Bases moleculares para la prevención de una enfermedad causada por *Bordetella pertussis*, un patógeno re emergente

Trabajo de Tesis Doctoral 2010

Daniela Bottero
Directora: Prof. Dra. Daniela Hozbor



Universidad Nacional De La Plata Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Biológicas

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata – CCT – La Plata – CONICET, bajo la dirección de la Profesora Dra. Daniela Hozbor.

A mis maestros Carmen y Horacio

A Mauri y Lucre por mostrarme las formas del amor infinito

Mi reconocimiento

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) y a la Facultad de Ciencias Exactas, por haberme brindado el ámbito propicio para desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral.

Al Consejo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICET) por haberme otorgado una Beca con la cual me fue posible desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral.

Mi agradecimiento

A la Profesora Dra. Hozbor por haberme permitido participar de este grupo de trabajo, por tener tan claro el rumbo y no abandonar nunca la lucha, por el trabajo cotidiano y sobrehumano, por enseñarme tanto. Por la calidez humana...

A las tres personas que me alentaron enérgicamente y me acompañaron en la decision de emprender este camino de la ciencia allá por el año 2004. Gracias mamá-Jose, Sofi y Lopar!

Al Profesor Dr. Lagares por permitirme trabajar en su laboratorio.

A mis compañeros bodetelitos, por hacerme sentir tan a gusto cada día de trabajo...

A Emi por ser un poco "hija" y mucho más amiga y por el don de buena gente.

A Augustito por la visión permanentemente-crítica-y-reflexiva, y por ser tan brutalmente semejante a mi hermano Sebastián, que está lejos y lo extraño.

A Mati por la inquietud exasperante por desguazar hasta lo impensado cada nuevo desafío y obviamente por ser el cuidador de nuestro lugar de trabajo. No voy a hablar de pHs...

A los diagnósticos que se quedaron:

A Dario por la calma, la buena predisposición y por los futuros proyectos juntos

A Euge por seguir con nosotros, por las charlas habidas y las venideras!

A los diagnósticos que se nos fueron Dani y Arielito por los incontables mates y porque los dos juntos me hacian reir mucho!

A Celi por confundirse como una más entre nosotros a pesar haber sido nuestra profe, por la ayuda sincera y desinteresada.

A Roy por su amistad, te extrañamos!

A Juli por la frontalidad y los muy muy valiosos consejos de madre.

A Fede por la buena predisposicion cotidiana, por los papers, por el compromiso.

A Mariana y Maxi por comprender mi despolarizacion de este final de tesis sin conocernos demasiado aún.

A los RPSs por alojarnos y compartir espacios y muchos momentos,

A Tony por su ejemplo de búsqueda permanente de confraternización, por su interés por el otro y su buena predisposición. Por incorporar a Mauri en su grupo contemporáneamente a mí.

A Flor por demostrarme mil veces que se puede ser más prolijo, más eficiente y por interesarse y ofrecer su ayuda otras mil veces más

A Angie por "la" palabra nunca ausente, por la solidaridad espontánea y sincera, por tu generosidad.

Al abogado-devenido en bioquímico Dr. Negro por resolver todas las consultas juridisprudenciales de manejo intra y extra facultad.

A Gonza por recordarme los ímpetus de juventud!

A Walter por el humor.

A Euge y Carlita por la frescura y las ganas de aprender!

A Rubencito, por la bienvenida y el cariño de todas las mañanas, por todos los regalos para Lucre!!

A los R3s por emanar tanto glamur y desfachatez, por ser el alma de las fiestas, por alegrar tantos almuerzos, PC2s y CABBIOS!!!! Porque a pesar de auto proclamarse como bipolares la esencia es UP!

A Anibal por la "suigenerisidad", por su ejemplo como docente y por su espíritu calmo.

A JPG por la energía siempre positiva, por el empuje, las ganas y la mano siempre tendida.

A Piti por compartir conmigo este nuevo y maravilloso mundo de la maternidad.

A Covelita por ayudarme en estos últimos tiempos en la cátedra, por el buen humor y la buena onda.

A Nachito por los locros que fueron y espero que los que vendrán! por reinventar la terminología de la química: "nacl" ya es parte de mi léxico...

A Florcita, Caro, Julita y Leti por renovar mi staff de amigas y ser mis nuevas amigas, "las jóvenes".

A Marinita y Edu, y a Elias por estar presentes desde la distancia.

A Mai y Amanda por su amistad, por tantas y tantas horas de estudio juntas porque no hubiera sido tan hermosa la etapa de la facu sin ustedes!!! ... y a Lichar, Vázquez, al Fisa, Analía...

A Silvina, María, Paula, Yamila y Natalia, mis amigas desde el cole, porque a pesar de habernos convertido en mujeres tan distintas nos seguimos eligiendo y la amistad de cada una en particular me hace mejor persona. Las quiero mucho!!!

A los Echaza por aceptarme y aguantarme durante tantos años como una hija más, por su enorme hospitalidad, a Dieguito por llevarnos a la cancha tantos sábados ... y después domingos, por incorporarme en los proyectos venideros y por el cariño.

A Sofi, por ser mi hermana de la vida...

A mi familia de sangre: papáJuanK, mamáJose y Seba, por acompañarme incondicionalmente en la vida; y a la nueva: Vivi, Jorge, Le, Damián, Santi y Sofi por el cariño y por ser tan distintos pero tan complementarios a los Bottero!!

A todos por ser una parte muy importante de dos de los momentos más felices, encontrar al amor de mi vida y tener a Lucre.

MUCHAS, MUCHAS GRACIAS!



Contenidos

PRÓLOGO	19
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	23
La enfermedad Breve reseña histórica Descripción clínica	25 25 28
El agente etiológico	30
Proceso de infección y patofisiología	34
Respuesta inmune protectora contra la infección generada por Bordetella pertussis	52
Estrategias de control contra la enfermedad Vacunas Quimioprofilaxis	55 55 59
Epidemiología Situación epidemiológica mundial Situación epidemiológica en Argentina	61 61 64
Re emergencia de la enfermedad: causas potenciales	68
Objetivos abordados	76
CAPÍTULO II EVALUACIÓN DE LA DIVERENCIA ANTIGÉNICA DE L POBLACIÓN BACTERIANA LOCAL EN RELACIÓN A LAS CEPAS EMPLEADA EN LA FORMULACIÓN DE VACUNAS	
Introducción	81
Resultados y discusión Polimorfismo en el gen de la Subunidad 1 de la toxina pertussis (ptxS1) Polimorfismo en el gen de la adhesina Pertactina (prn) Determinación de los serotipos Fimbriales de los aislamientos locales de B. pertussis Caracterización por fingerprinting de aislamientos de B. pertussicirculantes en Argentina s mediante la técnica de Electroforesis en campo pulsado	83 83 87 92
(PFGE) Resumen y planteo de interrogantes profundizados en los siguientes capítulos	94 100
nesumen y pianteo de interrogantes profundizados en los siguientes capitulos	TOO

CAPÍTULO III BASES MOLECULARES PARA LA SELECCIÓN DE UNA CER	
VACUNAL DE B. PERTUSSIS	102
Introducción	104
Resultados y discusión Cinética de crecimiento – producción de factores de virulencia	105 105
Identificación de componentes bacterianos inmunogénicos, comunes y diferenciales Perfiles de expresión proteico de muestras enriquecidas en proteínas de	108
superficie de cepas de <i>Bordetella pertussis</i>	111
Resumen e interrogantes	123
CAPÍTULO IV ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD PROTECTIVA DE DISTINTA	AS
CEPAS VACUNALES DE B. PERTUSSIS	124
Introducción	126
Resultados y discusión	127
CAPÍTULO V CONCLUSIÓN	132
CAPÍTULO VI MATERIALES Y MÉTODOS	138
Cepas, aislamientos clínicos y medios de cultivo empleados Medios de cultivo empleados para el desarrollo de <i>B. pertussis</i>	140 142
Evaluación de la divergencia antigénica de la población bacteriana local Análisis del polimorfismo en el gen de la Subunidad 1 de la toxina pertussis	143
(ptxS1) y de la adhesina Pertactina (prn)	143
Determinación de los serotipos fimbriales Fingerprinting mediante la técnica de Electroforesis en campo pulsado (PFGE)	144 145
Caracterización de cepas vacunales Cinética de crecimiento microbiano empleando el medio sintético de Stainer- Scholte	147 147
Detección de la toxina pertussis producida mediante técnicas de inmunoblot	147
Identificación de componentes bacterianos inmunogénicos, comunes y diferenciales	149
Análisis proteómico de muestras enriquecidas en proteínas de membrana	151
Estudios in vivo de la capacidad protectiva empleando el modelo de desafío intranasal en ratón	154

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

158

PRÓLOGO

La tos convulsa o pertussis es una enfermedad respiratoria aguda altamente contagiosa causada por la bacteria gram negativa *Bordetella pertussis*. El nombre de la enfermedad, de alguna forma, remite al pasado. Sin embargo, pertussis está cada vez más presente, ya que en diversos países del mundo -incluida Argentina- se está registrando un notable incremento en la cantidad de casos.

Esta situación ha focalizado la atención sobre las estrategias de prevención y control empleadas para esta enfermedad. En este punto resulta interesante hacer un breve repaso de la historia de las vacunas anti-pertussis. Los primeros ensayos de vacunación datan de los comienzos del siglo veinte. Específicamente en 1914, Hess vacunó a 244 niños con una vacuna a la que se denominó celular por estar compuesta por una suspensión del agente causal muestro por calor. Del total de niños vacunados con esta formulación sólo enfermaron 20 (8,2%), en tanto que de 80 niños no vacunados, enfermaron 59 (73,7%). Casi simultáneamente, entre 1915 y 1917, Luttinger vacunó a una cifra similar, enfermando 23 de los 239 niños vacunados, estimando una protección del 90%. Probada así la vacuna, el primer estudio de campo fue realizado por Madsen, en las islas Feroe donde se registraba una gran epidemia que se inició en 1923. Esta situación permitió inmunizar cerca de 2.000 individuos lográndose reducir apreciablemente la letalidad de la enfermedad, pues fallecieron 5 de 2.094 vacunados, versus 18 de 627 no vacunados. Estos resultados impulsaron la aceptación del uso de esta vacuna. Más tarde, Perla Kendrick y Grace Eldering adicionaron a la formulación de pertussis un adyuvante y los componentes tetánico y diftérico constituyendo así la triple bacteriana la cual luego de pasar los test de toxicidad, seguridad y efectividad fue incorporada en los calendarios de vacunación a partir de los años cuarenta. La inmunización masiva con esta formulación redujo de manera significativa la morbi mortalidad causada por esta enfermedad. Esta formulación continúa en uso hasta nuestros días, aunque en algunos países debido a reportes que asociaron la aparición de reacciones adversas con la vacunación,

disminuyó su aceptación, propulsando el desarrollo de vacunas de componentes o acelulares carentes de factores bacterianos que podrían asociarse a la reactogenicidad.

Las reacciones adversas de la vacuna celular de pertussis constituyen uno de los grandes mitos de la medicina moderna. Revisando los trabajos que lo originaron, vemos registradas muertes súbitas ocurridas meses post-vacunación lo cual constituiría una evidencia contraria a aquella asociación. Estudios posteriores mostraron que la inducción de reacciones severas por la vacunación con vacunas pertussis celulares no es frecuente. Los debates al respecto aún continúan pero más allá de ello, la controversia ha permitido el desarrollo de nuevas vacunas que hoy pueden utilizarse en la población adolescente adulta considerada principal fuente de diseminación del patógeno.

En Argentina la vacunación contra la tos convulsa comienza en los años setenta con la incorporación masiva de la vacuna celular triple bacteriana (DTP – Difteria, Tétanos y Pertussis) en el Calendario Nacional de Vacunación con tres dosis a los 2, 4 y 6 meses y un refuerzo a los 18 meses. La situación epidemiológica de la enfermedad motivó en los años ochenta la incorporación de un refuerzo al ingreso escolar y en el año 2009 un refuerzo en la población adolescente. Se espera que estas estrategias mejoren el control de esta enfermedad que para Argentina, al igual que para otros países, continúa siendo un problema para la salud pública. Varias son las hipótesis respecto de las causas de la situación epidemiológica actual de la enfermedad, la mayoría de ellas están asociadas a las vacunas: coberturas subóptimas, relativa baja efectividad de las vacunas en uso, corta duración de la inmunidad conferida por las vacunas ya sean celulares o acelulares, adaptación del agente causal a huéspedes inmunes, o combinaciones de cualquiera de las anteriores.

En este contexto dentro de los objetivos planteados en el desarrollo de este trabajo de Tesis se encuentra la caracterización de la población de *Bordetella pertussis* circulante en nuestro país. En particular, nos dedicaremos a la evaluación de su divergencia y de su polimorfismo respecto de ciertos factores de virulencia implicados en la protección. Estos objetivos se extendieron a las cepas vacunales ya que nuestro grupo de investigación está involucrado de manera directa con un proyecto que persigue la reactivación de la producción nacional de vacunas. De manera complementaria a

estudios realizados previamente en nuestro grupo, evaluamos la implicancia de la divergencia genómica en la funcionalidad bacteriana focalizando los estudios a las cepas vacunales, en particular a cuatro cepas con potencialidad de ser incluidas en una formulación producida en nuestro país.

Para una mejor compresión de los experimentos realizados y los resultados alcanzados comenzaré este trabajo con una reseña histórica de la tos convulsa y con una descripción de las principales características de su agente causal. Me referiré luego a las vacunas anti-pertussis desarrolladas y empleadas para el control de la enfermedad. Presentaré datos sobre la epidemiología actual de pertussis en el mundo y en nuestro país y discutiré las hipótesis hasta ahora planteadas para explicar las causas de la resurgencia de la enfermedad de forma que a partir de allí se puedan plasmar los objetivos específicos abordados durante mi trabajo de Tesis. En los capítulos siguientes a la introducción presentaré los resultados alcanzados esperando que los mismos confluyan a las conclusiones finales de mi trabajo las cuales espero contribuyan al conocimiento sobre esta patología y sobre las estrategias de control hoy en uso.

Capítulo I

Introducción

La enfermedad

Breve reseña histórica

La tos convulsa es una enfermedad respiratoria aguda cuya sintomatología típica son los paroxismos de tos, vómitos después de toser y el estridor inspiratorio. Esta enfermedad conocida también con nombres como coqueluche, tos ferina, pertussis o tos de los 100 días, fue descripta primariamente como una patología de la infancia ocupando la primera causa de muerte en los niños durante la época en la que no existían vacunas especificas. Aún hoy, luego de 60 años de la incorporación de la vacuna en los calendarios nacionales de vacunación, la enfermedad se la considera un problema de salud pública ya que continúa provocando en el mundo 30 millones de casos y 300.000 muertes por año.

La primera crónica médica de esta enfermedad aparece en 1578 en una descripción de Gillaume de Bailllou (1538-1616) sobre una epidemia ocurrida en ese año en Francia. Este médico francés considerado como el principal epidemiólogo de occidente después de Hipócrates, trabajó por rescatar la tradición hipocrática basada en la observación clínica, el entendimiento humano y la macroscómica de las enfermedades y su tratamiento. Fue famoso por su erudición, elocuencia y la claridad de sus cursos y escritos. Dejó excelentes descripciones de la peste, posiblemente de la fiebre tifoidea y del sarampión. A este médico se le acredita la descripción clínica de la tos convulsa, aunque otros señalan que fue un médico iraní el responsable de esta descripción algunos años antes, en 1501 (6). Algunas descripciones de cuadros clínicos compatibles con el de la tos convulsa que datan de años anteriores hacen dudar que la primera mención de la enfermedad la haya hecho Baillou. De hecho Kohn (100) sugiere que la descripción de Perinthus cough realizada por Hipócrates alrededor del año 400 A.C. se correspondía a una enfermedad cuya sintomatología es compatible con tos convulsa. Más aún en el año 1190, en el Reginad´s Vita Godrici se emplea la palabra kinkehost para describir una enfermedad que pareciera ser la tos convulsa ya que kink es el sinónimo escocés de paroxismo de tos (152). En el diccionario medieval holandés Middelnederlandasch woordenboek se sugirió que

la palabra *gisschen* podría ser una denominación para tos convulsa en el este de Holanda en la primera mitad del siglo XIV. En "Historia de la Pediatría en Holanda", van Lieburg (106) se refiere al libro de los Milagros de la Catedral de Hertogenbosch, al sur de Holanda, donde se describe un peregrinaje a la estatua de Santa María en el año 1383 en agradecimiento a la recuperación de un niño que padecía de una enfermedad respiratoria denominada *kychoest*. Si bien resulta imposible confirmar retrospectivamente como tos convulsa o pertussis cualquiera de estos antecedentes clínicos, los mismos al menos sitúan la aparación de la enfermedad varios siglos atrás (26, 132, 160).

Más dudas aún se suscitan respecto del origen del nombre de la enfermedad. Los norteamericanos han adoptado el término latino *per* (intensa) *tussis* (tos), los españoles prefieren la denominación de tos ferina ("tos de las fieras"). Un poco más oscuro es el origen del término usado por los franceses, coqueluche. Existen dos teorías respecto a este último: una es onomatopéyica y lo hace derivar del vocablo *coq* (gallo) refiriéndose al sonido con que culminan las quintas de tos. La otra hace derivar a coqueluche de *coqueluchon*, que sería el nombre empleado para designar una caperuza aislante que se ponía a los niños tosedores o quizá la que usaban los antiguos infectólogos. En 1865 el profesor Trousseau durante su clase magistral en el Hotel-Dieu de París, se refiere a la enfermedad como la "*toux qui houpe*", de donde los ingleses hicieron derivar el término "whooping cough".

En relación al agente etiológico de la tos convulsa, hasta el advenimiento del siglo XX se pensaba que la enfermedad era causada por un hongo. En 1870 Letzerich describió el desarrollo de hongos en la expectoración de los niños que tosían en quintas: "unos esporos pequeños, redondeados o elípticos, de color pardo rojizo, que germinaban parcialmente para formar filamentos". Posteriormente Tschamer los cultivó y los inoculó en conejos, describiendo un micelio filamentoso que denominó *Ustilago maidis var Capnodium citri*. En el año 1883 ambas descripciones fueron rebatidas por Burger, quien publicó el hallazgo de un bacilo pequeño y elipsoidal en la expectoración de los coqueluchosos. Corriendo aún el año 1887 numerosos investigadores como Afanassjew, Czaplewski y Hensel continuaron describiendo al agente causal como un bacilo que resultaba

imposible de cultivar. En 1901, Jochmann y Krause aislaron en agar sangre, del esputo de un pequeño paciente, un bacilo que llamaron *Bacillus pertussis Eppendorf*, en honor al sector de Hamburgo donde estaba su Hospital.

Sólo recién en el año **1906** Joules Bordet y Octave Gengou lograron de manera contundente probar la causalidad de la sintomatología de la enfermedad con el bacilo, al que denominaron *Bordetella pertussis*. Estos autores lograron además replicarlo *in vitro* gracias al desarrollo de un medio de cultivo formulado en base a sangre, glicerol y papa. En palabras de los investigadores: "La pululación, dijeron Joules Bordet y Octave Gengou al describir su hallazgo, era de una abundancia tal y de una pureza tan perfecta, que era imposible rehusarse a admitir una relación de causalidad directa entre esta infección y la aparición de la coqueluche".

Bordetella pertussis y en menor medida otra especie del género Bordetella parapertussis son las responsables de esta enfermedad infecciosa aguda del tracto respiratorio que es altamente contagiosa y que hoy afecta preferentemente a los niños menores de 1 año de edad. Existen otros microorganismos que pueden causar una sintomatología similar a pertussis entre los que se puede mencionar Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae y ciertos virus respiratorios como adenovirus y el virus sincicial respiratorio. De hecho, el término síndrome coqueluchoide se continua empleado en la clínica médica para denotar los síntomas y signos indistinguibles de la tos convulsa, cuando no se puede demostrar la presencia de B. pertussis o B. parapertussis.

Descripción clínica

Pertussis podría describirse como una enfermedad extenuante que puede persistir durante varios meses. La enferemedad comienza con un **período de incubación** que dura entre 6 y 21 días, generalmente 10 días. El período siguiente de 1 a 2 semanas de duración, se denomina **fase catarral**. La sintomatología que se presenta en esta fase puede confundirse con otras infecciones respiratorias pues en general aparece como un resfrío con tos seca. En la fase catarral se describe la mayor tasa de diseminación de la enfermedad de ahí su gran importancia epidemiológica. Esta característica se sustenta en que es durante este periodo cuando la carga bacteriana en la nasofarínge del paciente infectado es alta y a que generalmente no se toman las medidas de control de la enfermedad como el aislamiento respiratorio del paciente o la instauración de tratamiento antibiótico. Siendo posiblemente la inespecificidad de la sintomatología que caracteriza este periodo, la principal causa.

La fase siguiente es la paroxística que dura de 3 a 6 semanas y se caracteriza por la presentación de accesos o paroxismos de tos que son propios de la enfermedad, vómitos después de toser, cianosis y apnea. Los paroxismos están caracterizados por accesos repetidos de tos en forma violenta, sin inhalaciones intermedias, seguidos de un estridor inspiratorio marcado y característico. Al finalizar el paroxismo es frecuente la eliminación de mucosidad clara y blanquecina seguida de vómitos. Los pacientes en general presentan leucocitosis marcada con linfocitosis absoluta, pierden peso, a veces presentan hipoglucemia pero raramente fiebre. No se detecta bacteriemia durante esta fase.

Los síntomas de la enfermedad van decreciendo en severidad durante el **período de convalecencia** que puede durar varios meses (55, 89).

Todo este cuadro clínico se corresponde con la presentación típica de la enfermedad. Sin embargo, existen distintos factores que lo condicionan como por ejemplo la edad del paciente, el estado de vacunación, el tratamiento con antibióticos y la coinfección con otros microrganismos (30). Para los niños menores de 6 meses la enfermedad evoluciona generalmente a una tos cianosante, sin estridores y que habitualmente se acompaña de apneas y bradicardias profundas. La enfermedad en niños mayores, adolescentes y adultos

jóvenes previamente inmunizados se presenta frecuentemente en forma atípica; los pacientes manifiestan tos persistente y prolongada (durante semanas o meses) o puede pasar completamente desapercibida. En un 13 a 20% de los adultos con tos prolongada, se ha encontrado que la causa es pertussis, frecuentemente con una duración media de la tos de 7 a 8 semanas (32, 63).

Las complicaciones más frecuentes de esta enfermedad se presentan en los niños menores de 1 año y son neumonías (22%), convulsiones (3%), encefalitis (1%) y en algunos casos puede ocurrir la muerte (0,3% en niños de 2 años a 6 meses y 1,3% en el primer mes de vida) (20, 31, 40). Si comparamos esta enfermedad con la meningitis bacteriana, su gravedad y mortalidad, así como las secuelas que puede ocasionar son comparables, sin que se le de la importancia que se da a la meningitis bacteriana.

Esta enfermedad es especialmente grave en los niños menores de 6 meses de vida, en niños no vacunados y en aquellos que han sido prematuros. Si recordamos que la primera dosis de vacuna contra esta enfermedad se coloca a los 2 meses de edad y la segunda a los 4 meses, la posibilidad de desarrollar las formas graves de la enfermedad se da con mayor frecuencia a estas edades.

Se estima que alrededor de 1 de cada 10 niños con pertussis desarrollarán neumonía y alrededor de 1 cada 50 padecerán convulsiones. Además, cerca de 1 de cada 250 personas que se infectan desarrollarán encefalopatía y en los casos de peor evolución ocurrirá el fallecimiento del paciente.

El agente etiológico

El principal agente etiológico de la tos convulsa es *Bordetella pertussis* aunque también se ha descripto a otra especie del género *Bordetella*, *B. parapertussis* con capacidad de inducir la misma patología pero en general con sintomatología más moderada (10).

B. pertussis forma parte del género *Bordetella* que pertenece a la familia *Acaligenaceae, orden Burkholderiales*, clase *Betaproteobacteria*. Dentro de este género, los 10 integrantes hasta ahora descriptos (Tabla I. 1) son cocobacilos gram negativos diminutos (0,2μm por 0,7-1μm) que con excepción de *B. petrii* son estrictamente aerobios con un metabolismo respiratorio no fermentativo.

Se los considera microrganismos de desarrollo fastidioso no debido a sus requerimientos nutricionales especiales sino a la dificultad de desarrollo por la inhibición ejercida fácilmente por compuestos tales como metales pesados, ácidos grasos insaturados, detergentes, peróxidos y sulfuros. Así los medios de cultivos empleados usualmente para el cultivo de *B. pertussis* se suplemetan con almidón, sangre o carbono activado como adsorbentes de sustancias tóxicas (64).

