en este estudio fueron revisados y aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).

En los ensayos de inmunización, se procedió como fue descrito previamente [22]. Grupos de 10 ratones BALB/c fueron inmunizados intraperitonealmente (i.p.) con 4 μg de rAfuA o rIRP1-3 con adyuvante de Freund completo (AFC). Transcurridos 19 días, se

realizó una segunda inmunización (refuerzo) con la respectiva proteína recombinante formulada con adyuvante de Freund incompleto (AFI). Un grupo de ratones vacunados solo con adyuvante fue utilizado como control.

3.2.6. Desafío de ratones inmunizados

En ensayos de protección activa, ratones inmunizados i.p. (n=10), según se describió previamente fueron sedados y desafiados por instilación en las fosas nasales con 50 µl de PBS conteniendo $1,5 \times 10^6$ UFC de *B. paraptussis* CN2591 cultivada en limitación de hierro 14 días después de la última inmunización. Transcurridos 3 días después de la infección, se sacrificaron los ratones. Los pulmones fueron extraídos y homogeneizados en PBS. Diluciones seriadas fueron sembradas en agar Bordet Gengou suplementado con 20 µg/ml de estreptomina para hacer recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). *B. paraptussis* CN2591 es resistente a estreptomina [35].

3.2.7. Ensayos de ELISA

Para la evaluación del título de anticuerpos anti-rAfuA y anti-rIRP1-3, se utilizaron ensayos de ELISA para la determinación semicuantitativa de anticuerpos dirigidos contra dicha proteína en muestras de suero de ratones inmunizados o sin inmunizar (control negativo). Brevemente, placas de 96 pocillos (MaxisorpNunc, Dinamarca) se sensibilizaron con 100 µl de una solución conteniendo 10 µg/ml de proteína recombinante en buffer 0,5 M de Na_2CO_3 pH 9,6 durante 12 hs. a 4°C en cámara húmeda. Los pocillos fueron luego lavados tres veces con solución PBS-0,05% v/v Tween 20 (Sigma) (PBS-T) y se realizó el bloqueo de sitios libres remanentes con 400 µl por pocillo de una solución PBS-10% p/v

leche descremada (PBS-L) durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. Se realizaron diluciones seriadas de los sueros de ratones inmunizados con rAfuA o rIRP1-3, de suero normal de ratón y de sueros de ratones infectados con *B. parapertussis* (obtenidos como fue descrito en el capítulo anterior) en PBS-L suplementada con 0,05% v/v de Tween 20 (PBS-LT). Transcurrida la etapa de bloqueo, se agregaron 100 µl de las diluciones de los distintos sueros a los pocillos sensibilizados con la respectiva proteína recombinante y se incubó durante 2 hs a 30 °C en cámara húmeda. Luego de tres lavados con PBS-LT se adicionaron 100 µl por pocillo de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con HRP) diluido en PBS-LT. Se incubó durante 2 hs a 37°C en cámara húmeda, se realizaron tres lavados con PBS-T y se agregó 100 µl por pocillo de sustrato para peroxidasa, orto-fenilendiamina, preparado en buffer fosfato/citrato/H₂O₂ (0,1 M Na₂HPO₄ / 0,1 M ácido cítrico / 0,001% H₂O₂). Transcurridos 15 min, la reacción se detuvo mediante el agregado de 50 µl por pocillo de solución 2 M H₂SO₄. Se determinó la absorbancia a 492 nm. El título se calculó mediante el método de punto final, como la inversa de la dilución de suero más alta que dio una lectura por encima del límite [36]. Suero normal de ratón fue utilizado para determinar el límite. En ensayos de ELISA con bacterias enteras, se procedió de igual manera pero las placas fueron sensibilizadas con *B. parapertussis* cultivadas en medio con exceso de hierro (SS) o medio libre de hierro (SS-Fe) en suspensión en PBS (DO₆₅₀: 1).

3.2.8. Ensayos de Opsonización

Bacterias cultivadas en medio SS-Fe se utilizaron para determinar la capacidad opsonizante de sueros de ratón anti-rAfuA y anti-rIRP1-3. Brevemente, 100 µl de bacterias (DO₆₅₀: 1) se incubaron con 60 µl de suero anti-rAfuA y anti-rIRP1-3 diluidos 1/10, suero

normal de ratón sin diluir, o suero de ratones infectados con *B. parapertussis* diluido 1/100 durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS, y se incubaron 30 min a 4 °C con anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con ficoeritrina (PE). Luego de un lavado final con PBS las bacterias fueron fijadas con paraformaldehído 4%. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo (BD FACSCalibur™, BD Biosciences).

3.2.9. Opsonofagocitosis

B. parapertussis cultivada medio SS-Fe y opsonizada como fue previamente descrito, fueron incubadas con PMN durante 40 min a 37°C en una relación inicial bacteria/célula (Rib/c) de 200. La fagocitosis se detuvo colocando en hielo las muestras. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Luego de la fijación, los neutrófilos se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) y se incubaron con NH₄Cl 50 mM durante 10 minutos a temperatura ambiente. El número de bacterias internalizadas y adheridas a superficie del neutrófilo fue determinado por doble marcación fluorescente y microscopia de fluorescencia. Para determinar el número de bacterias adheridas las células fueron incubadas con suero de conejo anti-*B. parapertussis* (30 min a 4°C), seguido por la incubación con fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con Cy3 (30 min a 4°C). Luego las células fueron lavadas y permeabilizadas mediante la incubación con una solución de saponina 0,1% (Sigma) y BSA 0,2% (Sigma) (30 min a temperatura ambiente), e incubadas con anticuerpos policlonales de conejo anti-*B. parapertussis* en PBS con saponina 0,1% y BSA 0,2% (30 minutos a temperatura ambiente), seguido por dos lavados con la misma solución conteniendo BSA y

saponina y la incubación con fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC (30 min a 25°C) en presencia de saponina 0,1% y BSA 0,2%. Luego dos lavados con la misma solución conteniendo BSA y saponina, se lavó una última vez con agua destilada para eliminar el exceso de sales, las muestras se montaron sobre portaobjetos y fueron analizadas por microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio DMLB acoplado a una cámara DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Suiza). El número de bacterias extracelulares (rojas y verdes) e intracelulares (verdes) se determinó por la observación de al menos 50 células en cada condición.

3.2.10. Western Blot

Para los ensayos de inmunodetección, muestras proteicas fueron obtenidas a partir de suspensiones bacterianas de *B. paraptussis* CN2591 cultivada en exceso o limitación de hierro. Muestras conteniendo igual cantidad de proteínas fueron tratadas con buffer Laemmli y analizadas mediante SDS-PAGE 10%. Las proteínas fueron luego transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (Immobilon PVDF Millipore, Bedford, Massachusetts) [273]. Las membranas fueron incubadas con antisueros de ratón anti-rAfuA o anti-rIRP1-3, durante 2 hs a temperatura ambiente. La detección inmunoquímica se realizó empleando anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research, BaltimorePike) y NBT/BCIP (Bio-Rad, Hercules, California) como sustrato de reacción.

En las inmunodetecciones, se utilizó también una fracción enriquecida en proteínas de membrana externa [37]. Las mismas se obtuvieron a partir de proteínas totales de ambas condiciones de cultivo de la siguiente manera. Brevemente, 20 mg de proteínas totales

fueron incubadas con una solución fría de carbonato de sodio (0,1 M, pH 11) y agitadas suavemente en cámara de hielo durante 1 h. Las muestras tratadas con carbonato de sodio fueron sometidas a ultracentrifugación ($115000 \times g$) durante 1 h a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet (fracción enriquecida en proteínas de membrana externa) se resuspendió en 2 ml de una solución 50 mM Tris/HCl, pH 7,5.

3.2.11. Análisis estadístico

La comparación de medias para dos grupos independientes fue realizada con la prueba t de Student con un grado de significación (p) de 0,05. La comparación estadística para más de dos grupos fue realizada con el análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación de los valores obtenidos (medias) se utilizó el test de Menor Diferencia Significativa (LSD) con un grado de significación (p) de 0,05.

3.3. Resultados y Discusión

3.3.1. Análisis de homología de secuencia

Las proteínas AfuA e IRP1-3 son inmunógenos protectores contra *B. pertussis* [22,23] que se sobreexpresan en limitación en hierro también en *B. parapertussis*. Los homólogos encontrados en la cepa de referencia de *B. parapertussis* de linaje humano (12822) presentan un 99,43% de identidad en el caso de AfuA y 99,44% en el caso de IRP1-3 respecto a las secuencias en *B. pertussis*. Cabe señalar que los antígenos que forman parte de las vacunas acelulares actuales, incluidos en muchos planes de vacunación a nivel mundial presentan solo un 93,6% de identidad en el caso de pertactina y 95,2% en FHA. En el caso de Fim, en este trabajo de tesis hemos observado que *B. parapertussis* no expresa ninguna de las proteínas fimbriales incluidas en las formulaciones actuales (Capítulo 5 de esta Tesis).

En la Figura 1 se muestran alineamientos entre las secuencias aminoacídicas de AfuA e IRP1-3 basados en los genomas de las cepas de referencia de *B. pertussis* y *B. parapertussis*. Alineamientos similares de los antígenos presentes en las vacunas acelulares FHA y pertactina se encuentran como Figura anexa al final del capítulo.

Según se muestra en la Figura 1, la secuencia de AfuA difiere solo en dos aminoácidos: el 31 y el 149. Según un análisis bioinformático llevado a cabo con BepiPred-2.0 [38], solo el residuo 31 podría ser parte de un epítotope. En particular, podría ser parte de uno de los 18 epítotope lineales B predichos. En la estructura cristalina del homólogo, BP1605 (Protein Data Bank código 1Y9U) el residuo 149 no está expuesto a la superficie ni forma parte de ningún epítotope estructural, según lo predicho con discotope (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope/>). En el caso de IRP1-3, de la que no se tiene estructura cristalográfica, la única diferencia se encuentra en el residuo 138, que sería parte

de un epítoto B lineal, aunque no de los más relevantes, de acuerdo al predictor de epítotoes [38]. En conjunto, estos datos sugieren que existe muy poca variabilidad antigénica entre AfuA e IRP1-3 de *B. pertussis* y de *B. parapertussis*.

```

AfuA Bp      1 mptkreslilpllrrelalagvatfseaqalaadevelyttrepkllipildafakdsagikvntvfvkdglilervraegdkapadvlmtvdiqnlidlvnggvtkiqsqtldsvvpanlrgeagswyalxlrdvlyvekd
AfuA Bpp      1 .....
AfuA Bp     141 lkldsfrygdldadpkwkvkvcirsgqghpyntalvaamiahdgaatekwlrvgkanlarkaaggdrdvardilggicdiglanayyvgghmknaepgtdarkwgdakvvrpt.fatakdggtvhnisgaavaahapnkana
AfuA Bpp     141 .....
AfuA Bp     281 vkllaylvsepaqtlyaqanyeyppvraqvklдавvasfopikvdtlpvaeiakyzkqaselvdkvqfdn
AfuA Bpp     281 .....

IRP1-3 Bp    1 mmkalllalalalpgaeafaaypigkpaekgmeigavylqpiendppgmraakdsdvhlleadihatagnatgfegeewpylvkkyevqkvgsdkvqkgtfmpmvandgphygdvkvldgpgkyklkkytimpptadk
IRP1-3 Bpp    1 .....
IRP1-3 Bp   141 mnhfgrhidkecvgvppwefepföleyefvfvagcggkqgy
IRP1-3 Bpp   141 .....

```

Figura 1. Alineamiento de secuencia entre AfuA e IRP1-3 de *B. pertussis* tohama I y sus homólogos en *Bordetella parapertussis* 12822.

3.3.2. Expresión durante la infección

AfuA e IRP1-3 han sido clonadas a partir de ADN de *B. pertussis* Tohama I y evaluadas como antígenos vacunales por nuestro grupo, por lo que contamos con cepas de *E. coli* que expresan ambos antígenos en forma recombinante. En primer lugar, entonces, para evaluar si *B. parapertussis* expresa AfuA e IRP1-3 durante la infección, si las mismas inducen anticuerpos, y si estos son capaces de reconocer la respectiva proteína recombinante de *B. pertussis*, evaluamos el título de los anticuerpos contra cada proteína en sueros de ratones infectados con *B. parapertussis* en ensayos de ELISA. Para ello, placas multipocillo fueron sensibilizadas con cada proteína recombinante, y se utilizaron como anticuerpos primarios los sueros de ratones infectados y sueros de ratones no infectados como control negativo (Figura 2). Los resultados muestran que en los sueros de ratones infectados, a diferencia de los sueros de ratones no infectados, hay anticuerpos que reconocen ambas proteínas. Estos resultados indican que *B. parapertussis* expresa ambas proteínas durante la infección, que ambas son inmunogénicas *in vivo* y que la similitud

entre las proteínas respectivas de *B. pertussis* y de *B. parapertussis* es tal que los anticuerpos son capaces de reconocer a las proteínas obtenidas en forma recombinante.

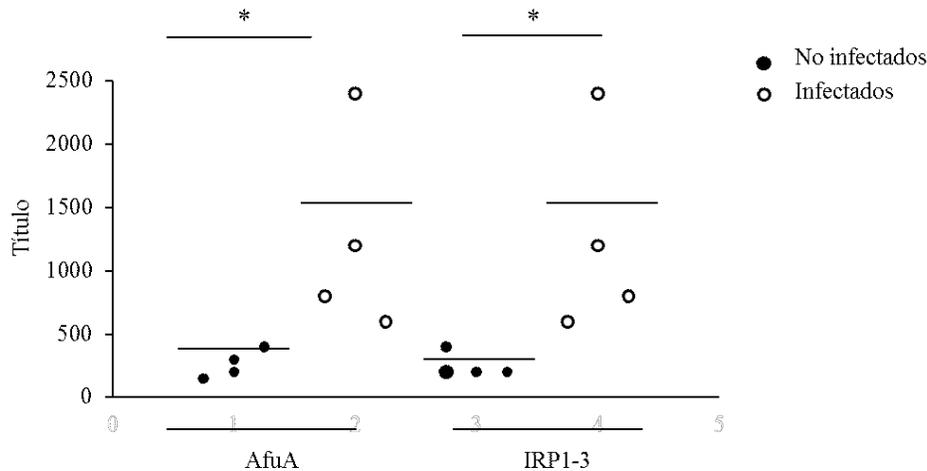


Figura 2. La infección con *B. parapertussis* induce anticuerpos que reconocen rAfuA y rIRP1-3. Los títulos de anticuerpos anti-AfuA y anti-IRP1-3 inducidos en ratones infectados con *B. parapertussis* se determinaron mediante ELISA. Las placas se recubrieron con proteína recombinante como antígeno. Se muestra el título medio de cada grupo. (* $p < 0,05$).

3.3.3. Reconocimiento de AfuA e IRP1-3 de *B. parapertussis* por anticuerpos inducidos por la proteína recombinante

Para evaluar si anticuerpos inducidos por las proteínas recombinantes rAfuA y rIRP1-3 reconocen sus respectivas homólogas en *B. parapertussis*, se realizaron ensayos de inmunodetección por western blot. Para ello, se obtuvieron muestras de extractos proteicos a partir de cultivos de *B. parapertussis* cultivada en exceso y limitación de hierro. Bacterias en fase exponencial tardía fueron lisadas en buffer Laemmli. Muestras provenientes de igual cantidad de bacterias de cada condición de cultivo o de igual cantidad de proteína de fracciones enriquecidas con proteínas de membrana externa de bacterias cultivadas en cada condición fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida, transferidas a

membranas de PVDF e incubadas con sueros de ratón obtenidos por inmunización con rAfuA o rIRP1-3 [22,23]. La Figura 3 muestra el resultado obtenido luego del revelado. Se puede observar que los anticuerpos inducidos por la inmunización con las proteínas recombinantes son capaces de reconocer a la proteína respectiva expresada por *B. parapertussis*. Por otro lado, si bien en el estudio proteómico no se pudo asegurar que IRP1-3 estuviera aumentada en limitación de hierro, el ensayo inmunodetección sugiere que ambos antígenos son proteínas reguladas por hierro y que IRP1-3_{Bpp} tiene una sobreexpresión importante en limitación de hierro, tal como se observó en *B. pertussis*. Por último, tal como se esperaba ambas proteínas se detectaron en la fracción enriquecida en proteínas de membrana externa observándose una detección mayor de ambas proteínas en esta fracción.

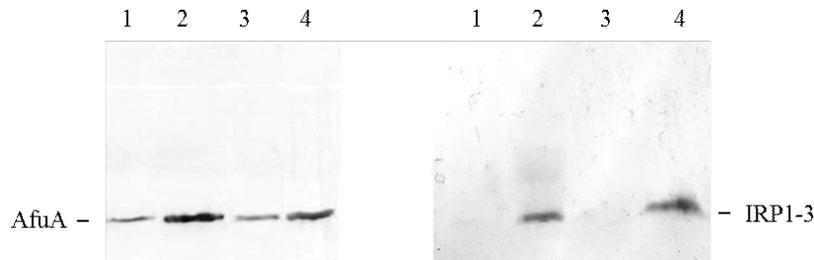


Figura 3. Inmunodetección de AfuA_{Bpp} e IRP1-3_{Bpp} por anticuerpos inducidos por las proteínas recombinantes de *B. pertussis*. Lisados de células enteras (1 y 2) y proteínas de membrana externa (3 y 4) de *B. parapertussis* cultivadas en exceso (1 y 3) y limitación de hierro (2 y 4) fueron separadas en un SDS-PAGE (10%) y transferidas a una membrana de PVDF. Anticuerpos anti-rAfuA y anti-rIRP1-3 fueron utilizados para la inmunodetección. El gel se sembró con muestras provenientes de números de bacterias equivalentes en los carriles 1 y 2, y la misma cantidad de proteína en los carriles 3 y 4.

3.3.4. Evaluación de la localización celular de AfuA e IRP1-3

Las proteínas asociadas a la superficie desempeñan un papel clave en la patogénesis y son los principales blancos para el desarrollo de vacunas porque están involucradas en la

interacción con el sistema inmune del hospedador [39]. Las proteínas de superficie se comportan como blancos de anticuerpos opsonizantes (opsoninas), un tipo de actividad biológica que ha demostrado ser crítica para la inducción de actividad celular bactericida tanto contra *B. pertussis* como *B. parapertussis*. En el caso de *B. pertussis*, tanto AfuA como IRP1-3 demostraron estar expuestas en superficie e inducir opsoninas lo cual demostró ser la base de la protección conferida por cada uno de ellos contra *B. pertussis*. Con el fin de estudiar la localización subcelular de estos antígenos en *B. parapertussis* y evaluar el posible efecto de apantallamiento que el antígeno O pudiera ejercer sobre ellos, se llevaron a cabo ensayos de inmunodetección en el formato de ELISAs usando bacterias enteras para sensibilizar las placas. Para ello, se realizaron cultivos de *B. parapertussis* en limitación de hierro y se utilizaron para sensibilizar placas de 96 wells. El título de anticuerpos presentes en los sueros de ratones inmunizados con cada proteína recombinante se utilizó como una medida de la capacidad de estos sueros de reconocer a la respectiva proteína expuesta en la superficie bacteriana y en su conformación nativa. Como se observa en la Figura 4, los sueros de ratones inmunizados con rAfuA mostraron reconocimiento bacteriano en ambas condiciones, sin embargo, los títulos fueron más altos cuando la placa se sensibilizó con la bacteria limitada en hierro. En cambio, el título ratones inmunizados con IRP1-3 fue bajo y no mostró un aumento significativo en condiciones de limitación de hierro.

Como fue mencionado previamente, el antígeno O de *B. parapertussis* podría tener un efecto de apantallamiento sobre los antígenos expuestos en superficie. Por ello en este ensayo se incluyó una cepa de *B. parapertussis* mutante deficiente en antígeno O para estudiar si éste interfiere con el reconocimiento de los antígenos (Figura 4). Los resultados obtenidos sugieren que el antígeno O no apantalla a AfuA en condiciones de limitación de

hierro, pero podría tener un efecto de apantallamiento sobre IRP1-3, ya que se observa un aumento significativo de título en el reconocimiento de IRP1-3 en superficie bacteriana cuando se usa como antígeno la mutante de antígeno O limitada en hierro.

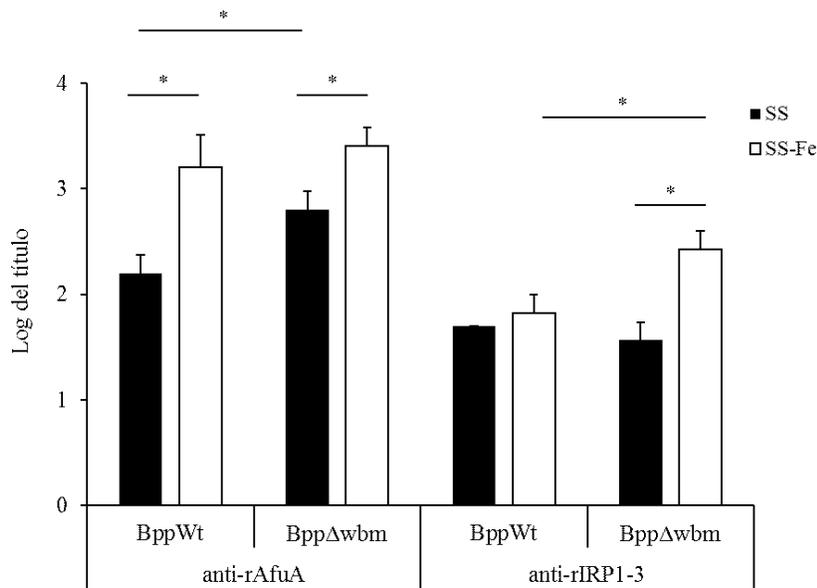


Figura 4. Detección de AfuA e IRP1-3 de *B. paraptussis* en superficie bacteriana. Los títulos de anticuerpos inducidos en ratones por inmunización con rAfuA (anti-rAfuA) o rIRP1-3 (anti-rIRP1-3) se determinaron mediante ELISA usando como antígeno células enteras de *B. paraptussis*. Las placas se recubrieron con *B. paraptussis* salvaje (BppWt) o *B. paraptussis* defectiva en la expresión de antígeno O (BppΔwbm) cultivadas en condiciones de exceso (SS) o limitación de hierro (SS-Fe). (*p < 0,05). Se muestran resultados representativos de dos ensayos independientes realizados por triplicados.

Estos resultados confirmaron que AfuA está regulada por hierro, que está expuesta en la superficie de la bacteria y que no está apantallado por el antígeno O. En el caso de IRP1-3, estos resultados también confirman que está regulada por hierro, y expuesta en la superficie de *B. paraptussis*, pero está apantallada por el antígeno O, lo que dificulta su reconocimiento por parte de los anticuerpos. Finalmente, estos resultados también muestran que los anticuerpos inducidos por las proteínas recombinantes producidas a partir de *B.*

parapertussis reconocen no solo a las proteínas desnaturalizadas, sino también a las proteínas en su conformación nativa en la superficie bacteriana.

3.3.5. Evaluación de la actividad opsonofagocítica anti-rAfuA y anti-rIRP1-3

El hecho de que un anticuerpo reconozca a una proteína de superficie bacteriana en un ELISA no necesariamente significa que sea un anticuerpo opsonizante. Con el fin de investigar si los anticuerpos inducidos por cada una de las proteínas recombinantes tienen esta actividad biológica se realizaron también ensayos de opsonización. Bacterias cultivadas en limitación de hierro se incubaron con sueros anti-rAfuA o anti-rIRP1-3 durante 60 min. Como control negativo se empleó suero normal de ratón y como control positivo suero de ratones infectados con *B. parapertussis*. Luego de varios lavados, las bacterias se incubaron con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con ficoeritrina (PE). La fluorescencia asociada a las bacterias evaluada por citometría de flujo se empleó como medida de la opsonización de la bacteria.

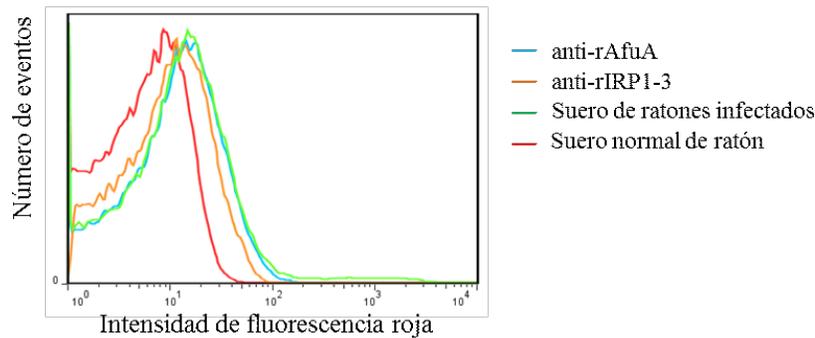


Figura 5. Oponización de *B. paraptussis* por anticuerpos anti-rIRP1-3 y anti-rAfuA. *B. paraptussis* limitada en hierro se incubó con suero de ratón anti-IRP1-3, anti-AfuA, suero normal de ratón, o suero de ratones infectados con *B. paraptussis* durante 1 h a 37°C. Las bacterias se lavaron, se incubaron con anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados con PE durante 1 h a 4°C, y se analizaron por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de 3 experimentos independientes

La figura 5 muestra histogramas representativos de la intensidad de fluorescencia asociada a las bacterias incubadas con los diferentes sueros. Los resultados muestran que el suero anti-rAfuA tiene una gran capacidad opsonizante, similar al suero de ratones infectados (control positivo). Este resultado no solo respalda la idea de que ésta proteína está expuesta en superficie sino que también sugiere que es blanco de opsoninas. Por el contrario, la capacidad opsonizante de anti-IRP1-3 fue baja lo cual concuerda con lo observado en el ensayo de ELISA y el eventual apantallamiento por el antígeno O.

Para completar el estudio de la actividad biológica de estos anticuerpos llevamos a cabo ensayos de opsonofagocitosis, es decir analizamos si los anticuerpos inducidos por estas proteínas recombinantes son capaces de promover la fagocitosis de *B. paraptussis*. Teniendo en cuenta que solo la fagocitosis mediada por anticuerpos, y por lo tanto por receptores Fc, es capaz de inducir actividad celular bactericida contra *B. paraptussis* en células inmunes [29,40], evaluar la actividad opsonofagocítica de estos anticuerpos

significa estimar la inducción de capacidad bactericida en la célula blanco. En este ensayo se usaron neutrófilos recientemente aislados de donantes (PMN) y se incubaron con *B. parapertussis* cultivada en limitación de hierro previamente opsonizadas con anticuerpos anti-AfuA, anti-IRP1-3, suero normal de ratón como control negativo o suero de ratones infectados con *B. parapertussis* como control positivo tal como fue descrito previamente. El número de bacterias fagocitadas fue determinado por doble marcación fluorescente y microscopía de epifluorescencia. Los resultados obtenidos muestran que la incubación con los anticuerpos anti-rAfuA y anti-rIRP1-3 favorece la fagocitosis por parte de células PMN (Figura 6). Cabe destacar que a pesar de que el nivel de opsonización con anti-rAfuA y suero de infectados era similar (Figura 5) la opsonofagocitosis es significativamente diferente lo que podría deberse a la diferente calidad y afinidad de los anticuerpos, entre otras razones.

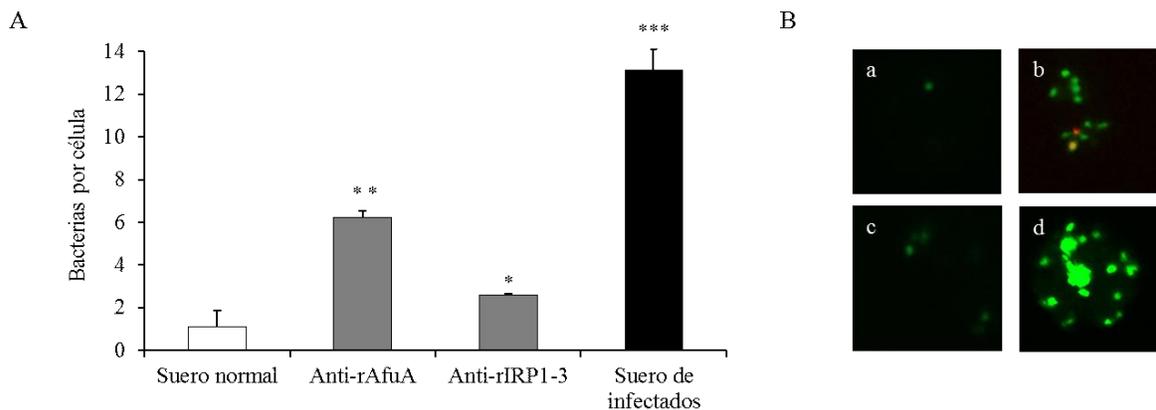


Figura 6. Capacidad de anticuerpos anti-rAfuA o anti-rIRP1-3 de promover la fagocitosis de *B. parapertussis* por neutrófilos. *B. parapertussis* opsonizada con anti-rAfuA, anti-rIRP1-3, suero de ratones infectados con *B. parapertussis* o suero normal de ratón, fue incubada con neutrófilos humanos durante 40 min a 37°C. Las células fueron fijadas y permeabilizadas, y el número de bacterias intracelulares y extracelulares fueron determinados por doble marcación fluorescente y microscopía de fluorescencia. A) Los datos presentados representan la media ± DE de un ensayo realizado por triplicado representativo de tres experimentos independientes utilizando neutrófilos de diferentes donantes. Los niveles de fagocitosis inducidos por el suero normal, los anticuerpos anti-rAfuA y anti-rIRP1-3, y el suero de ratones infectados son todos significativamente diferentes ($p < 0,05$). B) Microscopía de fluorescencia de la fagocitosis de *B. parapertussis* cultivada en limitación de hierro opsonizadas con (a) suero normal (b) anticuerpos anti-rAfuA (c), anti-rIRP1-3, y (d) un suero de ratones infectados con *B. parapertussis*. En el panel B se muestran fotos representativas de tres experimentos independientes.

3.3.6. Evaluación de la capacidad protectora de las proteínas rAfuA y rIRP1-3

Dado que los ensayos *in vitro* sugirieron que rAfuA y, posiblemente también rIRP1-3 son potenciales candidatos vacunales contra *B. parapertussis*, se decidió estudiar si estos antígenos son capaces de inducir una respuesta inmune protectora contra esta especie en modelos murinos. Para ello, grupos de ratones BALB/C fueron vacunados dos veces con rAfuA o rIRP1-3 en adyuvante de Freund. Como control negativo, se utilizó adyuvante de Freund solo. Una vez terminado el plan de vacunación los ratones fueron desafiados con *B. parapertussis* cultivada en limitación de hierro. Tres días después los animales fueron sacrificados y se realizó recuento de bacterias viables en pulmón. Para ello los pulmones

fueron extraídos en esterilidad y disgregados. Finalmente, se realizó un recuento en placas de agar Bordet Gengou y se calcularon las unidades protectoras de los dos antígenos.

Tabla 1. Protección contra *B. paraptussis* conferida por inmunización con rAfuA o rIRP1-3

Vacuna	log CFU en pulmones ^a	Unidades de protección ^b
rAfuA/FA	5,96 ± 0,24 ^c	0,97
rIRP1-3/FA	6,85 ± 0,11	0,06
PBS/FA	6,93 ± 0,06	--

^aLa carga bacteriana es representada como la media del Log UFC ± DE para cada grupo

^bLas unidades de protección fueron obtenidas mediante la substracción de la media del Log UFC del grupo vacunado a la media del Log UFC del grupo control (PBS/AF)

^cSignificativamente diferente del grupo control (p<0,05)

Los resultados mostrados en Tabla 1 muestran que, a diferencia de rIRP1-3, rAfuA es capaz de inducir una respuesta inmune con capacidad de disminuir significativamente la carga bacteriana en el pulmón de los ratones vacunados. La comparación con datos de bibliografía indica que el nivel de protección inducido por este antígeno es similar al alcanzado con los antígenos presentes en las vacunas comerciales, pertactina o FHA, en formulación monovalente [20]. Esto sugiere que esta proteína es un buen candidato para incluir en nuevas formulaciones vacunales ya que no solo es capaz de generar protección contra *B. pertussis* [23] sino también contra *B. paraptussis*.

3.4. Conclusiones

En los últimos años, la reemergencia de la tos convulsa ha llevado a la búsqueda de nuevas vacunas. Muchos grupos han trabajado en este tópico con diversos enfoques y generando diferentes resultados. Entre ellos nuestro grupo, que utilizó herramientas proteómicas para identificar nuevos candidatos vacunales. Dos candidatos que fueron seleccionados con esta estrategia mostraron ser protectores contra *B. pertussis* y están actualmente siendo estudiados en ensayos preclínicos en babuinos. Dado que estos dos antígenos están muy conservados en las dos especies y tienen muy alta homología de secuencia, en este capítulo se evaluaron ambos antígenos en su capacidad para proteger contra *B. parapertussis*.

Se observó que ambos antígenos se sobreexpresan en limitación de hierro en *B. parapertussis*, que también están expuestos en la superficie de esta especie y son blancos de opsoninas. Sin embargo, solo uno de ellos, rAfuA, resultó ser un antígeno protector en modelo de infección murino. Estos antígenos mostraron diferencias en las pruebas *in vitro* que podrían explicar este resultado. Anticuerpos dirigidos contra rAfuA mostraron un mayor reconocimiento de *B. parapertussis*, básicamente porque esta proteína, a diferencia de IRP1-3, no está apantallada por el antígeno O en la superficie bacteriana, lo que la convierte en un blanco de opsoninas más potente que IRP1-3 y en una mejor promotora de opsonofagocitosis. Resultados previos del tipo de respuesta inmune generada por estos dos antígenos también podría explicar la diferencia de protección observada, ya que estos antígenos difieren entre sí en el tipo de respuesta inmune que producen [22, 41]. AfuA induce un perfil con mayor contribución Th1 e IRP1-3 un perfil con mayor contribución Th2. Esto podría explicar la diferencia en protección porque el perfil Th1 es necesario

importante para eliminar a *B. parapertussis* del tracto respiratorio en modelos murinos [42,43].

3.5. Bibliografia

- [1] M. Semanjski, B. Macek, Shotgun proteomics of bacterial pathogens : advances, challenges and clinical implications, *Expert Rev. Proteomics*. 9450 (2016). doi:10.1586/14789450.2016.1132168.
- [2] M.L. Perez Vidakovics, J. Paba, Y. Lamberti, C. Andre Ricart, M. Valle De Sousa, M.E. Rodriguez, Profiling the *Bordetella pertussis* Proteome during Iron Starvation, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 2518–2528. doi:10.1021/pr060681i.
- [3] Y. Wang, H. Chen, Z. Guo, L. Sun, Y. Fu, T. Li, W. Lin, X. Lin, Quantitative proteomic analysis of iron-regulated outer membrane proteins in *Aeromonas hydrophila* as potential vaccine candidates, *Fish Shellfish Immunol.* 68 (2017) 1–9. doi:10.1016/j.fsi.2017.07.002.
- [4] M.S. Walters, H.L.T. Mobley, Bacterial proteomics and identification of potential vaccine targets, *Expert Rev. Vaccines.* 7 (2010) 181–184.
- [5] Y. Wang, X. Wang, F. Ali, Z. Li, Y. Fu, X. Yang, W. Lin, X. Lin, Comparative Extracellular Proteomics of *Aeromonas hydrophila* Reveals Iron-Regulated Secreted Proteins as Potential Vaccine Candidates, *Front. Immunol.* 10 (2019) 1–15. doi:10.3389/fimmu.2019.00256.
- [6] Y. a Lamberti, J. Alvarez Hayes, M.L. Perez Vidakovics, E.T. Harvill, M.E. Rodriguez, Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages, *Infect. Immun.* 78 (2010) 907–913. doi:10.1128/IAI.01031-09.
- [7] M.E. Rodriguez, S.M. Hellwig, D.F. Hozbor, J. Leusen, W.L. van der Pol, J.G. van de Winkel, Fc receptor-mediated immunity against *Bordetella pertussis*, *J. Immunol.* 167 (2001) 6545–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714823>.
- [8] J.D. Cherry, B.L. Seaton, Patterns of *Bordetella parapertussis* respiratory illnesses: 2008–2010, *Clin. Infect. Dis.* 54 (2012) 534–537. doi:10.1093/cid/cir860.
- [9] Q. He, M.K. Viljanen, H. Arvilommi, B. Aittanen, J. Mertsola, Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population, *JAMA.* 280 (1998) 635–637. doi:10.1001/jama.280.7.635.
- [10] V.P. Karalius, S.L. Rucinski, J.N. Mandrekar, R. Patel, *Bordetella parapertussis* outbreak in Southeastern Minnesota and the United States, 2014, *Med.* 96 (2017) 1–6. doi:10.1097/MD.0000000000006730.
- [11] F.R. Mooi, H. Van Oirschot, K. Heuvelman, H.G.J. Van der Heide, W. Gaastra, R.J.L. Willems, Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: Temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution, *Infect. Immun.* 66 (1998) 670–675.
- [12] E.S. Hovingh, R. Mariman, L. Solans, D. Hijdra, H.-J. Hamstra, I. Jongerius, M. Van Gent, F. Mooi, C. Loch, E. Pinelli, *Bordetella pertussis* pertactin knock-out strains reveal immunomodulatory properties of this virulence factor, *Emerg. Microbes Infect.* 7 (2018). doi:10.1038/s41426-018-0039-8.
- [13] A. Safarchi, S. Octavia, L.D.W. Luu, C.Y. Tay, V. Sintchenko, N. Wood, H. Marshall, P. McIntyre, R. Lan, Pertactin negative *Bordetella pertussis* demonstrates higher fitness under vaccine selection pressure in a mixed infection model, *Vaccine.* 33 (2015) 6277–6281. doi:10.1016/j.vaccine.2015.09.064.
- [14] C. Boursaux-Eude, N. Guiso, Polymorphism of repeated regions of pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*, *Infect. Immun.* 68 (2000) 4815–4817. doi:10.1128/IAI.68.8.4815-4817.2000.

- [15] N. Hegerle, A.S. Paris, D. Brun, G. Dore, E. Njamkepo, S. Guillot, N. Guiso, Evolution of French *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* isolates: Increase of *Bordetellae* not expressing pertactin, *Clin. Microbiol. Infect.* 18 (2012) E340–E346. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03925.x.
- [16] N. Otsuka, H. Han, H. Toyozumi-ajisaka, Y. Nakamura, Y. Arakawa, Prevalence and Genetic Characterization of Pertactin- Deficient *Bordetella pertussis* in Japan, *PLoS One.* 7 (2012) e31985. doi:10.1371/journal.pone.0031985.
- [17] Q. He, Appearance of *Bordetella pertussis* Strains Not Expressing the Vaccine Antigen Pertactin in Finland, *Clin. Vaccine Immunol.* 19 (2012) 1703–1704. doi:10.1128/CVI.00367-12.
- [18] L.C. Pawloski, A.M. Queenan, P.K. Cassidy, A.S. Lynch, M.J. Harrison, W. Shang, M.M. Williams, K.E. Bowden, Prevalence and Molecular Characterization of Pertactin-Deficient *Bordetella pertussis* in the United States, *Clin. Vaccine Immunol.* 21 (2014) 119–125. doi:10.1128/CVI.00717-13.
- [19] A.M. Barkoff, J. Mertsola, D. Pierard, T. Dalby, S.V. Hoegh, S. Guillot, P. Stefanelli, M. van Gent, G. Berbers, D. Vestrheim, M. Greve-Isdahl, L. Wehlin, M. Ljungman, N.K. Fry, K. Markey, Q. He, Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates: Evidence of increased circulation in Europe, 1998 to 2015, *Eurosurveillance.* 24 (2019) 1–11. doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.7.1700832.
- [20] N. Khelef, B. Danve, M.J. Quentin-Millet, N. Guiso, *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*: two immunologically distinct species, *Infect. Immun.* 61 (1993) 486–490. doi:10.1021/pr060681i.
- [21] X. Zhang, M.E. Rodríguez, E.T. Harvill, O antigen allows *B. parapertussis* to evade *B. pertussis* vaccine-induced immunity by blocking binding and functions of cross-reactive antibodies, *PLoS One.* 4 (2009) e6989. doi:10.1371/journal.pone.0006989.
- [22] J. Alvarez Hayes, E. Erben, Y. Lamberti, M. Ayala, F. Maschi, C. Carbone, B. Gatti, G. Parisi, M.E. Rodríguez, Identification of a new protective antigen of *Bordetella pertussis*, *Vaccine.* 29 (2011) 8731–8739. doi:10.1016/j.vaccine.2011.07.143.
- [23] J. Alvarez Hayes, E. Erben, Y. Lamberti, G. Principi, F. Maschi, M. Ayala, M.E. Rodríguez, *Bordetella pertussis* iron regulated proteins as potential vaccine components, *Vaccine.* 31 (2013) 3543–3548. doi:10.1016/j.vaccine.2013.05.072.
- [24] S. Banerjee, A.J. Weerasinghe, C.J. Parker Siburt, R.T. Kreulen, S.K. Armstrong, T.J. Brickman, L.A. Lambert, A.L. Crumbliss, *Bordetella pertussis* FbpA Binds Both Unchelated Iron and Iron Siderophore Complexes, *Biochemistry.* 53 (2014) 3952–3960. doi:10.1021/bi5002823.
- [25] S.K. Armstrong, Bacterial Metabolism in the Host Environment : Pathogen Growth and Nutrient Assimilation in the Mammalian Upper Respiratory Tract, *Microbiol. Spectr.* 3 (2015) 1–23. doi:10.1128/microbiolspec.MBP-0007-2014.f1.
- [26] M. Miethke, Molecular strategies of microbial iron assimilation: From high-affinity complexes to cofactor assembly systems, *Metallomics.* 5 (2013) 15–28. doi:10.1039/c2mt20193c.
- [27] D.B. Alexander, M. Iigo, K. Yamauchi, M. Suzui, H. Tsuda, Lactoferrin: an alternative view of its role in human biological fluids 1 This article is part of a Special Issue entitled Lactoferrin and has undergone the Journal’s usual peer review process, *Biochem. Cell Biol.* 90 (2012) 279–306. doi:10.1139/o2012-013.
- [28] T.J. Brickman, S.K. Armstrong, Iron and pH-responsive FtrABCD ferrous iron utilization system of *Bordetella* species, *Mol. Microbiol.* 100 (2012) 130–134.

- doi:10.1016/j.pestbp.2011.02.012.Investigations.
- [29] J. Gorgojo, E.T. Harvill, M.E. Rodríguez, *Bordetella parapertussis* Survives inside Human Macrophages in Lipid Raft-Enriched Phagosomes, *Infect. Immun.* 82 (2014) 5175–5184. doi:10.1128/IAI.02553-14.
- [30] O. V. Vieira, R.J. Botelho, S. Grinstein, Phagosome maturation: aging gracefully, *Biochem. J.* 366 (2002) 689–704. doi:10.1042/bj20020691.
- [31] A. Preston, A.G. Allen, J. Cadisch, R. Thomas, K. Stevens, C.M. Churcher, K.L. Badcock, J. Parkhill, B. Barrell, D.J. Maskell, Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *bordetellae*, *Infect. Immun.* 67 (1999) 3763–3767. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=96651&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [32] J. Alvarez Hayes, J.M. Oviedo, H. Valdez, J.M. Laborde, F. Maschi, M. Ayala, R. Shah, M. Fernandez Lahore, M.E. Rodriguez, A recombinant iron transport protein from *Bordetella pertussis* confers protection against *Bordetella parapertussis*, *Microbiol. Immunol.* 61 (2017) 407–415. doi:10.1111/1348-0421.12532.
- [33] B. Schwyn, J.B. Neilands, Universal Chemical Assay for the Detection Determination of Siderophores, *Anal. Biochem.* 56 (1987) 47–56.
- [34] S.M. Hellwig, H.F. van Oirschot, W.L. Hazenbos, a B. van Spriel, F.R. Mooi, J.G. van De Winkel, Targeting to Fcγ receptors, but not CR3 (CD11b/CD18), increases clearance of *Bordetella pertussis*, *J. Infect. Dis.* 183 (2001) 871–879. doi:10.1086/319266.
- [35] M. Watanabe, Y. Haraguchi, In Vitro Susceptibility of *Bordetella parapertussis* to Various Antimicrobial Agents, *Antimicrob. Agents Chemother.* 33 (1989) 968–969.
- [36] A. Frey, J. Di Canzio, D. Zurakowski, A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays, *J. Immunol. Methods.* 221 (1998) 35–41. doi:10.1016/S0022-1759(98)00170-7.
- [37] M.P. Molloy, B.R. Herbert, M.B. Slade, T. Rabilloud, A.S. Nouwens, K.L. Williams, A.A. Gooley, Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 2871–2881. doi:ejb1296 [pii].
- [38] M.C. Jespersen, B. Peters, M. Nielsen, P. Marcatili, BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes, *Nucleic Acids Res.* 45 (2017) W24–W29. doi:10.1093/nar/gkx346.
- [39] G. Grandi, Bacterial surface proteins and vaccines, *F1000 Biol. Rep.* 3 (2010) 1–3. doi:10.3410/B2-36.
- [40] J. Gorgojo, Y. Lamberti, H. Valdez, E.T. Harvill, M.E. Rodriguez, *Bordetella parapertussis* Survives the Innate Interaction with Human Neutrophils by Impairing Bactericidal Trafficking inside the Cell through a Lipid Raft-Dependent Mechanism Mediated by the Lipopolysaccharide O Antigen, *Infect. Immun.* 80 (2012) 4309–4316. doi:10.1128/IAI.00662-12.
- [41] J. Alvarez Hayes, *Biología y vacunas. Proteómica aplicada a la identificación de factores de virulencia e inmunógenos presentes en el fenotipo infectante de Bordetella pertussis*, Tesis Doctoral. 2013.
- [42] D.N. Wolfe, G.S. Kirimanjeswara, E.T. Harvill, Clearance of *Bordetella parapertussis* from the Lower Respiratory Tract Requires Humoral and Cellular Immunity Clearance of *Bordetella parapertussis* from the Lower Respiratory Tract Requires Humoral and Cellular Immunity, *Infect. Immun.* 73 (2005) 6508–6513. doi:10.1128/IAI.73.10.6508.

- [43] D.N. Wolfe, A.T. Karanikas, S.E. Hester, M.J. Kennett, E.T. Harvill, IL-10 Induction by *Bordetella parapertussis* Limits a Protective IFN- γ Response, *J. Immunol.* 184 (2012) 1392–1400. doi:10.4049/jimmunol.0803045.

Capítulo 4

Clonado, análisis y evaluación de un nuevo candidato vacunal contra la tos convulsa

4. CLONADO, ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DE UN NUEVO CANDIDATO VACUNAL CONTRA LA TOS CONVULSA

4.1. Introducción

En el capítulo 2 de esta tesis se identificó un potencial candidato vacunal. Dicha proteína es un componente de sistema de transporte de alta afinidad de aminoácidos ramificados y recibe el nombre de LivJ (BPP2948). Aunque entre las dos técnicas proteómicas ensayadas no hubo coincidencia en cuanto a la posible sobreexpresión en limitación de hierro de dicha proteína, la misma fue identificada en ambas condiciones de cultivo y fue reconocida por sueros de ratones y humanos convalecientes, lo que muestra que además de ser inmunogénica está expresada durante la infección.

En un intento por predecir la estructura tridimensional de LivJ se utilizaron tres bases de datos (BLAST, HHpred y FFAS03) para seleccionar la estructura con mejor *score* como modelo. La búsqueda en BLAST arrojó un elevado número de proteínas con la misma función en gran número de bacterias evolutivamente cercanas como aquellas pertenecientes al género *Achromobacter* y a la familia de *Alcaligenaceae*, pero sin estructura cristalográfica. La proteína seleccionada fue LivK de *Escherichia coli*, que tiene 51% de identidad con LivJ de *B. parapertussis* y fue cristalizada en varias ocasiones, primero en su forma apo, y también unida a leucina. Usando la estructura de LivK como molde, se construyeron modelos estructurales usando el programa MODELLER (Figura 1). La calidad de los modelos generados fue a su vez analizada utilizando el programa PROSAIL. El modelo de la proteína LivJ está compuesto por dos dominios, cada uno de los

cuales consiste en una hoja beta central flanqueada por alfa hélices. De acuerdo a las estructuras cristalográficas utilizadas como modelo, los ligandos se unen en una hendidura formada entre los dos dominios de la proteína, con contribuciones tanto de puentes de hidrógeno como uniones no polares. Teniendo en cuenta la distancia con el ligando, se seleccionaron algunos aminoácidos conservados que podrían interactuar con el mismo. Thr102 podría formar puentes de hidrógeno con el grupo amino del ligando. Ser79 y Tyr202, con los grupos carboxilato. Y Tyr202 también interactuaría por fuerzas de van der Waals con las cadenas laterales hidrofóbicas de los ligandos [1].

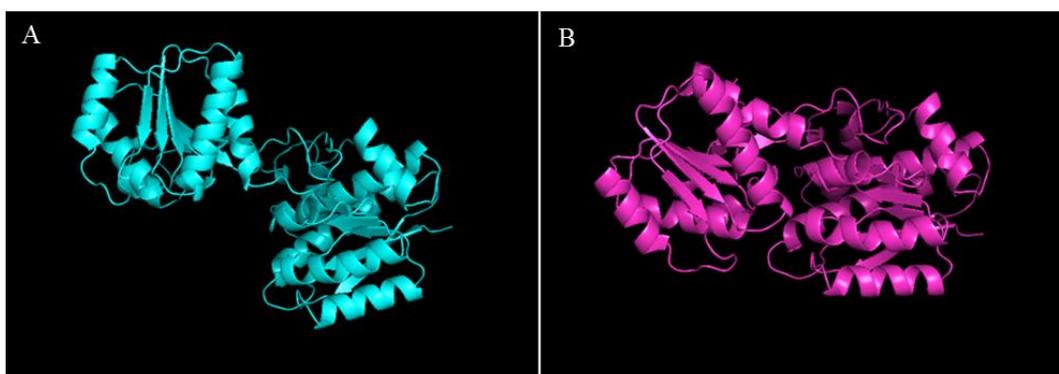


Figura 1. Modelo estructural de LivJ de *B. paraptussis* basado en la estructura de la proteína Livk de *E. coli*. La figura muestra el modelo basado en la configuración apo (A) y el modelo de la proteína unida a aminoácidos (B).

Tanto en el genoma de *B. pertussis* como en el de *B. paraptussis*, se encuentran dos genes que codifican para proteínas anotadas como LivJ, BPP2948 y BPP2941. BPP2948 es la que fue identificada por MALDI-TOF a partir de geles bidimensionales, BPP2941 es su parálogo con 60% de identidad. Ambas proteínas se identificaron en la proteómica *shotgun* (Capítulo 2 de esta Tesis). Los ortólogos en *B. pertussis* son BP1285 y BP1277, respectivamente (Figura 2).