Especie	Rango de hospedador/fuente	Enfermedad	Referencia	
B. pertussis	Humanos	Pertussis	Bordet y Gengou, 1906	
B. parapertussis _{hu}	Humanos	Pertussis	Eldering y Kendrick, 1938	
B. parapertussis ov	Ovejas	Neumonía	Cullinane et al. 1987, Porter et al., 199	
B. bronchiseptica	Varios mamíferos	Enfermedad respiratoria	Ferry, 1912	
B. holmesii	Humanos	Septicemia, tos	Weyant et al., 1995	
B. avium	Pájaros	Rinotraqueitis	Kersters et al., 1996	
B. trematum	Humanos	Infecciones de heridas, otitis media	Vandamme et al., 1996	
B. hinzii	Pollos, humanos	Infecciones oportunistas en humanos	Cookson et al., 1994	
B. petrii	Ambiente, humanos	Infecciones oportunistas	Von Wintzingerode et al., 2001	
B. ansorpii	Humanos	Infecciones oportunistas Ko et al., 2005		

Tabla I. 1: Especies identificadas hasta el momento pertenecientes al género Bordetella

Las distintas especies del género tienen un diferente rango de huéspedes (Tabla I. 1). Así, por ejemplo para *B. pertussis* el único huésped hasta ahora descripto es el hombre mientras que para *B. parapertussis* se describen dos especies, una capaz de producir infección en los humanos, *B. parapertussis*_{hu} y otra que infecta exclusivamente al ganado ovino, *B. parapertussis*_{ov}. *B. bronchiseptica* presenta el mayor rango de huésped ya que ha sido aislada de numerosos animales incluyendo perros, monos,

conejos, cerdos y caballos, aunque también se han documentado infecciones esporádicas en humanos (67, 69, 181). Las primeras descripciones de infecciones en humanos por *B. bronchiseptica* estaban referidas a pacientes que trabajaban en contacto con animales infectados y/o pacientes con el sistema inmune deprimido, pero más tarde aparecieron algunos casos en individuos sanos y sin contacto evidente con animales infectados. Estos hallazgos resultan en parte preocupantes ya que las vacunas hoy existentes no están dirigidas contra este patógeno (181).

Las tres especies, *B. pertussis*, *B.parapertussis* y *B. bronchiseptica*, se las denominan **especies clásicas** ya que de las 10 especies del género estas son las más estudiadas. Pese a presentar una alta homología a nivel de ADN, las tres especies pueden diferenciarse fenotípicamente mediante pruebas bioquímicas como movilidad, actividad ureasa y reducción de nitratos y también analizando el crecimiento en agar Mc Conkey.

En la Tabla I. 2 se muestran los resultados de dichas pruebas para éstas y otras especies del género.

Característic as	B. pertussis	B. parapertussis	B. bronchi septica	B. avium	B. hinzii	B. holmesii	B. trematum
Colonias visibles en BGA - días	3	1-2	1	1	2	2-3	
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	-	+	+	+	•	-
Nitrato	-	-	+	ı	ı	•	variable
Movilidad	-	-	+	+	+	•	+
Ureasa	-	+ (24 hs)	+ (4 hs)	-	V	-	-
Hemólisis	+	+	v	v	?	-	
Crecimiento en agar MacConkey	-	V (lento)	+	+	+	+ (lento)	+

Tabla I. 2: Resultados de pruebas bioquímicas para la identificación a nivel de especie entre los miembros del género *Bordetella.* V: resultado de la prueba variable. BGA: medio de cultivo de Bordet - Gengou.

Desde el **punto de vista evolutivo** se especuló que *B. pertussis* había evolucionado de una cepa particular de *B. bronchiseptica* (129, 166), y de hecho recientemente parece

haberse identificado un linaje antecesor específico. Mediante el análisis de los datos de Multilocus Sequence Typing (MLST) de aislamientos del género *Bordetella* que infectan diferentes especies de mamíferos se han podido indentificar cuatro poblaciones bacterianas diferentes que se han designado como complejos: el complejo I y IV comprenden cepas de *B. bronchiseptica*, mientras que los complejos II y III comprenden los patógenos humanos *B. pertussis* y *B. parapertussis*_{hu}, respectivamente (Figura I. 1).

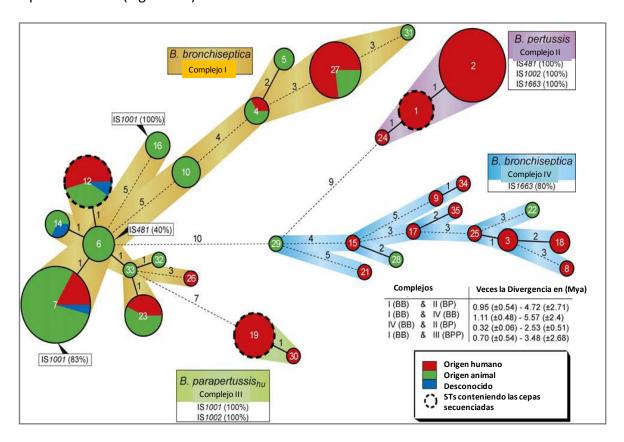


Figura I. 1: Árbol de expansión mínima para las especies *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*. El árbol presentado se elaboró en base a la secuencia de 7 genes "housekeeping". Para la construcción de este árbol primero se conectaron los tipos de secuencia que comparten el número más alto de variantes de un solo locus. Cada círculo representa un tipo de secuencia (ST) y el tamaño del mismo se relaciona con el número de aislamientos en cada ST particular. Los círculos de colores indican la distribución por huésped. Los números entre los STs conectados representan el número de subloci diferentes entre esos STs. Los complejos clonales I, II, III y IV se indican por tiras de colores entre STs conectados. ST16 (complejo I de *B. bronchiseptica*) contiene los aislamientos de *B. parapertussis*_{ov}. Los STs que contienen cepas cuyos genomas han sido secuenciados (*B. pertussis* Tohamal, *B. parapertussis* 12822 o *B. bronchiseptica* RB50) se indican con una línea punteada más gruesa. La distribución de elementos de inserción IS481, IS1001, IS1002 e IS1663 se muestran en recuadros; los números entre paréntesis indican el porcentaje de cepas que contienen el ISE como se determino por PCR. Se señalan los tiempos de divergencia entre los complejos I y IV de *B. bronchiseptica* y *B. pertussis* complejo II. Fuente: *Bordetella pertussis*, the Causative Agent of Whooping Cough, Evolved from a Distinct, Human-Associated Lineage of *B. bronchiseptica*. Diavatopoulos, Cummings, Schouls, Brinig, Relman, Mooi. PLoS Pathogens December 2005 Vol1. Issue 4.

 $parapertussis_{hu}$ habrían evolucionado a partir de los complejos IV y I, respectivamente, lo que indicaría que la adaptación de estas dos especies a los seres humanos se

produjo a través de dos eventos independientes (139, 166). Los mismos parecerían ser relativamente recientes o quizás teniendo en cuenta la baja diversidad que presentan las dos especies podría pensarse que ambas hayan encontrado lo que se conoce como cuello de botella evolutivo. En esos estudios se puede observar además que *B. parapertussis*_{ov} derivan claramente de grupos ST diferentes del complejo I.

Los integrantes *B. bronchiseptica* pertenecientes al complejo IV están más estrechamente relacionados con *B. pertussis* que los incluidos en el complejo I. Casi todas las cepas incluidas en el complejo IV fueron aisladas de pacientes con síntomas compatibles con pertussis y la mayoría contiene una secuencia de inserción IS1663 no encontrada en otros linajes. La adquisición de esta IS podría explicarse a través de mecanismos de transferencia vertical u horizontal. Una tranferencia vertical sugeriría una ascendencia común, mientras que la segunda indicaría un nicho compartido. Más allá de este aspecto en particular respecto de la adquisición de la IS1663, las cepas del complejo IV parecen haber sufrido una reducción del genoma que pofría estar asociada a una restricción de rango de huésped. Más aún, en la evolución de *B. pertussis* y *B. parapertussis* a partir del complejo I de *B. bronchiseptica* la adquisición de genes parece haber sido un evento raro (139).

Por su parte, los aislamientos de *B. bronchiseptica* obtenidos principalmente de humanos pertenecientes al complejo IV muestran la misma diversidad que *B. bronchiseptica* complejo I, es decir que parecerían ser aislamientos más antiguos que los de *B. pertussis*.

En base a estos resultados Diavatoupolus *et al* proponen que la falta de reportes de la enfermedad en Europa anteriores al año 1500 podrían implicar que la enfermedad provocada por *B. pertussis* fue importada a Europa desde otros continentes en donde hubo evidencia de la enfermedad anterior al siglo XVI o bien a que en el escenario evolutivo de *Bordetella*, *B. pertussis* tuvo un origen mucho más reciente a partir del antecesor común de los complejos IV y II. Los autores proponen que este antecesor común fue el primero que circuló en este continente produciendo una sintomatología moderada, lo suficiente como para que la enfermedad fuera subdiagnosticada, y que en algún punto temporal cercano dio origen a *B. pertussis*.

Desde el **punto de vista microbiológico** la dificultad en la recuperación de aislamientos a partir de muestras clínicas contribuyen a la baja popularidad de estos microorganismos del género *Bordetella* dentro del laboratorio. Especificamente en lo que se refiere a *B. pertussis* y *B. parapertussis* la necesidad de una sospecha oportuna de la enfermedad por parte del médico, del empleo de condiciones especiales para la toma, conservación, transporte y siembra de la muestra hacen que esta tarea de recuperación de aislamientos sea todo un desafío para el microbiologo. Sin embargo el logro de la misma ha permitido comenzar a entender no sólo aspectos evolutivos de estos patógenos sino también la dinámica de transmisión y circulación dentro de la población.

A continuación se describirán con más detalle características de *B. pertussis* ya que es objeto de estudio de esta tesis.

Proceso de infección y patofisiología

B. pertussis es un patógeno humano que se localiza exclusivamente en el tracto respiratorio del huésped. El proceso infeccioso comienza con el ingreso del patógeno a las vías aéreas del huésped a través de gotitas o aerosoles expelidos por un individuo infectado. Una vez dentro, la bacteria se adhiere a la mucosa nasofaríngea causando una inflamación leve en la zona. B. pertussis puede adherirse al epitelio ciliado pero también puede hacerlo a otros tipos celulares como los macrófagos alveolares y células dendríticas (142). Las bacterias adheridas proliferan y liberan toxinas causando ciliostasis, daño en el epitelio respiratorio, liberación de mucus, inflamación del lumen del tracto respiratorio e inhibición de las funciones de células del sistema inmune del huésped. Esta disrupción de la función normal de la mucosa ciliada y el daño del epitelio respiratorio son las patologías primarias asociadas con la infección de B. pertussis.

En los pulmones la primera lesión causada por pertussis parece ser la hiperplasia linfoide de los nódulos linfáticos peribronquiales y traqueobronquiales. Se ha reportado que pueden ocurrir incluso necrosis y descamación de las capas superficiales epiteliales de los bronquios pequeños (103). En la mayoría de los casos

de muerte por pertussis los pacientes presentan bronconeumonía, generalmente debida a una infección secundaria (88).

Los modelos de infección en animales han permitido conocer un poco más sobre la patofisiología de esta infección. Así, empleando el modelo de infección intranasal de pertussis en ratones se pudo observar que B. pertussis causa una bronconeumonía asociada a hemorragia alveolar con edema, sin evidencia de lesiones necróticas. El pulmón infectado presenta una inflamación perivascular y peribronquial generalizada, con un gran número de células infiltrativas, predominando entre ellas los polimorfonucleares. La distribución de estas células es homogénea en todo el pulmón. Se observa en general, inflamación del parénquima pulmonar con aflujo de linfocitos, mientras que el exudado intra alveolar está compuesto principalmente por monocitos. En la infección temprana también se ha observado una afluencia de células T γ δ en pulmones de ratones así como un rápido reclutamiento de células dendríticas.

En animales inmunizados el curso de la infección es menos prolongado y el influjo de células es más transitorio (120).

Para el desarrollo de las distintas etapas de infección, la bacteria requiere de una serie de **factores de virulencia** muchos de los cuales ya han sido identificados y caracterizados (92). Algunos de estos factores de virulencia pueden agruparse en dos categorías: **adhesinas** y **toxinas**, aunque también existen sistemas más complejos como el sistema de secreción tipo III que también juegan rol clave en la patogénesis de pertussis.

Así, mientras que las adhesinas median la adhesión al epitelio ciliado, a macrófagos y a neutrófilos, las toxinas son conocidas por contribuir a la patogénesis y en muchos de los casos estar involucradas en la evasión de la respuesta inmune montada por el huésped.

Entre las adhesinas las más estudiadas son la hemaglutinina filamentosa (FHA), fimbrias (FIM) y pertactina (PRN) y entre las toxinas, la adenilato ciclasa – hemolisina (ACT), toxina dermonecrótica (DNT), toxina pertussis (PTx, presente sólo en *B. pertussis*) y el lipooligosacárido (LOS).

En la Figura I. 2 que se muestra a continuación se esquematizan varios de estos factores de virulencia asociados a las células bacterianas.

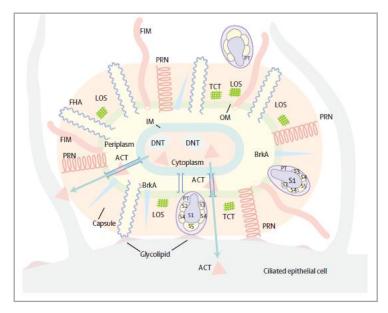


Figura I. 2: Adhesinas y toxinas de *B. pertussis.*

Fuente: Recent developments in pertussis. *Natasha S Crowcroft, Richard G Pebody*) *Lancet* 2006;

367: 1926-36

A continuación describiremos los aspectos más sobresalientes de cada uno de ellos.

Hemaglutinina filamentosa (FHA)

La FHA en una proteína de 220 kDa asociada a la superficie bacteriana pero que también se secreta al medio en cantidades importantes. Presenta una estructura filamentosa de 2 nm de diámetro y 45-50 nm de longitud que consiste en 19 hojas plegadas que formarían un barril que atraviesa la membrana externa. El gen estructural de esta adhesina, *fhaB*, tiene aproximadamente 10,1 kb y codifica para una proteína precursora de 367 kDa, FhaB. Este precursor sufre una serie de modificaciones en el extremo N-terminal y clivaje en el C-terminal, antes de que FhaB sea secretada. La eficiente secreción de FHA requiere de una proteína de membrana externa accesoria, FhaC, cuyo gen se encuentra río abajo de *fhaB* en un cluster de genes accesorios involucrados en la secreción tanto de FHA como de las fimbrias. Esta proteína no sólo está involucrada en la adhesión a células del huésped sino también entre células bacterianas, permitiendo la formación de microcolonias y biofilms (29). Se ha demostrado que esta proteína está implicada en la colonización traqueal, en la adherencia y la invasión de *B. pertussis* a macrófagos y células epiteliales aunque también se cree que tiene funciones inmunomodulatorias (1).

Por otra parte la forma soluble de FHA parecería que ejerce efectos como atenuador de la respuesta inmune (93). Recientemente se ha demostrado la capacidad de *B. pertussis* para inhibir la proliferación de los linfocitos T a antígenos exógenos, en este

proceso estaría involucrada FHA. La interacción de esta proteína con los receptores de macrófagos además parece inhibir la liberación de la citoquina proinflamatoria IL-12 vía un mecanismo dependiente de IL-10. Así, FHA facilitaría la persistencia deteniendo la respuesta inmune protectora Th1 (118). FHA también sería capaz de inducir un proceso apoptótico en monocitos y células epiteliales de pulmón (2).

Fimbria (Fim)

Las fimbrias o aglutinógenos son estructuras filamentosas de naturaleza proteica que se extienden desde la superficie bacteriana y participan en la adhesión a distintas células del huésped (116). En B. pertussis las fimbrias están compuestas por subunidades proteicas mayores de 22,5 y 22 kDa y una subunidad menor común a la que se designa FimD. La presencia de un tipo de subunidad mayor le confiere al microrganismo un tipo serológico de antígeno fimbrial que puede ser Fim2 (correspondiente a la subunidad proteica mayor de 22,5kDa) o Fim3 (a la de 22kDa). El ensamblaje de las subunidades mayores constituye la estructura filamentosa final de la fimbria. Muchos estudios sugieren que las fimbrias median la unión de Bordetella al epitelio ciliado y a monocitos por medio de las subunidades fimbriales mayores y mediante FimD respectivamente (114). Las proteínas que forman la estructura helicoidal de las fimbrias se unen a receptores heparán sulfato, sulfato de condroitina y dextrán sulfato, azúcares ampliamente distribuidos en el tracto respiratorio de los mamíferos, pudiendo mediar de esta manera la función de adhesión (61). Por otra parte las subunidades menores, que son las consideradas adhesinas, son capaces de unirse a la integrina VIa-5 presente en la superficie de monocitos (78).

Los antígenos fimbriales estan codificados por los genes *fim 2* y *fim 3* que son transcriptos por un mecanismo de corrimiento del marco de lectura de la hebra en una zona rica enresiduos citocinas (C-stretch) entre los elementos -10 y -35 de las regiones promotoras de los genes *fim.* Este mecanismo de regulación de la transcripción afecta de manera independiente la transcripción de cada uno de los genes *fim* por lo tanto los microrganismos pueden expresar combinaciones de estos antígenos o alguno de ellos por separado. Así, los aislamientos de *B. pertussis* se clasifican en los serotipos de fimbria 2, 3 o 2-3. Tanto Fim2 como Fim3 inducen anticuerpos aglutinantes y contienen epitopes antigénicos únicos lo que les da

especificidad de serológica, estos anticuerpos han correlacionado con la inmunidad anti pertussis luego de la vacunación con vacunas celulares.

La serotipificación de las cepas circulantes en base a los antígenos fimbriales se ha empleado en estudios epidemiológicos y la información obtenida de estos trabajos marca la evolución de las cepas circulantes sobre todo en relación a la historia de vacunación de cada país (23, 81, 163, 165, 172, 175). Más aún, los datos de cambios de serotipo fimbrial han sido de utilidad para las recomendaciones en el empleo de cepas para la formulación de vacunas. Por ejemplo, en el año 1979 la Organización Mundial para la Salud (OMS) sugirió el empleo de vacunas celulares que contuvieran cepas con serotipos fimbriales 2, 3 (177).

Pertactina (PRN)

La PRN es una proteína de la familia de las proteínas autotransportadoras que está presente en la membrana externa de *B. pertussis* y participa en el proceso de adhesión de la bacteria al huésped y en la colonización (114-115). La PRN fue la primera proteína del género *Bordetella* descripta como autotransportadora. Generalmente estas proteínas son secretadas al espacio periplásmico y posteriormente se autoprocesan mediante clivaje sobre su extremo C-terminal. PRN se sintetiza como un péptido precursor de 910 aminoácidos (P93 de 93 kDa) y sufre un procesamiento auto proteolítico en los extremos N- y C- terminales cuyos productos finales son los péptidos P.69 (69 kDa) y P.30 (22kDa) que se localizan en la superficie y en la membrana externa bacteriana respectivamente.

La estructura secundaria de PRN contiene dos regiones inmunodominantes que presentan repeticiones de secuencia: la región 1, cuya secuencia aminoacídica es (GGXXP) se encuentra ubicada a continuación del tripéptido RGD involucrado en la adhesión a las células del huésped; y la región 2 (PQP) que se encuentra en el extremo C-terminal. Esta región es considerada el epitope inmunoprotector de mayor importancia. Los altos títulos de anticuerpos contra PRN asociados a los de toxina pertussis o a los de fimbria en general han sido correlacionados con la protección contra las formas severas de la enfermedad (33, 98, 120, 158).

La estructura cristalina obtenida por rayos X muestra la presencia de un plegamiento helicoidal que consiste en 16 cadenas β hélice paralelas con una sección transversal en

forma de V, también se diferencian regiones con conformación estructural de loops que sobresalen uniendo las regiones β. Uno de estos loops o lazos contiene la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) y diversas regiones repetidas ricas en prolina (P) y leucina (L) del motivo asociado con la adherencia a los tejidos del huésped (44) Figura I. 3.

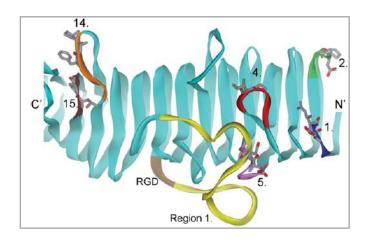


Figura I. 3: Esquema de la estructura cristalina de P.69 correspondiente al extremo N-terminal de la misma. Se indican el extremo amino terminal, la región polimórfica 1 incluyendo los sitios RGD y diferentes loops de la estructura reconocidos por diferentes anticuerpos monoclonales. Fuente: The role of peptide loops of the *Bordetella pertussis* protein P.69 pertactin in antibody recognition. Hijnen, M., R. de Voer, F. R. Mooi, R. Schepp, E. E. Moret, P. van Gageldonk, G. Smiths, and G. A. Berbers. 2007. Vaccine 25:5902-14.

Para el gen que codifica para la pertactina, *prn*, se han descripto diferentes variantes alélicas. El polimorfismo entre las cepas vacunales y los aislamientos de la población bacteriana circulante ha sido propuesto como una de las potenciales causas que contribuyen a la reemergencia de pertussis descripta hace 20 años y que continúa en la actualidad. Este aspecto lo analizaremos con detalle más adelante (124-126).

Además de la PRN se han descripto otras proteínas autotransportadoras como **BrkA** (del inglés <u>Bordetella resistence killing</u>), el factor de colonización traqueal (**TcfA**) y el producto del gen regulado por el sistema BvgAS, **Vag8**. A estas proteínas se les ha adjudicado un rol durante el proceso infectivo. De modo que, BrkA parecería impedir la lisis mediada por la vía clásica del complemento y contribuiría a la adhesión de *B. pertussis* a las células del huésped (42, 141). Recientemente se ha demostrado que

esta proteína posee actividad protectora; siendo capaz de aumentar la eficacia de vacunas acelulares cuando ésta es evaluada en el modelo murino (111).

Vag8 es una proteína autotransportadora de 95 kDa que contiene una secuencia RGD involucrada en procesos de adhesión (115). A diferencia de otras proteínas autotransportadoras de *Bordetella*, su dominio C-terminal no es clivado durante el proceso de secreción. El rol de esta proteína en la patogénesis de *B. pertussis* aún no ha sido determinado.

El factor de colonización traqueal (Tcf) es una proteína autotransportadora expresada exclusivamente por *B. pertussis*. Ensayos *in vivo* empleando el modelo murino sugieren que el Tcf es importante para la colonización y persistencia de la bacteria en la tráquea de los ratones. El gen que codifica para esta proteína se ha descripto como polimórfico y recientemente se han detectado aislamientos clínicos de pertussis que expresan este factor de forma variable debido a un mecanismo de variación de fase (169).

Toxina pertussis (PTx)

Este emblemático factor de virulencia es secretado exclusivamente por *B. pertussis*. A la acción de esta toxina se le han atribuido la mayor parte de los síntomas de la tos convulsa: sensibilización por histamina, el aumento en la secreción de insulina y la supresión de efectos regulatorios inmunológicos (114). También se le adjudica la linfocitosis en sangre periférica. Es por ello que se la ha designado como pertusígeno, factor promotor/estimulante de leucocitos, proteína de activación de islote, factor tóxico de aparición tardía e incluso antígeno protector (128).

Recientemente se ha sugerido que PTx sería importante en los primeros estadios de la infección probablemente a través de un mecanismo que retarda el reclutamiento de neutrófilos y su afluencia a las vías respiratorias (20).

Esta toxina de 106 kDa pertence al grupo de toxinas AB_5 y está formada por 6 subunidades S1-S5 en una relación 1:1:1:2:1, cuyos pesos moleculares estimados son de 28, 23, 22, 11,7 y 9,3 kDa respectivamente (Figura I. 4)

.

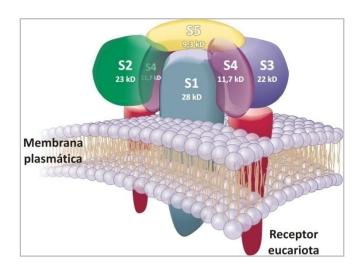


Figura I. 4: Esquematización de la estructura de la toxina pertussis de *B. pertussis*.

La **subunidad S1** también llamada **monómero A**, está formada por 269 aminoácidos incluyendo al péptido señal y contiene un sitio catalítico que transfiere ADP-ribosa desde el NAD⁺ a las subunidades-α heterotriméricas de las proteínas G. El efecto de esta ADP- ribosilación mediado por la PTx es el de impedir la activación celular mediada por receptores e interferir en la transducción de señales intracelulares (34). Por otra parte, el **oligómeroB** es un pentámero formado por las subunidades restantes S2 a S5 que adopta una disposición espacial en anillo y toma contacto con los receptores glicoproteicos de la célula huésped.

Luego del proceso de adhesión, el monómero A de la toxina es translocado al citosol de la célula blanco en un proceso independiente de endocitosis. La unión de ATP al oligómero B de la toxina causa la liberación de la subunidad S1 en el citosol y es activada luego de sufrir la reducción de su puente disulfuro. En su forma reducida, S1 cataliza la transferencia de ADP-ribosa desde el NAD $^+$ hacia la subunidad α de proteínas G_i que transmiten señales inhibitorias al complejo adenilato ciclasa, resultando en el aumento intracelular de AMPc, lo cual afecta las vías de señalización en muchos tipos de células, incluidas las células del sistema inmune. PTx es capaz de inhibir la quimiotaxis de macrófagos (*in vivo*), de neutrófilos y linfocitos (*in vitro*) debido a la alteración de los niveles intracelulares de calcio, así como también es responsable de la inhibición de las respuestas oxidativas y de la liberación del contenido lisosomal en macrófagos y neutrófilos; y de la estimulación de la síntesis y secreción de TNF α , IL-1 e IL-6 (19, 21).

La toxina se secreta al medio extracelular mediante un sistema proteico llamado sistema Ptl (del inglés <u>Pertussis toxin liberation</u>), que se encuentra embebido en la membrana externa bacteriana formando un poro. Las proteínas que consituyen este sistema de secreción están codificadas por 9 genes denominados *ptl*A-I que mapean justo por debajo de los genes que codifican para la Ptx (Figura I. 5).

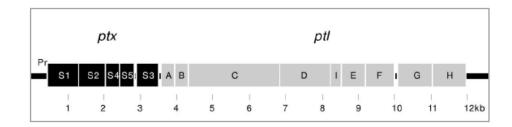


Figura I. 5: Esquema de la estructura del operón *ptx-ptl* **de** *Bordetella pertussis. Fuente:* Stabilization of the pertussis toxin secretion apparatus by the C terminus of PtID. A.Verma, A. M. Cheung, and D. L. Burns. 2008. J Bacteriol 190:7285-90.

La transcripción del operón es regulada por un único promotor ubicado río arriba del gen que codifica para *ptxS1* y la traducción ocurre partir del S1 y avanza por el mRNA hasta *ptlH*, siendo esta la última proteína en ser traducida. Sin embargo, se sabe que la transcripción para el gen *ptlH* tiene menor eficiencia que los de *ptx* por lo que las dos proteínas no se encuentran normalmente en los mismos niveles dentro de la célula (145).

La interacción de la subunidad S1 con el oligómero B en la membrana externa bacteriana no requiere de su ensamblado previo y el sistema Ptl es capaz de secretar S1 asociada con el oligómero B o S1 con alguno de los componentes, sin embargo no se detecta liberación por separado de los componentes de la holotoxina. Se ha propuesto que la secreción de la toxina, involucra al menos 2 pasos diferentes: en una primera etapa la subunidad S1 se ancla en la membrana externa bacteriana actuando como centro de nucleación para el ensamblaje con el resto de las subunidades y en una instancia posterior se produciría la interacción con el sistema Ptl formando un pilus que como un pistón provoca la extrusión del complejo a través de la membrana externa al medio extracelular (46). No se ha observado S1 libre en periplasma ni acumulado en el citoplasma, sino que del total de moléculas presentes en la célula, la mitad se encuentra como holoenzima soluble acumulada en el periplasma y el resto

asociado a la membrana externa bacteriana. Las subunidades S2 y S3 se encuentran tanto asociadas a membrana como solubles en periplasma y la mitad del total se encuentra en la forma ensamblada en la holotoxina (145).

La liberación de PTx en sobrenadantes bacterianos comienza a ocurrir a partir de las tres horas de cultivo y se extiende y aumenta de manera lineal hasta las 18 horas, sin embargo el máximo de secreción de la misma se observa a partir de las 12 h y hasta las 24 h donde se detiene, hecho que concuerda con el comienzo de la fase estacionaria de crecimiento. En este periodo se liberan en promedio 3 moléculas/(célula x minuto), la etapa que limita este proceso de liberación de la toxina es el paso de secreción y no el de ensamblado de la holoenzima.

Para este factor de virulencia también se ha descripto la presencia de polimorfismo en la secuencia del gen que codifica para las subunidades S1 y S3 (170), al respecto se dará más detalle más adelante.

Adenilato ciclasa-Hemolisina (AC-Hly)

La toxina adenilato ciclasa es uno de los principales factores de virulencia no sólo de *B. pertussis* sino también de otras especies del género que infectan a los mamíferos. Esta toxina que se sintetiza como precursor inactivo de 1.706 residuos aminoacídicos presenta dos tipos de actividades, la actividad adenilato ciclasa (AC) y como hemolisina (Hly) (114). Esta última es dependiente de una modificación post traduccional que consiste en el agregado de un grupo palmitoilo a dos residuos de Lisina ubicados en las posiciones 860 y 983. La actividad adenilato ciclasa está asociada al extremo N-terminal de este polipéptido (aproximadamente 400 aminoácidos) mientras que la capacidad hemolítica está confinada al extremo C-terminal.

La actividad AC le permite a *B. pertussis* afectar las funciones fisiológicas de la célula eucariota en la que penetra, mediante la síntesis descontrolada de cAMP a partir de ATP y activada por calmodulina. Por otra parte es capaz de formar canales selectivos de cationes en las membranas eucariotas mediante el dominio con actividad hemolisina. Esta toxina inhibe además la fagocitosis de los macrófagos e induce la apoptosis en estas células (97).

En la Figura I. 6 se muestra un esquema del péptido en el que se indican las regiones de las que se conoce función.

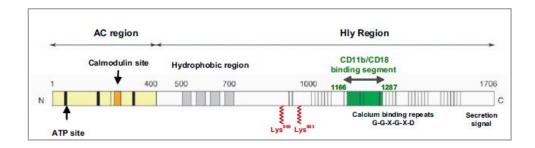


Figura I. 6: Esquema de la toxina AC-Hy de *B. pertussis*. Se indica el dominio que presenta actividad adenilato ciclasa (extremo N- terminal) y la región con actividad hemolisina (extremo C-terminal). Se muestran además el sitio de reconocimiento para el ATP, la calmodulina y las regiones hidrofóbicas. En rojo se señalan las posiciones de Lisina que sufren modificaciones post traduccionales. En verde se indica el dominio de unión las células eucariotas. Fuente: Genomic analysis of the adenylate cyclase-hemolysin C-terminal region of *Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica*. V Chenal-Francisque, V Caro, C Boursaux-Eude, N Guiso.

Ambos dominios, AC y Hly presentan características estructurales similares a las toxinas de la familia de toxinas RTX (Repeat in Toxin) ya que contienen un arreglo de repeticiones en tándem de 9 aminoácidos (L-X-G-G-X-G (N/D)-D-X-(U)-X: código de aminoácido de una letra, X representa cualquier aminoácido y U representa cualquier residuo grande hicrofóbico como I, L, V, F, Y) que están involucrados en la unión a calcio (9).

La mayor parte de la toxina AC permanece asociada a la superficie celular y no es secretada al medio extracelular en grandes cantidades, esta propiedad parecería estar regulada por la proteína FHA. Se vió que mutantes de *B. pertussis* que no expresaban FHA, liberaban más AC al medio y que la asociación de la toxina a la superficie bacteriana podía ser restablecida mediante la expresión de FHA por un plásmido en *trans* (183).

Toxina dermo necrótica (TDN)

Esta toxina fue el primer factor de virulencia descripto por Bordet y Gengou en 1.909. Se la ha denominado así por su capacidad de producir lesiones necróticas en piel cuando se la inyecta subcutáneamente en animales de experimentación como

conejos, ratones y cobayos. Se trata de un polipéptido simple de alrededor de 160 kDa que se encuentra mayoritariamente asociado al citoplasma bacteriano y cuya secuencia aminoacídica presenta un 99% de similitud entre los miembros de las especies "clásicas" del género. Sin embargo, estas proteínas parecen cumplir distinta función para una u otra especie. En el caso de *B. pertussis* se ha observado que mutantes que carecen de TDN son tan virulentos como las bacterias salvajes (173) mientras que en el caso de *B. bronchiseptica* sólo aquellas cepas capaces de sintetizar TDN pueden inducir neumonía y atrofia nasal en cerdos (18).

La toxina TDN pertenece a la familia de las A-B toxinas. En su extremo N-terminal se ha descripto que se encuentra el dominio de unión a células eucariotas mientras que en el extremo C-terminal la actividad catalítica de esta proteína. La toxina es una transglutaminasa que cataliza la poliamidación y la deamidación de las proteínas del grupo de las GTPasas de la familia de proteínas Rho. Las GTPasas así modificadas pierden su capacidad de hidrolizar GTP. Para que esta toxina presente actividad catalítica, la proteína debe internalizarse por endocitosis y en los endosomas tempranos sufrir un clivaje por proteasas eucariotas mamíferas del tipo de las furinas (59).

Toxina citotraqueal (TCT)

Esta toxina corresponde a un monómero disacárido tetrapéptido (*N*-acetilglucosamin-1,6-anhidro-N-acetilmuramil-(L)-alanil--(D)-glutamil-mesodiaminopimelil-(D)-alanina) del péptidoglicano presente en todos los microrganismos gram negativos. El peptidoglicano de la pared celular de la mayoría de las bacterias como *E. coli* se recicla continuamente, es decir que los monómeros liberados al medio extracelular se internalizan al citoplasma y se emplean para la síntesis del nuevo peptidoglicano; en el caso de *Bordetella* la proteína AmpG que es la encargada de transportar los fragmentos de peptidoglicano nuevamente al citoplasma celular no es funcional por lo que TCT se libera al medio extracelular de manera constitutiva e independientemente del control del sistema de dos componentes designado como BvgAS por <u>B</u>ordetella <u>v</u>irulence genes que describiremos más adelante (53).

La TCT produce la citopatología característica de la infección de *B. pertussis* sobre células ciliadas en tejido traqueal. El lipopolisacárido bacteriano sinergiza la acción de

esta proteína, mediante la inducción de la producción de IL-1α por las células no ciliadas traqueales conduciéndolas a sintetizar óxido nítrico sintetasa (53-54). El NO* generado difundiría y produciría la destrucción de las células ciliadas traqueales que sí son sensibles al efecto de este gas. Estos radicales destruyen enzimas dependientes de iones y eventualmente inhiben la función mitocondrial y la replicación del ADN de las células epiteliales ciliadas que se encuentran en contacto con la bacteria. Esta toxina también actúa sobre otras células, inhibe la quimiotaxis y el metabolismo oxidativo de neutrófilos; lo cual podría contribuir a la persistencia de *B. pertussis* en el huésped (120). Estudios recientes han mostrado que TCT estimula la respuesta en células inmunes a través de moléculas patrones de reconocimiento microbiano que interactúan con peptidoglicano y sus derivados (19).

Lipopolisacárido (LPS)

El lipopolisacárido es una molécula anfifílica localizada por fuera de la membrana externa de las bacterias gram negativas formada por el lípido A, a través del cual se inserta en la membrana, un core o núcleo de naturaleza oligosacarídica y un extremo distal constituido por un polisacárido lineal denominado antígeno O (87, 89). *B.* pertussis a diferencia de otras bacterias gram negativas no presenta antígeno O. Cuando se somete el LPS de B. pertussis a corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida se puede observar una banda denominada B, de mayor movilidad, compuesta por el lípido A y el core interno; y una banda de menor movilidad denominada banda A que corresponde a los componentes de la banda B más un trisacárido formado por N-acetil-N-metil-fucosamina (FucNAcMe), ácido 2,3-dideoxidi-N.acetilmanosaminurónico (2,2-deNAcManA) y N-acetilglucosamina (GlaNAc). Al igual que otras bacterias gram negativas, el LPS de B. pertussis actúa como una potente endotoxina durante el proceso infeccioso, produciendo efectos mitogénicos y tóxicos (137). Recientemente se ha revelado que gran parte de la respuesta inmune frente a B. pertussis es iniciada y controlada a través de la señalización vía receptores Toll-like 4 (TLR-4). TLR-4 es uno de TLRs de células de mamíferos que reconocen moléculas microbianas conservadas, como el LPS permitiéndole al sistema inmune responder a una infección. Se ha demostrado que la infección por B. pertussis es más

severa en ratones defectivos en TLR-4 marcando el rol del LPS en la interacción patógeno huésped (149).

La unión del LPS a la superficie de los leucocitos activa simultaneamente dos vias de señalización intracelular, una mediada por la molécula adaptadora MyD88 (de Myeloid Differentiation factor 88), que induce la producción de citoquinas inflamatorias y otros mediadores de la cascada inflamatoria y la segunda es mediada por el adaptador TRIF, que induce la producción de INF – β y lleva a la activación de células T promoviendo la respuesta inmune adaptativa (113).

El rol del LPS en la patogénesis parecería estar relacionado con el proceso de colonización, en el caso particular de *B. pertussis* la estructura más distal del LPS parecería ser requerida para la colonización eficiente de la cavidad nasal (77).

Sistemas de Secreción de Tipo III (TTSS)

Los TTSS se han descripto únicamente en las bacterias gram negativas y presentan

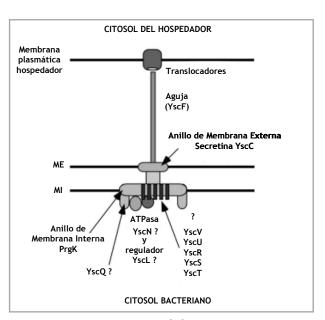


Figura I. 7: Estructura del TTSS propuesta para Yersinia. Adaptado de Ghosh et al. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004

estructuras proteicas complejas del de jeringas inyectoras tipo con proteínas capacidad traslocar de efectoras directamente en el citoplasma o en la membrana células eucariotas (62, 115). Esta estructura del tipo "aguja" se muestra gráficamente en la Figura I. 7. El sistema de secreción de tipo III se ha identificado en una gran variedad de microrganismos, entre ellos en los patógenos humanos Yersinia, Shigella, Salmonella y E. coli enteropatógena. En el género *Bordetella* se identificó el TTSS

por primera vez en *B. bronchiseptica* como factor de virulencia activado por BvgAS. El locus *bsc*, que codifica para TTSS está altamente conservado dentro del grupo de las bordetellas clásicas, pero sólo se había demostrado la secreción de proteínas efectoras en miembros de las especies *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis* (48).

Recientemente se demostró la presencia del TTSS en *B. pertussis* y se vió que está implicado en la colonización del tracto respiratorio de ratones, en este mismo modelo animal un mutante defectivo en la expresión del mismo inducía una mayor producción de citoquinas pro inflamatorias de la respuesta innata en los pulmones justo después del desafío y más tarde una respuesta más elevada de IL-17, INF-γ e IgG específicas de antígeno (48).

El locus de secreción de tipo III de *Bordetella*, denominado *bsc*, codifica para 22 ORF entre los que se encuentran los que codificarían para las proteínas de la maquinaria del TTSS, la ATPsa BscN, proteínas secretadas por el TTSS y posibles chaperonas. Respecto a las proteínas secretadas se han identificado cuatro proteínas cuyos genes forman parte del locus *bsc*: BopB, BopD, BopN y Bsp22. Panina y colaboradores (138), a través de una búsqueda computacional en los genomas de las bordetellas clásicas han identificado una quinta proteína efectora del TTSS que estaría codificada por el gen *bopC/bteA* ubicado por fuera del locus *bsc*, a 2,5 Mpb en *B. bronchiseptica*, 1,7 Mpb en *B. parapertussis* y 1,8 Mpb en *B. pertussis*.

En el extremo 3' del locus *bsc* se ha descripto un locus adicional denominado *btr*, por <u>Bordetella</u> type III regulation, compuesto por los genes *btrS*, *btrU*, *btrW* y *btrV* que codifican para proteínas regulatorias del TTSS. La proteína BtrS fue encontrada como necesaria y suficiente para la transcripción de todos los genes *bsc*, BtrU y BtrW para la secreción y BtrV para la traducción y/o estabilidad de las proteínas. El loci *bteA* está co-regulado con el locus *bsc* y éstos dos, con el locus *btr*, son regulados y activados transcripcionalmente por el sistema de dos componentes BvgAS; el cual ejerce el control sobre el TTSS al regular a BtrS (117, 138).

Como hemos mencionado más arriba, la expresión funcional del TTSS se describió primariamente para *B. bronchiseptica*. En *B. pertussis* si bien se ha descripto la transcripción de los genes *bsc* y *btr*, la funcionalidad del sistema no ha podido ser corroborada al menos para cepas adaptadas en el laboratorio (117).

En este contexto, la mayoría de los estudios del TTSS en *Bordetella* se han focalizado sobre *B. bronchiseptica*. *B. bronchiseptica* expresa las proteínas BopB y BopD, que son ortólogas de las proteínas translocadoras YopB y YopD de *Yersinia spp*. Estas proteínas interaccionan entre sí para formar el poro en la membrana de la célula del huésped y son requeridas para la actividad citotóxica del TTSS (101, 135). BopN aún no ha sido

caracterizada en *Bordetella* spp. En *Yersinia* su ortóloga YopN previene la secreción de proteínas en ausencia de contacto con células del huésped. A diferencia de las otras proteínas efectoras del TTSS, Bsp22 es exclusiva del género *Bordetella*. Esta proteína se sintetiza en mayor proporción durante el crecimiento *in vitro* de *B. bronchiseptica y* aunque mutaciones en *bsp22* no afectan la secreción de las otras proteínas sí eliminan los efectos *in vivo* e *in vitro* descriptos para el TTSS de *Bordetella* (131, 138, 153-154, 182).

Regulación de la expresión de factores de virulencia: Sistema de dos componentes

La expresión de mayoría de los factores de virulencia antes descriptos está regulada por un sistema de dos componentes al que se denomina BvgAS (27). Estos sistemas están ampliamente distribuidos entre Bacteria y Archea y les permiten a los organismos que los poseen montar respuestas adaptativas frente a los estímulos ambientales altamente cambiantes a los que se enfrentan dentro de su ciclo de vida. Estos sistemas son capaces de regular funciones simples como las vías metabólicas o el movimiento celular pero también procesos especializados como el desarrollo y la virulencia. Consisten en sistemas proteicos de transferencia de grupos fosfato que generalmente están formados por dos proteínas conservadas una histidina kinasa (HK) encargada de interactuar o censar el medio circundante y una proteína reguladora de respuesta (RR) que es regulada por su HK específica y que genera la respuesta celular. El mecanismo involucrado comprende por un lado, el reconocimiento del estimulo ambiental mediante un dominio sensor poco conservado ubicado en el extremo Nterminal de HK y por otro la catálisis de autofosforilación de la porción conservada de la HK en un residuo histidina. Este enlace N-P de alta energía que se genera es relativamente inestable y la molécula intermediaria puede ceder fácilmente el grupo fosfato en comparación con los enlaces fosfoester producidos por las Ser/Thr/Tyr kinasas. Por otra parte, el dominio RR cataliza la transferencia del grupo fosforilado en His de la HK a uno de sus residuos de ácido aspártico ubicado en una cadena lateral, dando un grupo acilo fosfato de alta energía que activa el RR.

La HK también posee actividad RR fosfatasa.

La respuesta neta en este sistema de transducción de señales dependerá del grado de fosforilación del RR y de múltiples proteínas auxiliares que regulan la actividad de HK o que influyen sobre la estabilidad de fosforilación de RR. Usualmente las HK son proteínas transmembrana que censan mediante dominios extracelulares estímulos del medio circundante. Las proteínas RR presentan varios dominios efectores que desencadenan la respuesta al estímulo y un dominio N-terminal REC (dominio receptor conservado) que participan en la catálisis de la transferencia del grupo fosfato desde la HK sobre sí misma y que regula la actividad del dominio efector dependiendo del estado de fosforilación. Los dominios REC también poseen actividad catalítica de auto desfosforilación (60, 147).

En el caso particular del género Bordetella, el sistema de transducción de señales de dos componentes controla la expresión de genes asociados directamente con la patogénesis, mediante la regulación coordinada de la expresión de la mayoría de los factores de virulencia y de colonización asociados a la infectividad al huésped (28). Este sistema de dos componentes está codificado en un único locus denominado bvg. El mismo fue identificado por Weiss y colaboradores (1989) cuando observaron que la inserción del transposón Tn5 dentro del mismo, eliminaba simultáneamente la síntesis de PTx, FHA, AC-Hly y TDN (cuyos genes se denominan vag por virulence activated genes). Posteriormente se demostró que la pertactina también es una proteína bvgregulada. Estas bacterias que tienen suprimida la expresión coordinada de los genes bvg-activados poseen menor capacidad para causar la enfermedad y por ello se las designa bacterias avirulentas. Mutaciones espontáneas en el locus bvg pueden llevar también a las bacterias al estado de avirulencia (27-28). Este fenómeno irreversible se lo ha denominado cambio de fase y se refiere a la aparición de variantes avirulentas que no expresan los factores de virulencia antes descriptos pero expresan otra serie de proteínas cuyo rol hasta hoy no ha podido ser dilucidado. La frecuencia de aparición de estos mutantes es de 10⁶. Respecto al mecanismo molecular que estaría involucrado en el fenómeno de cambio de fase; en B. pertussis se ha descripto que es el resultado de un corrimiento reversible del marco de lectura en el gen bygS dentro de una zona que involucra una cadena de citosinas. Otro fenómeno mediado por el locus bvg es la denominada modulación fenotípica que a diferencia del cambio de fase, se trata de una alternancia reversible entre las fases virulentas y avirulentas

(también designadas Bvg⁺ o Bvg⁻ respectivamente). La modulación fenotípica ocurre en respuesta a ciertas señales del entorno a las que se denominan moduladores. Hasta el presente sólo se conocen señales que ejercen su acción *in vitro*, ellas son: bajas temperatura, presencia de MgSO₄ o ácido nicotínico en el medio de cultivo. En ausencia de cualquiera de estas señales las proteínas de BvgAS regulan positivamente la expresión de los genes que codifican para los factores de virulencia y negativamente los genes que se denominan vrg (del inglés vir repressed genes). En realidad, la modulación de fase no se trata de un proceso on - off sino que hay una variación continua de expresión de genes en cuyos extremos se encuentra fase virulenta por un lado y la fase avirulenta por otro. De hecho, recientemente se ha descripto y caracterizado una tercera fase denominada fase intermedia o Bvgⁱ que se obtiene al emplear determinadas concentraciones de los agentes moduladores.

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

Respuesta inmune protectora contra la infección generada por Bordetella pertussis

La infección por *B. pertussis* en los humanos desencadena una respuesta humoral y celular. El primer mecanismo inmune que parece inducirse cuando *B. pertussis* se encuentra con el huésped es el mediado por Toll like receptor 4 (TLR4) y la vía alternativa del complemento (7, 19, 87). La exposición a LPS y otros productos bacterianos promueve la expresión de IL-12 e IL-23 por células dendríticas centinelas y macrófagos en las primeras horas después de la infección (Figura I.8).

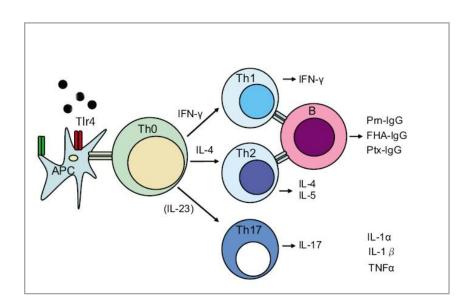


Figura I. 8: Señalización vía TLR-4 y respuesta del sistema inmunológico a la infección con *B. pertussis*. Fuente: The role of Toll-like receptor-4 in pertussis vaccine-induced immunity. Banus, S., R. M. Stenger, et al. (2008). BMC Immunol 9: 21

 $B.\ pertussis$ parece aumentar, preferencialmente, la producción de IL-23 pero no de IL-12 y se ha sugerido que la toxina pertussis y la adenilato ciclasa estarían involucradas en esto (19, 155). Así, cuando $B.\ pertussis$ ingresa al tracto respiratorio, se une a las células ciliadas del epitelio pero también es reconocida y capturada por células de la respuesta inmune innata como macrófagos, células T $\gamma\delta$, células Natural Killer (NK) y células dendríticas. Estas últimas procesan y presentan antígenos bacterianos a las células T (120). Mientras que la producción de IL-12 y IL-18 por las células de la

respuesta innata llevarían a una clásica respuesta del tipo Th1 (caracterizada por la secreción de IFN-y); la producción de IL-23 polarizaría la respuesta hacia la generación de una población de células T que es caracterizada por la producción de IL-17 (células Th17). Esta respuesta rápida de IL-17 de las células T residentes (α ß, γ δ y NK) promueve la producción citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, IL8 y TNF-α) que reclutan neutrófilos al sitio de infección, controlando inicialmente la misma (119). La respuesta Th1 sería suprimida en los estadios tempranos de la infección debido a los efectos de la secreción de IL-10 ya sea por células T regulatorias (Treg) estimuladas por antígenos o por macrófagos y células dendríticas estimuladas por FHA. La señalización vía LPS/TLR-4, en sinergia con la acción enzimática de AC-Hly, mediaría la producción de IL-10 e IL-23 generando una polarización hacia la respuesta Th17 (19). El NO y las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 y TNF- α inducidas por las toxinas de B. pertussis, especialmente LPS, TCT y PTx, así como contribuyen a la eliminación bacteriana también median la patología local en el pulmón y son responsables de muchas de las consecuencias sistémicas y neurológicas de la infección. El IFN-y secretado por células de la respuesta innata en la infección temprana y más tardíamente por células Th1, estimularía el reclutamiento y la activación de macrófagos y neutrófilos y provee ayuda a las células B a secretar anticuerpos opsonizantes y fijadores del complemento (IgG2a en ratones). Las células Th2 también activarían la expansión clonal de células B. Las bacterias, opsonizadas o no opsonizadas, son internalizadas por neutrófilos y macrófagos y eliminadas por NO o especies reactivas a oxígeno (120). La opsonización de la bacteria produce la activación de la vía clásica del complemento. Las neutrófilos expresan receptores para el complemento que reconocen las bacterias marcadas por el complemento así como receptores Fc que reconocen las regiones Fc de los anticuerpos unidos a los antígenos bacterianos. Ambos mecanismos resultan en la activación de neutrófilos que, en el contexto de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, atraen más fagocitos al sitio de infección. Éstos son activados y eliminan las bacterias unidas a anticuerpos. Se ha sugerido que las células Th2 controlarían también la secreción de IgA la cual es detectada en pulmones de ratones infectados previo a la detección de IgG en suero. Se ha sugerido que esta inmunoglobulina podría tener un rol en la eliminación de la infección primaria (82, 121, 180).