A

```

BPP2948 1 #nkaffrtvialgmaagiamaags--haqtikiavvoptcgvvtqygdvrvregvdtaierinatggvngkkleavvlddgccepkgqpvaaanrvvndkigfvvghvcagatiaateilynnegvnmvcpaatspavtdgk
BP1285 1 #nkaffrtvialgmaagiamaags--haqtikiavvoptcgvvtqygdvrvregvdtaierinatggvngkkleavvlddgccepkgqpvaaanrvvndkigfvvghvcagatiaateilynnegvnmvcpaatspavtdgk
BPP2941 1 #kfqgftplavalgalaf----agavhaadtkikigipqmtgntqygdqiagaltaietlnakgvvgkkllepiliddgccepkgqpvaaanrvvndkigfvvghvcagatiaateilynnegvnmvcpaatspavtdgk
BP1277 1 #kfqgftplavalgalaf----agavhaadtkikigipqmtgntqygdqiagaltaietlnakgvvgkkllepiliddgccepkgqpvaaanrvvndkigfvvghvcagatiaateilynnegvnmvcpaatspavtdgk

BPP2948 139 nyefifrtigrddqqgpaakflekikpvtvavlhdkqayggqiatavkdtlekngtkvifeginagdsdyaavtkkaakvdfvyggypemglllrqaeqglidakfmgpeqvgnpdinaagpavegmlitlp
BP1285 139 nyefifrtigrddqqgpaakflekikpvtvavlhdkqayggqiatavkdtlekngtkvifeginagdsdyaavtkkaakvdfvyggypemglllrqaeqglidakfmgpeqvgnpdinaagpavegmlitlp
BPP2941 137 kphffrtigrddqqgpaaryiantikpkkvavlhdkqayggvatqvkdtlernkvnvalfeeginvdsdyaaitkkaavdfvyggypemglllrqaeqglinakfmgpeqtanqdlvaagpaidgllitlp
BP1277 137 kphffrtigrddqqgpaaryiantikpkkvavlhdkqayggvatqvkdtlernkvnvalfeeginvdsdyaaitkkaavdfvyggypemglllrqaeqglinakfmgpeqtanqdlvaagpaidgllitlp

BPP2948 279 adfflnpnaaeivkafdkkrdasgafltaayaatqvialdgi kgaqsedptkwaqylhaneftqptiqktswnkqgdlnafevftwhkdgktsyk
BP1285 279 adfflnpnaaeivkafdkkrdasgafltaayaatqvialdgi kgaqsedptkwaqylhaneftqptiqktswnkqgdlnafevftwhkdgktsyk
BPP2941 277 sdfcklpgnegvkvafqdkrdpdqafqspayaavqlaesinavq-edpavkvdhlnkntfntaigkveydkgdldkdfefavfkwdkngkktql-
BP1277 277 sdfcklpgnegvkvafqdkrdpdqafqspayaavqlaesinavq-edpavkvdhlnkntfntaigkveydkgdldkdfefavfkwdkngkktql-

```

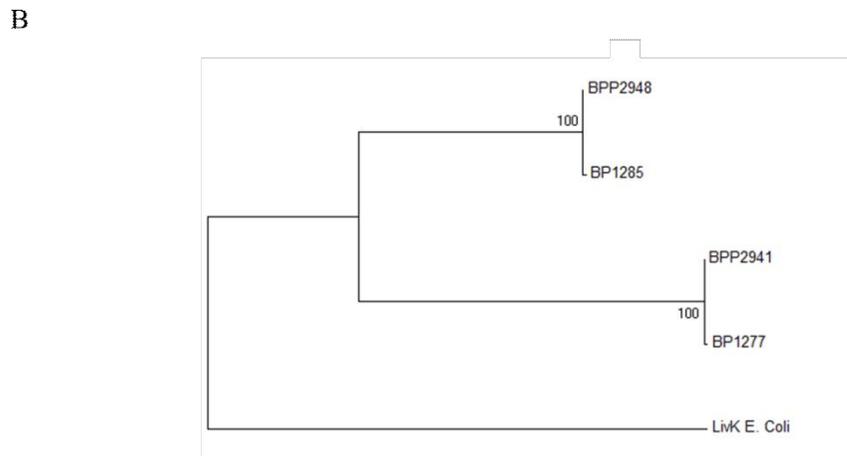


Figura 2. A) Alineamiento de secuencias de BPP2948 con su ortólogo en el genoma de *B. pertussis* y ambos parálogos. En verde se resaltan las regiones que conservan la misma secuencia en los cuatro genes B) Árbol filogenético de ambas proteínas anotadas como LivJ en *B. pertussis* y *B. parapertussis* y la proteína utilizada para el modelado de BPP2948

LivJ fue propuesta como candidato vacunal contra otros patógenos tales como *Shigella flexneri* y *Brucella abortus*. Se trata de una proteína implicada en mecanismos de patogenicidad y sobreexpresada durante la infección en varios patógenos [2–4]. Los aminoácidos ramificados son nutrientes importantes en la fisiología bacteriana, con funciones que van desde la síntesis de proteínas hasta la señalización y la adaptación a la ausencia de otros aminoácidos [5]. Por ejemplo, en *Actinobacillus pleuropneumoniae*, un patógeno respiratorio porcino, la limitación en aminoácidos ramificados es una señal para la expresión de un subconjunto de genes también inducidos *in vivo*, que incluye no solo

genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos ramificados, sino también otros genes que codifican para proteínas importantes durante la infección [6].

Los estudios descritos en este capítulo se llevaron a cabo con el fin de evaluar la potencialidad de LivJ como candidato vacunal en nuevas formulaciones acelulares contra la tos convulsa.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y limitación

Para los estudios realizados en este capítulo, se empleó la cepa *B. parapertussis* CN2591 y la cepa isogénica defectiva en la expresión de antígeno O [7]. Las bacterias fueron cultivadas en placas de Agar Bordet Gengou (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan), suplementada con 15% v/v de sangre desfibrinada de carnero (ABGs), por 2 días a 37°C. Al cabo de este tiempo se repicó en una nueva placa ABGs y se cultivó a 37 °C durante 20 hs. Del cultivo en medio sólido se extrajo el inóculo para el cultivo en medio líquido Stainer-Scholte (SS).

Para obtener *B. parapertussis* limitada en hierro, la misma se cultivó en medio SS en condiciones de exceso de hierro (SS) y de limitación de hierro (SS-Fe), como se describió en el Capítulo 2. Brevemente, después de 20 horas en placa, las bacterias se subcultivaron en medio líquido SS y se mantuvieron en condiciones de agitación a 37°C durante 24 h. Luego, las células se recolectaron mediante centrifugación ($10000 \times g$ durante 15 minutos a temperatura ambiente), se lavaron con solución salina estéril libre de hierro y se usaron para inocular SS (36 μM de hierro) o SS formulado sin agregado de hierro (SS-Fe). Las bacterias se cultivaron a 37°C durante 20 h, y se subcultivaron una vez en los medios de cultivo respectivos hasta la fase exponencial tardía. La presencia de sideróforos en los sobrenadantes de cultivo de *B. parapertussis* cultivados en medio sin hierro se evaluó mediante el ensayo de cromo azurol S (CAS) para confirmar el crecimiento limitado en hierro[8].

En ensayos de clonado y expresión de proteínas recombinantes se emplearon las cepas *E. coli* DH5 α y *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, respectivamente. Las mismas fueron cultivadas en medio Luria Bertani (LB) a 37°C suplementado con 50 $\mu\text{g/ml}$ de

kanamicina en el caso de *E. coli* DH5 α o con 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina y 50 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol en el caso de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL.

4.2.2. Anticuerpos y sueros

Los siguientes anticuerpos fueron utilizados en este capítulo: El suero de ratones convalecientes de *B. parapertussis* fue obtenido en forma similar a como fue descrito en el capítulo 2 de esta tesis. El suero de ratones vacunados con células enteras de *B. pertussis* se obtuvo como se describe en [9]. IgG purificada de humanos que padecieron tos convulsa que se empleó en este estudio es la que describe en [10]. Los sueros de conejo contra *B. parapertussis* fueron obtenidos mediante inmunización con células enteras como se describió en [11]. Para los ensayos de opsonización fracciones (Fab')₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch, Baltimore Pike, Pensilvania) fueron utilizados. Fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con Cy3 y fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC (ambos de Jackson ImmunoResearch) fueron utilizados para doble marcación. Anticuerpos de cabra anti-IgG ratón conjugados con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch) fueron utilizados como anticuerpos secundarios en ensayos de ELISA. Anticuerpos de cabra anti-IgG ratón y anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con fosfatasa alcalina (ambos de Jackson ImmunoResearch) fueron utilizados como anticuerpos secundarios en ensayos de dot blot y western blot. En los ensayos de ELISA para determinar el perfil de inmunoglobulinas, se utilizaron anti-IgG1 o anti-IgG2a de ratón conjugados con peroxidasa (ambas de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) como anticuerpos secundarios.

4.2.3. Células

Neutrófilos de sangre periférica fueron aislados de sangre humana utilizando gradientes de centrifugación Ficoll-Histopaque (Sigma, San Luis, Misuri). Los glóbulos rojos remanentes en la suspensión de polimorfonucleares (PMN) fueron removidos por lisis hipotónica. Previo a la realización de los ensayos funcionales, los neutrófilos fueron lavados dos veces con DMEM suplementado con 0,2 % p/v de BSA (Sigma) y utilizados inmediatamente. Los experimentos descritos en este capítulo fueron llevados a cabo utilizando neutrófilos purificados en el momento.

4.2.4. Clonado de LivJ de *B. parapertussis*

La región codificante del gen BPP2948 (*livJ*) sin la región que codifica para el péptido señal fue amplificada mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando como molde ADN extraído de *B. parapertussis* CN2591 y goTaq polimerasa (promega, Madison, Wisconsin). El programa de amplificación utilizado consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 98°C durante 4 min, seguido por 35 ciclos de 30 seg a 98°C, 40 seg a 55°C, 1:15 min a 72°C, y un ciclo final de extensión de 10 min a 72°C. Los cebadores específicos utilizados fueron los siguientes:

Cebador	Secuencia	Sitio de restricción
LivJ-FW	CGCC <u>CATATGATGACGATCAAGATCGCCGTG</u>	NdeI
LivJ-RV	ACTA <u>CTCGAGCTTGTACGACGTCTTGCTGC</u>	XhoI

El producto de PCR correspondiente fue ligado en pCR4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, California) y la mezcla utilizada para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Las transformantes fueron seleccionadas en placas de LB suplementadas con kanamicina. El plásmido obtenido de esta forma fue digerido con las enzimas de restricción NdeI y XhoI, y el producto purificado fue ligado al plásmido pET28a (Novagen, Madison, Wisconsin) digerido de la misma forma. Células competentes de *E. coli* fueron transformadas con la mezcla de ligación y sembradas en placas de LB suplementadas con kanamicina. Los clones positivos fueron confirmados por PCR. ADN plasmídico se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, cepa utilizada para la expresión de proteínas recombinantes.

El fragmento del plásmido correspondiente al marco de lectura abierto de la proteína recombinante fue secuenciado para confirmar ausencia de mutaciones introducidas por PCR (Macrogen Inc., Seúl, Corea).

4.2.5. Inducción y purificación de proteínas recombinantes

Para la inducción de la expresión de rLivJ, las bacterias transformadas fueron cultivadas a 37°C hasta alcanzar una DO₆₅₀ de 0,4, momento en el cual se agregó isopropil- β -D tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final 0,5 mM y se continuó el cultivo durante otras 3 hs. La purificación se realizó de la siguiente manera. Las bacterias fueron recuperadas por centrifugación y suspendidas en buffer desnaturizante conteniendo 50 mM tris, 5 mM EDTA, 8 M urea, 10 mM imidazol, pH 7,4, que permite la ruptura de las bacterias, la solubilización de la proteína y es compatible con las columnas de afinidad. Los restos fueron eliminados por centrifugación a 10000 x g por 20 min y la proteína

recombinante en el sobrenadante fue purificada por afinidad en una columna cargada con una resina de cobalto (HisPur™ Cobalt Resin, Pierce, Rockford, Illinois) previamente equilibrada con buffer desnaturizante. La columna fue lavada con el mismo buffer para eliminar las proteínas no unidas y la elución de las proteínas recombinantes fue realizada con buffer 50 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 300 mM NaCl, 8 M urea, 150 mM imidazol, pH 7,4. La pureza de la proteína fue analizada mediante SDS-PAGE 12,5%. Las proteínas fueron dializadas y liofilizadas. La proteína recombinante fue suspendida en buffer con 0,1 M de carbonato de amonio a pH 8 y pasada por una resina de Polimixina B (Sigma) para eliminar una posible contaminación con LPS; luego fue nuevamente dializada y liofilizada.

4.2.6. Inmunización de ratones

En ensayos con animales se utilizaron ratones hembras BALB/c de entre 3 y 5 semanas obtenidos y criados en salas de cría libres de patógenos de las instalaciones del bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata. El manejo de animales y todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de conformidad con las directrices de ARRIVE y de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE de la Unión Europea para Experimentos con Animales. Los protocolos descritos en este estudio fueron revisados y aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

En los ensayos de inmunización, se procedió como fue descrito previamente [12]. Brevemente, grupos de 4 ratones BALB/c fueron inmunizados intraperitonealmente (i.p.) con 4 µg de rLivJ con adyuvante de Freund completo (AFC). Transcurridos 14 días, se realizó una segunda inmunización (refuerzo) con la proteína recombinante formulada con

adyuvante de Freund incompleto (AFI). Un grupo de ratones vacunados solo con adyuvante fue utilizado como control.

Se extrajeron muestras de sangre de todos los ratones los días 0, 14 y 28. El suero fue separado y almacenado a -20°C hasta su análisis.

4.2.7. Desafío de ratones inmunizados

En ensayos de protección activa, 14 días después de la última inmunización los ratones inmunizados i.p. (n=10), fueron sedados y desafiados por instilación en las fosas nasales con 50 µl de PBS conteniendo $1,5 \times 10^6$ UFC de *B. parapertussis* CN2591 según se describió previamente [13]. Transcurridos 3 días de la infección, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los pulmones. Se determinó las UFC en los pulmones según se describió previamente.

4.2.8. Ensayos de Dot Blot

Para la inmunodetección por dot blot, muestras de células de *B. parapertussis* sonicada, de rLivJ purificada y de holotransferrina humana (para ser usada como control negativo) se aplicaron a una membrana de nitrocelulosa (Immobilon, Millipore, Bedford, Massachusetts) y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en solución de bloqueo (PBS, 0,05% v/v Tween 20, 5% p/v BSA (sigma)), y luego durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda con sueros de ratones convalecientes de infección con *B. parapertussis* o IgG purificada de humanos que padecieron tos convulsa [10]. Luego de los lavados con solución PBS con 5% p/v BSA, la unión específica de anticuerpos IgG se visualizó mediante incubación con anticuerpos de

cabra anti-IgG ratón o con anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario y NBT/BCIP (Bio-Rad, Hercules, California) como sustrato de reacción.

4.2.9. Western Blot

Para los ensayos de inmunodetección por western blot se obtuvieron muestras proteicas a partir de suspensiones *B. parapertussis* CN2591 cultivada en exceso o limitación de hierro. Muestras conteniendo igual cantidad de proteínas fueron tratadas con buffer Laemmli y analizadas mediante SDS-PAGE 12,5%. En algunos casos se utilizó proteína recombinante (rLivJ) purificada y suspendida en buffer Laemmli. Las proteínas separadas por electroforesis fueron luego transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (Immobilon PVDF Millipore). Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C en solución de bloqueo (PBS, 0,05% v/v Tween 20, 5% p/v BSA (sigma)) antes de ser incubadas con sueros de ratón anti-rLivJ, o con sueros de ratones vacunados con vacuna de células enteras de *B. pertussis*, o de ratones infectados con *B. parapertussis* durante 2 hs a temperatura ambiente. La detección inmunoquímica se realizó empleando anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con fosfatasa alcalina y NBT/BCIP (Bio-Rad) como sustrato de reacción.

En algunos ensayos de western blot se utilizó una fracción enriquecida en proteínas de membrana externa. Las mismas se obtuvieron a partir de muestras bacterianas obtenidas en limitación y exceso de hierro, como se describió anteriormente. Brevemente, 20 mg de proteínas totales fueron incubadas con una solución fría de carbonato de sodio (0,1 M, pH 11), agitadas suavemente en frío durante 1 h y sometidas a ultracentrifugación (115000 × g)

durante 1 h a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet (fracción enriquecida en proteínas de membrana externa) se suspendió en 2 ml de una solución 50 mM Tris/HCl, pH 7,5.

4.2.10. Ensayos de ELISA

Para la evaluación del título de anticuerpos anti-rLivJ, se utilizaron ensayos de ELISA. Brevemente, placas de 96 pocillos (NuncMaxisorp, Roskilde, Dinamarca) se sensibilizaron con 100 µl de una solución conteniendo 10 µg/ml de proteína recombinante (rLivJ) en buffer 0,5 M de Na₂CO₃ pH 9,6 durante 12 hs a 4°C en cámara húmeda. En ensayos de ELISA con bacterias enteras, las placas fueron sensibilizadas con *B. paraptussis* salvaje o la mutante defectiva en la expresión de antígeno O cultivadas en medio con exceso de hierro (SS) o medio libre de hierro (SS-Fe) suspendidas en PBS (DO₆₅₀: 0,1), toda la noche. Los pocillos fueron luego lavados tres veces con solución de PBS suplementada con 0,05% v/v Tween 20 (Sigma) (PBS-T) antes de realizar el bloqueo de sitios libres remanentes con 400 µl por pocillo de una solución de PBS suplementada con 10% p/v leche descremada (PBS-L) durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. Transcurrida la etapa de bloqueo, se agregaron 100 µl de diluciones seriadas de los sueros de ratones inmunizados y de suero normal de ratón en PBS-L suplementada con 0,05% v/v de Tween 20 (PBS-LT) que fueron incubados durante 2 hs a 30°C en cámara húmeda. Luego de tres lavados con PBS-LT se adicionaron 100 µl por pocillo de anti-IgG de ratón (en placas sensibilizadas con células enteras o proteína purificada), o anti-IgG1 o anti-IgG2a de ratón (en placas sensibilizadas con proteína purificada) conjugados a peroxidasa diluido en PBS-LT. Se incubó durante 2 hs a 37°C en cámara húmeda, se realizaron tres lavados con PBS-T y se agregó 100 µl por pocillo de sustrato para

peroxidasa, orto-fenilendiamina, preparado en buffer fosfato/citrato/H₂O₂ (0,1 M Na₂HPO₄ / 0,1 M ácido cítrico / 0,001% H₂O₂). Transcurridos 15 min, la reacción se detuvo mediante el agregado de 50 µl por pocillo de solución 2 M H₂SO₄. Se determinó la absorbancia a 492 nm. El título se calculó mediante el método de punto final, como la inversa de la dilución de suero más alta que dio una lectura por encima del valor de corte [14]. Suero normal de ratón fue utilizado para determinar el límite.

4.2.11. Ensayos de Opsonización

Para determinar la capacidad opsonizante de sueros de ratón anti-rLivJ se incubaron 100 µl de bacterias (DO₆₅₀: 1) con 60 µl de suero anti-rLivJ diluido 1/10, o suero normal de ratón durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS, se incubaron 30 min a 4°C con fracciones (Fab')₂ de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con PE. Luego de dos lavados con PBS las bacterias fueron fijadas con paraformaldehído 4%. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo (BD FACSCalibur™, BD Biosciences).

4.2.12. Opsonofagocitosis

Los ensayos de opsonofagocitosis se llevaron a cabo como se describe en [15]. Brevemente, *B. parapertussis* opsonizadas como se describe más arriba, fueron incubadas con PMN durante 40 min a 37°C en una relación inicial bacteria/célula (Rib/c) de 200. La fagocitosis se detuvo colocando en hielo las muestras. Para determinar el número de bacterias fagocitadas por célula se empleó doble marcación y microscopía de fluorescencia, según se describió previamente [15]. Brevemente, las células fueron fijadas con

paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Luego de la fijación, los neutrófilos se lavaron con PBS y se incubaron con NH_4Cl 50 mM durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para determinar el número de bacterias asociadas a la superficie celular de los neutrófilos las células fueron incubadas con suero policlonal anti-*B. paraptussis* de conejo (30 min a 4°C). Luego de tres lavados las células se incubaron con fragmentos F(ab')_2 de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con Cy3 durante 30 min a 4°C. Con el fin de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos todas las incubaciones fueron realizadas en presencia de 25% v/v de suero humano inactivado por calor. Para determinar el número de bacterias intracelulares las células fueron lavadas y permeabilizadas mediante la incubación con una solución de saponina 0,1% (Sigma) y BSA 0,2% (Sigma) (30 min a temperatura ambiente), seguido de la tinción de las bacterias por inmunofluorescencia indirecta. Para ello las células fueron incubadas con anticuerpos policlonales de conejo anti-*B. paraptussis* en PBS con saponina 0,1% y BSA 0,2% (30 minutos a temperatura ambiente). Luego de dos lavados con PBS con saponina 0,1% y BSA 0,2%, se incubaron con fragmentos F(ab')_2 de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con FITC (30 min a 25°C) en presencia de saponina 0,1% y BSA 0,2%. Luego de dos lavados con PBS con saponina 0,1% y BSA 0,2%, las células fueron lavadas con agua destilada para eliminar el exceso de sales, se montaron sobre portaobjetos y fueron analizadas por microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio DMLB acoplado a una cámara DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Suiza). El número de bacterias extracelulares (rojas y verdes) e intracelulares (verdes) se determinó por la observación de al menos 50 células en cada condición.

4.2.13. Análisis estadístico

La comparación de medias para dos grupos independientes fue realizada con la prueba t de Student con un grado de significación (p) de 0,05. La comparación estadística para más de dos grupos fue realizada con el análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación de los valores obtenidos (medias) se utilizó el test de Menor Diferencia Significativa (LSD) con un grado de significación (p) de 0,05.

4.3. Resultados y Discusión

Se estudiaron los dominios a través del servidor pfam [16], y se identificó un dominio de proteína periplásmica de unión de ligandos. El programa signalP, también muestra que la proteína tiene un péptido señal en sus primeros 28 aminoácidos. En general, el péptido señal es la parte N-terminal de una proteína que se dirige a la vía de secreción. La proteína a ser secretada se une a un complejo de proteínas conocido como translocón, que comprende las subunidades SecY, E y G. Durante la translocación, el péptido señal se escinde por una enzima conocida como peptidasa señal I o peptidasa líder (Lep) en bacterias[17,18]. Debido a que este fragmento N-terminal es clivado y ya no formará parte de la proteína madura, no fue incluido para el diseño de los cebadores para el clonado de expresión. Si bien el estudio de localización subcelular por herramientas bioinformáticas como pSortB [19] y SOSUI [20] la muestra como una proteína de localización periplasmática, debido a su función es posible que, al igual que AfuA e IRP1-3, esta proteína se encuentre al menos parcialmente expuesta en superficie. De cualquier manera, el hecho de que haya sido reconocida por sueros de ratones y humanos infectados lo convierte en un interesante candidato a evaluar.

4.3.1. Clonado, expresión y purificación de LivJ

Para la obtención de LivJ en forma recombinante se amplificó el gen que codifica para esta proteína a partir de ADN genómico de *B. paraptussis* utilizando cebadores específicos; como se mencionó previamente, los cebadores se diseñaron a partir del residuo 29 de la secuencia codificante (Figura 3), de manera de obtener una forma soluble de la proteína y se clonaron en el vector pET28a, generando la construcción pET28a-LivJ, que se

utilizó para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3) competentes. La expresión de la proteína recombinante se llevó a cabo mediante la inducción por agregado de IPTG siguiendo protocolos estándar de inducción. La inducción fue confirmada por electroforesis de lisados de bacterias *E. coli* obtenidas antes y después de la inducción (Figura 3C).

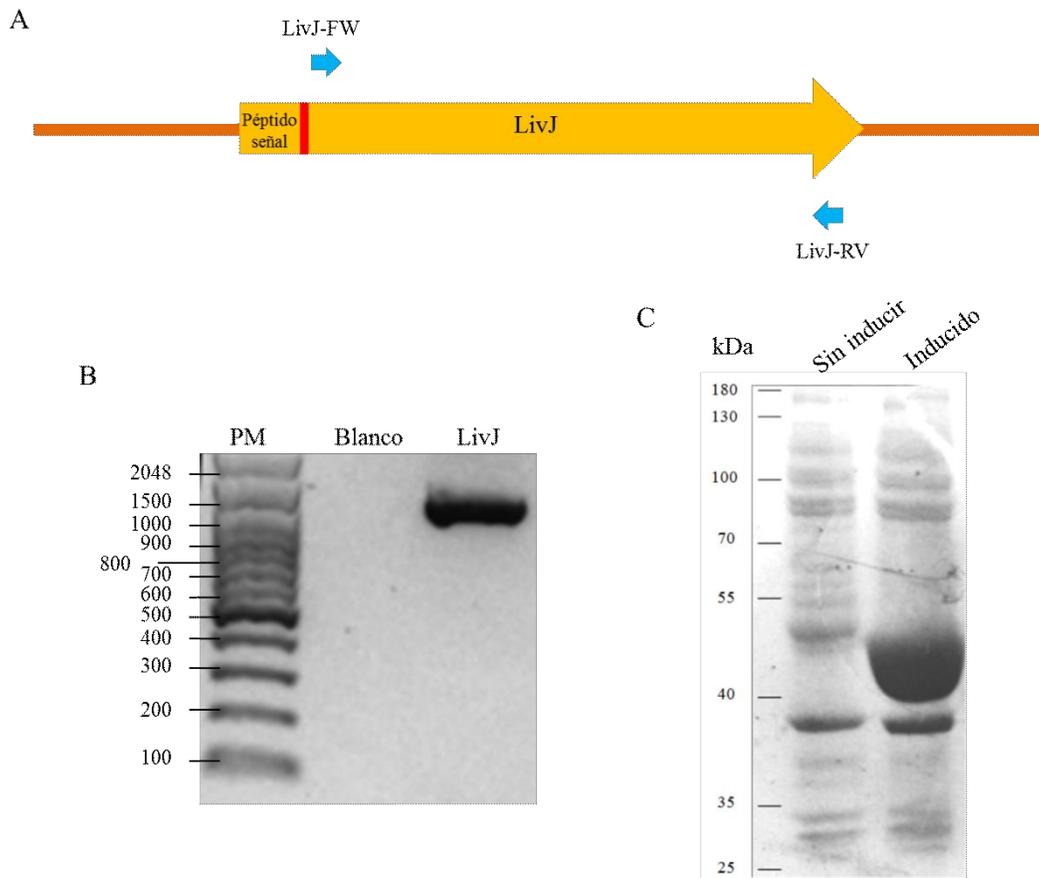


Figura 3. Obtención de LivJ en forma recombinante. A) Estrategia de clonado de LivJ B) Gel de agarosa 1% con el producto de PCR que se obtuvo a partir de ADN genómico de *B. paraptussis* CN2591 y que fue utilizado para construir el plásmido pET28a-sLivJ. C) SDS-PAGE 12,5% de bacterias antes y después de la inducción. Se observa la expresión de rLivJ al agregar IPTG.

El plásmido pET28a está diseñado de manera tal que se produzca una proteína que contiene, además de la secuencia del gen clonado, 6 residuos de histidina en el extremo N-terminal. Este diseño permite que la misma sea fácilmente purificada utilizando una

columna de cobalto. Como se observa en la Figura 4 la purificación dio como resultado una única banda de aproximadamente 40 kDa, siendo que el tamaño esperado de acuerdo a predicciones de 40,2 kDa.

Finalmente, y en forma previa a los siguientes ensayos, la proteína recombinante purificada fue enviada Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires que confirmó su identidad por MALDI-TOF.

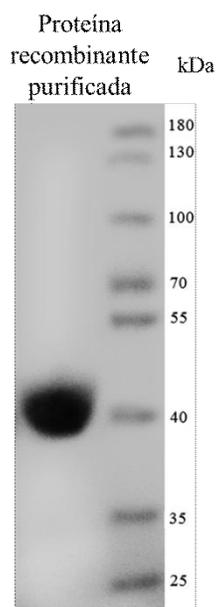


Figura 4. Purificación de rLivJ. SDS-PAGE 12,5% de rLivJ purificada utilizando columnas de cobalto a partir de un extracto crudo de proteínas de *E. coli* inducidas por 3hs con IPTG.

Una vez que esta proteína fue obtenida en forma recombinante y libre de LPS se pudo disponer de cantidad suficiente para su caracterización como antígeno vacunal. En primer lugar se evaluó si la proteína recombinante era reconocida por sueros de ratones infectados con *B. parapertussis* y anticuerpos humanos infectados. Para ello se emplearon ensayos de dot blot utilizando a la proteína recombinante como antígeno. Holotransferrina

humana fue empleada como control negativo y células de *B. parapertussis* sonicadas como control positivo. En la Figura 5 se puede observar que ambos sueros reconocen a LivJ recombinante

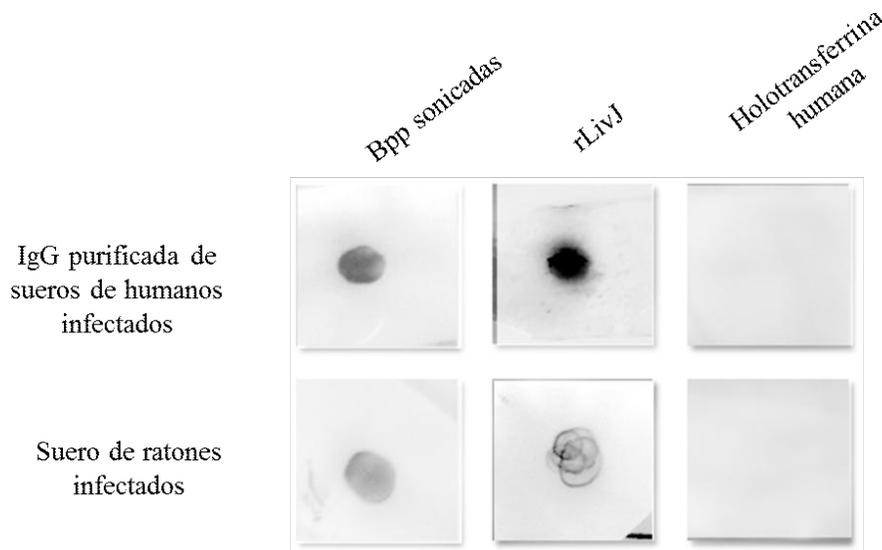


Figura 5. Reconocimiento de rLivJ por anticuerpos inducidos por infección. Membranas de nitrocelulosa fueron cargadas con la proteína recombinante, *B. parapertussis* sonicada, como control positivo, u holo transferrina humana como control negativo e incubadas con sueros de humanos o ratones infectados con *B. parapertussis* como se indica.

Dado que en estudios del análisis del seroproteoma de ratón inducido por vacuna celular contra *B. pertussis* [21] se detectaron anticuerpos contra LivJ de *B. pertussis* decidimos evaluar si dichos sueros reconocían nuestra proteína recombinante. Sueros de ratones infectados contra *B. parapertussis* que habían reconocido a la proteína recombinante en ensayos de Dot blot (Figura 5) se usaron como control positivo. Para ello, 5 μ g de proteína recombinante fueron sembradas en diferentes calles de un gel de SDS-PAGE 12,5%. Luego de la corrida electroforética las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF. Posteriormente, la membrana fue bloqueada e incubada con suero de

ratones vacunados con células enteras de *B. pertussis* o con suero de ratones infectados con *B. parapertussis*. En la Figura 6 se puede ver que ambos sueros reconocen a rLivJ.

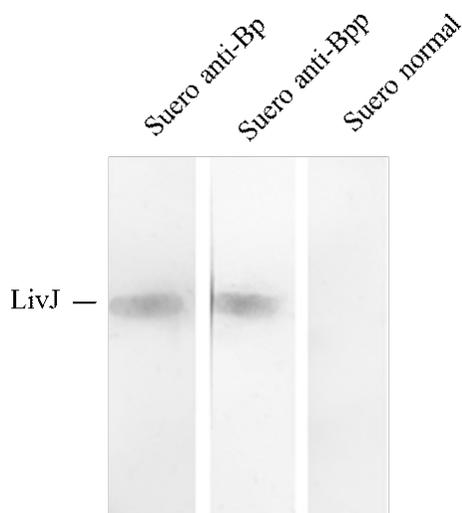


Figura 6. Detección de rLivJ por sueros de ratón anti-*B. pertussis* y anti-*B. parapertussis*. Cinco μ g de rLivJ fueron cargados en distintas calles de un gel de poliacrilamida 12,5% y transferidos. Sueros de ratones vacunados con células enteras de *B. pertussis* (Bp), suero de ratones infectados con *B. parapertussis* (Bpp), o suero normal de ratón fueron utilizados como anticuerpos primarios.

Estos resultados ponen en evidencia la similitud entre las LivJ de ambas especies y la retención de epítopes de las respectivas proteínas nativas en nuestra proteína recombinante.

4.3.2. Respuesta humoral generada por vacunación con rLivJ

Como paso siguiente, decidimos evaluar la inmunogenicidad de la proteína producida en forma recombinante. Para ello, ratones BALB/c se inmunizaron con rLivJ formulada con adyuvante de Freund completo y recibieron una dosis refuerzo a los 14 días

con la proteína en adyuvante de Freund incompleto. Como control negativo un grupo de ratones se inmunizó con adyuvante solo siguiendo el mismo plan de inmunización. Se recolectaron muestras de suero previo a cada inmunización (día 0 y día 14) y también 14 días después del refuerzo (día 28) y se utilizaron para caracterizar la respuesta humoral a la vacunación.

Como primera medida, se determinó el título de IgG anti-rLivJ inducido por las distintas inmunizaciones mediante ensayos de ELISA en placas sensibilizadas con la proteína recombinante.

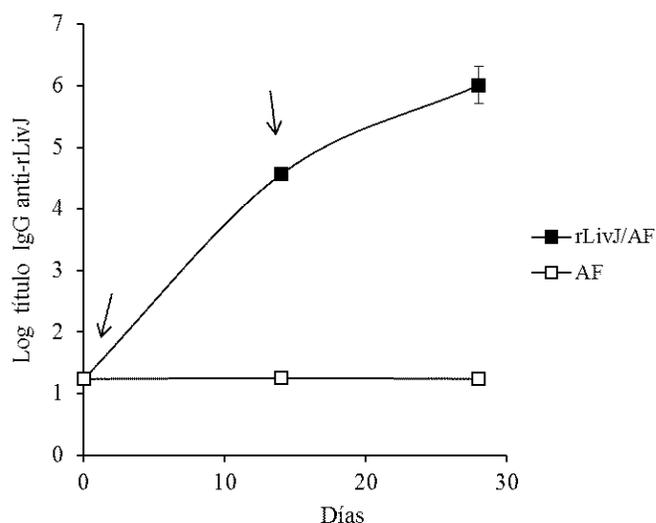


Figura 7. Título de anticuerpos anti-rLivJ inducidos por vacunación con rLivJ. Grupos de ratones fueron inmunizados los días 0 y 14 con proteína recombinante en adyuvante de Freund (rLivJ/AF) o con adyuvante de Freund (AF) solo. Los días 0, 14 y 28 se obtuvieron muestras de suero. Se muestra la evolución del título de anticuerpos IgG anti-rLivJ a lo largo del plan de vacunación. Los resultados muestran la media \pm DE de resultados representativos de dos determinaciones independientes por triplicado

La Figura 7 muestra el aumento de IgG a lo largo del esquema de inmunización. La Figura 8 muestra la distribución de isotipos de IgG anti-rLivJ en los sueros obtenidos el día 28 (14 días después de la segunda inmunización). La relación IgG1/IgG2a obtenida es de

1,19±0,15, lo que sugiere una respuesta IgG1/IgG2a balanceada similar a la obtenida para rAfuA (1,26±0,18). En ratones, la activación de linfocitos Th1, caracterizado por la producción de IFN- γ e IL-2, induce la producción de anticuerpos IgG2a mientras que la activación del subconjunto Th2 y la posterior producción de citoquinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 se asocia principalmente con el desarrollo de IgG1 y de IgE [22]. Por lo tanto, el ratio IgG1/IgG2a es una forma sencilla de obtener una aproximación del tipo de respuesta inducida por la vacunación con diversos antígenos. En este caso, los resultados sugieren que el antígeno LivJ da una respuesta balanceada entre Th1 y Th2.

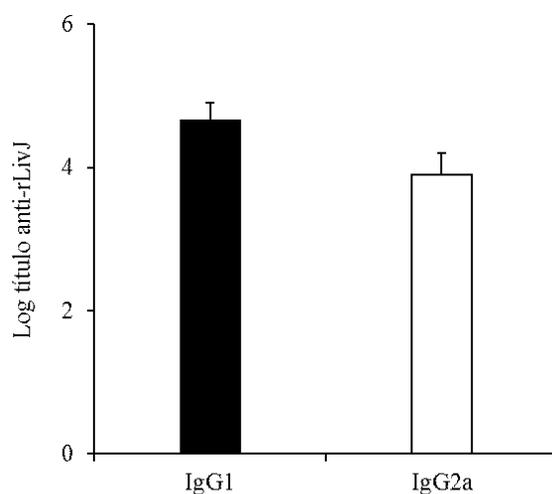


Figura 8. Distribución de isotipos IgG1 e IgG2a anti-rLivJ en sueros de ratones inmunizados con rLivJ. Grupos de ratones fueron inmunizados los días 0 y 14 con proteína recombinante. Catorce días después de la segunda inmunización se determinó el título de IgG1 e IgG2a por ELISA. Los resultados muestran la media \pm DE de resultados representativos de dos determinaciones independientes por triplicado

4.3.3. Regulación por hierro de LivJ

En el capítulo 2 de esta tesis, se encontró una discrepancia en lo observado entre dos aproximaciones proteómicas con respecto a cambios en abundancia de LivJ cuando se

comparó una condición de crecimiento estándar con una de limitación en hierro. Por un lado, la proteína se identificó como aumentada en limitación de hierro en geles bidimensionales, pero no se observaron diferencias en la proteómica *shotgun*. Para terminar de discernir este aspecto antes de seguir avanzando en esta caracterización decidimos evaluar por un lado la regulación por disponibilidad de hierro de esta proteína y por otro lado la exposición en superficie bacteriana. Para ello, en primer lugar, muestras de proteínas totales o fracciones enriquecidas en proteínas de membrana externa de *B. parapertussis* cultivada en exceso y limitación de hierro fueron sometidas a ensayos de inmunodetección (western blot) con los sueros anti-rLivJ obtenidos en ratones descritos en el apartado anterior.

La Figura 9 observa una sola banda correspondiente al peso molecular de LivJ indicando que los anticuerpos inducidos por la proteína recombinante reconocen a la proteína expresada por la bacteria en forma específica. A pesar de que los anticuerpos inducidos contra LivJ podrían ser capaces de reconocer a su parólogo, el peso molecular de ambas proteínas es muy similar (0,5 kDa de diferencia) por lo que es muy posible que en la Figura 9 la banda que se observa sea de ambas proteínas. No se observa diferencia significativa en la intensidad de la banda en ninguna de las dos muestras (células totales o fracción enriquecida con proteínas de membrana externa) en las distintas condiciones de disponibilidad de hierro, lo que sugiere que esta proteína estará expresada en forma similar en cualquiera de las dos condiciones tal como lo mostró la proteómica *shotgun*. Es posible que el aumento detectado en el análisis de los geles bidimensionales haya sido parte de un artefacto debido a la compensación necesaria para normalizar la carga proteica entre los geles analizados.

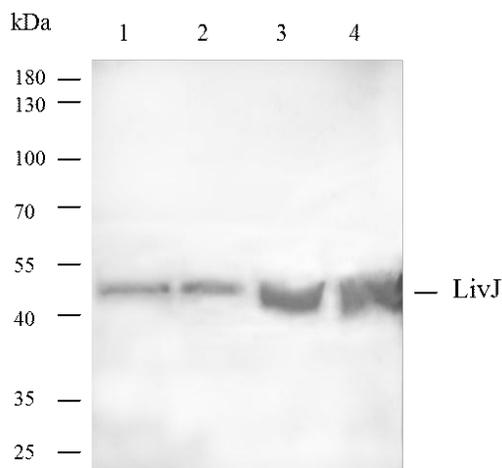


Figura 9. Expresión LivJ en *B. parapertussis* cultivada en alta y baja disponibilidad de hierro. Extractos de proteína totales de *B. parapertussis* (1 y 2) y de proteínas de membrana externa (3 y 4) cultivada en presencia (1 y 3) o ausencia (2 y 4) de hierro se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12, 5%. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF. El revelado se realizó con suero de ratón anti-rLivJ. El gel se sembró con muestras provenientes de números de bacterias equivalentes en los carriles 1 y 2, y la misma cantidad de proteína en los carriles 3 y 4.

4.3.4. Evaluación de la localización celular de LivJ

Como se mencionó en el punto anterior, la Figura 9 demuestra que rLivJ induce anticuerpos capaces de reconocer la proteína expresada por la bacteria. Por otro lado, dado que LivJ se detectó en la fracción enriquecida en proteínas de membrana externa (Figura 9), cabe suponer que esta proteína se encuentra efectivamente entre las proteínas de membrana externa pero falta evaluar si está expuesta en superficie bacteriana. Para ello se realizaron ensayos de ELISA utilizando células enteras de *B. parapertussis* cultivadas en exceso y limitación de hierro como antígeno. Como se muestra en la Figura 10, los sueros de ratones inmunizados con rLivJ reconocen a la proteína en la superficie de la bacteria en ambas condiciones de cultivo y, aunque los títulos fueron más altos cuando la placa se sensibilizó con la bacteria limitada en hierro, esta diferencia no es estadísticamente significativa. La diferencia puede deberse tanto a las pequeñas diferencias en el nivel de expresión del

antígeno como a la modificación en el antígeno O que fue mencionada en capítulos anteriores, ya que como se ve en la Figura 10 hay un poco de apantallamiento de LivJ por el antígenos O que se refleja en el mayor nivel de reconocimiento de la mutante defectiva en este antígeno (Bpp Δ wbm) en ambas condiciones de cultivo.

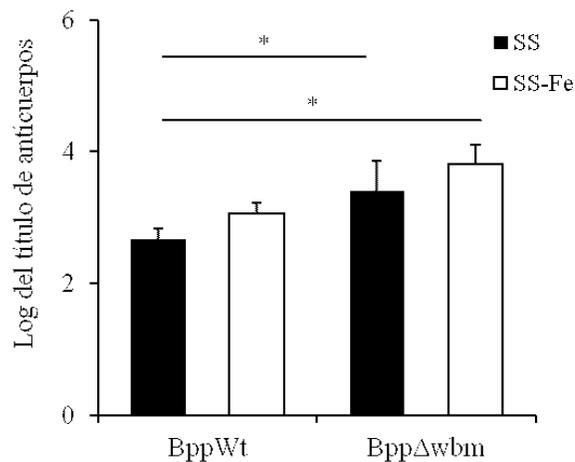


Figura 10. Detección de LivJ en superficie de *B. paraptussis*. El título de anticuerpos inducidos en ratones mediante inmunización con rLivJ se determinó mediante ELISA usando como antígeno células enteras de *B. paraptussis*. Las placas se recubrieron con *B. paraptussis* salvaje (BppWt) o *B. paraptussis* defectiva en la expresión de antígeno O (Bpp Δ wbm) cultivadas en condiciones de exceso (SS) o limitación de hierro (SS-Fe). (* $p < 0,05$). Los títulos de anticuerpos se expresan como la media del logaritmo del título de los tres sueros \pm DE de resultados representativos de dos determinaciones independientes por triplicado

Estos resultados demuestran que la proteína recombinante de LivJ es capaz de inducir anticuerpos que reconocen a la proteína nativa en la superficie en *B. paraptussis*. Por ensayo de western blot vimos solo una banda de reconocimiento tanto en el lisado de células como en la fracción enriquecida en proteínas de membrana externa (Figura 9) por lo que cabe esperar que los resultados observados en la Figura 10 se deban efectivamente al reconocimiento de LivJ en superficie bacteriana y no a un pegado inespecífico. En este

contexto, estos resultados demuestran que LivJ está accesible para anticuerpos dirigidos contra ella y con un nivel de expresión levemente aumentado en condiciones de infección (limitación de hierro). El antígeno O tiene un nivel de apantallamiento bajo sobre la proteína según los resultados de ELISA (Figura 10). Tanto el nivel de reconocimiento como el nivel de apantallamiento es similar al observado con AfuA (Capítulo 3 de esta tesis) con lo cual podría esperarse que LivJ actúe como blanco de opsoninas y, de ser así, podría esperarse que sea un antígeno protector contra *B. paraptussis*. En los apartados siguientes evaluamos esta posibilidad.

4.3.5. Actividad opsonizante y opsonofagocítica de los anticuerpos anti-rLivJ

Para evaluar si LivJ es blanco de opsoninas, incubamos anticuerpos anti-rLivJ obtenidos por inmunización de ratones con la proteína recombinante y empleamos suero normal de ratón como control negativo. Terminada la incubación las bacterias se lavaron y se incubaron un anticuerpo anti-ratón conjugado con ficoeritina (fluorescencia roja). Las bacterias se lavaron, se fijaron y se analizaron por citometría de flujo.

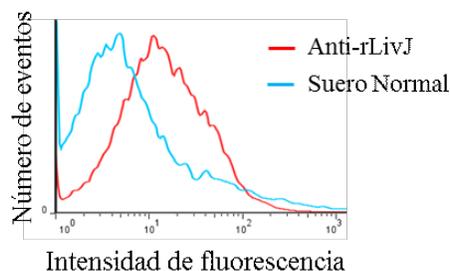


Figura 11. Oponización de *B. parapertussis* por sueros anti-rLivJ. *B. parapertussis* fue incubada con suero anti-rLivJ o suero normal de ratón durante 30 min a 37°C. Luego de los correspondientes lavados, las bacterias fueron incubadas con anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados con PE durante 30 min a 4°C, lavadas, fijadas y analizadas por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de dos experimentos independientes.

La Figura 11 muestra que los anticuerpos inducidos con rLivJ opsonizan a la bacteria, lo cual confirma la exposición en superficie bacteriana de LivJ y demuestra la afinidad de los anticuerpos inducidos por la proteína recombinante por la proteína en su conformación nativa.

Como último paso se realizaron ensayos de opsonofagocitosis. Para ello se aislaron las células polimorfonucleares (PMN) de donantes humanos sanos y incubaron con *B. parapertussis* previamente incubadas con suero de ratón anti-rLivJ o suero normal de ratón (para ser empleado como control negativo). Las bacterias fueron teñidas con doble marca fluorescente y las bacterias fagocitadas fueron contadas con un microscopio de epifluorescencia.

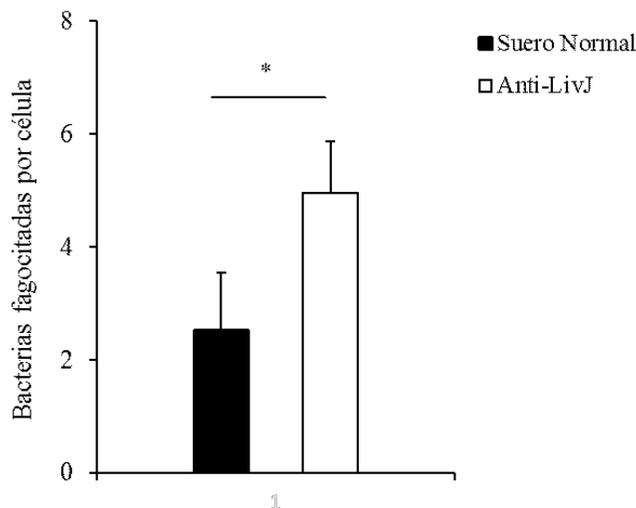


Figura 12 .Capacidad de anticuerpos anti-rLivJ de promover la fagocitosis de *B. paraptussis* por neutrófilos humanos. *B. paraptussis* opsonizada con suero anti-rLivJ, o suero normal de ratón, fue incubada con neutrófilos humanos durante 40 min a 37°C. Las bacterias fueron detectadas mediante doble marcación fluorescente (las intracelulares con verde y las extracelulares con verde y rojo) y microscopía de fluorescencia. Los datos graficados representan la media ± DE de resultados representativos de dos determinaciones independientes por utilizando neutrófilos de diferentes donantes (*p<0,05).

Como se observa en la figura 12, el suero anti-rLivJ induce anticuerpos opsonizantes de *B. paraptussis* y promueve la fagocitosis de la bacteria mediada por receptores Fc lo cual se espera que resulte en actividad celular bactericida. Algo que no ocurre si la fagocitosis de esta bacteria no es mediada por anticuerpos [15]. Cabe señalar sin embargo, que al compararlo con los valores de opsonofagocitosis mostrados en el capítulo anterior de esta tesis, se observa que la actividad opsonofagocítica inducida por rLivJ es significativamente menor que la inducida por rAfuA, por ejemplo. Esto puede deberse a menor afinidad de los anticuerpos dirigidos contra LivJ, entre otras posibilidades

4.3.6. Evaluación de la capacidad protectora de la proteína rLivJ

Finalmente, y para determinar si rLivJ tiene actividad protectora contra infecciones de *B. paraptussis*, se evaluó la protección activa en modelo murino de infección

intranasal. Grupos de ratones hembra BALB/c se vacunaron a los días 0 y 14 con rLivJ en adyuvante de Freund completo en la primera dosis, e incompleto en la segunda. Un grupo de ratones inoculados solamente con adyuvante fue utilizado como control. Al día 28, los ratones fueron desafiados por inoculación intranasal de *B. parapertussis*. Al tercer día post-desafío los ratones fueron sacrificados y los pulmones fueron extraídos para realizar recuento de bacterias UFC como se explicó anteriormente.

Tabla 1. Protección contra la infección por *B. parapertussis* conferida por inmunización con rLivJ

Vacuna	log CFU en pulmones ^a	Unidades de protección ^b
rLivJ/FA	6,49 ± 0,12	-0,17
PBS/FA	6,32 ± 0,17	--

^a La carga bacteriana es representada como la media del Log UFC ± DE para cada grupo

^b Las unidades de protección fueron obtenidas mediante la substracción de la media del Log UFC del grupo vacunado a la media del Log UFC del grupo control (PBS/AF)

Como se observa en la Tabla 1, este antígeno no mostró capacidad protectora contra infecciones de *B. parapertussis* en las condiciones ensayadas, ya que no se observaron diferencias significativas en la protección del grupo ratones vacunados con rLivJ y el grupo control. En un trabajo previo se observó que LivJ de *B. bronchiseptica* es un antígeno que induce una fuerte respuesta humoral pero en un modelo de dosis letal no logró un aumento significativo en la curva de sobrevivencia de los ratones vacunados [23]. Si bien LivJ es un antígeno relativamente abundante en células de *B. parapertussis* según los resultados de las proteómicas descritas el Capítulo 2 es posible que la densidad del antígeno en la superficie bacteriana durante la infección no sea suficiente para que la bacteria sea opsonizada eficientemente. En un estudio del exoproteoma de *E. coli* se observa que dependiendo de las condiciones de cultivo, la bacteria libera mayores cantidad de LivJ al medio extracelular [24], por lo que es posible que, *in vivo*, haya una mayor secreción de LivJ disminuyendo la

densidad de la proteína en superficie. Si este fuese el caso, LivJ de *B. parapertussis* no sería un buen blanco de opsoninas.

4.4. Conclusión

En este capítulo se caracterizó un inmunógeno identificado a través de una combinación de proteómica comparativa e inmunoproteómica como potencial antígeno vacunal. Si bien los resultados de este capítulo sugieren que esta no es una proteína regulada por hierro, se puede afirmar que se expresa en el fenotipo infectante ya que es reconocida por sueros de infectados. La proteína recombinante obtenida a partir de ADN de *B. parapertussis* mostró ser un antígeno que induce una importante respuesta humoral y una respuesta balanceada Th1/Th2, según los perfiles de isotipos obtenidos. Los anticuerpos generados por la proteína recombinante reconocen a la proteína nativa en la superficie bacteriana y, la opsonizan. A pesar de eso y de que se observó actividad opsonofagocítica *in vitro*, este antígeno no logró disminuir la carga de la infección en modelos murinos. Esto puede deberse a una menor disponibilidad del antígeno en la superficie bacteriana durante la infección o a una baja avidéz de los anticuerpos inducidos por vacunación. Nuevas estrategias están siendo implementadas para evaluar si este antígeno puede ser considerado para estudios futuros, o debe descartarse como antígeno vacunal.