En relación a la **inmunidad inducida por vacunación** resulta importante tener en cuenta que en la actualidad existen dos tipos de formulaciones vacunales, una denominada celular constituida por una suspensión de bacterias enteras muertas por calor y detoxificadas, y otra denominada acelular o de componentes constituida por antígenos de probada capacidad protectora. Este último tipo de vacunas ha surgido en respuesta a reportes sobre la inducción de reacciones adversas asociadas a la vacunación con formulaciones celulares (ver más adelante). Existe evidencia suficiente, basada principalmente en experimentos de inmunización pasiva y empleo de ratones KO, que muestra que los anticuerpos poseen un rol en la protección contra *B. pertussis* (99).

Ensayos de inmunización activa y pasiva en el modelo murino demostraron que existe una relación entre el número de componentes de las vacunas acelulares y el grado de protección conferida y que PTx y PRN son los antígenos más protectivos (120, 122). Por medio de estudios en los que se utilizaron ratones defectivos en Inmunoglobulinas (Ig-/-) se ha demostrado que la infección con *B. pertussis* en estos ratones se establece de forma crónica. Los anticuerpos dirigidos contra los factores de virulencia FHA, FIM, PRN y PTx podrían prevenir la adhesión a las células mediados por ellos y en el caso de células que expresan receptores Fc promover la captura por opsonización (120).

Más aún, varios estudios clínicos sugieren que anticuerpos contra PTx, PRN y FIM pueden conferir protección: la incidencia de formas severas de la enfermedad se ha mostrado que es menor en individuos con altos títulos de anticuerpos contra PTx solamente, PRN y PTx o PRN y FIM (120). Sin embargo, a diferencia de otros patógenos, para *B. pertussis* no se han podido definir niveles de anticuerpos contra un antígeno o combinación de antígenos que puedan predecir protección.

Cheers y colaboradores demostraron, hace más de 40 años, que *B. pertussis* podría tener una fase intracelular y que la inmunidad celular podría ser requerida para eliminar a la bacteria intracelular. Distintos grupos han demostrado que *B. pertussis* es capaz de invadir y sobrevivir en células de mamíferos, incluidos macrófagos, polimorfonucleares y células del epitelio respiratorio (8, 56, 104). Después de haber eliminado una infección primaria, la inmunidad adquirida es muy efectiva ante exposiciones posteriores a *B. pertussis*. La inmunidad celular, junto con los anticuerpos de la subclase adecuada son los mecanismos efectores involucrados en la

respuesta a la infección primaria y los que confieren protección contra exposiciones secundarias al patógeno.

Por otra parte los mecanismos efectores involucrados en la inmunidad conferida por vacunas están muy relacionados con el tipo de vacuna empleada: las vacunas celulares y las acelulares inducerían mecanismos de protección diferentes. Las vacunas celulares inducen mayoritariamente una respuesta tipo Th1 mientras que las vacunas acelulares inducen mayormente una respuesta del tipo Th2 en ratones y Th1/Th2 en niños sugiriendo algún rol para la inmunidad celular aunque seguramente menos significativo que en el caso de vacunas celulares, especialmente en la protección a largo plazo inducida por las acelulares. La infección por *B. pertussis* en los humanos desencadena selectivamente una respuesta celular mediada por células Th1 de la inmunidad natural (120).

Estrategias de control contra la enfermedad

Vacunas

La elevada transmisibilidad de pertussis así como su alta mortalidad han determinado que la medida de control más importante contra esta enfermedad sea la vacunación. Historicamente, el primer desarrollo consistió en suspensiones bacterianas muertas por calor y detoxificadas preparadas a partir de un aislamiento de *B. pertussis*. Estas formulaciones que aún se continúan empleando se las denomina vacunas celulares (vacunas celulares, VC).

Varios hitos marcaron la historia de las vacunas celulares, sin dudas el primero se remonta al año 1906 cuando los investigadores Joules Bordet y Octave Gengou aislaron en el laboratorio al agente causal y consiguieron cultivarlo (12).

Entre 1914 y 1917 se hicieron algunas pruebas con vacunas formuladas a partir de bacterias enteras y muertas a pequeña escala. Años más tarde, en 1923 y 1924 Madsen realizó el primer estudio a campo con estas vacunas en las islas Feroe de Dinamarca aprovechando una gran epidemia de pertussis que se inició en 1923 (108). En 1929, a raíz de los estudios llevados a cabo en Dinamarca, Madsen y Sauer revelaron los primeros informes de medida de capacidad profiláctica de una vacuna fabricada a partir de una suspensión bacteriana de *B. pertussis* (109).

Fue recién en 1940 cuando la vacuna celular contra pertussis usando aluminio como adyuvante se combinó con el toxoide diftérico y se realizaron pruebas para evaluar su seguridad en un estudio a campo dirigido por las investigadoras Kendrick y Eldering (95). Posteriormente en el año 1949 se estudió la efectividad de una vacuna que además incluía al toxoide tetánico. La vacuna así formulada, denominada vacuna triple bacteriana DTP (por Difteria Tétanos Pertussis) mostró una buena respuesta para cada uno de los antígenos (38). Es desde entonces que esta vacuna celular DTP se usa masivamente y se la ha incluído en los calendarios de vacunación nacionales de muchos países y desde 1974 en los programas de inmunización de la Organización Mundial para la Salud (EPI de la OMS Expanded Program of Inmunization).

Las VCs han demostrado ser efectivas llegando a alcanzar eficacias entre 80 y 95% dependiendo de la definición de caso empleado en los ensayos clínicos (179). Sin embargo, se ha reportado la asociación de **reacciones secundarias adversas** con la vacunación. Entre otros se han descripto llanto prolongado e inconsolable y convulsiones febriles. Para eventos como el síndrome de muerte súbita de los niños, que también fue atribuido al empleo de vacunas celulares contra pertussis, no existen resultados que puedan indicar una relación causal y para otros desordenes la evidencia es insuficiente como para extraer conclusiones. Al lipopolisacárido y a la toxina pertussis se les ha atribuído principalmente la toxicidad de estas vacunas celulares (120). Fue por este motivo que en la década de los años '70 Suecia, Inglaterra, Gales y Japón se redujo significativamente la aceptación de estas formulaciones. Esta determinación trajo aparejada un aumento muy marcado en la incidencia de casos reportados (65).

La preocupación surgida por la seguridad de las vacunas celulares y el recrudecimiento de la enfermedad en los países donde dejó de emplearse VC, impulsaron el desarrollo de otro tipo de vacunas, las llamadas vacunas acelulares (vacunas acelulares, VaC), formuladas a partir de antígenos proteicos específicos purificados a partir de cultivos de *B. pertussis*. Las primeras formulaciones acelulares contenían sólo toxina pertussis, luego se adicionó otro componente la hemaglutinina filamentosa (FHA). En la actualidad existen formulaciones de tres a cinco componentes formuladas con PTx, FHA, y PRN en el primer caso y en el segundo se agregan además los dos serotipos de antígenos fimbriales (Fim2 y Fim3) (30). Se ha demostrado que las VaC de 3

componentes pueden presentar una eficacia del 85-90% (179). Para cualquiera de estas formulaciones se han reportados reacciones adversas únicamente leves que se hacen más frecuentes cuando es mayor en número de dosis aplicadas (24, 146).

En la actualidad no hay un consenso sobre cuál vacuna aplicar y de hecho hay calendarios que emplean sólo Vcs, otros exclusivamente VaCs y otras en las que las primeras dosis se realizan con VC y los refuerzos con VaC.

Es importante recordar como ya se mencionara anteriormente, que las respuestas inmunes que se obtienen de la inmunización con las vacunas VC o VaC son diferentes ya que las primeras se caraterizan por dar una respuesta más de tipo celular mientras que la acelular estaría mediada fundamentalmente por una respuesta tipo Th2. En ningún caso la inmunidad conferida es de por vida. La duración de la protección luego de la vacunación varía según el tipo de vacuna, el plan de vacunación, el nivel de exposición y la edad de aplicación de la primera dosis (51).

La inmunidad protectora en el caso de las vacunas parece no superar los 12 años. Tampoco la infección natural confiere inmunidad de por vida, en este caso se ha estimado que la duración de la inmunidad hasta que el individuo puede infectarse nuevamente varia de 7 a 20 años (176).

Siendo en la actualidad los perfiles de eficacia para los dos tipos de vacunas muy similares, la elección de qué clase de vacunas emplear para el **esquema de vacunación primario** dependerá de cada país. Las estrategias elegidas por cada uno se basarán en la historia nacional de esta infección, de la calidad y disponibilidad de las vacunas (168). La mayoría de los países en desarrollo emplea VC debido al menor costo de las mismas. En general, los países desarrollados han modificado sus calendarios nacionales de vacunación y han incorporado el uso de vacunas acelulares. Es así que se emplea exclusivamente vacuna celular en la infancia en el Reino Unido, mientras que en Estados Unidos sólo se utilizan VaCs, que fueron licenciadas en los años '90 para su empleo en vacunación primaria (65). La mayoría de las naciones recomiendan una serie primaria de 3 dosis entre las 6 semanas y los 3 meses de vida, que usualmente se completan a los 6 meses (WHO Expanded Program of Immunization). Muchos calendarios incluyen además refuerzos y una cuarta o quinta dosis a los 4-6 años de edad.

En este sentido se han visto que niños inmunizados con VC y que reciben refuerzos con VaC que parecen tener los mejores niveles de protección que cualquier otra combinación de vacunas (11).

En la Tabla I. 3 se muestran los cambios que se fueron dando según los años en los esquemas de vacunación de algunos países de Europa y el tipo de vacuna recomendada en cada caso.

País	Año del programa de vacunación	Calendario de vacunación	Calendario de refuerzos
Finlandia	1952	3,4 y 5m DTP	20-24m DTP
Holanda	1953	2,3,4 y 11 m DTP-IPV-Hib	
Francia	1959	3,4 y 5m DTP-IPV	16 a 18mDTP-IPV
	1995	2, 3, 4 m DTP-IPV-Hib	16 a 18m DTP-IPV-Hib
	1998	2, 3, 4 m DTP-IPV-Hib	17 a 18m DTP-IPV-Hib, 11 a 13a DtaP-IPV
Alemania	1995	2, 3, 4 m DTP-IPV-Hib-HB	11 a 14m DTP-IPV-Hib-HB
Alemania	2000	2, 3, 4 m DTP-IPV-Hib-HB	12 a 14m DTP-IPV-Hib-HB, 9 a 17adTaP o dTaP-IPV
	1953	3, 5, 12m DTP	
Suecia	1979-1996	sin vacunación	
Suecia	1996	3, 5, 12m DTPa	
	1998	3, 5, 12m DTaP_IPV-Hib	
	1961	5, 6, 7 y 15m DTP	
	1969	5 y 9 s y 10m P (noadsorbida)	
Dinamarca	1997	3, 5, y 12m DTaP-IPV	
Dillamarca	2002	3, 5, y 12m DTaP-IPV/HIB	
	2003		5a TdaP
	2004		5a TdaP-IPV
Polonia	1960	2, 3, 4, 5 y 16 a 17m DTP	
Folonia	2004		6a DtaP
	1950	3, 5 y 10m DTP	
UK	1990	2, 3, 4m DTP	
	2000/2001	DtaP-Hib	
	oct-01		aP sumada a DT preescolar

Tabla I. 3: Programas de vacunación hasta el año 2004 en 8 países de Europa. Referencias: s: semanas de edad, m: meses de edad, a: años de edad DTP, IPV: vacuna Polio inactivada, Hib: vacuna *Haemophilus influenzae*, tipoB. HB: Hepatitis B, aP: pertussis acelular, DTaP: Difteria- Tétanos- Pertussis acelular. Fuente: *Bordetella pertussis* Strains Circulating in Europe in 1999 to 2004 as Determined by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Hallander, Advani, Riffelmann, von Konig, Caro, Guiso, Mooi, Gzyl, Kaltoft, Fry, Mertsola and He. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 2007, p. 3257–3262.

Debido al creciente número de casos en individuos de grupos etareos diferente del de los niños, en los últimos años se ha recomendado el empleo de refuerzo sobre los adolescentes y adultos. Los grupos de adultos en los que se ha recomendado el uso de vacuna contra pertussis son el de mujeres embarazadas o puérperas y sus grupos familiares cercanos (estrategia capullo o cocoon), personal de salud y los individuos que tengan al cuidado grupos de niños. Los estudios de ensayos clínicos que emplean refuerzos con VaC en adolescentes y adultos han sugerido niveles de protección de hasta el 92% (174).

En nuestro país la vacunación contra la tos convulsa se vale de la vacuna pentavalente DTP-Hib-HB (Difteria, Tétanos, Pertussis, *H. influenzae* tipo b y Hepatitis B) recomendada en el Calendario Nacional de Vacunación en 4 dosis a los 2, 4, 6 meses y a los 18 meses se recomienda la cuarta dosis con vacuna cuádruple bacteriana DTP-Hib, finalmente se indica un refuerzo a los 6 años con vacuna triple bacteriana DTP. Recientemente se ha incluido en el calendario un nuevo refuerzo a los 11 años con vacuna triple bacteriana acelular DTaP (91).

Quimioprofilaxis

Para el tratamiento de esta patología y en el control de foco, se emplean antimicrobianos de forma de favorecer la eliminación bacteriana de las vías respiratorias y para limitar la transmisión a los contactos suceptibles. Los antimicrobianos recomendados en la terapéutica son los macrólidos como eritromicina y también los más nuevos como azitromicina o claritromicina. En caso de intolerancia a los mismos puede emplearse trimetoprima sulfametoxazol (TMS). La duración del tratamiento será de 7 o de 14 días según el antimicrobiano que se emplee. Si el tratamiento se instaura en la primera semana de iniciados los síntomas su efecto es el de reducir la duración y severidad de los síntomas. Sin embargo, a veces esto no es posible ya que existen demoras en la consulta al médico, en la sospecha de caso y en su confirmación en el laboratorio lo que en conjunto lleva a la indicación de tratamiento con antibióticos con el objetivo fundamental de limitar la diseminación de la enfermedad. Es así que la recomendación es la administración de antibióticos en las primeras cuatro semanas de iniciados los síntomas y en las seis a ocho semanas para individuos que están en contacto con personas de alto riesgo como niños, mujeres en el tercer trimestre de embarazo y profesionales de la salud (85).

En la Tabla I. 4 que se muestra a continuación se detallan los agentes antimicrobianos sugeridos para el tratamiento de la infección por pertussis y las dosis recomendadas por grupo etareo.

		Agente primario		Agente alternativo
Edad	Azitromicina	Eritromicina	Claritromicina	TMS
	Agente recomendado. 10mg/kg día	No preferido. Asociado con estenosis pilórica infantil.	No	Contraindicado en niños< de 2m
<1m	única dosis por 5días	Usarla en caso de que AZ no esté disponible.	recomendado	(riesgo de kernicterus)
		40-50mg/kg día en 4 dosis por 14 días		
		40-60mg/kg por día en 4 días	15mg/kg día en 2 dosis	Contraindicado en niños < de 2m
1-5m	10mg/kg única dosis 5 días	dividido en dosis por 14 días	por 7 días	Para niños > de 2m, TM: 8mg/kg día
				S: 40mg/kg día en 2 dosis por 14 días.
Bebés (> de 6m)	10mg/kg 1dosis y luego 5mg/kg día	40-50 mg/kg día(máx 2g día)	15mg/kg día en dos dosis	TM: 8mg/kg día, S: 40mg/kg día
y niños	(máx: 500mg) días 2-5	en 4 dosis durante 14 días	(máx: 1g) por día por 7 días)	en dos dosis por 14 días
	500 mg única dosis y	2g/día en 4 dosis durante 14	1g/día en 2	TM: 320mg/día, S: 1.600mg/día
Adultos	luego 250mg día en los días 2-5	<u> </u>		en dos dosis por 14 días

Tabla I. 4: Tratamiento antimicrobiano y profilaxis post exposición para pertussis por grupo etareo. TMS: Trimetoprima Sulfametoxazol puede ser empleado como antibiotico alternativo a los macrólidos en pacientes mayores de 2m alérgicos a los macrólidos, aquellos que no pueden tolerar a los macrólidos o en quienes están infectados con una cepa *de B. pertussis* resistente a macrólidos. TM: Trimetoprima, S: sulfametoxazol, m: meses de edad. Fuente: http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5414a1.htm#tab4.

Epidemiología

Situación epidemiológica mundial

La tos convulsa es una enfermedad endémica con brotes epidemicos cada 2 a 5 años (30). En la era prevacunal la enfermedad era la primera causa por de muerte por infecciones en niños. El impacto de la vacunación masiva contra pertussis fue importante ya que se redujo significativamente la tasa de morbi mortalidad de la enfermedad. Así por ejemplo, en los Estados Unidos la disminución en el número de casos de pertussis comparando las eras pre y post vacunales fue de 92,2% y la merma en las muertes del 99,3% (150). En la Figura I. 9 se muestra la cinética de disminución de casos que ocurrió claramente luego de la incorporación de la vacuna en Estados Unidos.

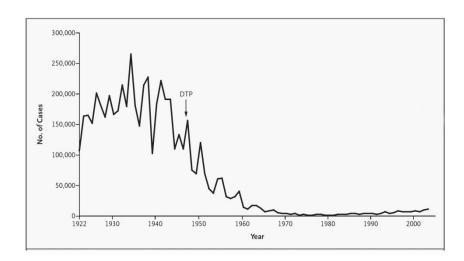


Figura I. 9: Distribución de casos notificados de pertussis en los Estados Unidos durante el periodo 1922-2003. DTP indica el año de introducción de vacuna celular en ese país. Fuente: Pertussis— Not Just for Kids. Erik L. Hewlett, M.D., and Kathryn M. Edwards, M.D. n engl j med 352; 12 www.nejm.org march 24, 2005.

Como era esperable el advenimiento de la vacunación universal provocó un cambio en la epidemiología de la transmisión de la enfermedad que estando restringida al contagio entre niños en la era prevacunal, se modificó y la población adolescente-adulta pasó a ser la principal fuente de transmisión a los niños muy pequeños en los que las consecuencias de la infección pueden ser fatales (86, 144). En la era prevacunal, la mayoría de los casos ocurrían en niños de entre 3 a 6 años. Los adultos

que habían tenido la enfermedad cuando eran chicos, adquirian su refuerzo inmune por las recurrentes exposiciones en la población, y las madres les transferían protección a sus hijos a través del pasaje transplacentario de anticuerpos, con lo que los menores de 6 meses generalmente no se enfermaban gravemente. Con el uso de vacunas contra pertussis en la población, la circulación del microrganismo disminuyó encontrando un nuevo grupo pediátrico protegido. La proporción de casos aumentó en quienes habían perdido la inmunidad conferida por las vacunas, es decir los adolescentes y adultos y en niños que habían recibido menor cantidad de anticuerpos protectivos de la madre y que por su edad no completaban los esquemas de vacunación establecidos en los calendarios nacionales. En la Figura I. 10 se esquematizan los grupos susceptibles e inmunes y la dinámica de la transmisión de la enfermedad tanto para la era prevacunal como para la era vacunal.

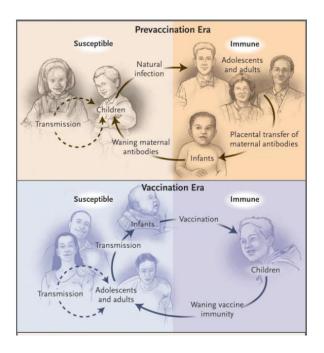


Figura I. 10: Transmisibilidad de pertussis en la era pre y post vacunal. Fuente: Pertussis— Not Just for Kids. Erik L. Hewlett, M.D., and Kathryn M. Edwards, M.D. n engl j med 352;12 www.nejm.org march 24, 2005.

En este sentido en los años '80s los datos de la vigilancia de coqueluche centrados en la población de adolescentes y adultos comenzaron a mostrar un aumento en la proporción de casos en este grupo. Esta situación fue registrada primariamente en

países con buenas coberturas de vacunación como Canadá, Francia y Australia. En la Figura I. 11 se muestra la proporción de casos de pertussis informados entre personas de diferentes edades en los Estados Unidos en los años 1989, 1993, 1997, 2.001 y 2005, observándose el aumento de casos en estos últimos años para los niños menores de 1 año y para los mayores de 20 años con un pico alrededor de los 13-14 años. Las tasas de incidencia para adolescentes y adultos recientemente registradas alcanzan valores de 300 a más de 500 cada 100.000 personas por año (159).

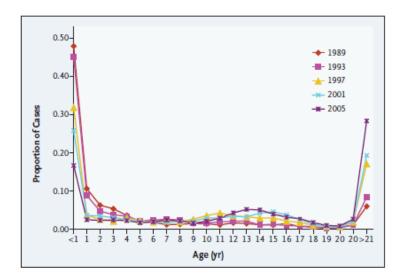


Figura I. 11: Distribución de casos notificados de pertussis de acuerdo a la edad de los pacientes. Estados Unidos durante los años 1989, 1993, 1997, 2001, 2005. Los datos provienen del National Notifiable Diseases Surveillance System and the Supplementary Pertussis Surveillance System perteneciente al CDC, cortesía de Kristin Brown. Fuente: The Control of Pertussis — 2007 and Beyond. Scott A. Halperin, M.D. N engl j med 356;2 www.nejm.org. jan 11, 2007.

Más aún durante las dos últimas décadas se ha producido una re emergencia sostenida de pertussis con tasas de incidencia que aunque son preocupantes, no alcanzan los niveles de la era prevacunal. Varios son los países que han registrado esta situación entre ellos Holanda, Bélgica, España, Alemania, Francia, Australia, Canadá, Estados Unidos, Argentina (31, 36, 161). En Holanda en el año 1996, tuvo lugar un brote epidémico de tal escala que la tasa de incidencia resultó ser 5 veces mayor que las de epidemias anteriores (35).

Se estima que los datos epidemiológicos actuales no reflejan sino una muy baja proporción de los casos reales existentes debido principalmente a la dificultad

diagnóstica de la patología. Es por esto que resulta dificultoso el análisis acabado de esta patología.

Situación epidemiológica en Argentina

En la Argentina como en otros países, la tos convulsa es una enfermedad endemoepidémica de notificación obligatoria que ha provocado importantes brotes en
distintas provincias de nuestro país con casos mortales (148). Es importante recordar
en este punto que el esquema de vacunación que se emplea en la actualidad en
nuestro país consiste en 6 dosis, las tres primeras a los 2, 4 y 6 meses de edad con tres
refuerzos; uno a los 18 meses, otro al ingreso escolar y el último recientemente
incorporado en calendario a los 11 años de edad (www.msal.gov.ar). Las tres primeras
dosis se realizan con la quíntuple bacteriana celular (<u>D</u>ifteria, <u>T</u>étanos, <u>P</u>ertussis y
<u>H</u>aemphilus tipo <u>b</u>, DTP-Hib difteria, <u>H</u>epatisis <u>B</u>, DTP-Hib Hb), el primer refuerzo se
realiza con la cuádruple bacteriana (<u>D</u>ifteria, <u>T</u>étanos, <u>P</u>ertussis y <u>H</u>aemphilus tipo <u>b</u>,
DTP-Hib), el segundo refuerzo con la triple bacteriana celular (<u>D</u>ifteria, <u>T</u>étanos,
<u>P</u>ertussis, DTP) y la inmunización a los 11 años con la triple acelular DTaP. Hasta el año
1985 se aplicaban las 3 dosis primarias y el refuerzo de los 18 meses, luego se incluyó
el refuerzo al ingreso escolar y a partir del año corriente el refuerzo de los 11 años.

Según el Sistema Argentino Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), desde el año 1998 se venía registrando un descenso en las notificaciones el cual continuó hasta el año 2002 y a partir de ese año la situación se revierte para comenzar un perfil de notificaciones anuales ascendente (Figura I. 12).

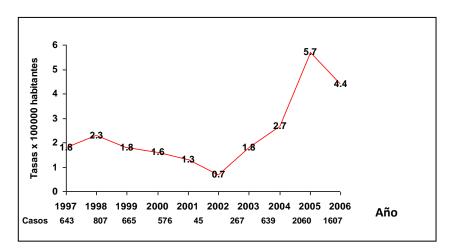


Figura I. 12: Tasa de notificación de casos en Argentina, periodo 1997-2006. Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE).

Nuestro laboratorio como uno de los laboratorios Nacionales de Referencia de *B. pertussis* ha contribuido en el diagnóstico, registro y análisis de datos lo que nos ha permitido observar que el aumento de casos se ha sostenido hasta nuestros días. A modo de ejemplo se muestra en la Figura I. 13 la distribución de casos confirmados de pertussis durante los años 2005 -2008 (90).

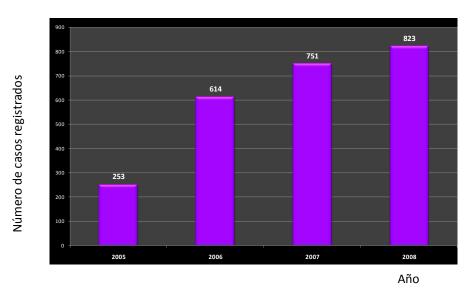


Figura I. 13: Distribución de casos confirmados de pertussis registrados en los LNR por año. Periodo 2005-2008.

Si se analiza distribución de casos confirmados de acuerdo a la edad de los pacientes se observa que las mayores proporciones se detectan en los niños menores de 6 meses de edad (Figura I. 14).

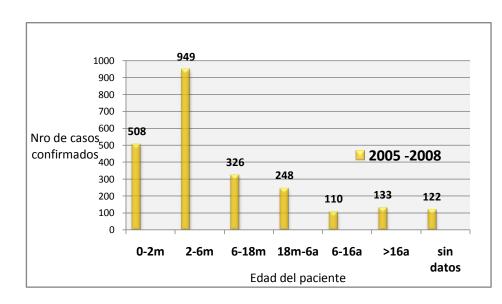


Figura I. 14:
Distribución
de casos
confirmados
de pertussis
según la
edad del
paciente.
Período
2005-2008

Si bien esta distribución por edades se observa en otros países, es importante destacar que en la actualidad en Argentina no se realiza una vigilancia sistematizada sobre la población adolescente adulta por lo que muy posible que haya un subregistro en esta población. Nuestro grupo de trabajo junto a otros profesionales de la salud y gracias a un trabajo conjunto de búsqueda de contactos de casos confirmados de pertussis o con sintomatología compatible con pertussis ha comenzado a detectar casos en la población adolescente adulta. Este aspecto es de gran interés ya que es esta población la que actuaría como diseminador del patógeno a la población susceptible constituida fundamentalmente por los niños menores de 1 año de edad.

Si se analiza la distribución de casos confirmados de acuerdo a su estado de vacunación, se observa que la mayor proporción de casos se registra en la población no vacunada o con un número de dosis de vacuna insuficientes como para conferirles protección (Figura I. 15).

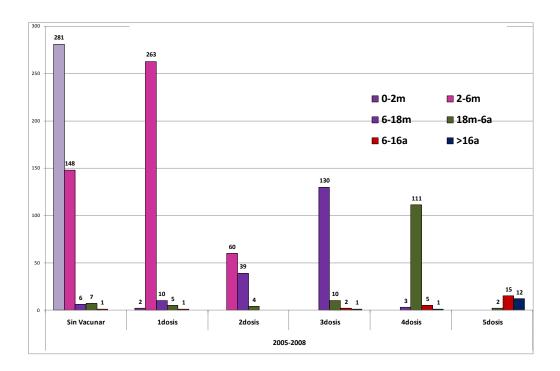


Figura I. 15: Distribución de casos confirmados de pertussis según la edad y el estado de vacunación del paciente. Período 2005-2008.

En resumen la situación epidemiológica de resurgencia de pertussis en Argentina marca sin dudas que esta patología está presente hoy como un problema grave para la salud pública a resolver.

La búsqueda de una solución definitiva requiere al menos de una comprensión profunda de la causalidad que lleva a la situación epidemiológica descripta.

Re emergencia de la enfermedad: causas potenciales

Se han propuesto varias hipótesis que intentan explicar el por qué de la resurgencia de la pertussis, algunas de estas hipótesis ya cuenta con evidencias experimentales que las respaldan permitiendo el diseño de estrategias tendientes a mejorar el control de la enfermedad. Una de ellas está referida a mejoras en la vigilancia debido a la mayor sensibilización de los médicos en la sospecha clínica y a la incorporación de métodos de diagnóstico de laboratorio más sensibles y específicos. Estas mejoran sin duda conllevan a un aumento de las notificaciones sobre todo en los primeros tiempos en los que fueron implementadas. Sin embargo han transcurrido más de 5 años y en algunos países hasta más de 10 años en que estas mejoras han sido introducidas y a pesar de ello el aumento de casos continúa registrándose. Es por ello que esta posibilidad como potencial causal ha sido prácticamente dejada de lado. Otras causas que se proponen actualmente incluyen las fallas en las vacunas no sólo en cuanto a la eficacia sino a la relativamente corta inmunidad conferida por las mismas. Más recientemente se ha sumando como contribuyente del aumento del número de casos de pertussis, a la adaptación de las bacterias circulantes a la inmunidad conferida por las vacunas haciendo que éstas sean aún menos efectivas (126). El peso relativo de cada una de estas posibilidades depende de cada país y esto ha impedido llegar a un consenso global sobre la causalidad de la resurgencia de pertussis. Así Canadá, por ejemplo atribuyó el aumento en el número de casos al empleo de vacuna pobremente efectiva ya que además de la incidencia elevada en los niños pequeños, este país evidenció lo que describieron como una "cohorte en movimiento", es decir que la indicencia pico por edad se modificaba cada año y era mayor que el promedio histórico. Este hecho revelaba la existencia de una cohorte sensible a la infección que había recibido una vacuna celular contra pertussis menos efectiva (136).

Holanda por otra parte presenció un importante aumento de casos entre pacientes vacunados de un amplio rango etario, que comenzó 2 años antes del brote de 1996. Este cambio fue atribuido a variaciones en el agente causal de la enfermedad (35, 125-126, 167). En Holanda se demostró por primera vez que la estructura de la población de *B. pertussis* circulante no era igual a la de las cepas empleadas en la producción de

vacunas quizás como consecuencia de una presión de selección ejercida por la inmunización masiva. En un estudio realizado por van der Zee et al (167) se compararon los patrones de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) de la secuencia de inserción IS1002 de aislamientos de B. pertussis pertenecientes a los períodos 1950-1954, 1978-1990, 1991-1993 y 1994, que fue un año epidémico en ese país. Doce de 15 aislamientos estudiados del periodo 1950-1954 pertenecían al mismo grupo A y ninguno de los aislamientos de otros periodos se agrupaban en este grupo A. Los aislamientos de los dos periodos siguientes incluyendo los de la epidemia de 1994 pertenecían a los grupos B y C respectivamente. Los resultados evidenciaron un cambio genotípico de B. pertussis en el tiempo, siendo la diferencia más notable la que se observó entre el periodo 1950-1954 y en los períodos subsiguientes. El perfil de RFLP designado como D1 persistió por más de 40 años e incluso parece haberse expandido quizás como consecuencia de de ser el menos afectado por la inmunidad inducida por las vacunas. Los resultados concuerdan con la hipótesis de que los cambios en la población de B. pertussis circulantes en Holanda pueden ser consecuencia de la presión de selección ejercida por la vacuna que fue introducida en 1953. En aquel estudio los autores detectaron además cambios en dos importantes antígenos protectores, la toxina pertussis y la pertactina (126). Las mutaciones detectadas en los genes que codifican para estos dos importantes inmunógenos se muestran en las Figuras I. 16, I. 17 y I. 18.

		305	390	region 1	1010	1212	1595	1744	region 2		2558
		TCC	GTT		TCC	TCC	CTA	GGTCCCCAGCC	GCCGCAGCCGCCGCAG	CCGCAGCCGGAA	CAC
	prn1	s	v		s	s	L		P O P P O		Н
	prn2	1						1			
	prn3										
	prn4			-					M-Marin		
	prn5										
	prn6	.т.	c		.т.	T	. G.	GGTCCCCAGCC	GCCGCAG	GCCGCAGCCGGAA	.G.
	2	F	v		F	S	R	G P Q P	P Q	PQPE	R
	prn7						. G.				
							R				
	prn8						. G .				
	-						R				
		1									
790											
P A G G		G A	V P	G G A V	P G	G F G	-	G G F G P	G G F G P	G G F G P	V
P A G G	TGCGGTTCCC GG		V P	G G A V GCTGGTGCGGTT	P G	G F G				G G F G P GGCGGC <u>TTC</u> GGT <u>C</u> CC	
P A G G	TGCGGTTCCC GG	G A	V P		P G						V GTCCTC
PAGG	TGCGGTTCCC GG	G A	V P		P G	G F G					
P A G G 1 CCTGCC GGCGGT 2	TGCGGTTCCC GG	G A	V P		P G	G F G					
P A G G 1 CCTGCC GGCGGT 2	TGCGGTTCCC GG	G A	V P		P G	G F G					GTCCT
PAGG	TGCGGTTCCC GG	G A	V P		P G	G F G					GTCCT

Figura I. 16: Regiones polimórficas del gen de pertactina. Los números indican la posición de las bases relativas al codón de inicio del gen de *prn*1. Las bases polimórficas se marcan en negrita. Los puntos indican la identidad de secuencia con *prn*1, las rayitas representas espacios introducidos para aumentar el número de apareamientos. Las mutaciones silentes se indican sombreadas. Los codones se resaltan por estar subrayados. Fuente: Epidemiological typing of Bordetella pertussis isolates: recommendations for a standard methodology Mooi, F. R., H. Hallander, C. H. Wirsing von Konig, B. Hoet, and N. Guiso. 2000. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 19:174-81.

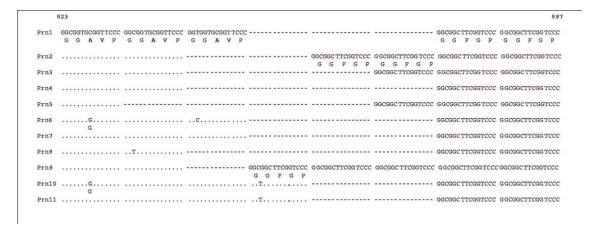


Figura I. 17: Polimorfismo en la región 1 del gen de pertactina. Alineamiento de 11 de las 12 secuencias conocidas. Los puntos representan bases idénticas; las rayitas las bases eliminadas. La numeración de bases corresponde a los de la secuencia de prn1. Número de acceso AJ011091 (GeneBank database [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez]). Fuente: Simple Algorithm for Identification of Bordetella pertussis Pertactin Gene Variants Muyldermans, G., D. Pierard, N. Hoebrekx, R. Advani, S. Van Amersfoorth, I. De Schutter, O. Soetens, L. Eeckhout, A. Malfroot, and S. Lauwers. 2004. J Clin Microbiol. 42:1614-9.

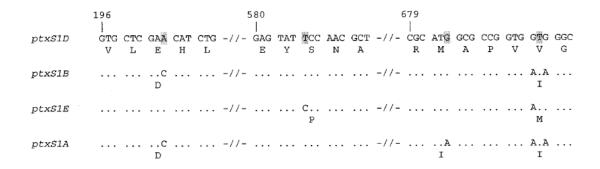


Figura I. 18: Regiones polimórficas en el gen de la subunidad S1 de la toxina pertussis *ptxS1*. Las 3 regiones polimórficas se muestran con las bases en sombra. Las diferencias se muestran en relación a *ptxS1D*. Los puntos indican identidad de secuencia, los números la posición de las bases en el gen *ptxS1* relativos al codón de inicio. Fuente: Polymorphism in the Bordetella pertussis virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution.Mooi, F. R., H. van Oirschot, K. Heuvelman, H. G. van der Heide, W. Gaastra, and R. J. Willems. 1998. Infect Immun 66:670-5 (126).

El grupo liderado por el Dr. Mooi y colaboradores, en Holanda fueron los pioneros en la descripción de la divergencia antigénica entre las cepas B. pertussis empleadas en la producción de vacunas y la población bacteriana circulante (125). Ellos detectaron que la secuencia que codifica para el antígeno superficial pertactina presentaba variantes alélicas características de cada período. Así, en el periodo 1949-1980, sólo se encontraba la variante prn1, en 1981 aparecen 2 tipos nuevos de variantes prn2 y prn3 que comprenden del 20% al 30% de los aislamientos de ese periodo hasta 1988. Desde 1989 en adelante aproximadamente el 90% de los aislamientos correspondieron a los alelos prn2 y prn3. Es importante remarcar en este punto que las dos cepas empleadas en las formulaciones vacunales de Holanda contenían la variante prn1. Para la toxina pertussis se encontraron cuatro variantes alélicas: A, B, D y E. La frecuencia de aparición de los alelos B y D para la toxina pertussis disminuyen en el tiempo, llegando en el período 1990 -1996 a valores del 12% en el caso del alelo B y a la desaparición en el segundo. En el periodo 1978-1985 los autores detectaron un nuevo alelo para la subunidad S1 de la toxina pertussis, el alelo ptxS1A. A partir de ese período la frecuencia de aparición de dicho alelo se incrementa hasta llegar a valores del 88% en el período 1990-1996.

Estos resultados descriptos por primera vez en Holanda (126) permitieron vislumbrar la necesidad de estudiar la evolución de este patógeno no sólo en términos de la

extensión de la biodiversidad génica y su extensión sino en términos funcionales respecto de la implicancia de la misma en la protección y control de la enfermedad. Los estudios sobre la divergencia antigénica se fueron profundizando y gracias a ello comenzó a detectarse polimorfismos en otras secuencias génicas como por ejemplo en las fimbrias (163). Los genes que codifican para estas subunidades están ubicados en dos loci cromosomales no ligados, *fim*2 y *fim*3, respectivamente. Se ha descripto la presencia de polimorfismo en la secuencia del gen que codifica para el antígeno Fim3, hallándose 4 variantes alélicas diferentes *fim* 3 A, A*, B y C generadas por mutaciones puntuales en tres regiones diferentes, 3 de ellas son no sinónimas (163). Por otra parte para *fim*2 también se encontraron 2 variantes alélicas, *fim*2-1 y *fim*2-2. En los aislamientos más modernos se detectó la presencia de los alelos 2 para la *fim* 2 y B para la *fim*3, mientras que en las cepas vacunales o en los aislamientos más antiguos se detecta la presencia del alelo 1 para la *fim*2 y A para la *fim*3 (163).

Los autores introducen con sus resultados la hipótesis sobre la presión de selección que la vacunación estaría ejerciendo sobre las cepas cuyas variantes alélicas estarían más adaptadas a superar la respuesta inmune generada por el huésped (35, 72).

Para seguir los cambios en las poblaciones de patógenos se ha desarrollado y empleado diferentes metodologías. En el caso de *B. pertussis*, la técnica de **Multilocus Enzyme Electroforesis (MLEE)** ha sido de las primeras en emplearse para estos estudios (129, 166). En ellos se eligieron 15 enzimas, las cuales fueron analizadas en 60 aislamientos pertenecientes a las especies *B. pertussis*, *B. parapertussis y B. bronchiseptica* recuperadas de humanos y de otros mamíferos. Se encontraron así 11 loci polimórficos que diferenciaron 14 perfiles electroforéticos (ET). Todos los aislamientos de *B. parapertussis* presentaban el mismo ET siendo este muy similar a 9 de los 10 ET observados para los aislamientos de *B. bronchiseptica*. Mediante esta metodología se pudo observar que la cepa de referencia de la OMS *B. pertussis* Bp18323, empleada en los test de potencia de vacunas en ratones era más similar a *B. bronchiseptica* y a *B. parapertussis* que *a los aislamientos de B. pertussis*. En general los resultados obtenidos mediante MLEE permitió establecer que la estructura del género *Bordetella* era clonal (129).

van Loo y colaboradores (170), emplearon la técnica de MLST o Multi-Locus Sequence Typing que se basa en los mismos principios del MLEE pero que asigna grupos en base a la secuencia nucleotídica, más que por movilidad electroforética de sus productos génicos. La principal importancia de la metodología MLST por sobre otros metodologías de tipificación como RFLP, la amplificación de fragmentos polimórficos al azar y PFGE, es que los resultados de la secuenciación de genes son de por sí comparables entre laboratorios (40, 47, 88). Estos estudios se han focalizado fundamentalmente a los genes que codifican para proteínas de superficie bacteriana ya que presentan mayor probabilidad de variación por su directa exposición al sistema inmune del huésped. Se estudió la secuencia de: las subunidades S1, S2, S3, S4 y S5 de la toxina pertussis, de Hemaglutinina Filamentosa, Pertactina, antígeno de Fimbria 2 y antígeno de Fimbria 3, OmpP y OmpQ dos proteínas integrales de la membrana externa, el Factor de Colonización Traqueal, la proteína BrkA, Vag8 o gen activado en virulencia y BipA o proteína de fase intermedia de Bordetella. Los autores definieron 8 perfiles de MLST según los polimorfismos en los genes ptxS1, PtxS3 y tcfA: MLST-1: ptxS1D, ptxS3A, tcfA2, MLST-2: ptxS1B, ptxS3A, tcfA2, MLST-3: ptxS1A, ptxS3A, tcfA2, MLST-4: ptxS1A, ptxS3A, MLST-5: ptxS1A, ptxS3B, MLST-7: ptxS1A, ptxS3A, tcfA5, MLST-8: ptxS1B, ptxS3B, tcfA2, MLST-9: ptxS1E, ptxS3A, tcfA. Este estudio permitió evidenciar un cambio en la población de B. pertussis luego de la introducción de las vacunas celulares en Holanda con la emergencia de los tipos MLST-3, 4 y 5 ausentes en la era prevacunal. Además se asoció el aumento de la frecuencia de aparición de los tipos de MLST-4 y 5 con aumento de notificaciones y con la epidemia de 1996. Gracias a que en el año 2003 Parkhill et al (139) secuenciaron los genomas de las tres especies de Bordetella con mayor relevancia epidemiológica (grupo de las especies "clásicas") se pudo determinar así que la cepa BpTohamal de B. pertussis contiene el "abrumador" número de 261 elementos de inserción, 238 de los cuales son copias idénticas de IS481 y que representan el 6% del genoma bacteriano. La presencia de estas secuencias explica no sólo la pérdida de numerosos genes en el transcurso de la evolución de B. pertussis sino que en parte serían los responsables de la plasticidad genómica que ha llevado a inversiones en grandes regiones genómicas con un alto número de pseudogenes: 350 pseudogenes en B. pertussis comparados con los 19 encontrados en B. bronchiseptica. La mayoría de los genes perdidos de los genomas

de *B. pertussis y B. parapertussis* y de los pseudogenes están asociados a funciones de transporte de membrana, metabolismo de moléculas pequeñas, regulación y expresión de genes y síntesis de estructuras de superficie.

Sin dudas un acercamiento con gran poder discriminatorio en el estudio de la población de *B. pertussis* es el análisis de macrorestricción del ADN empleando la **electroforesis** en campo pulsado (PFGE) (123).

Brevemente la metodología consiste en embeber los microrganismos en tacos de agarosa, provocar su lisis *in situ* y finalmente digerir el ADN cromosomal con endonucleasas de restricción de corte infrecuente. Luego los tacos de agarosa conteniendo los fragmentos de ADN cromosomal se insertan en las calles de un gel de agarosa y se someten a una electroforesis en un campo eléctrico de pulsos y que cambia su sentido según un patrón determinado. Mediante esta técnica se obtiene un patrón de bandas de ADN de diferente tamaño según los sitios de corte que la endonucleasa haya encontrado en función de la secuencia genómica de cada aislamiento. Los patrones de restricción del ADN obtenidos para cada aislamiento se comparan entre sí para determinar su similitud y se pueden emplear análisis por arboles filogenéticos para evaluar el grado de similitud entre ellos (162).

En mayo del año 1999 se reunió un grupo de expertos involucrados en laboratorios de investigación epidemiológica de coqueluche en el Instituto Pasteur de Paris en Francia, con el objetivo de llegar a un consenso sobre la metodología más adecuada a aplicar en estudios epidemiológicos de vigilancia de *B. pertussis*. De esta reunión se propuso que la metodología para la tipificación de *B. pertussis* estuviera basada en la serotipificación, el fingerprinting de ADN y la tipificación de genes (123).

La tipificación de aislamientos por "huellas dactilares de los microrganismos" o fingerprints de ADN incluye varias técnicas como ribotipificación, Randomly amplified polymorphic DNA o RAPD, fingerprinting basado en IS1002, y electroforesis en campo pulsado o PFGE. En ese momento se sugirió el empleo de PFGE por su gran poder discriminatorio, utilizando como enzimas de restricción a *Spel* y *Xbal* (123). En estudios algo más recientes se impulsó la idea de usar una sola enzima, la enzima *Xbal* ya que se encontró que brinda suficiente información para el análisis de relaciones epidemiológicas entre aislamientos (25, 76, 140).

Con la implementación de esta metodología, se ha documentado que la población circulante de *B. pertussis* es esencialmente diferente de aquellas cepas empleadas en la producción de vacunas. Por otra parte se ha demostrado que la población bacteriana ha cambiado desde la introducción de vacunación alrededor de 50 años atrás (3, 25, 58, 72, 76, 124, 126) quizás ocasionado una efectividad aún menor de las vacunas hoy en uso. La implicancia de esta divergencia está siendo debatida no sólo en el marco de las vacunas celulares sino también de las vacunas acelulares ya que recientemente y luego de varios años de haber introducido dichas vacunas, se han aislado bacterias ya sea carentes de inmunógenos protectores incluidos en las vacunas acelulares o bacterias que expresan un mayor rendimiento los mismos de forma de subvertir la respuesta inmune montada en el huésped (15, 48).

En las páginas anteriores hemos hecho un recorrido resumido del estado de arte de esta patología que tiene la particularidad de que pese a ser inmunoprevenible, en la actualidad y desde hace 20 años, se la considera como una enfermedad resurgente afectando no sólo a los niños menores de 1 año de edad sino también a la población adolescente- adulta. Para explicar esta situación se han propuesto varias hipótesis no excluyentes entre sí, entre las que se puede mencionar a la mejora en la vigilancia de la enfermedad la cual puede implicar desde una mayor sensibilidad para la sospecha de caso hasta la aplicación de metodologías diagnósticas más sensibles y específicas, corta duración de la inmunidad conferida por vacuna y adaptación de las cepas bacterianas circulantes a la inmunidad conferida por vacunas.

El peso relativo de cada una de estas posibles causas depende de cada país y para intentar mejorar el control de la enfermedad estas deben profundizarse en cada región aunque sin dudas el inicio en la mejora debe partir del aseguramiento de una adecuada cobertura vacunal.

En este trabajo de tesis hemos abordado el estudio de la diversidad microbiana local, la de las cepas que se usan actualmente en la producción de vacunas, la comparación entre ellas y el impacto de la diversidad en la protección contra la enfermedad. Este trabajo fue posible, al menos en parte, gracias a que desde el año 2004 nuestro grupo ha trabajado conjuntamente con el Ministerio de Salud de la

Nación, el Instituto ANLIS Malbrán y hospitales nacionales, provinciales y municipales de nuestro país en la implementación de una red nacional para la vigilancia de pertussis. Nuestro grupo de trabajo ha tranferido tecnología diagnóstica y ha contribuido en la capacitación para la confirmación de casos sospechosos desde el laboratorio, de hecho nos hemos constituido en uno de los Laboratorios de Referencia Nacionales. De esta manera, hemos podido obtener una colección de aislamientos argentinos de *B. pertussis* con la que el país no contaba. Es a partir de la construcción de este cepario local que he comenzado los estudios sobre diversidad microbiana que se detallan a continuación.

Objetivos abordados

- 1. Análisis de la divergencia de los aislamientos locales de B. pertussis.
- 2. Análisis de la divergencia de las cepas de *B. pertussis* empleandas actualmente en la producción de vacunas
- 3. Análisis comparativo entre los aislamientos clínicos y las cepas vacunales y comparación con las cepas que se emplean en la producción de vacunas.
- 4. Caracterización funcional de las diferentes cepas que se emplean en la producción de vacunas.