4.5. Bibliografia

- [1] S. Trakhanov, N.K. Vyas, H. Luecke, D.M. Kristensen, J. Ma, F.A. Quioco, Ligand-free and -bound structures of the binding protein (LivJ) of the Escherichia coli ABC leucine/isoleucine/valine transport system: Trajectory and dynamics of the interdomain rotation and ligand specificity, *Biochemistry*. 44 (2005) 6597–6608. doi:10.1021/bi047302o.
- [2] T.E. Molzen, P. Burghout, H.J. Bootsma, C.T. Brandt, C.E.V. Der Gaast-De Jongh, M.J. Eleveld, M.M. Verbeek, N. Frimodt-Møller, C. Ostergaard, P.W.M. Hermans, Genome-wide identification of streptococcus pneumoniae genes essential for bacterial replication during experimental meningitis, *Infect. Immun*. 79 (2011) 288–297. doi:10.1128/IAI.00631-10.
- [3] S. Basavanna, S. Khandavilli, J. Yuste, J.M. Cohen, A.H.F. Hosie, A.J. Webb, G.H. Thomas, J.S. Brown, Screening of Streptococcus pneumoniae ABC transporter mutants demonstrates that livJHMGF, a branched-chain amino acid ABC transporter, is necessary for disease pathogenesis, *Infect. Immun*. 77 (2009) 3412–3423. doi:10.1128/IAI.01543-08.
- [4] D.A. Ribardo, D.R. Hendrixson, Analysis of the LIV system of Campylobacter jejuni reveals alternative roles for livJ and livK in commensalism beyond branched-chain amino acid transport, *J. Bacteriol*. 193 (2011) 6233–6243. doi:10.1128/JB.05473-11.
- [5] J.C. Kaiser, D.E. Heinrichs, Branching out: Alterations in bacterial physiology and virulence due to branched-chain amino acid deprivation, *MBio*. 9 (2018) 1–17. doi:10.1128/mBio.01188-18.
- [6] T.K. Wagner, M.H. Mulks, A subset of Actinobacillus pleuropneumoniae in vivo induced promoters respond to branched-chain amino acid limitation, *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 48 (2006) 192–204. doi:10.1111/j.1574-695X.2006.00147.x.
- [7] A. Preston, A.G. Allen, J. Cadisch, R. Thomas, K. Stevens, C.M. Churcher, K.L. Badcock, J. Parkhill, B. Barrell, D.J. Maskell, Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in bordetellae, *Infect. Immun*. 67 (1999) 3763–3767. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=96651&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [8] B. Schwyn, J.B. Neilands, Universal Chemical Assay for the Detection Determination of Siderophores, *Anal. Biochem*. 56 (1987) 47–56.
- [9] X. Zhang, M.E. Rodríguez, E.T. Harvill, O antigen allows B. parapertussis to evade B. pertussis vaccine-induced immunity by blocking binding and functions of cross-reactive antibodies, *PLoS One*. 4 (2009) e6989. doi:10.1371/journal.pone.0006989.
- [10] J. Nagel, E.J. Poot-Scholtens, Serum IgA antibody to Bordetella pertussis as an indicator of infection, *J. Med. Microbiol*. 16 (1983) 417–426.
- [11] S.M. Hellwig, H.F. van Oirschot, W.L. Hazenbos, a B. van Sriel, F.R. Mooi, J.G. van De Winkel, Targeting to Fcγ receptors, but not CR3 (CD11b/CD18), increases clearance of Bordetella pertussis, *J. Infect. Dis*. 183 (2001) 871–879. doi:10.1086/319266.
- [12] J. Alvarez Hayes, E. Erben, Y. Lamberti, M. Ayala, F. Maschi, C. Carbone, B. Gatti, G. Parisi, M.E. Rodríguez, Identification of a new protective antigen of Bordetella pertussis, *Vaccine*. 29 (2011) 8731–8739. doi:10.1016/j.vaccine.2011.07.143.

- [13] J. Alvarez Hayes, E. Erben, Y. Lamberti, G. Principi, F. Maschi, M. Ayala, M.E. Rodríguez, Bordetella pertussis iron regulated proteins as potential vaccine components, *Vaccine*. 31 (2013) 3543–3548. doi:10.1016/j.vaccine.2013.05.072.
- [14] A. Frey, J. Di Canzio, D. Zurakowski, A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays, *J. Immunol. Methods*. 221 (1998) 35–41. doi:10.1016/S0022-1759(98)00170-7.
- [15] J. Gorgojo, Y. Lamberti, H. Valdez, E.T. Harvill, M.E. Rodríguez, Bordetella parapertussis Survives the Innate Interaction with Human Neutrophils by Impairing Bactericidal Trafficking inside the Cell through a Lipid Raft-Dependent Mechanism Mediated by the Lipopolysaccharide O Antigen, *Infect. Immun.* 80 (2012) 4309–4316. doi:10.1128/IAI.00662-12.
- [16] E.L.L. Sonnhammer, S.R. Eddy, R. Durbin, Pfam: A comprehensive database of protein domain families based on seed alignments, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 28 (1997) 405–420. doi:10.1002/(SICI)1097-0134(199707)28:3<405::AID-PROT10>3.0.CO;2-L.
- [17] M. Pohlschroder, W.A. Prinz, E. Hartmann, J. Beckwith, M. Delbru, Protein Translocation in the Three Domains of Life: Variations on a Theme, *Ce.* 91 (1997) 563–566.
- [18] H. Nielsen, Predicting secretory proteins with SignalP, *Methods Mol. Biol.* 1611 (2017) 59–73. doi:10.1007/978-1-4939-7015-5.
- [19] N.Y. Yu, J.R. Wagner, M.R. Laird, G. Melli, S. Rey, R. Lo, P. Dao, S. Cenk Sahinalp, M. Ester, L.J. Foster, F.S.L. Brinkman, PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes, *Bioinformatics*. 26 (2010) 1608–1615. doi:10.1093/bioinformatics/btq249.
- [20] K. Imai, N. Asakawa, T. Tsuji, F. Akazawa, A. Ino, M. Sonoyama, S. Mitaku, SOSUI-GramN: high performance prediction for sub-cellular localization of proteins in Gram-negative bacteria, *Bioinformation*. 2 (2008) 417–421. doi:10.6026/97320630002417.
- [21] Y.Z. Zhu, C.S. Cai, W. Zhang, H.X. Guo, J.P. Zhang, Y.Y. Ji, G.Y. Ma, J.L. Wu, Q.T. Li, C.P. Lu, X.K. Guo, Immunoproteomic analysis of human serological antibody responses to vaccination with whole-cell pertussis vaccine (WCV), *PLoS One*. 5 (2010) e13915. doi:10.1371/journal.pone.0013915.
- [22] M.V. Lavigne, M. Castro, N. Mateo, S. Deluchi, C. Atzori, L. Piudo, M. Calcagno, M.L. Brero, M. Manghi, Whole-cell Bordetella pertussis vaccine component modulates the mouse immune response to an unrelated soluble antigen, *Microbes Infect.* 4 (2002) 815–820. doi:10.1016/S1286-4579(02)01601-5.
- [23] Y. Liu, H. Chen, Q. Wei, C. Xiao, Q. Ji, G. Bao, Immune efficacy of five novel recombinant Bordetella bronchiseptica proteins, *BMC Vet. Res.* 11 (2015) 173. doi:10.1186/s12917-015-0488-4.
- [24] X.X. Xia, M.J. Han, Y.L. Sang, J.S. Yoo, Comparison of the extracellular proteomes of Escherichia coli B and K-12 strains during high cell density cultivation, *Proteomics*. 8 (2008) 2089–2103. doi:10.1002/pmic.200700826.

Capítulo 5

Comparación entre las especies causantes de la tos convulsa. Búsqueda de determinantes de patogenicidad

5. COMPARACIÓN ENTRE LAS ESPECIES CAUSANTES DE LA TOS CONVULSA. BÚSQUEDA DE DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD

5.1. Introducción

A partir de este trabajo de tesis y de trabajos anteriores realizados por nuestro grupo, contamos con varios perfiles proteómicos que contienen información sobre las proteínas expresadas por *B. pertussis* y *B. parapertussis* en diversas condiciones de crecimiento.

Como se mencionó previamente, el secuenciamiento de las cepas de *B. pertussis* Tohama I y de *B. parapertussis* 12822 mostró que el genoma de esta última es más grande, conteniendo 588 marcos de lectura abierta más que el genoma de *B. pertussis*. La disponibilidad de genomas completos es crucial para poder hacer genómica comparativa. La disponibilidad de secuencias genómicas completas ofrece la posibilidad de identificar ortólogos, es decir genes que evolucionaron a partir de el mismo gen ancestral, y es condición necesaria para determinar ausencia o presencia de genes en una cepa en particular. La capacidad de delinear conjuntos de ortólogos y de identificar genes faltantes es indispensable para la reconstrucción del metabolismo de un organismo y otros sistemas funcionales y para las reconstrucciones de la evolución del genoma.

En los últimos años, con el incremento de las secuencias genómicas disponibles se han creado muchas herramientas para su análisis. Varios estudios recientes han proporcionado evidencia que sugiere que los genomas bacterianos son en realidad mosaicos que incluyen genes compartidos por todos los aislados de un grupo (genoma central), así como también genes específicos. La suma del genoma central y los genes restantes propio de cada cepa incluida dentro del grupo se define como el pan-genoma. Definir el pan-genoma de una bacteria arroja luz sobre su biología y ciclo de vida.

En este capítulo construimos dos pangenomas utilizando los genomas de varias cepas de *B. pertussis* y de *B. parapertussis*, respectivamente, para analizar la variabilidad de cada especie por separado. Luego, construimos un pangenoma con los genomas de las cepas de referencia de cada especie (*B. pertussis* Tohama I y de *B. parapertussis* 12822) con el fin de identificar genes sin ortólogos en la otra especie. Utilizando esta información seleccionamos para un posterior análisis aquellos genes sin ortólogos que se hubieran encontrado expresados en el estudio proteómico realizado en el Capítulo 2 de esta Tesis en un intento por avanzar en la comprensión de las bases moleculares de las diferencias entre estas dos especies estrechamente relacionadas.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y limitación

Para los estudios realizados en este capítulo, se emplearon las siguientes cepas, *B. parapertussis* CN2591 (cepa salvaje), una cepa mutante isogénica defectiva en la expresión del antígeno O denominada CN2591 Δ wbm (*B. parapertussis* Δ wbm) [1] y *B. pertussis* Tohama I. Para los ensayos de aglutinación y adhesión, estas cepas se transformaron con el plásmido pCW505 (suministrado amablemente por Alison Weiss, Cincinnati, OH) que induce la expresión citoplásmica de la proteína fluorescente verde (GFP) sin afectar el crecimiento o la expresión de antígenos [2]. Las bacterias fueron cultivadas en placas de Agar Bordet Gengou (DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan), suplementada con 15% v/v de sangre desfibrinada de carnero (ABGs), por 3 días a 37°C en el caso de *B. pertussis*, o 2 días en el caso de *B. parapertussis*. Al cabo de este tiempo se repicó en una nueva placa ABGs y se cultivó a 37°C durante 20 hs. Del cultivo en medio sólido se extrajo el inóculo para el cultivo en medio líquido Stainer-Scholte (SS).

5.2.2. Anticuerpos

El suero de conejo anti-Fimbria de *B. pertussis* (suero anti-Fim) y el suero normal de conejo se obtuvieron como se mencionó previamente [4]. Anticuerpos de cabra anti-IgG conejo conjugada con HRP (Sigma, Saint Louis, MO) fueron utilizados en ELISA.

5.2.3. Línea celular

Células epiteliales bronquiales humanas 16HBE14o- (cedidas gentilmente por el Dr. Dieter Gruenert, Universidad de San Francisco, California) se cultivaron en botellas

tratadas con 10 mg/l de fibronectina, 10 ml/l de colágeno bovino y 0,1 g/l de seroalbúmina bovina (BSA) (todos de Sigma, Saint Louis, Missouri) en medio MEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) (ambos de GIBCO BRL, Grand Island, New York) al 10% a 37°C, 5% de CO₂ tal como se describió previamente [5]. Las células se cultivaron hasta el 80% de confluencia, se levantaron con 0,25% v/v tripsina-0,1% p/v EDTA (Sigma) (5 min a 37° C) y se cultivaron en placas de 24 pocillos (2×10⁵ células por pocillo) previamente tratadas con fibronectina, colágeno, BSA por 18 hs previo a la infección.

5.2.4. Prueba de ELISA

Los títulos de anticuerpos se determinaron mediante ELISA, como se describió previamente [6]. Brevemente, se colocaron en placas de ELISA (NuncMaxisorp, Roskilde, Dinamarca) 100 µl por pocillo de *B. pertussis*, *B. parapertussis* cepa salvaje o *B. parapertussis* Δwbm (DO₆₅₀: 1) en PBS y se incubaron durante la noche a 4°C en cámara húmeda. Las placas recubiertas se lavaron tres veces con PBS -Tween 20 (Sigma) al 0,05% p/v y se bloquearon con PBS con leche descremada al 10% p/v durante 1 h a 37°C. Se prepararon diluciones seriadas de suero de conejo anti-Fim o suero normal de conejo en PBS conteniendo 5% p/v de leche descremada y 0,05% de Tween 20, y se agregaron 100 µl por pocillo. Las placas se incubaron durante 2 horas a 30°C. Anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugada con HRP seguido por OPD (O-fenilendiamina de Sigma) y H₂O₂, se emplearon en el revelado. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico 2 M y se determinó la absorbancia a 492 nm. El título se calculó mediante el método de punto final, como la inversa de la dilución de suero más alta que dio una lectura por encima del límite [7]. Suero normal fue utilizado para determinar el límite.

5.2.5. Ensayo de aglutinación

La actividad aglutinante de los anticuerpos anti-Fim de *B. pertussis* se determinó como se describió anteriormente [4]. Brevemente, 100 μ l de GFP-*B. pertussis* o GFP-*B. parapertussis* cultivadas en medio SS (OD₆₅₀: 1) se incubaron durante 1 hora a 37°C con diluciones seriadas de suero de conejo anti-Fim de *B. pertussis* o suero normal de conejo como control negativo. La aglutinación se visualizó con un microscopio de fluorescencia (DMLB acoplado a una cámara DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Suiza).

5.2.6. Ensayos de adhesión bacteriana a células bronquiales

Células 16HBE14o- cultivadas por 18 horas sobre cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos se incubaron con GFP-*B. pertussis*, GFP-*B. parapertussis* o GFP-*B. parapertussis* Δ wbm con una multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula en presencia o ausencia de anticuerpos anti-Fim de *B. pertussis*. Para facilitar la interacción de las bacterias con las células, las placas se centrifugaron durante 5 minutos a 340 \times g, a temperatura ambiente y se incubaron 4 horas a 37°C en 5% (v/v) de CO₂, las células se lavaron dos veces para eliminar las bacterias no unidas. Las células se fijaron usando paraformaldehído al 4%, se lavaron con PBS y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con PBS que contenía NH₄Cl 50 mM. Después de la fijación las células se incubaron 5 min con 5 μ g/ml de yoduro de propidio (Sigma) para la tinción de núcleos. Después de varios lavados, los vidrios con las células se montaron en portaobjetos y se analizaron por microscopia de fluorescencia con un microscopio DMLB acoplado a una cámara DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd.). El número de bacterias (verde

fluorescente) por célula se determinó mediante examen microscópico de al menos 10 campos seleccionados al azar con un mínimo de cinco células por campo.

5.2.7. Análisis estadístico

La comparación de medias para dos grupos independientes fue realizada con la prueba t de Student con un grado de significación (p) de 0,05. La comparación estadística para más de dos grupos fue realizada con el análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación de los valores obtenidos (medias) se utilizó el test de Menor Diferencia Significativa (LSD) con un grado de significación (p) de 0,05.

5.3. Resultados y Discusión

5.3.1. Comparación de genomas de *B. parapertussis*

Como paso previo al estudio comparativo de los genomas de *B. pertussis* y *B. parapertussis*, se utilizaron las herramientas bioinformáticas para evaluar la hipótesis formulada por otros autores [8,9], de que existe muy poca diversidad genética entre las cepas circulantes de *B. parapertussis*. Para ello se trabajó con los 19 genomas completos disponibles en el NCBI. Los genomas fueron alineados para construir un árbol filogenético utilizando REALPHY [10].

En la Figura 1 se observa que los genomas de *B. parapertussis* en el árbol filogenético se separan según el año de aislamiento. Por otro lado, los genomas de los aislados de Alemania de 1993 están más cercanos entre sí que uno del mismo año de Estados Unidos. Esto sugiere que, a pesar de su limitada variabilidad genética, *B. parapertussis* presenta ciertas diferencias dependiendo del año y lugar de origen. Finalmente, los aislados de Estados Unidos del año 2012 tienen mutaciones en el gen de pertactina (*prn*), algo similar a lo observado con los aislados clínicos de *B. pertussis* y también de *B. parapertussis* en Francia [11]. Las mutaciones en pertactina son consideradas un mecanismo de evasión de la respuesta inmune inducida por las vacunas acelulares. La aparición de cepas de *B. parapertussis* sin pertactina en lugares donde solo se aplica dicha vacuna pone en duda la falta de protección muchas veces observada [12]. En ese sentido, algunos trabajos tanto de epidemiología como de evaluación en modelos murinos sugieren cierto grado de protección conferido por dicha vacuna que podría explicar esta selección de mutantes entre las cepas circulantes [13,14].

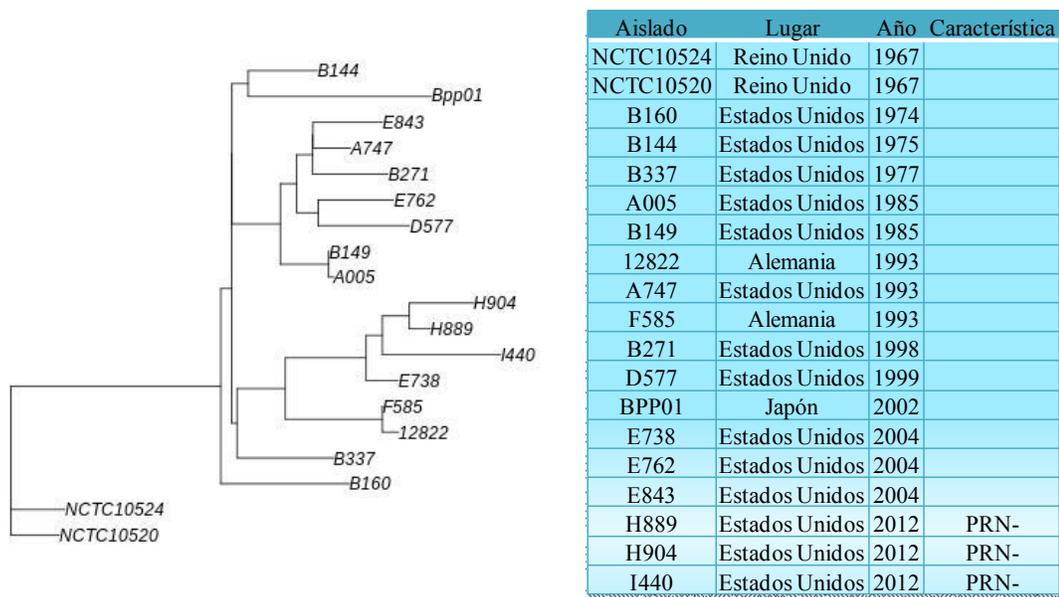


Figura 1. Relación filogenética a partir de los genomas de los 19 aislados de *B. parapertussis* secuenciados.

Al analizar los genomas de *B. parapertussis* con el software GET_HOMOLOGUES [15], utilizando el método OrthoMCL [16], se observa que de un total de 4126 genes en clústeres conteniendo genes homólogos, 4007 se encuentran codificados en los 19 genomas analizados, y 34 en 18 de ellos (Figura 2). Muy pocos se encuentran solo en uno o dos genomas, lo cual confirma que *B. parapertussis* ha cambiado muy poco a lo largo del tiempo. *B. pertussis*, en cambio, ha tenido una gran variación a lo largo del tiempo. Por ejemplo, un análisis similar fue realizado con 5 genomas de *B. pertussis* y de 4660 clústeres conteniendo genes homólogos, solo 2896 son compartidos por todos (Figura 3). Esto demuestra que la población de *B. parapertussis* es más homogénea. Se cree que la gran variación de *B. pertussis* a lo largo del tiempo es debida a la presión de selección inducida por las vacunas. El relevamiento de cepas de *B. pertussis* circulantes a lo largo del tiempo ha mostrado una inmunoselección dinámica dirigida por vacunación a lo largo de los años

[17]. Algo que no ha sucedido con *B. parapertussis* por la escasa protección cruzada de la vacuna contra la tos convulsa mencionada en los primeros capítulos de este trabajo de Tesis.

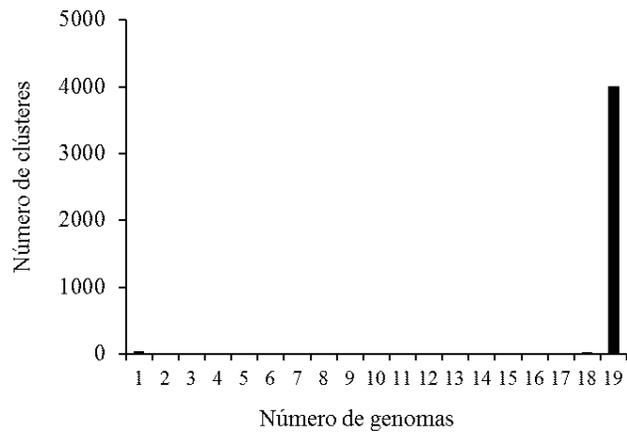


Figura 2. Análisis del pangenoma a partir de 19 genomas de *B. parapertussis*. Se muestra el número de clústeres compartido por todos los aislados o por un número determinado de ellos

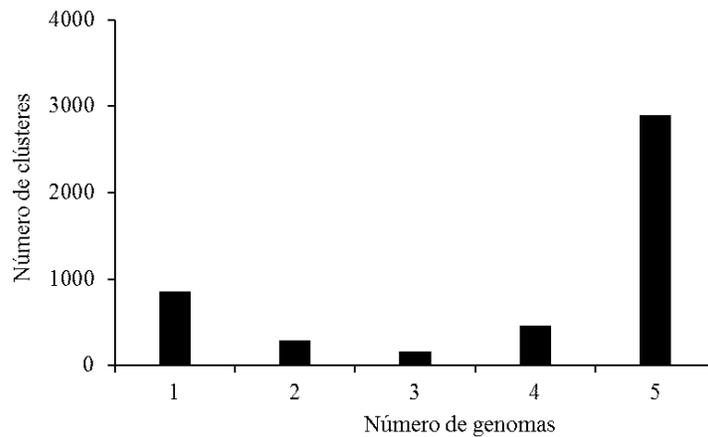


Figura 3. Análisis del pangenoma a partir de 5 genomas de *B. pertussis*. Se muestra el número de clústeres compartido por todos los aislados o por un número determinado de ellos.

5.3.2. Proteínas de *B. parapertussis* ausentes en el genoma de *B. pertussis*

La comparación entre las secuencias de los genomas de *B. pertussis* y las cepas de linaje humano de *B. parapertussis* sugiere que ambas especies derivan de un ancestro

común similar a *B. bronchiseptica*. Sin embargo, de acuerdo con Diavatopolous y colaboradores [18], *B. pertussis* y *B. parapertussis* pueden haber derivado de distintos clones de *B. bronchiseptica* y la adaptación al entorno humano puede haber ocurrido como dos eventos independientes separados en el tiempo, tal como se menciona en el Capítulo 1 de esta Tesis. La transición de aquel ancestro con capacidad de infectar muchas especies de mamíferos a las especies actuales restringidas a humanos, fue acompañada por la pérdida de un gran número de genes y, generación de pseudogenes y elementos de inserción. Dado que como parte de este trabajo de tesis se obtuvo la primera caracterización proteómica de *B. parapertussis*, se realizó también una búsqueda de aquellas proteínas identificadas en *B. parapertussis* que están ausentes o anotadas como pseudogenes en el genoma de *B. pertussis*. Con este fin, se empleó el software GET_HOMOLOGUES [15], utilizando el método OrthoMCL [16]. El pangenoma obtenido con esta técnica para estas dos cepas contiene 4301 clústeres de genes homólogos, de los cuales 291 son únicos de *B. pertussis*, mientras que 1157 solo se encontraron en el genoma de *B. parapertussis*.

Ciento cuarenta y cinco (145) proteínas de *B. parapertussis* identificadas en el estudio de proteómica descrito en el Capítulo 2 no tienen ortólogos codificados en el genoma de *B. pertussis* Tohama I (Tabla 1).

Entre ellas, se identificaron cuatro proteínas que contienen dominios de proteínas de estrés universal o USP (BPP1099, BPP1590, BPP3176, BPP4064). Estas proteínas se acumulan en distintas condiciones de stress, como estrés osmótico, oxidativo e incluso en limitaciones nutricionales [19]. En estudios recientes de *Brucella abortus* se ha observado el aumento de este tipo de proteínas en la fase intracelular de persistencia de este patógeno [20]. Este dominio ha sido relacionado también con la sobrevivencia de *Mycobacterium smegmatis* dentro de macrófagos y con su virulencia en modelos murinos [21]. Estas

proteínas se consideran involucradas en la patogenicidad porque sustentan la resistencia bacteriana a las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno generadas como parte de la defensa del hospedador. Otras proteínas relacionadas con el estrés oxidativo que se encontraron en el proteoma de *B. parapertussis* y que no están presentes en el genoma de *B. pertussis* son *osmC* (BPP1969), una chaperona (BPP2690) y el citocromo *c5* (BPP4111). Se ha visto que el citocromo *c5* en *Neisseria gonorrhoea* aumenta la tolerancia y resistencia al oxígeno y al estrés oxidativo. Los patógenos de mamíferos deben sobrevivir a la presencia de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno durante la colonización del hospedador, la expresión de este grupo de proteínas sugiere que *B. parapertussis* es una especie más resistente a condiciones de estrés lo cual podría explicar en parte la gran persistencia de esta especie en el hospedador.

Otra proteína interesante encontrada solo en *B. parapertussis* es *gshA* (BPP4089). Esta enzima cataliza la conversión de glutamato y cisteína en glutatión [22]. Este hallazgo sugiere que, a diferencia de *B. pertussis*, *B. parapertussis* podría sintetizar glutatión, un factor esencial para el crecimiento de *B. pertussis* incluida en la formulación del medio SS [23]. Con el fin de investigar si *B. parapertussis* puede crecer sin necesidad de una fuente externa de glutatión, se usó medio SS formulado con o sin glutatión para cultivar *B. pertussis* y *B. parapertussis* y se tomaron muestras a lo largo del cultivo. Las curvas de crecimiento (Figura 4), mostraron que *B. pertussis* no es capaz de crecer en medios SS sin la adición de glutatión; ya que no se observó aumento en la densidad óptica a partir de las 5 hs; mientras que el crecimiento de *B. parapertussis* no mostró diferencias significativas en medios SS formulados con o sin glutatión. Estos resultados sugieren que, a diferencia de *B. pertussis*, *B. parapertussis* sintetiza glutatión o no lo necesita. El glutatión le confiere a la bacteria resistencia a múltiples formas de estrés como estrés osmótico, oxidativo y

toxicidad por cationes metálicos divalentes [24]. Por otro lado, *gshA* también ha sido descrita como una proteína involucrada en la resistencia de la bacteria al estrés ácido y es considerada un factor de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* [25,26]. En resumen, estos resultados muestran nuevamente que *B. parapertussis* podría tener una defensa más robusta que *B. pertussis* frente a las situaciones de estrés que podría explicar la ventaja de competitiva de *B. parapertussis* en infecciones mixtas [27]. Esta ventaja competitiva también podría sustentarse en que, según nuestros resultados, *B. parapertussis* expresa una bacteriocina, linocina M18 (BPP1410) que no expresa *B. pertussis*. Las bacteriocinas son toxinas que inhiben el crecimiento de otras bacterias y permiten la competencia por diversos nichos ecológicos [28].

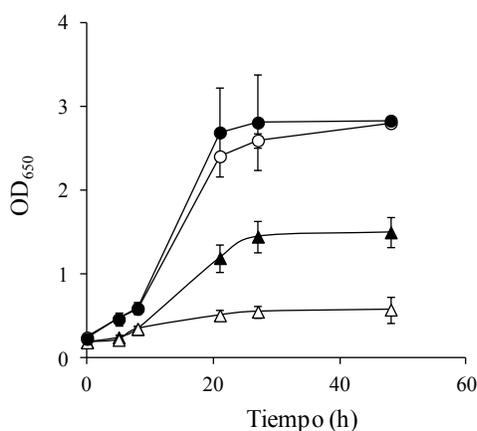


Figura 4. Curva de crecimiento de *B. parapertussis* en SS y SS sin glutatión (círculos negros y blancos, respectivamente), y de *B. pertussis* en SS y SS sin glutatión (triángulos negros y blancos, respectivamente). Se muestran las medias \pm DE de valores obtenidos por duplicados de un experimento representativo de dos ensayos independientes.

Recientemente, se ha encontrado que *B. parapertussis* es capaz de sobrevivir y persistir dentro de macrófagos humanos y que esto podría constituir una estrategia de persistencia importante dentro del hospedador [29]. En este estudio identificamos dos

proteínas involucradas en la ruta de degradación de itaconato, BPP3645 y BPP3643. No se encontró ningún ortólogo de de estos genes en *B. pertussis*. La degradación del itaconato se ha descrito en otras especies como *Salmonella typhimurium* y *Yersinia pestis*, como beneficiosa para la supervivencia bacteriana dentro de los macrófagos, ya que el itaconato producido por estas células afecta el crecimiento bacteriano al inhibir el ciclo del glioxilato [30–32]. Aunque no realizamos estudios comparativos de la sobrevivencia intracelular de *B. pertussis* y *B. parapertussis*, estudios previos no detectaron diferencias significativas entre ambas cepas [25, 29]. Sin embargo, es posible que *B. pertussis* y *B. parapertussis* difieran en su forma de interacción con el macrófago, lo que eventualmente desencadenaría diferentes patrones de activación en el hospedador y diferentes formas de inmunoevasión para cada cepa. Algo que no hemos detectado en los estudios anteriores [33] y que deberá estudiarse más detalladamente.

TctABC es una familia de proteínas llamadas transportadores tripartitos de tricarbóxilatos (TTT) [34]. El TctC es el componente periplásmico del transportador. En varios genomas, incluidos los de *B. pertussis* y *B. parapertussis* [35], existe un mayor número de genes que codifican para los diferentes TctC que genes de TctA y TctB, lo que sugiere que varios TctC pueden interactuar con el mismo complejo TctA-TctB permitiendo así el transporte de una gran cantidad de metabolitos. En este estudio proteómico encontramos nueve transportadores TctC diferentes cuyos genes codificadores están ausentes en el genoma de *B. pertussis*; estos son: BPP0290, BPP0629, BPP0911, BPP0983, BPP1384, BPP2202, BPP2719, and BPP3797. La presencia de un mayor número de estos transportadores en *B. parapertussis* podría indicar un metabolismo más versátil debido a la posibilidad de transportar un rango más amplio de metabolitos.

En este estudio proteómico, también se identificaron cuatro autotransportadores expresados solo en *B. parapertussis*, BPP0104, BPP0452, BPP1617, and BPP1815. Los autotransportadores son proteínas típicamente involucradas en muchos mecanismos patogénicos, como la adhesión y la evasión del sistema inmune del huésped. Muchos de los factores de virulencia clásicos del género *Bordetella* como pertactina, BrkA y Vag8 pertenecen a la familia de los autotrasportadores [36,37]. Entre estas proteínas encontradas, solo BPP0104 y BPP0452 tienen homología con proteínas con funciones relevantes informadas en otros patógenos: BPP0452 es similar a una proteína de *Mycobacterium abscessus* denominada *fluffing*. Estas proteínas confieren aglutinación entre las células bacterianas promoviendo la formación de biofilm y la resistencia a los antimicrobianos [38]. Por otro lado, BPP0104 es una adhesina putativa homóloga a autotransportadores de bacterias del género *Pseudomonas* y una invasina de *Mycobacteroides abscessus*. Debido a la relación entre los autotransportadores y la virulencia estos genes son particularmente interesantes y serán motivo de estudio para evaluar su rol eventual en el ciclo infeccioso de la *B. parapertussis*

Un factor de virulencia descrito como clave en la patogénesis de *B. parapertussis* es el antígeno O [12,39]. Esta estructura antigénica está ausente en *B. pertussis* y, como era de esperarse, aquí encontramos la expresión de varias proteínas codificadas por el operón involucrado en su producción, WbmQ (BPP0128), WbmL (BPP0133), WbmI (BPP0136), WbmH (BPP0137), WbmG (BPP0138) y WbmF (BPP0139), cuyos genes no están presentes en el genoma de *B. pertussis*. También encontramos PagL (BPP3320), una enzima con actividad deacilasa de lípido A. Se ha observado que la deacilación del lípido A reduce la activación de la señalización vía TLR4 [40]. Esto es consistente con un estudio previo que muestra que la producción de citoquinas por células de línea HEK293 que

expresan TLR4/MD2 humano es significativamente más débil cuando se estimula con LPS de *B. parapertussis* en comparación con LPS de *B. pertussis* [41]. En el mismo trabajo se muestra que el LPS de *B. bronchiseptica* es a su vez más endotóxico que el de las otras dos especies, por lo que se sugiere que la modificación del LPS podría ser parte de la adaptación de *B. parapertussis* al humano. La selección de un LPS menos endotóxico podría favorecer la persistencia durante la infección ya que existiría una menor estimulación de la respuesta inflamatoria.

Varias transposasas se encontraron solamente en *B. parapertussis*. Entre ellas, BPP0078, BPP2054, BPP2252, BPP2470, BPP3113 y BPP3139. Por otro lado, un gen que codifica la trasposasa relacionada con IS481, un elemento de inserción importante en *B. pertussis* [42], no se encuentra en el genoma de *B. parapertussis*. La transposición de elementos del ADN es un mecanismo clave para generar diversidad genética. Los elementos transponibles son responsables de las inserciones, deleciones e inversiones de los fragmentos del genoma, y están implicados en la evolución del genoma de *B. parapertussis* y *B. pertussis* y en la diferente disposición de elementos genéticos en los genomas de estas especies durante la adaptación al ser humano [36,43].

Las fimbrias son proteínas filamentosas muy inmunogénica que actúan como adhesinas. En el caso de *B. pertussis*, se han descrito dos serotipos fimbriales diferentes: Fim2 y Fim3. Ambos genes están presentes en el genoma de *B. parapertussis*, pero ninguna de estas proteínas se encontró en nuestro estudio proteómico. Estos resultados concuerdan con informes anteriores que indican que *B. parapertussis* no produce Fim2 ni Fim3 [44]. En el proteoma de *B. parapertussis*, en cambio, identificamos otra proteína fimbrial, BPP1684, con identidad de secuencia relativamente baja con Fim 2 y Fim3 (74% y 57%, respectivamente). Este marco de lectura abierto ya había sido identificado previamente

[36]. El gen que codifica esta proteína no está presente en el genoma de *B. pertussis*. Haciendo un árbol filogenético con las proteínas fimbriales codificadas en los genomas de *B. pertussis* Tohama I y *B. parapertussis* 12822 se puede observar la divergencia evolutiva entre la proteína BPP1684 y las demás (Figura 5).

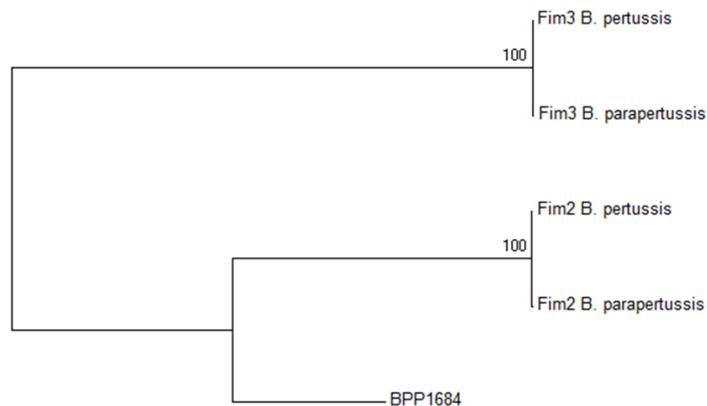


Figura 5. Árbol filogenético de las fimbrias de *B. pertussis* y *B. parapertussis*.

Las proteínas fimbriales de *B. pertussis* son antígenos incluidos en algunas formulaciones de vacuna acelular. Estudios previos mostraron que los anticuerpos inducidos por estas vacunas acelulares, compuestas de antígenos purificados *B. pertussis*, no protegen contra *B. parapertussis* [12]. Como ya se mencionó, esta falla de la vacuna se atribuyó principalmente a la presencia del antígeno O en la superficie de *B. parapertussis* que afectaría el acceso de los anticuerpos a los antígenos vacunales compartidos por ambas especies y a la divergencia antigénica de Prn y FHA entre ambas especies [45]. Hasta el momento no se ha descrito divergencia antigénica en las fimbrias de ambas especies ni el grado de apantallamiento que el Antígeno O puede ejercer sobre las fimbrias de *B. parapertussis*. Debido a los resultados de proteómica que indican que *B. parapertussis* no expresa ningún homólogo de las fimbrias incluidas en la vacuna acelular en uso (Fim2 y

Fim3 de *B. pertussis*) sino que expresa una fimbria diferente como poca homología con Fim2 y Fim3 de *B. pertussis* decidimos evaluar la reactividad cruzada de proteínas fimbriales de ambas especies. En particular estudiamos si los anticuerpos inducidos por fimbrias de *B. pertussis* reconocen a *B. parapertussis*. Para ello, *B. pertussis* Tohama I, *B. parapertussis* CN2591 y la cepa de *B. parapertussis* mutante de antígeno O (Bpp Δ wbm), fueron cultivadas en medio SS y usadas como antígeno en ensayos de ELISA de células enteras, incubadas con suero de conejo contra las proteínas fimbriales de *B. pertussis* o suero normal de conejo para ser usado como control negativo.

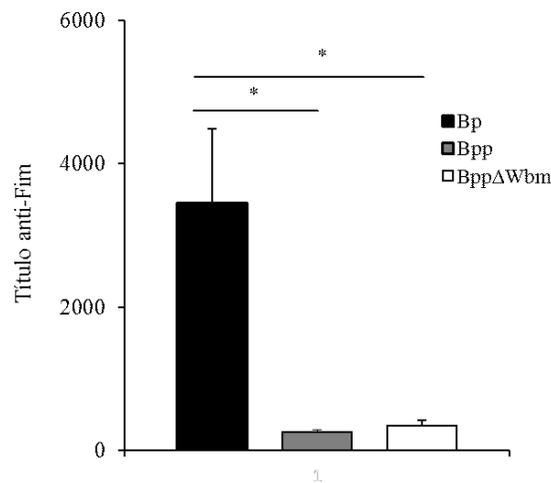


Figura 6. Reconocimiento de *B. parapertussis* por anticuerpos anti-Fim de *B. pertussis*. Las placas se sensibilizaron con células enteras *B. pertussis* (Bp), *B. parapertussis* (Bpp) o una cepa de *B. parapertussis* mutante de antígeno O (Bpp Δ Wbm). (* $p < 0,05$). Los títulos de anticuerpos se expresan como la media \pm DE de ensayos realizados por triplicado. Se muestran los resultados de un ensayo representativo de dos independientes

En la Figura 6 se puede ver que los sueros anti-Fim de *B. pertussis* no reconocen a *B. parapertussis*, y que esta falta de reconocimiento no se debe un eventual apantallamiento

por el antígeno O porque no se observa un aumento de reconocimiento en la cepa mutante defectiva para antígeno O.

Estudios previos han demostrado que los anticuerpos contra fimbrias son protectores contra *B. pertussis* por su actividad aglutinante que eventualmente previene la unión a las células epiteliales [4]. Por tal motivo se llevaron a cabo ensayos funcionales para estudiar las posibles consecuencias de las diferencias encontradas en las fimbrias presentes en ambas cepas. En primer lugar se llevaron a cabo ensayos de aglutinación incubando *B. pertussis*, *B. parapertussis* o *B. parapertussis* deficiente en la producción de antígeno O (*BppΔwbm*) con diluciones seriadas del suero anti-Fim de *B. pertussis*. Los resultados mostraron que el suero anti-Fim de *B. pertussis* es capaz de aglutinar a *B. pertussis* pero no puede aglutinar a *B. parapertussis* cepa salvaje ni a *B. parapertussis* deficiente en antígeno O (Figura 7), confirmando la falta de reconocimiento cruzado entre las fimbrias de ambas especies observada en la Figura 6.

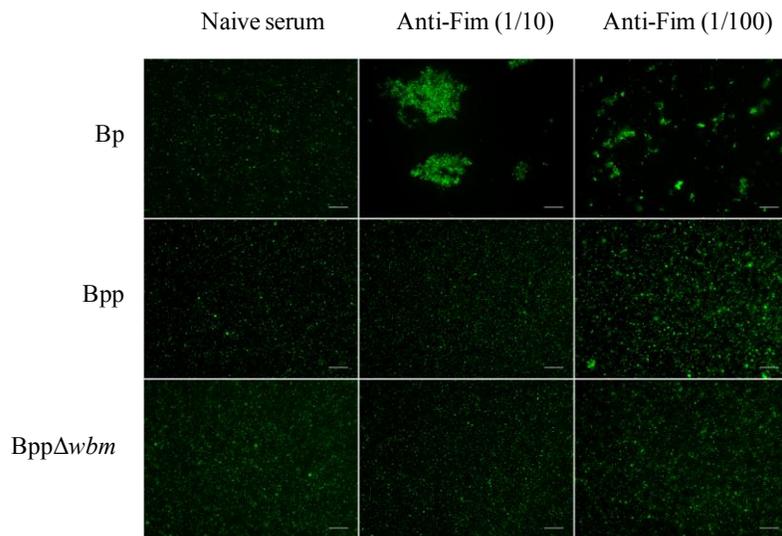


Figura 7. Actividad aglutinante de sueros anti-Fim de *B. pertussis* contra *B. paraptussis*. GFP-*B. pertussis*, GFP-*B. paraptussis* o GFP-*B. paraptussis* Δ wbm cultivadas en medio SS (DO₆₅₀: 1) se incubaron durante 1 hora a 37°C con suero normal de conejo (control negativo), o suero de conejo anti-Fim en diluciones seriadas. La aglutinación se analizó por un microscopía de fluorescencia. Se muestran paneles representativos de dos ensayos independientes.

Por último se evaluó la capacidad de sueros anti-Fim de *B. pertussis* de impedir la adhesión de *B. pertussis* y *B. paraptussis* a células del epitelio respiratorio. Para ello, células bronquiales 16HBEo- fueron incubadas con *B. pertussis*, *B. paraptussis* o *B. paraptussis* deficiente en la producción de antígeno O (Bpp Δ wbm), con una multiplicidad de infección (MOI) de 20 bacterias por célula en presencia de suero de conejo anti-Fim de *B. pertussis* o suero normal de conejo.

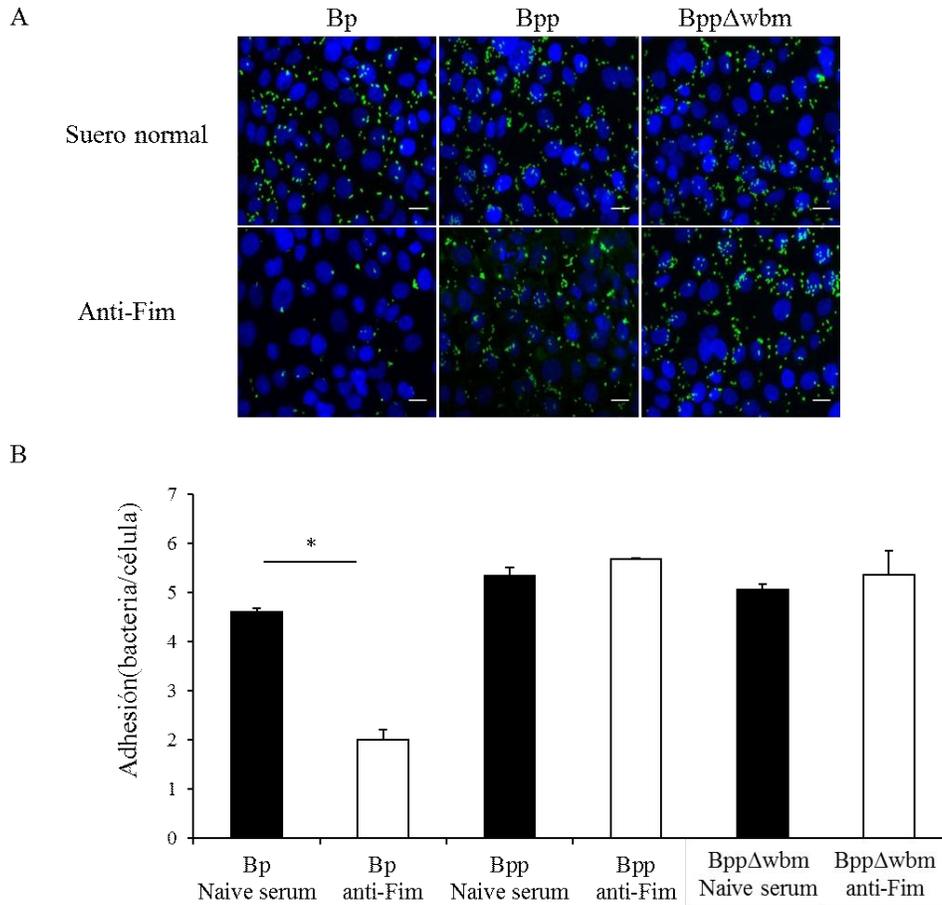


Figura 8. Efecto de suero anti-Fim de *B. pertussis* en adhesión de *B. paraptussis* a células epiteliales respiratorias. La línea celular epitelial bronquial humana 16HBE14o se infectó con *B. pertussis*, *B. paraptussis* o *B. paraptussis* Δwbm (MOI 20) en la presencia de suero de conejo anti-Fim de *B. pertussis* o suero normal de conejo. Después de 4 h, las células se lavaron dos veces para eliminar las bacterias no adheridas, se fijaron y se observaron en microscopio de fluorescencia, (A) Imágenes representativas de *B. pertussis*, *B. paraptussis* o *B. paraptussis* Δwbm unidas a células epiteliales en presencia de suero anti-Fim y suero normal. (B) Cantidad de bacterias adheridas por célula. Los datos representan la media ± DE de triplicados. Se muestran los resultados de un ensayo representativo de dos ensayos independientes. (* P < 0.05).

Como puede observarse en la Figura 8, la adhesión de la cepa salvaje o la cepa defectiva en el antígeno O de *B. paraptussis* no se vio afectada por la presencia de anticuerpos anti-Fim de *B. pertussis* mientras que, tal como se esperaba, la adhesión *B. pertussis* fue significativamente menor en presencia de anti-Fim. Estos resultados son acordes a observado en Figura 7 y Figura 8, y confirman que no hay reactividad cruzada.

Estos resultados muestran por primera vez que los anticuerpos inducidos por fimbrias de *B. pertussis* no reconocen a *B. parapertussis* aportando al conocimiento de las bases moleculares de la falta de protección de la vacuna acelular contra *B. parapertussis* y alertan una vez más sobre la necesidad de contar con mejores formulaciones vacunales para el control de la tos convulsa.

5.3.3. Búsqueda de proteínas expresadas en *B. pertussis*, sin ortólogos en el genoma de *B. parapertussis*.

Debido a que el análisis anterior arrojó una lista de proteínas únicas tanto para una especie como para la otra, y a que este grupo cuenta con diversos proteomas también de *B. pertussis*, se decidió hacer una búsqueda de esos genes únicos de *B. pertussis* que se hayan encontrado expresados en alguno de los estudios proteómicos de *B. pertussis* [42,46]. De los 291 genes encontrados sin ortólogos en *B. parapertussis*, 63 fueron identificadas en al menos una de proteómicas mencionadas. Muy poca información pudo inferirse sin embargo, porque la mayoría de dichas proteínas son de función desconocida o no relacionada con la virulencia (como proteínas relacionadas a la edición de ADN). La proteína más importante que encontramos en las proteómicas de *B. pertussis*, ausente en *B. parapertussis*, es la toxina pertussis clave en la inmunomodulación de la respuesta del huésped [47] y muy vinculada con síntomas de la enfermedad causada por esta especie, como la linfocitosis y la hipertensión pulmonar. Más análisis y estudios complementarios son necesarios para determinar posibles funciones de las demás proteínas identificadas.

5.4. Conclusión

En este trabajo de tesis se obtuvo por primera vez un perfil proteómico de *B. parapertussis*. Entre las proteínas identificadas se encontró un gran número de las proteínas de esta especie sin homólogo en *B. pertussis* que podrían ayudar a comprender la persistencia de este patógeno en la población. Se cree que *B. parapertussis* ha evolucionado a partir de un ancestro de *B. bronchiseptica* y se ha adaptado al huésped humano más recientemente que *B. pertussis*. Por lo tanto, *B. parapertussis* ha evolucionado en presencia de inmunidad contra *B. pertussis* [73], lo que finalmente condujo a la diversidad antigénica entre estas especies. En este estudio, además de la ya conocida presencia de antígeno O y ausencia de toxina pertussis en *B. parapertussis*, se identificaron varias proteínas expresadas solo por *B. parapertussis* potencialmente implicadas en la virulencia, persistencia y antigenicidad característica de esta especie. Entre ellas, algunas que podrían estar implicadas en mecanismos de inmunoevasión, en la resistencia a múltiples condiciones de estrés, en el uso de diversas fuentes de nutrientes, en la supervivencia intracelular, en la evasión a la inmunidad inducida por vacunación e incluso en la ventaja competitiva de *B. parapertussis* en la colonización del nicho.