Estos objetivos se abordarán a través de los capítulos II, III y IV. En el capítulo II se desarrollará la evaluación de la divergencia antigénica de la población bacteriana local de *B. pertussis* en relación a las cepas empleadas en la formulación de vacunas; en el capítulo III se evaluarán los aspectos moleculares tendientes a la selección de una cepa vacunal de *B. pertussis*, para lo cual se describirá la cinética de crecimiento y producción de factores de virulencia, se identificarán los componentes bacterianos inmunogénicos, comunes y diferenciales y finalmente se analizarán los perfiles de expresión proteico en muestras enriquecidas en proteínas de superficie de cepas vacunales y de un aislamiento local representativo; en el capítulo IV se desarrollarán los estudios in vivo de la capacidad protectiva de las distintas cepas vacunales empleando el modelo de desafío intranasal en ratón

Con el desarrollo de esta propuesta esperamos contribuir al conocimiento que sirva de base para el diseño de una vacuna más efectiva contra pertussis, no sólo en términos generales, sino en lo que se refiere a su efectividad en Argentina, determinando la definición de la/s cepa/s o eventualmente componentes a incluir en una nueva formulación.

Capítulo II

Evaluación de la divergencia antigénica de la población bacteriana local en relación a las cepas empleadas en la formulación de vacunas

Introducción

Como se ha mencionado anteriormente Argentina no contaba con una colección de cepas de B. pertussis hasta que a partir del 2004, se comenzó a conformar una red nacional de vigilancia para pertussis que desde el laboratorio es la confirmación acompañada con diagnóstica mediante metodologías microbiológicas, serológicas y de biología molecular. Es así que se ha construyendo un cepario que hasta el año 2006 contenía 66 aislamientos del agente causal de la tos convulsa. Durante el periodo siguiente y hasta el presente podido recuperar hemos nuevos aislamientos clínicos de B. pertussis específicamente 99 aislamientos, 1 de B. bronchiseptica y 6 aislamientos de B. parapertussis provenientes de la provincia de Neuquén.

Nuestro cepario cuenta hoy con 188 aislamientos locales (165 se corresponden a B. pertussis) siendo el más antiguo uno correspondiente al año 1969 el cual fue cedido gentilmente por la ANLIS Malbrán. La distribución de la recuperación de los aislamientos por año durante el período 2006 - 2008 es de 10 aislamientos durante el año 2006, 39 durante el 2007, 44 durante el año 2008 y 6 en 2009 (Figura II. 1). En el periodo 1969-1999 el número de aislamientos fue 12, 9 en el año 2000, 7 en el 2001, 5 en el 2002, 12 para 2003, 15 en 2004 y 6 en 2005.

Respecto de la distribución geográfica de los aislamientos clínicos de *B. pertussis*, el mayor número pertenece a la provincia de Buenos Aires (128/165,

76%), el resto de aislamientos corresponde a las provincias de Neuquén y a Córdoba con un 8% cada una de ellas y sólo 2 aislamientos pertenecen a la provincia de Santa Fé. Esto en parte refleja el subregistro de la enfermedad en muchas provincias del país o al menos de la falta de notificación a nivel central va sea al Ministerio de Salud de la Nación o a los Centros de Referencia para esta patología (Servicio de Bacteriología Clínica del ANLIS - Malbrán y nuestro laboratorio).

Si bien la vigilancia epidemiológica de la con enfermedad ha mejorado transcurso de los años y prueba de ello es el incremento en la recuperación microbiana, todavía es necesario realizar mejoras en el registro de datos como por ejemplo la fecha de inicio de síntomas, el estado de vacunación del paciente y la identificación de los contactos familiares. La disponibilidad de estos datos nos permitirá comprender la epidemiología en nuestro país de esta enfermedad. En este punto es importante remarcar que en el comienzo de la vigilancia de pertussis no se contaba con una ficha epidemiológica consensuada y de hecho al principio muchas de las muestras que arribaban a nuestro laboratorio sólo contaban con el nombre del paciente y el lugar en donde se había tomado la muestra. Afortunadamente hoy tenemos una evolución más que positiva respecto a los datos volcados en dichas fichas y se ha informatizado la notificación de casos.

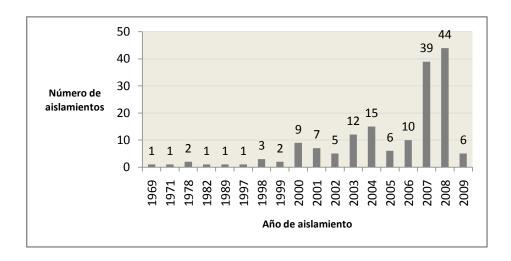


Figura II. 1: Distribución por año de aislamientos clínicos de *B. pertussis* recuperados en Argentina. El primer aislamiento de nuestra colección es del año 1969, perteneciente a la época en la que en el país no se contaba con vacuna específica contra pertussis.

En cuanto a la evolución de los pacientes de los que se ha podido aislar el agente causal y que además cuentan con la ficha epidemiológica completa, se ha podido constatar que seis fallecieron como consecuencia de la enfermedad.

Del total de aislamientos de B. pertussis sólo se cuenta con datos de edad en 89 casos (89/165) y de estos 77 se correspondieron a pacientes menores de 6 meses. De los 165 aislamientos, sólo 58 tienen información sobre el estado de vacunación y de ellos 52 no habían recibido más que 1 dosis de vacuna, sólo una paciente tenía 3 dosis y 2 de los pacientes tenían 13 y 23 años (ambos recuperados en agosto de 2008).

Estos datos concuerdan con informes que dan cuenta que la carga bacteriana en nasofaringe es mayor cuanto menor es el número de dosis de vacuna recibidas y la edad del paciente, siendo mayor la sensibilidad del cultivo en este grupo de pacientes (41, 73, 85). Por otra parte, teniendo en cuenta que la efectividad de la vacuna contra pertussis alcanza un 70% sólo después de recibir 3 dosis no resulta llamativo lograr el aislamiento de B. pertussis en estos pacientes (41, 73, 85).

Durante mi trabajo de tesis hemos realizado la caracterización de la mayoría de los aislamientos clínicos de nuestra colección (139/165).Para emplearon las técnicas de PCR para la genotipificación del polimorfismo en el gen la subunidad S1 de la toxina pertussis (ptxS1) У pertactina (prn) electroforesis de campo pulsado (PFGE) empleando como enzima de restricción a Además se ha Xbal. realizado serotipificación del antígeno fimbria. Los resultados alzanzados se muestran a continuación.

Resultados y discusión

Polimorfismo en el gen de la Subunidad 1 de la toxina pertussis (ptxS1)

En el momento en que se describieron las variantes alélicas para el gen que codifica para la subunidad S1 de la toxina pertussis (ptxS1) se propuso como metodología de tipificación la secuenciación del producto de amplificación obtenido a partir de los primers S1-MF (ACAATGCCGGCCGTATC CTC) y S1-MR (TTCGAAGTACGAGCTG GCGG) (123) que amplifican una región interna de la obtenida (tamaño del amplicón 930bp) con los primers S1-F2 (CCCCCTGCCATGGTGTGATC) (AGAGCGTCTTGCGGTCGATC).

Más tarde se introdujeron como metodologías alternativas la PCR en tiempo real, la hibridación y curvas de desnaturalización (110)PCR У convencionales empleando primers específicos (50). Dada la sencillez de la incorporamos nuestro misma en laboratorio esta última metodología que consiste en amplificar la región de ADN mediante dos juegos de pares de primers cuya secuencia se indica en la Figura II. 2. **Estas** reacciones amplificación de posibilitan la clasificación de aislamientos locales circulantes en dos aquellos que contienen grupos: polimórfica del variante gen contiene la base nitrogenada adenosina en la posición 684 denominada variante

ptxS1A y otros que contienen la base nitrogenada guanina en dicha posición a las que denominaremos ptxS1 no A. La variante no A podría tratarse tanto de las variantes B, D o la E (ptxS1B, D o E). Estas variantes en las que agruparemos a los aislamientos como ptxS1 noA se han encontrado con la misma frecuencia unos que otros por lo que no resulta imprescindible su discrimación. Así, el algoritmo de trabajo resulta aún más sencillo pues las variantes quedarán clasificadas como A y no A.

Se emplean entonces los primers designados como S1 684(A) o S1 684(G) y S1R. En caso de obtener un amplicón de 180 bp cuando se emplean los primers S1 684(A) y S1R y de no producirse amplificación al emplear el par S1 684G-S1R la variante se clasifica como variante A o ptxS1A.

En la Figura II. 2 que se muestra a continuación se esquematizan regiones que codifican para el gen de la subunidad S1 de la toxina pertussis y se señalan sólo los nucleótidos de las que posiciones dan cuenta del polimorfismo, así como los pares de primers que pueden emplearse para la clasificación de cada una de las variantes alélicas.

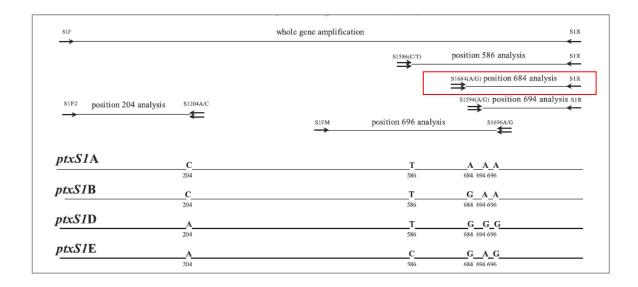


Figura II. 2: Polimorfismo del gen ptxS1. Las flechas representan los primers empleados de para el análisis los sitios polimórficos. **S1** 684 **TCGGCACATTGGTGCGCATG** TCGGCACATTGGTGCGCATA. 684 G: S1R: **S1** TCAATTACCGGAGTTGGGCG. Fuente: The new strategy for allele identification of the genes coding for pertussis toxin subunit S1 (ptx S1) and pertactin (prn) in Bordetella pertussis Fiett, J., I. Letowska, M. Gniadkowski, and W. Hryniewicz. 2003. J Microbiol Methods 55:651-66.

Esta metodología fue puesta a punto en el laboratorio ensayando diferentes condiciones experimentales como ser concentraciones de Mg(Cl)₂, de di-metil sulfóxido, tiempos de cada una de las etapas de amplificación, número de ciclos. Las condiciones óptimas encontradas fueron descriptas en la sección de Materiales y Métodos.

En la Figura II. 3 se muestra a modo de ejemplo cómo se observan los resultados de la PCR con este par de juegos de primers empleando como molde ADN total extraído a partir de la cepa vacunal BpTohamal y de los aislamientos clínicos Bp707 y Bp708.

Durante el desarrollo de mi Tesis Doctoral he aplicado esta metodología a 139 aislamientos de nuestra colección, quedando excluidos algunos de los primeros aislamientos ya que lamentablemente no pudieron recupe-rarse y los aislamientos del año 2009. Del total de aislamientos de B. pertussis analizados el 94,9% (132/139) correspondieron a la variante A de ptxS1, las restantes (5,1%, 7/139) se clasificaron como variantes ptxS1 no A. Los aislamientos circulantes conteniendo la variante ptxS1noA presentes también en las cepas vacunales, correspondieron a un único aislamiento de los años 1982, 1989 y 2000 y a cuatro aislamientos obtenidos de individuos infectados en una misma familia en el año 2006, por lo que su número puede ser considerado como el 1 aislamiento independiente.

La variante A de la subunidad S1 es diferente a la presente en las cepas vacunales en uso en distintas formulaciones: cepa Bp Tohamal *ptxS*1B, Bp509 *ptxS1* noA, Bp137 *ptxS1* noA, IM1416 y IM1414 *ptx*S1D.

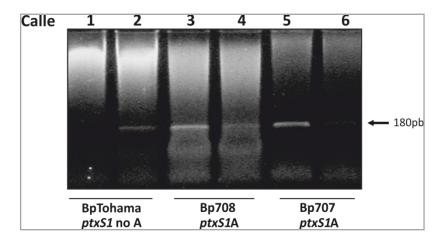


Figura II. 3: Electroforesis en gel de agarosa 1,5% (p/v) de los productos de amplificación de la región polimórfica ptxS1684. Las calles 1 y 2 corresponden a los productos de amplificación de la región polimórfica ptxS1684 empleando como molde DNA total de cepa vacunal BpTohamal empleando los primers S1684A-S1R y S1684G-S1R respectivamente – Variante alélica ptxS1B. Calles 3 y 4: incluye los productos de amplificación obtenidos para el aislamiento clínico Bp708 empleando los primers S1684A-S1R y S1684G-S1R respectivamente – Variante alélica ptxS1A. Calles 5 y 6: idem para el aislamiento clínico Bp707 empleando los primers S1684A-S1R y S1684G-S1R respectivamente – Variante alélica ptxS1A. El amplicón presenta un peso molecular de 180pb.

En la Tabla II. 1 se muestra la distribución en los aislamientos de Argentina. de variantes alélicas para la *ptxS1* por año

Año de aislamiento	Nro cepas estudiadas	Nro de aislamientos ptxS1 A	Nro de aislamientos ptxS1 no A
1969	1	1	-
1971	1	1	-
1978	2	2	-
1982	1	-	1
1989	1	-	1
1998	2	2	-
2000	8	7	1
2001	7	7	-
2002	5	5	-
2003	12	12	-
2004	12	12	-
2005	6	6	-
2006	10	6	4
2007	38	38	-
2008	33	33	-
Total	139	132	7

Tabla II. 1: Distribución por año de las variante alélicas de *ptxS1* contenidas en los distintos aislamientos locales.

Del total de cepas estudiadas el 59 % presentaba un aislamiento *ptxS1*no A y (82/139) tiene datos de edad del tenía 4 meses de edad y una sola dosis de paciente. Sólo uno de los 82 pacientes vacuna. El resto de los aislamientos con la

variante ptxS1A pertenecían a pacientes con edades entre los 25 días y los 23 años. De los 82 pacientes sólo 11 eran mayores de 6 meses. Cincuenta y uno de 139 (37%) aislamientos estudiados tenían datos del estado vacunación del paciente. De los mismos sólo 1 pertenecía a la variante ptxS1 noA, de los restantes aislamientos (50) conteniendo la variante ptxS1A sólo 3 tenían más de una dosis de vacuna.

Los resultados obtenidos muestran que la mayoría de los aislamientos circulan-tes contienen el alelo A para la subunidad S1 de la toxina pertussis estando sólo representado en un 5% el alelo ptxS1 noA. Este útlimo alelo se ha reportado característico de aislamientos provenientes de epócas anteriores o tempranas a la incorporación de las vacunas en los calendarios nacionales. Es por ello que se los designa como alelos viejos y a los aislamientos que la contienen aislamientos viejos. Lamentablemente nuestra colección no cuenta con una cantidad significativa de aislamientos de los años anteriores a la década del '70 que fue cuando se vacunación instauró la masiva antipertussis (vacuna DTP) en Argentina por lo que los resultados obtenidos no nos permiten aportar una clara evidencia a la hipótesis sobre la presión de selección que podrían estar ejerciendo las vacunas. Si analizamos datos presentados

en otros países podemos observar que por ejemplo en Polonia en un periodo de 40 años desde 1968 hasta el 2001, se vio que de 120 aislamientos analizados todos excepción de 3 aislamientos pertenecían a la variable ptxS1A. Los 3 aislamientos conteniendo la variable ptxS1B correspondieron al año 1968 (50). En otro estudio similar con 47 cepas del mismo país se observó que los alelos ptxS1B o pertenecientes a la variante vacunal fueron detectados en un 33 % del de los aislamientos obtenido durante los años 1960 y 1970, mientras que los aislamientos de los años 1990s esa proporción desapareció para ser desplazada completamente por ptxS1A (72). De igual forma, en Finlandia Mooi et al (124) describieron el reemplazo de variantes ptxS1 que circulaban en la era variantes prevacunal ptxS1B, por diferentes ptxS1A, el reemplazo variantes alélicas fue completo en los años 1990s. Cabe destacar que las Finlandia vacunas empleadas en contenían las variantes ptxS1B y ptxS1D.

Nuestros datos como los de otros países reflejarían la prevalencia actual de la variante *ptxS1*A y una mayor frecuencia de las variantes no A en los años más cercanos a la instauración de la vacuna (170, 175).

Polimorfismo en el gen de la adhesina Pertactina (prn)

Otro de los inmunógenos descriptos como polimórficos es la pertactina que hemos mencionado introducción de este trabajo proteínas se trata de un antígeno superficial con un rol relevante no sólo en la patogenicidad de B. pertussis sino en la protección contra la enfermedad (33, 68, 84, 158). Estas funciones marcan sin duda la importancia de analizar el polimorfismo de prn. La secuencia de ADN que codifica para esta proteína presenta dos regiones denominadas como región 1 y región 2 en las cuales se ha detectado polimorfismo genético. En el esquema de la Figura II. 4 se muestra la región polimórfica 1.

Recientemente se ha observado que las variaciones registradas principalmente

en la región 1, provocan cambios en la estructura primaria la ٧ en inmunogenicidad de la proteína. Especificamente se ha observado que anticuerpos producidos tanto infección como por vacunación dirigidos contra la variantes prn2 no eran capaces de reconocer la región variable de la prn1 (79). Más aún que los individuos vacunados y aquellos infectados con tampoco cepas prn3, presentaban anticuerpos específicos contra la variable prn1.

En varios países se produjeron cambios conformacionales en la región variable de la pertactina originando la emergencia de cepas *prn2*.

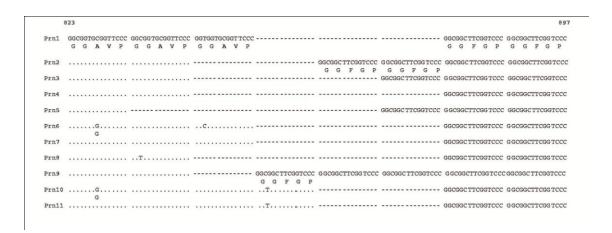


Figura II. 4: Polimorfismo en la región 1 del gen de pertactina. Se alinearon las 11 de las 12 secuencias conocidas. Los puntos representan bases idénticas; las rayas los nuclótidos eliminados. La numeración de bases corresponde a los de la secuencia de *prn1*. Número de acceso AJO11091 (GeneBank database [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez]). Fuente: Simple Algorithm for Identification of *Bordetella pertussis* Pertactin Gene Variants Muyldermans, G., D. Pierard, N. Hoebrekx, R. Advani, S. Van Amersfoorth, I. De Schutter, O. Soetens, L. Eeckhout, A. Malfroot, and S. Lauwers. 2004. J Clin Microbiol. 42:1614-9.

Para la clasificación de las variantes del gen *prn*, una de las metodologías descriptas consiste en la secuenciación del gen de pertactina empleando los primers AF: GCCAATGTCACGGTCCAA y BR: CCGGATTCAGGCGCAACTC para amplificar una región de 1,43kb que contiene las regiones polimórficas 1 y 2. Para el secuenciamiento de la región 1 se ha recomendado el empleo de los

primers AF: GCCAATGTCACGGTCCAA y AR: GCAAAGGTGAATCGACAGGG (123). Otra de las metodologías usadas para la genotipificación de *prn* es la descripta por Muyldermans *et al* (130) que emplea reacciones de PCR empleando juegos de primers que permiten la clasificación de las cepas/aislamientos de *B. pertussis* en las variantes de *prn* según el algoritmo que se muestra en la Figura II. 5.

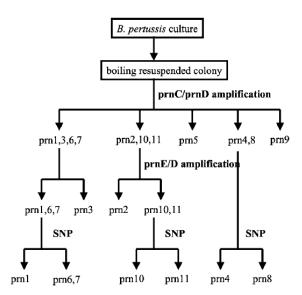
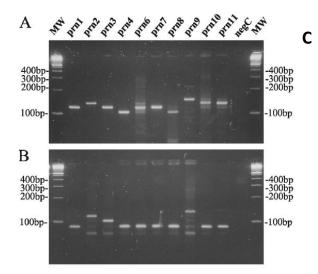


Figura II. 5: Algoritmo de trabajo para la clasificación de alelos de *prn*. Este algoritmo comienza con el aislamiento del material genético de la bacteria y una primera amplificación empleando los primers *prnC- prnD*. El empleo posterior de los primers *prnE- prnD* permite la identificación de los dos tipos de *prn* principales *prn2* y *prn 3*. Una identificación posterior de los tipos de prn menores *prn1* y 4-11 puede emplearse mediante la determinación del polimorfismo en un nucleótido simple (SNP) por secuenciamiento, PCR o real time. Fuente: Simple Algorithm for Identification of *Bordetella pertussis* Pertactin Gene Variants. J of clinical Microbiology, Muyldermans, G., D. Pierard, N. Hoebrekx, R. Advani, S. Van Amersfoorth, I. De Schutter, O. Soetens, L. Eeckhout, A. Malfroot, and S. Lauwers. Apr. 2004, p. 1614–1619 Vol. 42, No. 4 (130).

Estos autores propusieron el empleo de los primers *prnC* y *prnE* que hibridan con la región repetitiva GGAVP y la zona de superposición entre GGAVP y GGFGP respectivamente. El primer *prnD* se diseñó para que hibride con la región río abajo de la región 1. La amplificación de los aislamientos con los primers *prnC-prnD* y *prnE-prnD* permite determinar el

número total de unidades repetitivas GGAVP y GGFGP y el número de unidades repetitivas GGFGP a través de los tamaños de los fragmentos amplificados. Los resultados esperados para cada una de las variantes alélicas de *prn* empleando estos dos pares de primers se muestran en la Figura II. 6.



Tamaño del gen amplificado (pb)			
tipo de prn	prnC-prnD	prnE-prnD	
1	120	89	
2	135	119	
3	120	104	
4	105	89	
5	n.a.	104	
6	120	89	
7	120	89	
8	105	89	
9	150	134	
10	135	89	
11	135	89	

Figura II. 6: Electroforesis en geles de agarosa al 3% teñidos con bromuro de etidio (0,5 μg/ml) de los productos de amplificación obtenidos a partir de los primers prnC-prnD (Panel A) y prnE-prnD (Panel B). Se incluyen los resultados obtenidos a partir de diferentes cepas y aislamientos de B. pertussis.

En la Tabla del panel C se detalla el tamaño de cada uno de los amplicones obtenidos por PCR empleando los pares de primers *prnC-prnD* y *prnE-prnD*. Se incluyen los resultados esperados para cada una de las variantes alelicas de *prn*. n.a: no se produce amplificación. *Fuente:* Simple Algorithm for Identification of *Bordetella pertussis* Pertactin Gene Variants. J of clinical Microbiology, Muyldermans, G., D. Pierard, N. Hoebrekx, R. Advani, S. Van Amersfoorth, I. De Schutter, O. Soetens, L. Eeckhout, A. Malfroot, and S. Lauwers. Apr. 2004, p. 1614–1619 Vol. 42, No. 4 (130).

Para realizar la genotipificación de prn los aislamientos de nuestra colección, primeramente se puso a punto la metodología descripta por Muyldermans et al en el laboratorio. Las condiciones del ciclado de la PCR y las correspondientes a la visualización de los resultados se detallan en la sección de Materiales y Métodos. Una vez puesta a punto esta metodología se procedió a caracterizar la colección de aislamientos circulantes de Argentina en base a las variantes alélicas de prn.

Al igual que en el caso de la toxina

pertussis, se trabajó sobre 139 aislamientos locales de *B. pertussis* obtenidos durante el período 1969-2008.

En la Figura II. 7 se muestra, a modo de ejemplo una fotografía de un gel de agarosa con los resultados de los amplicones obtenidos al emplear los primers *prnC-prnD* sobre DNA total de la cepa vacunal BpTohamal y los aislamientos Bp006, Bp505 y Bp506, de nuestra colección. En la Figura se incluyó al patrón de peso molecular Ladder *100pb* (QUIAGEN).

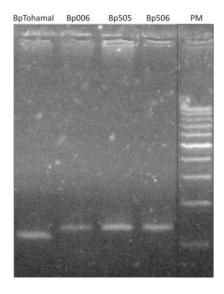


Figura II. 7: Gel de agarosa al 2% (p/v), teñido con bromuro de etidio (0,5μg/ml) en el que se incluyen los productos de amplificación obtenidos a partir del empleo de los primers prnC-prnD. En la parte superior de la figura se indica el aislamiento a partir del cual se obtuvo el amplicón. La calle 1 contiene un amplicón correspondiente a la variante prn1, las calles 2-4 aislamientos conteniendo la variante prn2. En la quinta calle del gel se incluyó un patrón de pesos moleculares de 100-1000 pb.

De la aplicación de esta metodología se pudo determinar que la variante más frecuente en nuestra colección es la prn2 88,5% (123/139).El primer aislamiento conteniendo la variable prn2 aparece en el año 1978. La distribución por año para este alelo es la 1998:3, siguiente 1978:1, 2000:7, 2001:5, 2002:5, 2003:9, 2004:11, 2005:6, 2006:6, 2007:37 y 2008:33. Sólo el 11,5% (16/139) de los aislamientos contien la variante prn1. Cuatro de estos aislamientos se obtuvieron durante el año 2006, todos ellos provenían de una misma familia por lo que se los podrían considerar como un único aislamiento.

Así de los 13 aislamientos, 5 serían provenientes de años anteriores al año 1989. No se encontró ningún aislamiento perteneciente a la variante *prn3*. En la Tabla II. 2 se muestra de manera esquemática la distribución de variantes para la colección *B. pertussis* hallada para nuestro país.