Tabla 1. Lista de proteínas identificadas en proteoma de *B. parapertussis* sin ortólogos codificados en el genoma de *B. pertussis* Tohama I

Gen	Locus	Descripción
<i>BPP0020</i>	BPP0020	Probable two-component response regulator
<i>BPP0059</i>	BPP0059	Histidine triad protein
<i>BPP0078</i>	BPP0078	Transposase
<i>BPP0099</i>	BPP0099	Putative exported protein
<i>BPP0104</i>	BPP0104	Putative adhesin
<i>BPP0110</i>	BPP0110	Putative methyltransferase
<i>BPP0121</i>	BPP0121	NAD dependent epimerase/dehydratase family protein
<i>BPP0122</i>	BPP0122	DegT/DnrJ/EryC1/StrS aminotransferase family protein
<i>BPP0123</i>	BPP0123	Putative asparagine synthetase
<i>wbmQ</i>	BPP0128	Putative formyl transferase
<i>wbmL</i>	BPP0133	Transport permease protein
<i>wbmI</i>	BPP0136	Putative asparagine synthetase
<i>wbmH</i>	BPP0137	Nucleotide sugar epimerase/dehydratase
<i>wbmG</i>	BPP0138	Nucleotide sugar epimerase/dehydratase
<i>wbmF</i>	BPP0139	Nucleotide sugar epimerase/dehydratase
<i>BPP0163</i>	BPP0163	Putative exported protein
<i>nhaA</i>	BPP0213	Na(+)/H(+) antiporter NhaA
<i>BPP0214</i>	BPP0214	Uncharacterized protein
<i>BPP0217</i>	BPP0217	Acetyltransferase (GNAT) family protein
<i>BPP0219</i>	BPP0219	Metallo-beta-lactamase superfamily protein
<i>BPP0235</i>	BPP0235	Uncharacterized protein
<i>BPP0290</i>	BPP0290	Putative exported protein
<i>BPP0357</i>	BPP0357	Transcriptional regulator
<i>BPP0360</i>	BPP0360	LysR family regulatory protein
<i>BPP0376</i>	BPP0376	Transcriptional regulatory protein
<i>BPP0378</i>	BPP0378	Uncharacterized protein
<i>BPP0402</i>	BPP0402	Putative branched-chain amino acid binding protein
<i>BPP0405</i>	BPP0405	Putative exported protein
<i>BPP0436</i>	BPP0436	LysR family regulatory protein
<i>BPP0452</i>	BPP0452	Autotransporter
<i>BPP0480</i>	BPP0480	Uncharacterized protein
<i>BPP0481</i>	BPP0481	Putative TetR-family transcriptional regulator
<i>BPP0570</i>	BPP0570	TetR family regulatory protein

<i>etfA</i>	BPP0615	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit
<i>BPP0621</i>	BPP0621	Uncharacterized protein
<i>BPP0629</i>	BPP0629	Putative lipoprotein
<i>BPP0640</i>	BPP0640	Luciferase-like monooxygenase
<i>BPP0645</i>	BPP0645	Uncharacterized protein
<i>BPP0695</i>	BPP0695	Putative GntR-family transcriptional regulator
<i>BPP0745</i>	BPP0745	Putative exported protein
<i>BPP0777</i>	BPP0777	Uncharacterized protein
<i>ggt</i>	BPP0885	Gamma-glutamyltranspeptidase
<i>BPP0911</i>	BPP0911	Putative exported protein
<i>BPP0914</i>	BPP0914	Putative enoyl-CoA hydratase/isomerase
<i>BPP0921</i>	BPP0921	Putative membrane protein
<i>BPP0927</i>	BPP0927	Uncharacterized protein
<i>BPP0931</i>	BPP0931	Putative GntR-family transcriptional regulator
<i>BPP0935</i>	BPP0935	Putative enoyl-CoA hydratase
<i>BPP0936</i>	BPP0936	Putative exported protein
<i>BPP0939</i>	BPP0939	Uncharacterized protein
<i>BPP0940</i>	BPP0940	Probable short chain dehydrogenase
<i>BPP0971</i>	BPP0971	Putative isochorismatase
<i>BPP0983</i>	BPP0983	Putative exported protein
<i>BPP0984</i>	BPP0984	Uncharacterized protein
<i>BPP0985</i>	BPP0985	Uncharacterized protein
<i>BPP1031</i>	BPP1031	Putative exported protein
<i>BPP1038</i>	BPP1038	Adenine deaminase
<i>BPP1048</i>	BPP1048	Uncharacterized protein
<i>BPP1099</i>	BPP1099	Putative universal stress protein
<i>BPP1122</i>	BPP1122	Putative exported protein
<i>dnaX</i>	BPP1221	DNA polymerase III subunit Tau
<i>BPP1244</i>	BPP1244	Putative peptidase
<i>BPP1245</i>	BPP1245	Uncharacterized protein
<i>aroG</i>	BPP1356	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase
<i>amaB</i>	BPP1366	N-carbamoyl-L-amino acid amidohydrolase
<i>BPP1371</i>	BPP1371	Putative exported protein
<i>BPP1372</i>	BPP1372	Probable 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase
<i>BPP1373</i>	BPP1373	Probable LysR-family transcriptional regulator
<i>BPP1376</i>	BPP1376	Putative extracellular solute-binding protein
<i>BPP1384</i>	BPP1384	Putative exported protein
<i>BPP1392</i>	BPP1392	Probable short-chain dehydrogenase
<i>BPP1393</i>	BPP1393	Putative lipoprotein
<i>BPP1409</i>	BPP1409	Uncharacterized protein

<i>linM18</i>	BPP1410	Bacteriocin
<i>BPP1579</i>	BPP1579	Uncharacterized transporter BPP1579
<i>BPP1585</i>	BPP1585	Uncharacterized protein
<i>BPP1590</i>	BPP1590	Putative universal stress protein
<i>BPP1617</i>	BPP1617	Autotransporter
<i>BPP1633</i>	BPP1633	Putative lipoprotein
<i>bph2</i>	BPP1734	DNA-binding protein Bph2
<i>BPP1739</i>	BPP1739	Putative cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase
<i>bapB</i>	BPP1815	Autotransporter
<i>kdgT</i>	BPP1892	2-keto-3-deoxygluconate permease
<i>BPP1939</i>	BPP1939	Putative permease component of ABC transporter
<i>BPP1946</i>	BPP1946	Putative membrane protein
<i>BPP1959</i>	BPP1959	Uncharacterized protein
<i>osmC</i>	BPP1969	Osmotically inducible protein C
<i>purN</i>	BPP1986	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase
<i>BPP2054</i>	BPP2054	Transposase
<i>BPP2077</i>	BPP2077	Uncharacterized protein
<i>BPP2082</i>	BPP2082	Carbonic anhydrase
<i>BPP2114</i>	BPP2114	Putative GntR-family transcriptional regulator
<i>BPP2129</i>	BPP2129	Putative ABC transport system, ATP-binding protein
<i>BPP2166</i>	BPP2166	Probable aldehyde dehydrogenase
<i>BPP2176</i>	BPP2176	Putative acyl-CoA carboxylase
<i>BPP2202</i>	BPP2202	Putative exported protein
<i>BPP2203</i>	BPP2203	Putative GntR-family transcriptional regulator
<i>BPP2252</i>	BPP2252	Transposase
<i>BPP2259</i>	BPP2259	Uncharacterized protein
<i>BPP2344</i>	BPP2344	Putative thiolase
<i>BPP2358</i>	BPP2358	Probable GntR-family transcriptional regulator
<i>BPP2470</i>	BPP2470	Transposase
<i>pntB</i>	BPP2497	NAD(P) transhydrogenase subunit beta
<i>BPP2690</i>	BPP2690	Uncharacterized protein
<i>BPP2704</i>	BPP2704	Putative membrane protein
<i>BPP2719</i>	BPP2719	Putative exported protein
<i>BPP2737</i>	BPP2737	Putative transcriptional regulatory protein
<i>BPP2783</i>	BPP2783	Carboxymethylenebutenolidase
<i>BPP2886</i>	BPP2886	Transposase
<i>gst</i>	BPP2935	Glutathione S-transferase
<i>BPP2982</i>	BPP2982	Probable ATP-binding component of ABC transporter
<i>BPP3042</i>	BPP3042	Probable ATP-binding ABC transporter protein
<i>BPP3061</i>	BPP3061	Uncharacterized protein

<i>BPP3103</i>	BPP3103	Uncharacterized protein
<i>BPP3113</i>	BPP3113	Transposase
<i>BPP3139</i>	BPP3139	Transposase
<i>BPP3176</i>	BPP3176	Uncharacterized protein
<i>BPP3223</i>	BPP3223	Putative inner membrane protein
<i>prpB</i>	BPP3233	2-methylisocitrate lyase
<i>BPP3266</i>	BPP3266	Putative coenzyme A transferase subunit
<i>prpE</i>	BPP3277	Propionate--CoA ligase
<i>BPP3320</i>	BPP3320	Lipid A deacylase
<i>BPP3342</i>	BPP3342	Putative branched-chain amino acid transport system protein
<i>risS</i>	BPP3360	Sensor kinase protein
<i>BPP3438</i>	BPP3438	Putative membrane protein
<i>BPP3584</i>	BPP3584	Putative ABC transport ATP-binding subunit
<i>BPP3587</i>	BPP3587	Probable hydrolase
<i>BPP3645</i>	BPP3645	Uncharacterized protein
<i>BPP3661</i>	BPP3661	Putative oxidoreductase
<i>BPP3672</i>	BPP3672	Putative outer membrane protein
<i>BPP3772</i>	BPP3772	Putative exported protein
<i>BPP3791</i>	BPP3791	Proline-rich inner membrane protein
<i>BPP3797</i>	BPP3797	Putative exported protein
<i>BPP3870</i>	BPP3870	Uncharacterized protein
<i>bphI</i>	BPP3905	Histone protein
<i>prmA</i>	BPP3915	Ribosomal protein L11 methyltransferase
<i>BPP4006</i>	BPP4006	UPF0271 protein BPP4006
<i>BPP4018</i>	BPP4018	Putative exported protein
<i>BPP4064</i>	BPP4064	Putative universal stress protein
<i>gshA</i>	BPP4089	Glutamate--cysteine ligase
<i>BPP4111</i>	BPP4111	Putative cytochrome c
<i>BPP4122</i>	BPP4122	Putative binding-protein-dependent transport protein
<i>BPP4262</i>	BPP4262	Probable ATP-binding ABC transporter protein
<i>BPP4326</i>	BPP4326	Putative membrane protein
<i>gluQ</i>	BPP4372	Glutamyl-Q tRNA(Asp) synthetase

5.5. Bibliografía

- [1] A. Preston, A.G. Allen, J. Cadisch, R. Thomas, K. Stevens, C.M. Churcher, K.L. Badcock, J. Parkhill, B. Barrell, D.J. Maskell, Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *bordetellae*, *Infect. Immun.* 67 (1999) 3763–3767. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=96651&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [2] C.L. Weingart, G. Broitman-maduro, G. Dean, S. Newman, M. Peppler, A.A. Weiss, Fluorescent labels influence phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils, *Infect. Immun.* 67 (1999) 4264–4267.
- [3] D.W. Stainer, M.J. Scholte, A Simple Chemically Defined Medium for the Production of Phase I *Bordetella pertussis*, *J. Gen. Microbiol.* 63 (1971) 211–220. doi:10.1099/00221287-63-2-211.
- [4] M.E. Rodríguez, S.M.M. Hellwig, M.L.A. Pérez Vidakovics, G.A.M. Berbers, J.G.J. Van De Winkel, *Bordetella pertussis* attachment to respiratory epithelial cells can be impaired by fimbriae-specific antibodies, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 46 (2006) 39–47. doi:10.1111/j.1574-695X.2005.00001.x.
- [5] A.L. Cozens, M.J. Yezzi, K. Kunzelmann, T. Ohrui, L. Chin, K. Eng, W.E. Finkbeiner, J.H. Widdicombe, D.C. Gruenert, CFTR Expression and Chloride Secretion in Polarized Immortal Human Bronchial Epithelial Cells, *Am J Respir Cell Mol. Bio.* 10 (1994) 38–47. doi:10.1165/ajrcmb.10.1.7507342.
- [6] J. Alvarez Hayes, J.M. Oviedo, H. Valdez, J.M. Laborde, F. Maschi, M. Ayala, R. Shah, M. Fernandez Lahore, M.E. Rodriguez, A recombinant iron transport protein from *Bordetella pertussis* confers protection against *Bordetella parapertussis*, *Microbiol. Immunol.* 61 (2017) 407–415. doi:10.1111/1348-0421.12532.
- [7] A. Frey, J. Di Canzio, D. Zurakowski, A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays, *J. Immunol. Methods.* 221 (1998) 35–41. doi:10.1016/S0022-1759(98)00170-7.
- [8] M.N. Khattak, R.C. Matthews, Genetic relatedness of *Bordetella* species as determined by macrorestriction digests resolved by pulsed-field gel electrophoresis, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 (1993) 659–664. doi:10.1099/00207713-43-4-659.
- [9] A. Van Der Zee, F. Mooi, J. Van Embden, J. Musser, Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp.: Phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 6609–6617. doi:10.1128/JB.179.21.6609-6617.1997.
- [10] F. Bertels, O.K. Silander, M. Pachkov, P.B. Rainey, E. Van Nimwegen, Automated Reconstruction of Whole-Genome Phylogenies from Short-Sequence Reads, *Mol. Biol. Evol.* 31 (2014) 1077–1088. doi:10.1093/molbev/msu088.
- [11] N. Hegerle, A.S. Paris, D. Brun, G. Dore, E. Njamkepo, S. Guillot, N. Guiso, Evolution of French *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* isolates: Increase of *Bordetellae* not expressing pertactin, *Clin. Microbiol. Infect.* 18 (2012) E340–E346. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03925.x.
- [12] X. Zhang, M.E. Rodríguez, E.T. Harvill, O antigen allows *B. parapertussis* to evade *B. pertussis* vaccine-induced immunity by blocking binding and functions of cross-reactive antibodies, *PLoS One.* 4 (2009) e6989. doi:10.1371/journal.pone.0006989.
- [13] J. Liko, S.G. Robison, P.R. Cieslak, Do pertussis vaccines protect against *bordetella parapertussis*?, *Clin. Infect. Dis.* 64 (2017) 1795–1797. doi:10.1093/cid/cix221.

- [14] U. Heininger, K. Stehr, P. Christenson, J.D. Cherry, Evidence of efficacy of the Lederle/Takeda acellular pertussis component diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine but not the Lederle whole-cell component diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine against *Bordetella parapertussis* in, *Clin. Infect. Dis.* 28 (1999) 602–4. doi:10.1086/515154.
- [15] B. Contreras-Moreira, P. Vinuesa, GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (2013) 7696–7701. doi:10.1128/AEM.02411-13.
- [16] L. Li, C.J. Stoeckert Jr, D.S. Roos, OrthoMCL : Identification of Ortholog Groups for Eukaryotic Genomes, *Genome Res.* 13 (2003) 2178–2189. doi:10.1101/gr.1224503.candidates.
- [17] D. Dorji, F. Mooi, O. Yantorno, R. Deora, R.M. Graham, T.K. Mukkur, *Bordetella Pertussis* virulence factors in the continuing evolution of whooping cough vaccines for improved performance, *Med. Microbiol. Immunol.* 207 (2017) 3–26. doi:10.1007/s00430-017-0524-z.
- [18] D.A. Diavatopoulos, C.A. Cummings, L.M. Schouls, M.M. Brinig, D.A. Relman, F.R. Mooi, *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*, *PLoS Pathog.* 1 (2005) e45. doi:10.1371/journal.ppat.0010045.
- [19] P. V. Gawande, M.W. Griffiths, Effects of environmental stresses on the activities of the *uspA*, *grpE* and *rpoS* promoters of *Escherichia coli* O157:H7, *Int. J. Food Microbiol.* 99 (2005) 91–98. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.06.012.
- [20] M.S. Roset, T.G. Alefantis, V.G. Delvecchio, G. Briones, Iron-dependent reconfiguration of the proteome underlies the intracellular lifestyle of *Brucella abortus*, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–15. doi:10.1038/s41598-017-11283-0.
- [21] Q. Jia, X. Hu, D. Shi, Y. Zhang, M. Sun, J. Wang, K. Mi, G. Zhu, Universal stress protein Rv2624c alters abundance of arginine and enhances intracellular survival by ATP binding in mycobacteria, *Sci. Rep.* 6 (2016) 35462. doi:10.1038/srep35462.
- [22] M.A. Liebert, L. Masip, K. Veeravalli, G. Georgiou, The Many Faces of Glutathione in Bacteria, *Antioxid. Redox Signal.* 8 (2006) 753–762.
- [23] M. Goldner, C.M. Jakus, H.K. Rhodes, R.J. Wilson, The Amino Acid Utilization by Phase I *Bordetella pertussis* in a Chemically Defined Medium, *J. Gen. Microbiol.* 44 (1966) 439–444. doi:10.1099/00221287-44-3-439.
- [24] A.J. Potter, C. Trappetti, J.C. Paton, *Streptococcus pneumoniae* uses glutathione to defend against oxidative stress and metal ion toxicity, *J. Bacteriol.* 194 (2012) 6248–6254. doi:10.1128/JB.01393-12.
- [25] P.M. Riccillo, C.I. Muglia, F.J. De Bruijn, A.J. Roe, I.R. Booth, O.M. Aguilar, Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance, *J. Bacteriol.* 182 (2000) 1748–1753. doi:10.1128/JB.182.6.1748-1753.2000.
- [26] R.L. Feinbaum, J.M. Urbach, N.T. Liberati, S. Djonovic, A. Adonizio, A.R. Carvunis, F.M. Ausubel, Genome-wide identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence-related genes using a *Caenorhabditis elegans* infection model, *PLoS Pathog.* 8 (2012) e1002813. doi:10.1371/journal.ppat.1002813.
- [27] Z.E. V. Worthington, N. Van Rooijen, N.H. Carbonetti, Enhancement of *Bordetella parapertussis* infection by *Bordetella pertussis* in mixed infection of the respiratory tract, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 63 (2012) 119–128. doi:10.1111/j.1574-

695X.2011.00836.x.

- [28] J.J. Quereda, O. Dussurget, M.-A. Nahori, A. Ghozlane, S. Volant, M.-A. Dillies, B. Regnault, S. Kennedy, S. Mondot, B. Villoing, P. Cossart, J. Pizarro-Cerda, Bacteriocin from epidemic *Listeria* strains alters the host intestinal microbiota to favor infection, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (2016) 5706–5711. doi:10.1073/pnas.1523899113.
- [29] J. Gorgojo, E.T. Harvill, M.E. Rodríguez, Bordetella parapertussis Survives inside Human Macrophages in Lipid Raft-Enriched Phagosomes, *Infect. Immun.* 82 (2014) 5175–5184. doi:10.1128/IAI.02553-14.
- [30] J. Sasikaran, M. Ziemski, P.K. Zadora, A. Fleig, I. a Berg, Bacterial itaconate degradation promotes pathogenicity, *Nat. Chem. Biol.* 10 (2014) 371–377. doi:10.1038/nchembio.1482.
- [31] H.H. Luan, R. Medzhitov, Food Fight: Role of Itaconate and Other Metabolites in Antimicrobial Defense, *Cell Metab.* 24 (2016) 379–387. doi:10.1016/j.cmet.2016.08.013.
- [32] X. Zhu, H. Lei, J. Wu, J. V Li, H. Tang, Y. Wang, Systemic Responses of BALB/c Mice to Salmonella Typhimurium Infection, *J. Proteome Res.* 13 (2014) 4436–4445. doi:10.1021/pr500770x.
- [33] Y. a Lamberti, J. Alvarez Hayes, M.L. Perez Vidakovics, E.T. Harvill, M.E. Rodriguez, Intracellular trafficking of Bordetella pertussis in human macrophages, *Infect. Immun.* 78 (2010) 907–913. doi:10.1128/IAI.01031-09.
- [34] B. Winnen, R.N. Hvorup, M.H. Saier, The tripartite tricarboxylate transporter (TTT) family, *Res. Microbiol.* 154 (2003) 457–465. doi:10.1016/S0923-2508(03)00126-8.
- [35] R. Antoine, F. Jacob-Dubuisson, H. Drobecq, E. Willery, S. Lesjean, C. Loch, Overrepresentation of a gene family encoding extracytoplasmic solute receptors in Bordetella, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 1470–1474. doi:10.1128/JB.185.4.1470-1474.2003.
- [36] J. Parkhill, M. Sebahia, A. Preston, L.D. Murphy, N. Thomson, D.E. Harris, M.T.G. Holden, C.M. Churcher, S.D. Bentley, K.L. Mungall, A.M. Cerdeño-Tárraga, L. Temple, K. James, B. Harris, M. a Quail, M. Achtman, R. Atkin, S. Baker, D. Basham, N. Bason, I. Cherevach, T. Chillingworth, M. Collins, A. Cronin, P. Davis, J. Doggett, T. Feltwell, A. Goble, N. Hamlin, H. Hauser, S. Holroyd, K. Jagels, S. Leather, S. Moule, H. Norberczak, S. O’Neil, D. Ormond, C. Price, E. Rabbinowitsch, S. Rutter, M. Sanders, D. Saunders, K. Seeger, S. Sharp, M. Simmonds, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, L. Unwin, S. Whitehead, B.G. Barrell, D.J. Maskell, Comparative analysis of the genome sequences of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica, *Nat. Genet.* 35 (2003) 32–40. doi:10.1038/ng1227.
- [37] S. Mattoo, J.D. Cherry, Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to Bordetella pertussis and Other Bordetella Subspecies, *Clin. Microbiol. Rev.* 18 (2005) 326–382. doi:10.1128/CMR.18.2.326.
- [38] M.A. Schembri, L. Hjerrild, M. Gjermansen, P. Klemm, Differential Expression of the Escherichia coli Autoaggregation Factor Antigen 43, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 2236–2242. doi:10.1128/JB.185.7.2236.
- [39] J. Gorgojo, Y. Lamberti, H. Valdez, E.T. Harvill, M.E. Rodriguez, Bordetella parapertussis Survives the Innate Interaction with Human Neutrophils by Impairing

- Bactericidal Trafficking inside the Cell through a Lipid Raft-Dependent Mechanism Mediated by the Lipopolysaccharide O Antigen, *Infect. Immun.* 80 (2012) 4309–4316. doi:10.1128/IAI.00662-12.
- [40] K. Kawasaki, R.K. Ernst, S.I. Miller, 3-O-Deacylation of Lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated Deacylase of *Salmonella typhimurium*, Modulates Signaling through Toll-like Receptor 4, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 20044–20048. doi:10.1074/jbc.M401275200.
- [41] P.B. Mann, D. Wolfe, E. Latz, D. Golenbock, A. Preston, E.T. Harvill, Comparative Toll-Like Receptor 4-Mediated Innate Host Defense to *Bordetella* Infection, *Infect. Immun.* 73 (2005) 8144–8152. doi:10.1128/IAI.73.12.8144.
- [42] J. Alvarez Hayes, Y. Lamberti, K. Surmann, F. Schmidt, U. Völker, M.E. Rodríguez, Shotgun proteome analysis of *Bordetella pertussis* reveals a distinct influence of iron availability on the bacterial metabolism, virulence, and defense response, *Proteomics.* 15 (2015) 2258–2266. doi:10.1002/pmic.201400512.
- [43] N. Khelef, B. Danve, M.J. Quentin-Millet, N. Guiso, *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*: two immunologically distinct species, *Infect. Immun.* 61 (1993) 486–490. doi:10.1021/pr060681i.
- [44] V. Bouchez, N. Guiso, *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, vaccines and cycles of whooping cough, *Pathog. Dis.* 73 (2015) ftv055. doi:10.1093/femspd/ftv055.
- [45] D.N. Wolfe, E.M. Goebel, O.N. Bjornstad, O. Restif, E.T. Harvill, The O antigen enables *Bordetella parapertussis* to avoid *Bordetella pertussis*-induced immunity, *Infect. Immun.* 75 (2007) 4972–4979. doi:10.1128/IAI.00763-07.
- [46] Y. Lamberti, J.H. Cafiero, K. Surmann, H. Valdez, J. Holubova, B. Večerek, P. Sebo, F. Schmidt, U. Völker, M.E. Rodríguez, Proteome analysis of *Bordetella pertussis* isolated from human macrophages, *J. Proteomics.* 136 (2016) 55–67. doi:10.1016/j.jprot.2016.02.002.
- [47] H.A. Valdez, J.M. Oviedo, J.P. Gorgojo, Y. Lamberti, M.E. Rodríguez, *Bordetella pertussis* modulates human macrophage defense gene expression, *Pathog. Dis.* 74 (2016) ftw073. doi:10.1093/femspd/ftw073.

Capítulo 6

Discusión general

6. DISCUSIÓN GENERAL

A pesar de las altas tasas de vacunación, la tos convulsa continúa siendo una enfermedad de alta incidencia en diversas regiones del mundo y ha sido declarada reemergente por la OMS en la década del '90. Esta es una enfermedad muy contagiosa con altas tasa de morbilidad y mortalidad causada por *B. pertussis* y *B. parapertussis*. Si bien la incidencia de *B. pertussis* es mayor, *B. parapertussis* también está implicada en el proceso de reemergencia. Se ha documentado la circulación de *B. parapertussis* en forma asintomática [1] y la presencia de esta especie en brotes epidémicos a lo largo de todo el mundo con una incidencia variable. Incluso en algunos casos ha sido la especie preponderante [2,3]. Uno de los factores más importantes vinculados a la reemergencia y al aumento de la incidencia de *B. parapertussis* en los casos de tos convulsa es el reemplazo de la vacuna de células enteras por una vacuna acelular formulada a partir de antígenos purificados de *B. pertussis*. Estas vacunas, aunque menos reactogénicas y por ello aptas para el uso en adultos, brindan una protección menor contra *B. pertussis* y casi ninguna contra *B. parapertussis*. Varios factores están involucrados en esta falta de protección contra esta última especie. Por un lado, *B. parapertussis* expresa el antígeno O, ausente en *B. pertussis*, que ejerce un efecto de apantallamiento sobre antígenos comunes a ambas especies incluidos en las formulaciones vacunales [4]. El antígeno O es una estructura que se encuentra modificando al lipopolisacárido en la superficie de la bacteria y se ha postulado que interfiere con la interacción de los anticuerpos con su proteína blanco en la superficie bacteriana. La falta de reconocimiento evita la opsonización de la bacteria, lo cual es indispensable para inducir actividad celular bactericida en las células inmunes y

evitar el establecimiento de la infección y los nichos de persistencia intracelular de *B. parapertussis* [5,6]. Por otro lado, también existen diferencias en los epítopes inmunodominantes de los antígenos comunes a ambas especies incluidos en las formulaciones vacunales [7], y dado que la vacuna está formulada exclusivamente con antígenos de *B. pertussis*, esta podría ser también causa de falta de protección cruzada. Cabe recordar que los antígenos comunes a ambas especies incluidos en las vacunas acelulares son pertactina, fimbria y hemaglutinina filamentosa.