Si se calcula la distribución de variantes alélicas por períodos, se observa que en los 30 años siguientes a la introducción masiva de la vacuna DTP en Argentina (año 1970), es decir entre los años 1969-2000, el 55,6% (5/9) de los aislamientos presentaban la variante *prn1*. En el

Año de aislamiento	Nro cepas estudiadas	Nro de aislamientos prn1	Nro de aislamientos prn2
1969	1	1	-
1971	1	1	-
1978	2	1	1
1982	1	1	-
1989	1	1	-
1998	3	-	3
2000	8	1	7
2001	7	2	5
2002	5	-	5
2003	11	2	9
2004	12	1	11
2005	6	-	6
2006	10	4*	6
2007	38	1	37
2008	33	-	33
Total	139	16	123

^{*} los 4 aislamientos pertenecen a una misma familia

Tabla II. 2: Distribución por años de variantes alélicas de pertactina en nuestra la colección de aislamientos de Argentina.

periodo 2000- 2008 podría deberse a grupos aislados de individuos no vacunados o con un número de dosis de vacuna insuficiente.

resultados obtenidos para variante pertactina en la Argentina, están en concordancia con reportados en otros países donde se encuentra que los aislamietnos de B. pertussis obtenidos en años posteriores a la vacunación masiva de la población presentaban predominantemente la variante alélica del tipo prn2 (112). Así, en Finlandia en un estudio realizado sobre 54 aislamientos el 72% de los aislamientos obtenidos en el periodo 1990-1996 contenían la variante prn2 mientras que el 12% presentaban la variante prn3 (124). En el Reino Unido, sobre 105 aislamientos estudiados es el periodo 1998-1999 el 47% expresaban prn1, el 50% prn2 y el 3% prn3 (58) y en los Estados Unidos el 70% de las 92 estudiadas proveniente periodo 1989-1999 eran prn2 (112). Este variación temporal en el alelo de prn desde la era prevacunal a la vacunal parecería estar de acuerdo con la hipótesis de la presión de selección ejercida por la vacuna que contiene en todos los casos cepas con la variante prn1.

La variante alélica *prn1* se ha encontrado en aislamientos pertenecientes a la época prevacunal en otros países (43, 58, 107, 124) y en una proporción muy baja en la actualidad. Sólo para 3 de los 16 pacientes de los que se aislaron microrganismos con la variante *prn1* se cuenta con información

sobre edad y estado de vacunación. No es posible por lo tanto, realizar algún análisis que asocie la presencia de un tipo de variante alélica y la edad o estado de vacunación del paciente. Esta información hubiera resultado utilidad ya que en algunos países como Italia se ha asociado la predominancia de aislamientos conteniendo la variante prn1 en regiones del país con baja cobertura de vacunación y en otros lugares también se la asocia con introducción tardía de la vacunación (112, 134).

Si analizamos en conjunto los resultados obtenidos para las variantes ptxS1 y prn se observa claramente aumento en el tiempo de las variantes no presentes en las vacunas. Mientras en las cepas vacunales encontramos el alelo B o D para la toxina pertussis y el alelo 1 o 7 para el gen de la pertactina, en nuestra colección hemos detectado el alelo A para ptxS1 con la siguiente frecuencia de aparición: periodo 1969-2006: 91,7% y 2006- 2008: 94,8%; y el alelo 2 para la prn: periodo 1969-2006: 78% y 2006-2008:93,6%. En el periodo 2000- 2008 sólo el 8,5% (11/130) presentaban el alelo prn1. Si bien el número de aislamientos provenientes del período más cercano a la introducción de vacuna no es muy significativo, la tendencia parecería reflejar cierto efecto selectivo ejercido por las vacunas dirigiendo la emergencia de variantes alélicas en los factores de virulencia pertactina y de los toxina pertussis diferentes presentes las vacunas. en

Determinación de los serotipos Fimbriales de los aislamientos locales de *B.* pertussis

serotipificación antígenos de fimbriales ha sido de utilidad desde el comienzo de la producción de las vacunas contra pertussis ya que la Organización Mundial para la Salud (OMS) sugirió el empleo de vacunas celulares que contuvieran cepas con serotipos fimbriales 2 y 3 (177). La descripción de la divergencia de los aislamientos circulantes de B. pertussis respecto de las cepas vacunales en antígenos superficiales profundizó la serotipificar necesidad de los aislamientos circulantes. Fue por esto decidimos que incluir en la

caracterización de los aislamientos locales, ensayos de aglutinación en portaobjetos empleando anticuerpos monoclonales anti fimbria obtenidos en ratón (WHO Reference Reagent for Anti–B. pertussis Fimbriae 3 y 2 Monoclonal Antibody-National Institute of Biological Standards and Control NIBSC (Potters Bar, Hertfordshire, United Kingdom-códigos de los productos: 04/156)).

La clasificación basada en el serotipo fimbrial puede realizarse mediante una observación sencilla como la mostrada en la Figura II. 8.



Figura II. 8: Prueba de aglutinación en portaobjetos empleando una suspensión bacteriana de un aislamiento conteniendo el serotipo Fim3 enfrentada: con anticuerpos monoclonales anti Fim2 (panel superior, prueba negativa) o con anticuerpos monoclonales anti Fim3 (panel inferior, prueba positiva)

Hasta el presente se han caracterizados 138 aislamientos de nuestra colección distribuidos por año según: 6 pertenecientes al 2009, 45 pertenecientes al año 2008, 36: 2007, 7: 2006, 4: 2005, 8: 2004, 6: 2003, 4: 2002, 7: 2001, 7: 2000, 2: 1998, 1: 1989, 1982, 1971 y 1969 y 2: 1978. Se incluyeron además aislamientos pertenecientes al año2009. De los 136 aislamientos caracterizados, 133 (97%) presentan el serotipo Fim 3 (años 1971, 1978, 1982,1998, 2000 al 2009) y 2 aislamientos (1,5%) presentan el serotipo Fim 2 (Bp6901 año 1969 y

Bp8901 año 1989). Un aspecto interesante de resaltar es que estos dos aislamientos locales con variantes Fim2 fueron aisladas en los años 1969 y 1989 y se clasificaron como ptxS1A prn1 y ptxS1 noA prn1 respectivamente. El aislamiento Bp733 obtenido en 2007 no aglutinó con ninguno de anticuerpos monoclonales y el aislamiento Bp506 obtenido en 2005 presentó autoaglutinación.

Todos estos resultados se resumen en la Tabla II. 3.

Año de aislamiento	Nro cepas estudiadas	Nro de aislamientos Fim2	Nro de aislamientos Fim3
1969	1	1	-
1971	1	-	1
1978	2	-	2
1982	1	-	1
1989	1	1	-
1998	2	-	2
2000	7	-	7
2001	7	-	7
2002	4	-	4
2003	6	-	6
2004	8	-	8
2005	4*	-	3
2006	7	-	7
2007	36**	-	35
2008	45	-	45
2009	6	-	6
Total	138	2	134

^{* 1} aislamiento autoaglutina

Tabla II. 3: Distribución de serotipos de fimbria analizados por año para la colección de aislamientos de *B. pertussis* de Argentina.

En concordancia con los resultados obtenidos por el grupo de Tsang et al (164), nuestros datos muestran que el serotipo Fim 2 se encuentra presente sólo en aislamientos antiguos (164). Los autores en su trabajo muestran que el 86 aislamientos locales aislados entre los años 1994 y 2002 pertenecían al serotipo Fim3. En Rusia, Finlandia, Francia, Suecia y Holanda, entre otros países (13, 23, 75, 171), se detectó un cambio en los serotipos de fimbrias de Fim2 o Fim2,3 a Fim3, que se produjo luego de la vacunación masiva con vacunas celulares siendo la variante Fim 3 la que predomina en la mayoría de las poblaciones vacunadas. Es interesante el ejemplo de Suecia donde predominó el serotipo Fim2 entre los años 1979 al 1996, período en

el que se había dejado de vacunar. En el 2003 el serotipo Fim3 reemplaza al 2 como el más prevalente, alcanzando una frecuencia mayor al 90% (165).

Se sabe que la respuesta inmune montada por sujetos inmunizados con vacuna celular conteniendo las dos variantes produce una respuesta más fuerte contra la variante 2, que la que se produce para el serotipo 3 (163). Debido a la respuesta inmune más débil obtenida contra el antígeno 3, los niños parcialmente inmunizados se infectan principalmente por aislamientos de B. pertussis cuyo serotipo fimbrial es el 3. Este aspecto aún requiere de ser profundizado y quizás las colecciones de aislamientos que incluyan los distintos períodos podrán dar más luz fenómeno de reemplazo de serotipos.

^{** 1} aislamiento es no aglutinable

Caracterización por fingerprinting de aislamientos de *B. pertussis* circulantes en Argentina mediante la técnica de Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

Entre los métodos usualmente empleados para conocer el grado de semejanza entre aislamientos bacterianos se encuentra la electroforesis en campo pulsado (PFGE). En particular para B. pertussis el uso de esta metodología se ha estandarizado y difundido de forma de no sólo seguir la evolución de patógeno a través del tiempo sino para poder llevar a cabo análisis que puedan tener impacto en la pública como por ejemplo identificar brotes epidémicos asociados a un microrganismo (123).

En este marco conceptual y con el objetivo de continuar con la caracterización de los aislamientos clínicos de B. pertussis es que analizamos el patrón de restricción genómico de cada aislamiento empleando la enzima de restricción Xbal mediante la técnica de Electroferesis de Campo Pulsado. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de similitud entre los perfiles de bandas, empleando el método de UPGMA. La misma metodología se aplicó sobre las cepas empleadas en la producción de vacunas.

El dendrograma, que se muestra a la izquierda de la FiguralI. 9, se construyó empleando el perfil de bandas obtenido por PFGE y aplicando el método de pares de grupos no pesados usando promedios aritméticos (UPGMA), con 1% de tolerancia de banda y 1% de optimización de parámetros.

Mediante la metodología de PFGE se estudiaron 120 aislamientos de los cuales 111 son aislamientos locales de *B. pertussis* y el resto corresponde a cepas empleadas en la formulación de vacunas. En el mismo se incluyeron a Bp

Tohamal, Bp10536, Bp509, Bp134, Bp137 y a la cepa de desafío Bp18323. Los resultados alcanzados se muestran en la Figura II. 9. En ella puede observarse que los aislamientos clínicos de B. pertussis se agruparon en un cluster mayoritario (recuadro violeta) conteniendo perfiles que sólo presentan pequeñas diferencias entre ellos. Las cepas vacunales junto con un grupo reducido de aislamientos (Bp8901 y Bp606-Bp609) se agruparon cluster significativamente un diferente (recuadro verde de la misma Figura II. 9). La similitud entre ambos grupos es de un 61%.

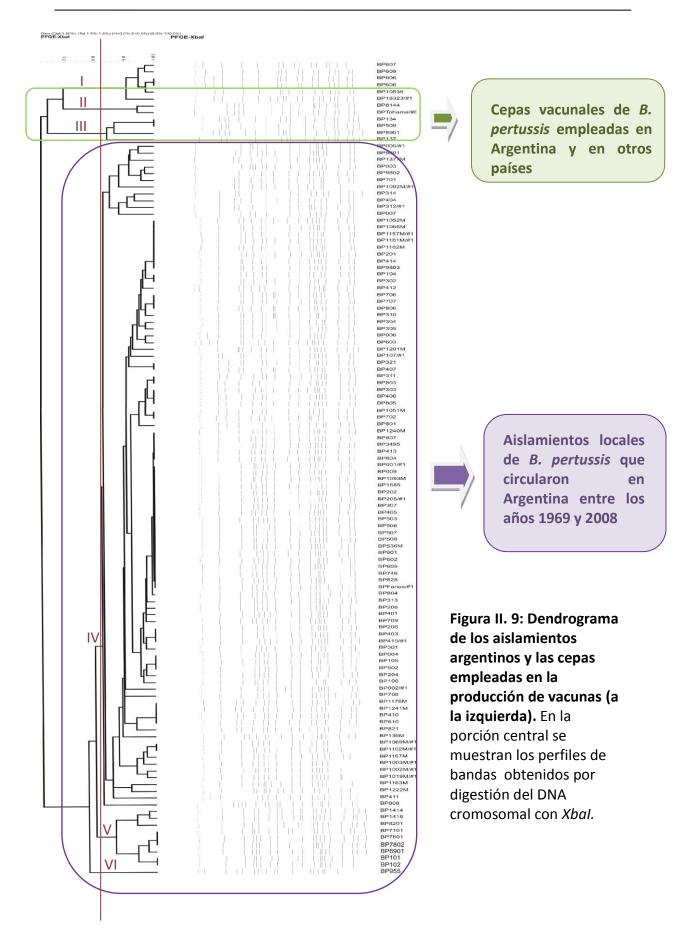
En total se obtuvieron 6 grupos principales (I, II, III, IV, V y VI) basados en un criterio de similitud mayor a 0,82 (señalado como una vertical en color bordó en la Figura II. 9) con 70 perfiles diferentes.

Respecto de los aislamientos locales estos muestran un 78% de similitud entre ellos. El grupo IV del PFGE, es el más prevalente y comprende aislamientos. Los aislamientos de este grupo presentan un grado de similitud del 84% y fueron aislados en su mayoría a partir del año 2000 (98,9%, 97/98). El grupo V del PFGE incluye 9 aislamientos, Bp1414, Bp1416, Bp8201, Bp7101, Bp7801, Bp7802, Bp6901, Bp101, Bp102 y está constituido por 6 perfiles similitud entre diferentes. La aislamientos de este grupo es del 88%, siendo el 82% de los aislamientos provenientes de años anteriores a 1982. Por su parte el grupo VI del PFGE está constituido por una única cepa Bp955 aislada en el año 2000.

Los grupos I, II y III del PFGE incluyen a 7 de las 9 cepas vacunales y algunos

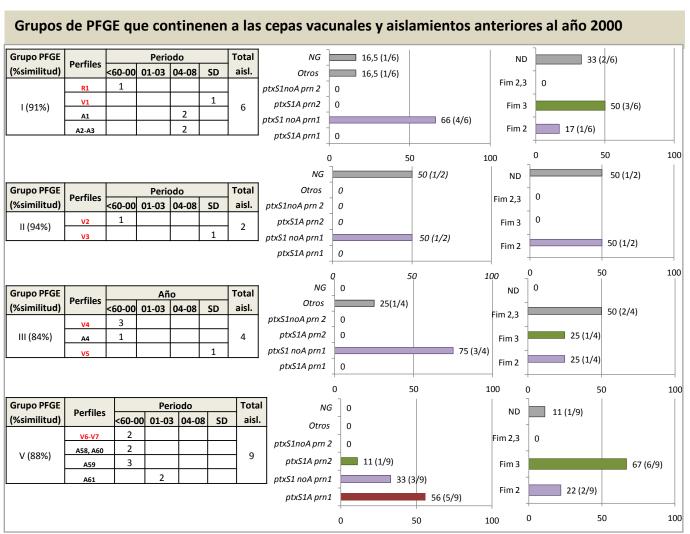
aislamientos locales cuyas variantes alélicas para *prn* son 1 principalmente y 6 o 7, mientras que para la subunidad *S1* de *Ptx* son noA, siendo estas las variantes halladas principalmente en aislamientos de la era prevacunal de numerosos países. El grupo V también contiene las 2 cepas vacunales restantes y aislamientos representati-vos de la era

prevacunal, todos presentan variantes alélicas de *prn* diferente de la 2 y la mitad son *ptxS1* noA. Estos grupos (I, II, III y V) contienen aislamientos anteriores al año 2001, excepto por el grupo de aislamientos provenientes de una familia Bp606 - 609 del año 2006 y que se extrañamente se incluyen en el grupo I (Figura II. 9 /Tabla II. 4).



Los grupos y perfiles definidos con un criterio de 0,82 de similitud se detallan en la Tabla II. 4, en la misma se ha incorporado además información respecto del año de recuperación de los aislamientos, las variantes alélicas de toxina pertussis y pertactina correspondiente y el serotipo fimbrial. En dicha tabla se observa que el 66% de las cepas/aislamientos del grupo I de PFGE presentan las variantes ptxS1 noA y prn1 (variantes viejas) y el 50% el serotipo fimbrial 3, mientras que el 100% de las cepas del grupo II de PFGE (2 cepas vacunales) presentan las variantes denominadas del tipo "viejo", es decir ptxS1 noA y prn1 y Fim2. El grupo III de PFGE está constituído mayoritariamente por aislamientos anteriores al año 2000. Todos estos aislamientos se caracterizan por presentar los alelos ptxS1 noA y prn1 y los serotipos fimbriales viejos es decir Fim 2 o Fim 2,3. En el grupo IV que

contiene el mayor número aislamientos (97), el 89% de los mismos son aislamientos posteriores al año 2000. De estos aislamientos el 77% presentan variantes nuevas ptxS1A y prn2 y el 66% el serotipo Fim3. El grupo V del PFGE contiene 9 cepas/aislamientos de las cuales el 78% presenta características de las denominadas "viejas" con un 33 y 56% de variantes ptxS1 noA - prn1 y ptxS1 A - prn1 respectivamente. El 67% de las mismas contienen serotipo fimbrial 3. Todos estos resultados muestran que la técnica de electroforesis en campo pulsado tiene un poder discriminatorio suficiente para agrupar las cepas vacunales y aquellas que circularon en años anteriores al 1982. Más aún, los grupos de PFGE muestran significativa correlación con la variante alélica de pertactina.



Grupo IV de PFGE que contiene un 89% de aislamientos locales recuperados después del año 2000 Periodo Grupo PFGE Total Perfiles <60. (%similitud) aisl. 01-03 04-08 SD 00 34 (33/97) NG 18 (17/97) A5-A15,A18,A20-A26,A31,A34 ND A38,A40,A42-A45,A47-A48,A50 7 11 12 10 Otros A57 Fim 2,3 ptxS1noA prn 2 1 3 3 1 (1/97) 77 (75/97) 66 3 6 A17, A27-A28, A30, A49 ptxS1A prn2 IV (84%) 97 Fim 3 (64/97)7 3 1 1 A19, A29, A39, A41 ptxS1 noA prn1 4 1 Fim 2 A32 ptxS1A prn1 4(4/97) 2 3 13 1 3 A46 0 50 100

Tabla II. 4: Grupos con 0,82% de semejanza obtenidos a partir del dendrograma construido en base a los resultados de PFGE. Se detallan los perfiles y el número total de aislamientos de cada grupo, la distribución de los mismos por periodo de año de aislamiento. Los gráficos de la derecha muestran la proporción (%) de aislamientos de un grupo conteniendo combinaciones de variantes alélicas de los genes *prn* y *ptxS1* de la "era pre-vacunal" (barras lilas) y las combinaciones de variantes alélicas que surgieron luego de años de uso de vacunas o variantes "nuevas" en barras verdes. En barras con el mismo código de colores la proporción de serotipos fimbriales dentro de cada grupo. Los perfiles designados como R, V y A corresponden a la cepa de referencia, las cepas vacunales y los aislamientos locales respectivamente. Periodo <60-00: aislamientos pertenecientes al periodo 1960-2000; 01-03: 2001-2003; 04-08: 2004-2008; SD: sin dato; NG: no genotipificado; ND: no determinado.

Respecto de las cepas vacunales presentan un 64% de similitud entre ellas e incluyen las cepas BpTohamal, Bp10536, Bp509, Bp134, Bp137, Bp8144. Los aislamientos locales Bp8901, Bp606-Bp609 y la cepa de referencia de la OMS Bp18323 también pertenecen al mismo grupo de PFGE. En la Figura II. 10 se muestra una porción ampliada del dendrograma mostrado en la Figura II. 9 que incluye a los grupos I, II y III en base a un criterio de similitud de 82% conteniendo mayoritariamente a las cepas vacunales analizadas.

Las cepas vacunales se ubicaron en tres clusters, el I: Bp10536 (V1), II: BpTohama (V2) y Bp8144 (V3); III: Bp134, Bp509 (V3) y Bp137 (V4); mientras que la cepa de referencia Bp18323 (R1) agrupa en el cluster I.

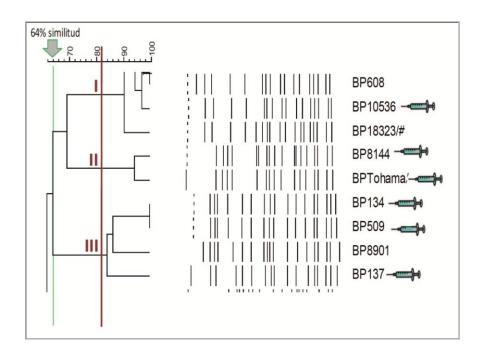


Figura II. 10: Sección del dendrograma obtenido del análisis de fingerprinting de ADN empleando *Xbal* como enzima de restricción. Las jeringas señalan aquellas cepas que se emplean en la producción de vacunas.

Resumen y planteo de interrogantes profundizados en los siguientes capítulos

Los resultados presentados en este capítulo muestran claramente que en nuestro país circula una población bacteriana de B. pertussis que expresa variantes predominantemente las ptxS1A y prn2 para la subunidad S1 de la toxina pertussis y la pertactina, respectivamente. De los 165 aislamientos clínicos locales analizados, 156 (94,9%) aislamientos expresan el alelo ptxS1A, 146 (88,5%) expresan el alelo prn2 y 156 (95%) presentan el serotipo Fim3. Por su parte las cepas incluidas en las actuales formulaciones vacunales contienen el alelo B o D para la toxina pertussis y el alelo 1 o 7 para la perctactina, mientras que para la fimbria los serotipos se corresponden a Fim 2 y 3.

Estos datos junto a los obtenidos mediante electroforesis en campo pulsado no sólo son noveles para nuestro país, sino que amplian el conocimiento respecto de la existencia de una divergencia antigénica entre las cepas que se emplean en la producción de vacunas y los aislamientos que circulan actualmente (3, 23). aspectos funcionales de esta divergencia están siendo exhaustivamente analizados de forma de poder establecer su implicancia en la resurgencia de la enfermedad. Nuestro grupo viene trabajando desde hace unos años sobre este aspecto y parte de los resultados alcanzados ya han sido publicados en revistas especializadas (14, 52) y como trabajo de tesis inédito (tesis doctoral de María Emilia Gaillard).

En particular hemos podido demostrar que la divergencia entre los aislamientos clínicos locales y la cepa vacunal reduce la efectividad de las vacunas cuando estas son empleadas en los modelos animales de infección aceptados. Más aún, el efecto negativo de esta divergencia en la protección contra la enfermedad parece agravarse en condiciones en las que la inmunidad específica está disminuida (pérdida de inmunidad luego de la vacunación).

Complementando este trabajo, durante desarrollo de mi tesis hemos caracterizado а distintas cepas vacunales que hoy son utilizadas por distinos productores de vacunas, de forma de evaluar si estas cepas se comportan indistintamente frente a la protección de infecciones causadas por los aislamientos que circulan en nuestro país. Este aspecto para nosotros además es de fundamental importancia ya que estamos invocurados en un proyecto (PAE VacSal ANPCyT 37207 IR Dra. Daniela Hozbor) que persigue como objetivo final la reactivación de la producción nacional de vacunas. Para el desarrollo de la primera etapa del mismo (reactivación de la cadena productiva con cepas vacunales de referencia), el interrogante que debe responderse está referido a qué cepa (s) vacunal (es) de referencia se debería/n incluir en una formulación nacional para esta sea efectiva contra la población bacteriana circulante.

Capítulo III

Bases moleculares para la selección de una cepa vacunal de *Bordetella pertussis*

Introducción

Uno de los subproyectos del proyecto PAE VacSal (ANPCyT 37207) mencionado en el final del capítulo anterior, consiste en un comienzo en la reactivación de la producción vacunas que en el caso del componente pertussis se realizaría a partir de cepas ya utilizadas en otros países en la producción de vacunas. Esta estrategia responde a la necesidad de superar el primer desafío que es la reactivación de la cadena productiva para luego sobre las capacidades va instaladas avanzar en el desarrollo de vacunas noveles. Así. hemos decidido trabajar en el formato de vacunas tradicionales que emplea cepas de historial conocido. Este objetivo de aparente simplicidad nos plantea sin embargo varios interrogantes, entre otros qué cepa o cepas emplear. En este punto es importante recordar que existe un número considerable de cepas

vacunales con potencialidad de ser incluidas en una formulación vacunal. Estas cepas vacunales presentan las características comunes aislamientos obtenidos en la década del cincuenta, de estar adaptadas a las laboratorio condiciones de consecuencia de su empleo extensivo en producción (22, 48, 156) y de presentar determinadas variantes alélicas en los genes de virulencia ptxS1 y prn, que hacen en suma que se las clasifique como "cepas viejas". Afortunadamente, en la actualidad se cuenta con mejores herramientas para la caracterización de las mismas de forma de poder hacer una elección más sólida sobre qué cepa o cepas emplear. En este capítulo y en el siguiente presentaré los resultados obtenidos sobre la caracterización de 4 potenciales candidatas vacunales. Los datos más sobresalientes conocidos de las mismas se incluyen en la Tabla III. 1

Cepa vacunal	Año aislamiento	Origen/Productor	ptxS1	prn	Fim
BpTohamal	1954	Japón /Glaxo-Smith Kline	no A (B)	1	2-1
Bp 509	1950	Holanda	no A (D)	7	2 o 2,3
Bp 137	SD	Brasil	no A	1	2,3
Bp10536	SD	SD	no A	SD	3

Tabla III. 1: Cepas vacunales del género *Bordetella* **utilizados en esta Tesis.** Bp: *Bordetella pertussis, ptx*S1: subunidad S1 de la toxina pertussis, *prn:* pertactina, Fim: fimbria. SD: sin dato.