Se han intentado varias estrategias para mejorar las vacunas acelulares contra la tos convulsa, pero pocas de dichas aproximaciones contemplan la necesidad de proteger al vacunado también contra las infecciones producidas por *B. parapertussis*. Un ejemplo de ello es el autotransportador BrkA, que fue propuesto como un nuevo antígeno vacunal contra *B. pertussis*, pero es un pseudogen en *B. parapertussis*, por lo que no sería útil para prevenir la tos convulsa ocasionada por esta especie [8]. Una vacuna que se ha probado con éxito en modelos murinos de infección de *B. parapertussis* es BPZE1, formulada a partir de una cepa de *B. pertussis* atenuada que se suministra viva por vía intranasal. La cepa BPZE1 resulta de la inactivación genética o eliminación de tres factores de virulencia; no produce citotoxina traqueal ni toxina dermonecrótica, y produce toxina pertussis genéticamente detoxificada. También se han propuesto formulaciones que incluyen vesículas de membrana externa de *B. pertussis* y *B. parapertussis* como vacunas contra la tos convulsa, que podrían proteger contra ambas especies [9,10]. El problema de estas dos últimas vacunas experimentales es que contienen LPS en su formulación y no podrían usarse para adultos. Teniendo en cuenta que la vacunación de adultos ha sido clave para reducir la mortalidad infantil, la formulación de vacunas acelulares más efectivas contra ambas especies sigue siendo prioritaria para el control de esta enfermedad.

Para la búsqueda de nuevos candidatos para la introducción de mejoras en las formulaciones vacunales contra *B. pertussis*, nuestro grupo recurrió a una combinación de proteómica comparativa e inmunoproteómica con el fin de detectar antígenos expresados durante la infección, blancos de opsoninas presentes en el fenotipo infectante. En primer lugar, se caracterizó el proteoma de la bacteria creciendo en una condición que simula el entorno al que se tiene que adaptar el microorganismo durante la infección, como la limitación en hierro; y luego se evaluó la inmunogenicidad *in vivo* de las proteínas que se encontraron aumentadas en dicha condición [11]. Tres antígenos fueron identificados a partir de dicho estudio. Los tres fueron evaluados como antígenos vacunales. Dos, de ellos resultaron ser antígenos protectores contra *B. pertussis* capaces de aumentar significativamente la protección de las formulaciones vacunales actuales [12,13] y están actualmente en fase preclínica en babuinos.

En este trabajo de Tesis usamos una estrategia similar y recurrimos a técnicas de proteómica para estudiar la adaptación fenotípica de *B. parapertussis* al estrés más importante que esta bacteria enfrenta *in vivo*, la limitación en hierro, y buscar nuevos candidatos vacunales entre las proteínas expresada en este fenotipo. Dos técnicas fueron utilizadas para el estudio de la adaptación de *B. parapertussis* a la baja disponibilidad de hierro. Por un lado la electroforesis bidimensional y comparación de geles para identificación de proteínas diferencialmente expresadas en condiciones de limitación de hierro, seguida de ensayos de inmunodetección con sueros de pacientes infectados para seleccionar aquellas proteínas efectivamente expresadas durante la infección que fueran inmunogénicas *in vivo*. Por otro lado, y siendo que este es el primer estudio del proteoma de *B. parapertussis*, llevamos a cabo un análisis más exhaustivo con técnicas de proteómica libre de geles para evaluar globalmente la adaptación a la limitación de hierro. El empleo de

proteómica *shotgun* permitió la identificación de un gran número de proteínas lo que representó un avance en la comprensión de la biología de esta especie. El uso de los datos generados por la proteómica *shotgun* en combinación con herramientas de genómica, posibilitó además avanzar en el estudio comparativo con la otra especie estrechamente relacionada, *B. pertussis*, con quien comparte el nicho.

Observamos que en limitación en hierro aumenta la expresión de un gran número de proteína relacionadas con la captación de hierro a partir de diversas fuentes. Si bien se desconoce la función de muchas de ellas, este estudio ha confirmado que *B. parapertussis* expresa un gran repertorio de sistemas de captura de hierro de alta afinidad. La limitación en hierro también llevó a notables cambios en el metabolismo de la bacteria, como la reducción de proteínas del ciclo de Krebs, la biosíntesis de aminoácidos y el aumento de la biosíntesis de un polímero de reserva como es el PHA. Además de los cambios observados en el metabolismo y los procesos celulares, la adaptación a la baja disponibilidad de hierro modificó la abundancia de algunos factores de virulencia. Tal es el caso de la toxina adenilato ciclasa (CyaA) cuyo nivel se encontró aumentado en limitación de hierro. Este dato es particularmente curioso si se compara con lo observado para *B. pertussis*, que disminuye la expresión de dicha toxina en la misma condición de cultivo [14]. Además de señalar diferencias a nivel regulatorio, esta discrepancia podría estar relacionada a distintos mecanismos de patogénesis entre las bacterias. CyaA es una toxina clave en la inmunomodulación [15,16], pero su efectividad en *B. parapertussis* ha sido recientemente puesta en discusión [17], por lo que su aumento en limitación de hierro puede responder a la necesidad de una mayor concentración de toxina para la persistencia de la bacteria en condiciones de infección, ya sea por la baja eficiencia como por la ausencia del efector sinérgico que es la toxina pertussis, que sí está presente en *B. pertussis*. Algo

particularmente interesante es la disminución de antígeno O que observamos en limitación en hierro. El antígeno O tiene una función protectora a distintos niveles [4–6,18], y encontrar que en las condiciones de infección disminuye su abundancia fue inesperado. Un fenotipo similar fue observado recientemente en *B. bronchiseptica* expuesta a suero o sangre, lo que reafirma que existe mecanismos regulatorios en respuesta a señales del entorno, como podría ser la baja disponibilidad de hierro, que llevan a una disminución del antígeno O a pesar de su importante función [19]. Siendo que el Antígeno O es una estructura muy inmunogénica es posible que su disminución en condiciones de infección favorezca la persistencia de la bacteria dentro del hospedador. Un mecanismo similar ha sido previamente reportado en infecciones crónicas de *B. bronchiseptica* [20].

Como se mencionó más arriba, la información obtenida con esta técnica de proteómica masiva nos permitió especular sobre algunas características particulares de *B. paraptussis*, contrastando la información obtenida por proteómica con los datos genómicos de *B. pertussis*. Los datos obtenidos apuntan a que *B. paraptussis* tiene una mayor capacidad de tolerancia a condiciones de estrés. También tiene un mayor número de autotransportadores cuyo rol aún hay que investigar pero que podrían estar relacionadas con algunos procesos durante la colonización del tracto respiratorio como la adhesión o la invasión de células del hospedador. Entre las proteínas no codificadas en el genoma de *B. pertussis*, destaca la identificación de BPP1684, una proteína fimbrial que solo había sido mencionada al secuenciarse el genoma de *B. paraptussis*. Debido a que las fimbrias expresadas por diversas cepas de *B. pertussis*, Fim2 y Fim3, se encuentran codificadas en el genoma de *B. paraptussis* pero no fueron identificadas en este estudio proteómico, creemos que un cambio en la proteína fimbrial expresada por *B. paraptussis* podría ser parte de una estrategia de selección durante la evolución de esta especie y su competencia

por el nicho ya colonizado por *B. pertussis*, el hombre. Las diferencias antigénicas entre las fimbrias de ambas especies ya habían sido sugeridas en algunos trabajos [21,22], pero esta es la primera vez que se encuentra la proteína BPP1684 expresada en *B. paraptussis*.

De los resultados obtenidos por proteómica comparativa combinada con estudios de reactividad con sueros de individuos infectados con *B. paraptussis*, se seleccionaron tres antígenos para su estudio como candidatos vacunales contra esta especie, la proteína de unión a hierro, AfuA, el transportador de iones ferrosos en pH ácido, IRP1-3, y un transportador de aminoácidos ramificados, LivJ. AfuA e IRP1-3 son dos de los antígenos previamente identificados por inmunoproteómica de *B. pertussis* que mostraron ser protectores contra esta especie [12,13]. En este trabajo de Tesis se observó que ambos transportadores también aumentan su abundancia celular en *B. paraptussis* en respuesta a la baja disponibilidad de hierro. Por otro lado, LivJ de *B. paraptussis* fue identificada por primera vez en este estudio proteómico. Se observó que es una proteína antigénica y expresada *in vivo*, levemente sobre-expresada en condiciones de limitación de hierro. El análisis bioinformático de la conservación a nivel de secuencia de estos tres antígenos entre *B. pertussis* y *B. paraptussis* mostró un muy alto porcentaje de identidad en comparación con los otros componentes vacunales (Prn, Fim, FHA). La conservación de estos genes en la evolución de ambas cepas puede deberse a que son proteínas con funciones metabólicas relevantes para la colonización y persistencia en el hospedador. IRP1-3 es el único receptor de hierro de alta afinidad funcional a pH 6 o menor. AfuA es el receptor de lactoferrina, una de las principales fuentes de hierro en el sitio de infección de ambas especies. La importancia de estos transportadores en la colonización les agrega valor como candidatos vacunales porque disminuye las posibilidades de la inmunoselección de mutantes defectivos dirigida por vacunación. LivJ, por su parte, es un transportador de alta afinidad

de leucina, isoleucina y valina. Este transportador es esencial para la virulencia de algunos patógenos como *Streptococcus pneumonia* [23] o *Campylobacter jejuni* [24] y se ha identificado como inmunógeno en varias especies, como *Shigella flexneri* [25], *B. bronchiseptica* [26], y *B. pertussis* [27,28].

Al igual que lo observado previamente en *B. pertussis*, AfuA e IRP1-3 de *B. paraptussis* son proteínas reguladas por hierro y que se encuentran en membrana externa. Usando anticuerpos obtenidos por inmunización con ambos antígenos recombinantes de *B. pertussis* observamos que dichos anticuerpos reconocen a su homólogo en la superficie de *B. paraptussis*. En el caso de AfuA, encontramos que el apantallamiento del Antígeno O sobre este antígeno es muy bajo pero en el caso de IRP1-3 existe un cierto apantallamiento que afecta la interacción antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos producidos por inmunización con ambos antígenos recombinantes clonados a partir de ADN de *B. pertussis* demostraron tener actividad opsonizantes contra *B. paraptussis* aunque tal como se esperaba el nivel de opsonofagocitosis inducido por IRP1-3 fue mucho menor y la protección conferida contra *B. paraptussis* no fue significativa lo cual puede deberse al apantallamiento por el antígeno O. AfuA, en cambio, demostró ser un antígeno protector también contra *B. paraptussis* probablemente debido a que es un buen blanco de opsoninas tal como se demuestra en el significativo aumento del nivel de fagocitosis de *B. paraptussis* mediada por anticuerpos anti-rAfuA. Hasta donde sabemos, AfuA es el primer antígeno que induce este tipo de anticuerpos contra ambas especies y el primer candidato vacunal de formulaciones acelulares que portectoras contra ambas especies simultáneamente.

El tercer antígeno, LivJ, fue clonado a partir de ADN de *B. paraptussis*. La proteína recombinante mostró ser capaz de inducir una fuerte respuesta humoral y una respuesta Th1/Th2 balanceada, pero no mostró capacidad protectora contra *B. paraptussis*.

Los anticuerpos anti-rLivJ, aunque opsonizantes, mostraron actividad opsonofagocítica baja *in vitro*, tal vez por tratarse de anticuerpos de baja afinidad. Esta reducida actividad biológica de los anticuerpos podría explicar la falta de protección. Otra posible explicación para la falta de protección sería que la cantidad de antígeno en la superficie de la bacteria sea menor en las condiciones de infección disminuyendo la opsonización y la posterior fagocitosis. En este sentido, se ha observado que dependiendo de las condiciones de entorno LivJ de *E. coli* queda retenida en superficie o es secretada al medio extracelular [29]. Si bien en nuestras condiciones experimentales detectamos una gran densidad de antígeno en superficie bacteriana, a juzgar por el grado de opsonización, no se puede descartar que la situación *in vivo* sea diferente y las condiciones de entorno induzcan la secreción de esta proteína. Debido a que no se obtuvo actividad protectora contra *B. parapertussis*, no se estudió el potencial de LivJ como inmunógeno contra *B. pertussis*. De cualquier manera el análisis de este antígeno como potencial candidato vacunal aún continúa en paralelo con otras estrategias de formulación como es el empleo de mejores adyuvantes.

Si bien es necesario encontrar una mejor composición antigénica en las formulaciones acelulares contra la tos convulsa, otro aspecto muy importante es el adyuvante. El hidróxido de aluminio induce una respuesta inmune con gran contribución Th2 que protege contra los síntomas de la enfermedad pero es deficiente en el control de la colonización [30]. Se ha demostrado en modelo murino y luego en babuinos que la inducción de una respuesta con contribución Th1 y Th7 es indispensables para evitar la colonización y la persistencia de ambas especies en el hospedador [30–32]. La inmunidad celular es crítica para eliminar reservorios y fuentes de contagio. Los últimos resultados obtenidos en modelos primates presentados en el 12th International Symposium on Bordetella (Bruselas, abril de 2019) indican que babuinos inmunizados con vacuna acelular

y luego infectados no presentan síntomas de tos convulsa pero presentan colonización nasofaríngea por largo tiempo y contagian a sus compañeros de jaula por períodos tiempo más prolongados que los babuinos no inmunizados [33]. Esto está relacionado con que la infección induce una respuesta inmune con una gran contribución Th1/Th17 en animales no vacunados, algo que no ocurre si el animal ha sido inmunizado con vacuna acelular. Los animales no vacunados presentan todos los síntomas de la enfermedad pero eliminan bacterias más eficientemente que los animales vacunados que han montado una respuesta con un sesgo Th2. Actualmente es muy limitada la cantidad de adyuvantes que están aprobados para vacunación humana. Entre ellos, los más atractivos parecen ser AS04 y AS01B, que contienen monofosforil lípido A, un potente activador de TLR4 junto con sales de aluminio [34,35] y CpG 1018 [36] porque inducirían una respuesta Th1. De cualquier manera, hay algunos adyuvantes más prometedores que en están fase preclínica y que junto con una mejor selección antigénica podría mejorar notablemente las formulaciones vacunales acelulares actuales.

5.2 Bibliografía

- [1] Q. Zhang, Z. Yin, Y. Li, H. Luo, Z. Shao, Y. Gao, L. Xu, B. Kan, S. Lu, Y. Zhang, M. Li, M. Liu, P. Yao, Z. Zhao, Q. He, 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.* 46 (2014) 280–287. doi:10.3109/00365548.2013.878034.
- [2] H. Bokhari, F. Said, M.A. Syed, A. Mughal, Y.F. Kazi, T. Kallonen, Q. He, A.J. King, K. Heuvelman, F.R. Mooi, Molecular typing of Bordetella parapertussis isolates circulating in Pakistan, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 63 (2011) 373–380. doi:10.1111/j.1574-695X.2011.00861.x.
- [3] V.P. Karalius, S.L. Rucinski, J.N. Mandrekar, R. Patel, Bordetella parapertussis outbreak in Southeastern Minnesota and the United States, 2014, *Med.* 96 (2017) 1–6. doi:10.1097/MD.00000000000006730.
- [4] X. Zhang, M.E. Rodríguez, E.T. Harvill, O antigen allows B. parapertussis to evade B. pertussis vaccine-induced immunity by blocking binding and functions of cross-reactive antibodies, *PLoS One.* 4 (2009) e6989. doi:10.1371/journal.pone.0006989.
- [5] J. Gorgojo, Y. Lamberti, H. Valdez, E.T. Harvill, M.E. Rodríguez, Bordetella parapertussis Survives the Innate Interaction with Human Neutrophils by Impairing Bactericidal Trafficking inside the Cell through a Lipid Raft-Dependent Mechanism Mediated by the Lipopolysaccharide O Antigen, *Infect. Immun.* 80 (2012) 4309–4316. doi:10.1128/IAI.00662-12.
- [6] J. Gorgojo, E.T. Harvill, M.E. Rodríguez, Bordetella parapertussis Survives inside Human Macrophages in Lipid Raft-Enriched Phagosomes, *Infect. Immun.* 82 (2014) 5175–5184. doi:10.1128/IAI.02553-14.
- [7] N. Khelef, B. Danve, M.J. Quentin-Millet, N. Guiso, Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis: two immunologically distinct species, *Infect. Immun.* 61 (1993) 486–490. doi:10.1021/pr060681i.
- [8] N. Marr, D.C. Oliver, V. Laurent, J. Poolman, P. Denoël, R.C. Fernandez, Protective activity of the Bordetella pertussis BrkA autotransporter in the murine lung colonization model, *Vaccine.* 26 (2008) 4306–4311. doi:10.1016/j.vaccine.2008.06.017.
- [9] D. Bottero, M.E. Gaillard, A. Errea, G. Moreno, E. Zurita, L. Pianciola, M. Rumbo, D. Hozbor, Outer membrane vesicles derived from Bordetella parapertussis as an acellular vaccine against Bordetella parapertussis and Bordetella pertussis infection, *Vaccine.* 31 (2013) 5262–5268. doi:10.1016/j.vaccine.2013.08.059.
- [10] D. Bottero, M.E. Zurita, M.E. Gaillard, F. Carriquiriborde, P. Martin Aispuro, M. Elizagaray, E. Bartel, C. Castuma, D. Hozbor, Outer-Membrane-Vesicle-Associated O Antigen, a Crucial Component for Protecting Against Bordetella parapertussis Infection, *Front. Immunol.* 9 (2018) 1–12. doi:10.3389/fimmu.2018.02501.
- [11] M.L. Perez Vidakovics, J. Paba, Y. Lamberti, C. Andre Ricart, M. Valle De Sousa, M.E. Rodríguez, Profiling the Bordetella pertussis Proteome during Iron Starvation, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 2518–2528. doi:10.1021/pr060681i.
- [12] J. Alvarez Hayes, E. Erben, Y. Lamberti, M. Ayala, F. Maschi, C. Carbone, B. Gatti, G. Parisi, M.E. Rodríguez, Identification of a new protective antigen of Bordetella pertussis, *Vaccine.* 29 (2011) 8731–8739. doi:10.1016/j.vaccine.2011.07.143.

- [13] J. Alvarez Hayes, E. Erben, Y. Lamberti, G. Principi, F. Maschi, M. Ayala, M.E. Rodríguez, *Bordetella pertussis* iron regulated proteins as potential vaccine components, *Vaccine*. 31 (2013) 3543–3548. doi:10.1016/j.vaccine.2013.05.072.
- [14] J. Alvarez Hayes, Y. Lamberti, K. Surmann, F. Schmidt, U. Völker, M.E. Rodríguez, Shotgun proteome analysis of *Bordetella pertussis* reveals a distinct influence of iron availability on the bacterial metabolism, virulence, and defense response, *Proteomics*. 15 (2015) 2258–2266. doi:10.1002/pmic.201400512.
- [15] G. Fedele, I. Schiavoni, I. Adkins, N. Klimova, P. Sebo, Invasion of Dendritic Cells, Macrophages and Neutrophils by the *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin: A Subversive Move to Fool Host Immunity, *Toxins (Basel)*. 9 (2017) 293. doi:10.3390/toxins9100293.
- [16] H.A. Valdez, J.M. Oviedo, J.P. Gorgojo, Y. Lamberti, M.E. Rodríguez, *Bordetella pertussis* modulates human macrophage defense gene expression, *Pathog. Dis.* 74 (2016) ftw073. doi:10.1093/femspd/ftw073.
- [17] A. Fukui-Miyazaki, H. Toshima, Y. Hiramatsu, K. Okada, K. Nakamura, Ak. Ishigaki, N. Shinzawa, H. Abe, Y. Horiguchi, The Eukaryotic Host Factor 14-3-3 Inactivates Adenylate Cyclase Toxins of *Bordetella bronchiseptica* and *B. parapertussis*, but Not *B. pertussis*, *MBio*. 9 (2018) 1–15. doi:10.1128/mBio.00628-18.
- [18] D.N. Wolfe, E.M. Goebel, O.N. Bjornstad, O. Restif, E.T. Harvill, The O antigen enables *Bordetella parapertussis* to avoid *Bordetella pertussis*-induced immunity, *Infect. Immun.* 75 (2007) 4972–4979. doi:10.1128/IAI.00763-07.
- [19] M.C. Gestal, I. Rivera, L.K. Howard, K.K. Dewan, I.H. Soumana, M. Dedloff, T.L. Nicholson, B. Linz, E.T. Harvill, Blood or Serum Exposure Induce Global Transcriptional Changes, Altered Antigenic Profile, and Increased Cytotoxicity by Classical *Bordetellae*, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 1–10. doi:10.3389/fmicb.2018.01969.
- [20] P. Gueirard, K. Le Blay, A. Le Coustumier, R. Chaby, N. Guiso, Variation in *Bordetella bronchiseptica* lipopolysaccharide during human infection, *FEMS Microbiol. Lett.* 162 (1998) 331–337. doi:10.1016/S0378-1097(98)00142-6.
- [21] U. Heininger, K. Stehr, J.D. Cherry, The efficacy of a whole cell pertussis vaccine and fimbriae against *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections in respiratory mouse model, *Vaccine*. 16 (1998) 1255. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9682386>.
- [22] B.M. van den Berg, H. Beekhuizen, F.R. Mooi, R. van Furth, Role of antibodies against *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to human bronchial epithelial cells, *Infect. Immun.* 67 (1999) 1050–5. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=96428&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [23] T.E. Molzen, P. Burghout, H.J. Bootsma, C.T. Brandt, C.E.V. Der Gaast-De Jongh, M.J. Eleveld, M.M. Verbeek, N. Frimodt-Møller, C. Ostergaard, P.W.M. Hermans, Genome-wide identification of streptococcus pneumoniae genes essential for bacterial replication during experimental meningitis, *Infect. Immun.* 79 (2011) 288–297. doi:10.1128/IAI.00631-10.
- [24] D.A. Ribardo, D.R. Hendrixson, Analysis of the LIV system of *Campylobacter jejuni* reveals alternative roles for livj and livk in commensalism beyond branched-

- chain amino acid transport, *J. Bacteriol.* 193 (2011) 6233–6243. doi:10.1128/JB.05473-11.
- [25] X. Peng, X. Ye, S. Wang, Identification of novel immunogenic proteins of *Shigella flexneri* 2a by proteomic methodologies, *Vaccine*. 22 (2004) 2750–2756. doi:10.1016/j.vaccine.2004.01.038.
- [26] Y. Liu, F. Qin, G. Bao, H. Chen, C. Xiao, Q. Wei, Q. Ji, Immunoproteomic Analysis of *Bordetella bronchiseptica* Outer Membrane Proteins and Identification of New Immunogenic Proteins, *J. Integr. Agric.* 13 (2014) 2010–2018. doi:10.1016/S2095-3119(13)60618-8.
- [27] B.E. Tefon, S. Maass, E. Ozcengiz, D. Becher, M. Hecker, G. Ozcengiz, A comprehensive analysis of *Bordetella pertussis* surface proteome and identification of new immunogenic proteins, *Vaccine*. 29 (2011) 3583–95. doi:10.1016/j.vaccine.2011.02.086.
- [28] Y.Z. Zhu, C.S. Cai, W. Zhang, H.X. Guo, J.P. Zhang, Y.Y. Ji, G.Y. Ma, J.L. Wu, Q.T. Li, C.P. Lu, X.K. Guo, Immunoproteomic analysis of human serological antibody responses to vaccination with whole-cell pertussis vaccine (WCV), *PLoS One*. 5 (2010) e13915. doi:10.1371/journal.pone.0013915.
- [29] X.X. Xia, M.J. Han, Y.L. Sang, J.S. Yoo, Comparison of the extracellular proteomes of *Escherichia coli* B and K-12 strains during high cell density cultivation, *Proteomics*. 8 (2008) 2089–2103. doi:10.1002/pmic.200700826.
- [30] P.J. Ross, C.E. Sutton, S. Higgins, A.C. Allen, K. Walsh, A. Misiak, E.C. Lavelle, R.M. McLoughlin, K.H.G. Mills, 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) e1003264. doi:10.1371/journal.ppat.1003264.
- [31] K.H.G. Mills, A. Barnard, J. Watkins, K. Redhead, B. Lane, S. Mimms, P. Bar, H. En, U. Kingdom, Cell-Mediated Immunity to *Bordetella pertussis*: Role of Th1 Cells in Bacterial Clearance in a Murine Respiratory Infection Model, *Infect. Immun.* 61 (1993) 399–410.
- [32] J.M. Warfel, T.J. Merkel, *Bordetella pertussis* infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates, *Mucosal Immunol.* 6 (2013) 787–796. doi:10.1038/mi.2012.117.
- [33] J.M. Warfel, L.I. Zimmerman, T.J. Merkel, 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 (2013) 787–792. doi:10.1073/pnas.1314688110.
- [34] A.M. Didierlaurent, S. Morel, L. Lockman, S.L. Giannini, M. Bisteau, H. Carlsen, A. Kielland, O. Vosters, N. Vanderheyde, F. Schiavetti, D. Larocque, M. Van Mechelen, N. Garcon, AS04, an Aluminum Salt- and TLR4 Agonist-Based Adjuvant System, Induces a Transient Localized Innate Immune Response Leading to Enhanced Adaptive Immunity, *J. Immunol.* 183 (2009) 6186–6197. doi:10.4049/jimmunol.0901474.
- [35] N.A. Rayner, D.E. Parker, E.B. Horton, C. Folland, L. V Alexander, D.P. Rowell, E.C. Kent, S.P. Volovik, S. Zervoudaki, Adjuvants for Human Vaccines, *Curr. Opin. Immunol.* 24 (2005) 167–187. doi:10.1016/j.coi.2012.03.008.ADJUVANTS.
- [36] A.M. Krieg, CpG Motifs in Bacterial DNA and Their Immune Effects, *Annu. Rev. Immunol.* 20 (2002) 709–760. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064842.