Resultados y discusión

Cinética de crecimiento – producción de factores de virulencia

Para avanzar en la caracterización de las 4 cepas vacunales seleccionadas analizamos primeramente su cinética de crecimiento en el medio sintético de Stainer- Scholte recomendado para la producción de vacunas pertussis. Se realizaron cultivos bacterianos da cada cepa hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. El aumento en la biomasa fue determinado mediante medidas de densidad óptica a 650 nm (DO_{650nm}) y recuentos de células viables

en placa. Los resultados obtenidos por ambas metodologías fueron comparables por lo que en esta presentación se incluye sólo la medida de DO_{650nm}. En la Figura III. 1 se muestran las curvas de crecimiento de las cuatro cepas vacunales obtenidas en las condiciones de cultivo detalladas en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados presentados son representativos de tres realizadas repeticiones en forma independiente.

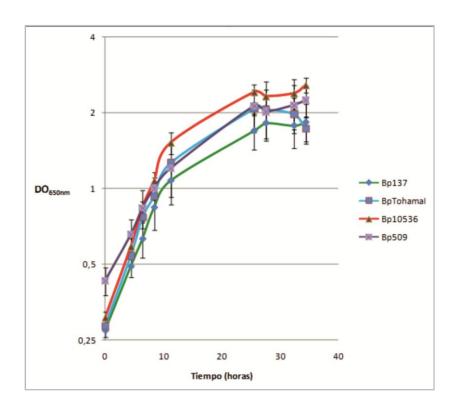


Figura III. 1: Cinéticas de crecimiento de las cepas vacunales BpTohamal, Bp509, Bp137 y Bp10536. Las DO_{650nm} se han incluído en escala logarítmica en base 2. Cada cepa vacunal estudiada se identifica en la gráfica con un color distinto. Los resultados mostrados se corresponden a los obtenidos de tres ensayos independientes.

En la Figura III. 1 se puede observar que para todas las cepas, la fase exponencial de desarrollo parecería extenderse por alrededor de 10- 12 h de iniciado el cultivo, después de las cuales los microorganismos entrarían en una fase de desaceleración del desarrollo y posteriormente a una fase estacionaria comienza а observarse aproximadamente luego de 25 h de cultivo. Si bien el diseño de los experimentos no tuvo como fin último determinar parámetros cinéticos del los resultados cultivo. obtenidos arrojar tiempos parecerían duplicación para todas las cepas de aproximadamente 4 h lo que concuerda con los datos publicados en la literatura (5).

Para las condiciones experimentales ensayadas, las cepas vacunales BpTohamal y Bp509 parecerían generar una cantidad de biomasa similar e intermedia respecto de las cepas Bp137 y Bp10536. Mientras que la cepa Bp137 presentaría el menor rendimiento de biomasa, la cepa Bp10536 alcanza los mayores valores de DO_{650nm}.

Un aspecto fundamental de ser analizado en este punto, donde la biomasa no representa un aspecto diferencial contundente para dejar de emplear preferencialmente una de las cepas, es el estado de virulencia de las bacterias. Es en el estadio virulento en el que la bacteria expresa los factores inmunoprotectores. La distinción entre la fase virulenta y la denominada avirulenta de B. pertussis puede ser realizada sencillamente mediante la observación del aspecto macroscópico de las colonias, de la presencia de halo de hemolisis en placas contenidendo medios de cultivo suplementados con sangre y la expresión de antígeno protector toxina pertussis. Empleando estas metodologías evaluamos el estado de virulencia en cada una de las fases de crecimiento bacteriano para cada una de las cepas vacunales estudiadas.

Para todos los tiempos y cepas ensayadas se pudo determinar que las colonias correspondían morfológicamente al tipo descripto para la fase virulenta de *B. pertussis*. En las placas de agar Bordet Gengou sumplentadas con sangre se pudo observar la presencia de un halo de hemólisis alrededor de las colonias resultante de la expresión del marcador del estado de virulencia AC-Hly. En la Figura III. 2 se muestra a modo de ejemplo la producción de hemólisis para la cepa BpTohamai de una muestra extraída del cultivo líquido a las 8 horas.

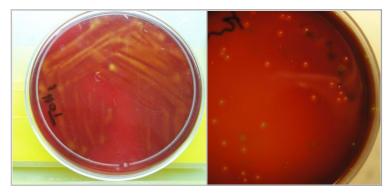


Figura III. 2: Evaluación del estado de virulencia de la cepa BpTohamal mediante la visualización de β-hemólisis en medio Agar Bordet Gengou suplementado con sangre al 10%. La muestra analizada fue tomada de cultivo líquido con 8 h de desarrollo.

Para el análisis semicuantitativo de la expresión de la toxina pertussis por unidad de biomasa en los cultivos de las distintas cepas se realizaron ensavos de empleando inmunoblot anticuerpos policlonales específicos contra subunidad S1 de la toxina pertussis. Dada la localización dual de la toxina celular (periplasmamembrana bacte-riana) y extracelular, la detección se realizó tanto en un lisado bacteriano como en los sobrenadantes los cultivos. Así, se tomaron muestras de cultivo correspondientes a fase logarítmica y a la fase estacionaria, es decir a las 8 y 24 h de de cultivo. Las muestras obtenidas tanto de células como de sobrenadante fueron sometidas a corridas electroforéticas en

geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

Para los sedimentos bacterianos se sembró en cada calle el equivalente a $2,4x10^8$ bacterias (medido por DO_{650}) para los muestreos de 8 y de 24 h. Mientras que para las proteínas obtenidas de sobrenadantes se sembró cada calle una alícuota sobrenadante precipitado con TCA y resuspendido en buffer de Laemmli correspondiente a aquel liberado por 4,3x10¹⁰ bacterias tanto para los cultivos obtenidos a las 8 como a las 24h. Los geles así obtenidos fueron transferidos a membranas de **PVDF** para ser enfrentadas luego al antisuero anti PTxS1. En la Figura III. 3 se muestran los resultados de los inmunoblots obtenidos.

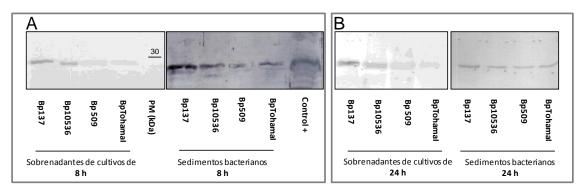


Figura III. 3: Inmunoblots empleando antisuero anti PTxS1 de proteínas totales y de sobrenadantes obtenidos de cultivos de diferentes cepas vacunales de Bordetella pertussis. Las membranas de PVDF se revelaron empleando suero murino anti toxina pertussis y anticuerpos anti-ratón conjugados con fosfatasa alcalina. Las distintas calles corresponden a proteínas de sobrenadantes y sedimentos de cultivos de 8h (Panel A) y de 24h (Panel B) provenientes de las cepas vacunales ensayadas que se indican.

Los resultados obtenidos muestran que la subunidad S1 del componente A de la toxina pertussis está presente en todas las cepas vacunales estudiadas tanto a las 8 como a las 24 horas. Si bien la técnica de inmunoblot no es cuantitativa, parecería observarse una leve diferencia en la producción de la

toxina por las distintas cepas vacunales. Tanto para los cultivos de 8 como de 24 h la cantidad de toxina asociada a las células bacterianas de la cepa Bp137 es mayor que la asociada al resto de las cepas vacunales. En el mismo sentido la toxina liberada en los sobrenadantes también parecería ser mayor para la

cepa Bp137, estos resultados pueden verse en la Figura III.3.

Los resultados mostrados hasta aquí nos presentan a las 4 cepas vacunales como potenciales candidatas que podrían utilizarse casi indistintamente en la producción de vacunas. Sin embargo, creemos conveniente emplear técnicas que nos permitan profundizar el estudio de las características funcionales de las mismas para acercarnos más adecuadamente a una buena selección

de la o las cepas a incluir en una formulación vacunal.

El estudio funcional de las cepas vacunales lo abordaremos empleando técnicas clásicas como el inmunoblot y más modernas como los geles 2D asociados a espectrometría de masa del tipo MALDI TOF e incluyendo a un aislamiento de nuestra colección tomado como representativo de la población bacteriana circulante.

Identificación de componentes bacterianos inmunogénicos, comunes y diferenciales

Para continuar con la caracterización de las cepas vacunales abordamos estudio comparativo de respuesta de anticuerpos montadas frente a inmunización con las cepas vacunales Bp137, Bp10536, Bp509 y BpTohamal. Para esto se prepararon vacunas a partir de cada una de las cepas vacunales las fueron utilizadas obtención de anticuerpos en el modelo de ratón empleando una inmunización sistémica. Para el análisis de la respuesta humoral inducida por cada formulación se realizaron inmunoblots empleando como antígeno a las proteínas totales obtenidas de cada cepa vacunal y como anticuerpos los sueros de ratones inmunizados con vacunas preparadas a partir de las mismas cepas. Estos ensayos realizaron al menos dos veces de forma independiente y los datos obtenidos resultaron ser consistentes entre sí. A modo de ejemplo se muestran los resultados obtenidos en uno de dichos experimentos (Figura III. 4 Paneles A y B). Para facilitar el análisis de los

mismos, las imágenes de los geles y de los inmunoblots fueron alineadas utilizando el software Image Master™ 2D Platinum (GE Healthcare).

Antes de comenzar con el análisis de la Figura III. 4, nos parece útil visualizar los resultados de una corrida electroforética en geles SDS-PAGE de proteínas totales obtenidas a partir de la lisis celular una de suspensión bacteriana (Figura III. 5). Como puede observarse en la figura los perfiles proteicos obtenidos son complejos pero pese a ello puede visualizarse que no completamente idénticos, diferencias se observan principalmente en cuanto a la cantidad de ciertos péptidos expresados. Las flechas verdes de la figura indican las bandas con relativas cantidades diferenciales. Específicamente se señalan cuatro bandas, dos en la zona de peso molecular mayor a 66kDa y dos cercanas a 29kDa. Las cepas Bp10536 y Bp137 por un lado y Bp509 y BpTohamal por otro presentan perfiles proteicos semejantes.

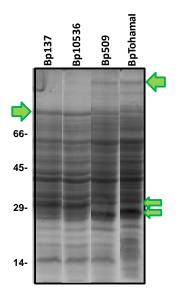
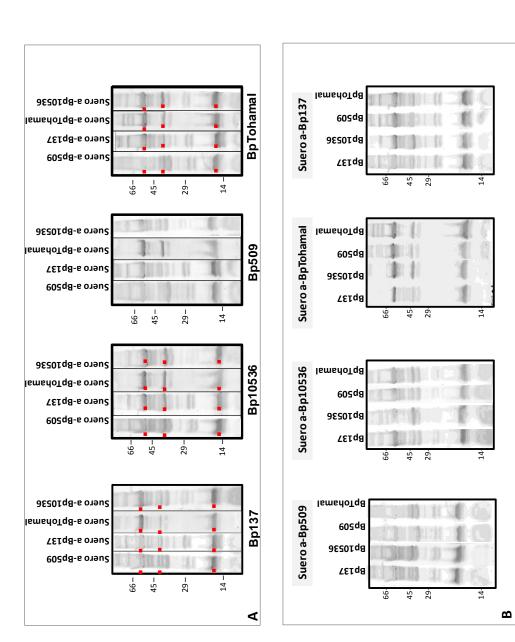


Figura III. 5: Proteínas totales de las cepas vacunales Bp137, Bp10536, BpTohamal y Bp509 corridos en SDS-PAGE 12,5% y revelado con Coomasie R-250. Las flechas verdes indican las bandas diferenciales. En la columna de la izquierda se indica el perfil de migración de un patrón de pesos moleculares en kDa.

Respecto de los resultados obtenidos al realizar el inmunoblot es importante destacar aue ninguna de las proteicas preparaciones vacunales mostró reactividad frente al suero obtenido de ratones no inmunizados (dato no mostrado) pero sí lo hicieron frente a cualquiera de los otros sueros ensayados (Figura III. 4). Un aspecto importante de destacar es que en todos los casos la reactividad del preparado proteico obtenido a partir de cada cepa vacunal reaccionó de manera diferencial frente a los sueros obtenidos de los ratones inmunizados con cada una de las cepas vacunales (Figura III. 4 Panel A). Como puede observarse en el Panel B de dicha figura, el suero obtenido de la inmunización con la cepa vacunal BpTohamal resulta ser menos reactivo que los sueros inmunes obtenidos a partir de Bp509, Bp137 o Bp10536, presentando un menor número de bandas de reconocimiento especialmente en las zonas de rango de peso molecular menor a 25kDa y mayor a 50kDa. Sin embargo, los péptidos que se separan en dicho rango de pesos moleculares de todas las cepas incluida BpTohamal fueron reconocidos por los sueros anti Bp137, anti Bp509 y anti Bp10536. Esta aparente discrepancia

entre la inducción de respuesta a BpTohamal y el reconocimiento de péptidos de BpTohamal por otros sueros podría deberse tanto diferencias en el título de anticuerpos generados contra esas proteínas como a diferencias en la presentación de antígenos permitiendo reconocer ciertos epitopes que en el caso de la vacunación con la cepa BpTohamal no se generan. Mientras que en el rango de pesos moleculares mayores a 66kDa el anti **BpTohamal** reconoce proteínas que el resto de los sueros no reaccionan (Panel A de la Figura III. 4). Los sueros inmunes obtenidos contra Bp137 y Bp509 dan un perfil de reconocimiento más complejo frente a todas las cepas, mientras que el patrón de bandas que se revela con el suero anti Bp10536 es intermedio y el que menos bandas reconoce es el suero inmune anti BpTohamal.

En esta misma figura en el panel A se han señalado con puntos rojos 3 bandas que son al menos aquellas reconocidas de manera indistinta en las cepas BpTohamal, Bp137 y Bp10536 por los antisueros generados de la inmunización con las mismas cepas.



previamente inmunizados con vacunas preparadas a partir de las mismas cepas. En el Panel A el rótulo inferior indica la cepa a la que Figura III. 4: Análisis de reactividad de proteínas totales de las cepas vacunales Bp137, Bp10536, Bp509 y BpTohamal. Las proteínas fueron resueltas en SDS-PAGE 12,5% p/v y transferidas a membranas de PVDF. Se analizó la reactividad de las proteínas frente a sueros de ratones pertenecen las preparaciones proteicas corridas en las cuatro calles y los rótulos superiores el suero empleado para su revelado. En el Panel B se indica sobre cada calle la cepa a la que pertenecen las proteínas corridas y más arriba el suero empleado para el revelado. A la izquierda de cada membrana de PVDF se indica el perfil de migración de un patrón de peso molecular (kDa) LMW-SDS Marker GE.

La banda de aproximadamente 43kDa es reconocida con mayor intensidad en las cepas Bp10536 y BpTohamal que en las cepas Bp509 y Bp137 independientemente del suero empleado, por lo que podría pensarse que Bp10536 y BpTohamal expresan esta proteína en mayor cantidad (Figura III. 4 Panel A). Por su parte el suero anti Bp137 presenta un perfil de reconocimiento similar para todas las cepas (Figura III. 4

En conjunto estos resultados parecen indicar un comportamiento diferencial

Panel B).

en cuanto a la respuesta humoral montada en ratones frente a la inmunización con distintas cepas, mostrando más claramente la existencia de una divergencia fenotípica entre las distintas cepas vacunales.

Para profundizar el conocimiento sobre la divergencia observada realizamos un estudio de tipo protemico comparativo empleando una preparación proteica enriquecida en proteínas de membrana de cada una de las cepas vacunales estudiadas.

Perfiles de expresión proteico de muestras enriquecidas en proteínas de superficie de cepas de *Bordetella pertussis*

Para este estudio se utilizaron muestras enriquecidas en proteínas de superficie de las cepas vacunales BpTohamal (Grupo II de PFGE), Bp509 (Grupo III de PFGE), Bp10536 (Grupo I de PFGE), y Bp137 (Grupo III de PFGE), las cuales fueron analizadas mediante geles 2-D asociadas a espectrometría de masa del tipo MALDI-TOF.

Este estudio también se extendió a los aislamientos locales de *B. pertussis*, en particular los resultados mostrados en este trabajo de tesis incluyen al aislamiento Bp106 (Grupo IV de PFGE) representativo de los aislamientos locales.

Dada la necesidad experimental de realizar los ensayos en paralelo en esta sección de la tesis analizaremos en conjunto los resultados obtenidos a partir de las cepas vacunales y el aislamiento local.

La metodología utilizada para la obtención de las proteínas enriquecidas en componentes de membrana incluyó un paso de sonicación, centrifugación

diferencial y un tratamiento con las enzimas ADNasa y ARNasa. Como hemos mencionado más arriba a efecto los resultados fueran de aue comparables, las muestras de las cepas y del aislamiento clínico se obtuvieron en paralelo manteniendo en todo momento las mismas condiciones. Para la separación en la primera dimensión de acuerdo al punto isoelectrico de las proteínas se emplearon tiras con rango de pH 4-7. Para la separación en la segunda dimensión de acuerdo al peso molecular se emplearon geles de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5 % p/v. Estos ensayos se repitieron tres veces para las cepas y el aislamiento clínico analizados los resultados У representativos de los mismos se muestran en las Figuras III. 6 y III. 7. Las imágenes de estos geles se analizaron utilizando el software Image Master™ 2D Platinium detectándose alrededor de 140 manchas o spots asignables a subunidades polipeptídicas diferentes. Mediante el análisis de huella peptídica

(Peptide Mass Fingerprint, PMF) MALDI - TOF se lograron identificar 56 péptidos.

En las Figuras III. 6 y III. 7 se muestran los geles bidimensionales teñidos con la

tinción de Coomasie coloidal G-250 con los mapas peptídicos de las muestras enriquecidas en proteínas de membrana obtenidos para cada cepa/aislamiento analizado.

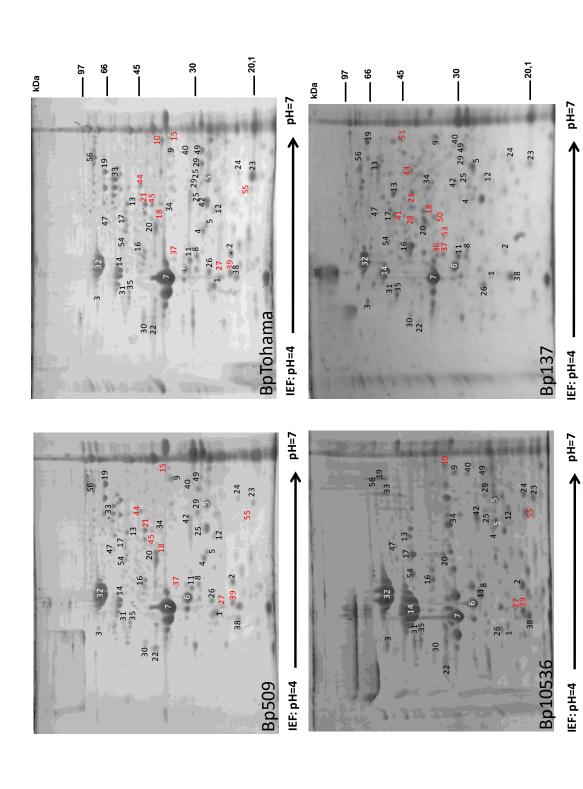
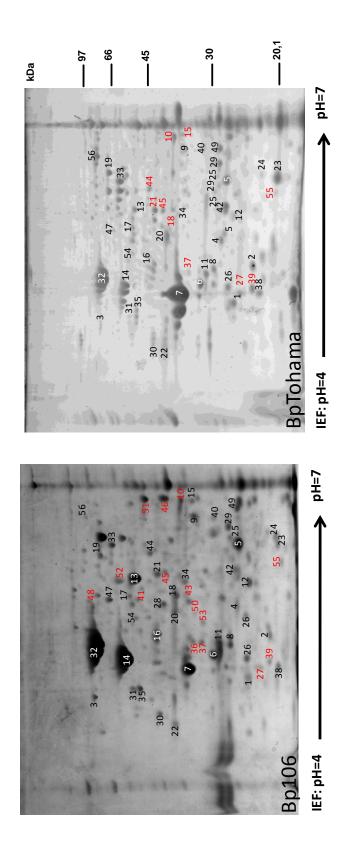


Figura III. 6: Electroforesis en geles bidimensionales de muestras enriquecidas en proteínas de membrana de las cepas vacunales BpTohama, Bp10536, Bp509 y Bp137. La primera dimensión consistió en un isoelectroenfoque en gradiente de pH 4-7 y la segunda en la Tabla III 1. Sobre la derecha de la figura se indica la distancia de migración de los marcadores de PM. Debajo de cada gel se indican los extremos del gradiente de pH en el que se realizó el isoelectroenfoque. La tinción de los geles se realizó mediante la técnica de Coomassie dimensión en un SDS-PAGE 12.5 % p/v. Los números sobre los geles corresponden a las proteínas identificadas por EM, las cuales se detallan Coloidal. Los geles que se muestran son representativos de los obtenidos en al menos tres corridas electroforéticas a partir de muestras obtenidas en cultivos independientes.



BpTohamal y el aislamiento clínico Bp106. La primera dimensión consistió en un isoelectroenfoque en gradiente de pH 4-7 y la segunda gradiente de pH en el que se realizó el isoelectroenfoque. La tinción de los geles se realizó con Coomassie Coloidal. Los geles que se muestran son representativos de los obtenidos en al menos tres corridas electroforéticas a partir de muestras obtenidas en cultivos dimensión en un SDS-PAGE 12.5 % p/v. Los números sobre los geles corresponden a las proteínas identificadas por EM, las cuales se detallan en la Tabla. III. 1. Sobre la derecha de la figura se indica la migración de los marcadores de PM. Abajo se indica los extremos del Figura III. 7: Electroforesis en geles bidimensionales de muestras enriquecidas en proteínas de membrana de la cepa vacunal independientes.

De la comparación de los proteomas se pudieron establecer diferencias en los patrones de expresión entre las distintas para la fracción cepas, proteica estudiada. Los resultados de proteínas que se expresan diferencialmente entre las cepas estudiadas se muestran en las Figuras III.6 y III. 7 (spots numerados en rojo) y se resaltan en verde en la Tabla III. 1 y B. En la Tabla III. 1 A y B se listan todas las proteínas identificadas y se detalla su ubicación celular, peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pl). Utilizando el software PSORT.2b se predijo la localización celular de las proteínas identificadas: 7 estarían asociadas a membrana externa, 3 localizadas en periplasma, 17 con localización desconocida (de las cuales 3 contienen péptido señal), 3 tendrían localización en membrana/citoplasma y 25 tendrían localización citoplasmática (Tabla III). De éstas últimas, algunas proteínas como la enolasa, chaperonina de 60 kDa, dihidrolipoamida deshidrogenasa y los factores de elongación Tu y Ts ya ha sido descriptas como proteínas asociadas a membrana en otras bacterias como *Neisseria meningitidis* (49). Estos datos verificarían que la metodología utilizada permite obtener muestras de proteínas enriquecidas en componentes de membrana.

Sobre el total de las 56 proteínas identificadas, 17 se han detectado como diferenciales entre las cepas vacunales (Tabla III. 1 A y B y Figura III. 6). De las 17 proteínas expresadas diferencialmente, 8 participan del metabolismo celular (BP1455, BP1499, BP1126, BP0047, BP3125, BP2439. BP0843. BP0844), 3 están asociadas a procesos de replicación o transcripción del ADN (BP1420, BP3642 Y BP 2435), 3 son estructurales o participan de la síntesis de componentes estructurales celulares (BP1630, BP3150, BP2750), 1 está asociada al transporte de moléculas en la célula (BP3322), 1 participa de la secreción de factores de virulencia (BP2235) y 1 es una proteína hipotética (BP2964).

Nº spot	Nombre de la proteína / Función	Locus del gen	РМ (кDа)	ld		Presenci	Presencia del gen en la cepa	la cepa		Nº péptidos	Cobertura	Localización
					BpTohama	Bp509	Bp10536	Bp137	Bp106	matcheados	secuencia (%)	
1-	competence lipoprotein precursor	bp1146	29,8	2	si	si	Si	Si	si	8	44	desconocida
5-	conserved hypothetical protein	bp3441	19,8	5,1	si	si	·s	·s	si	9	51	citoplasmática/membrana*
κ	molecular chaperone DnaK	bp2499	2'69	4,9	is	.is	is	.is	si	∞	17	citoplasmática
4-	putative lipoprotein	bp1296	30,6	7,4	is	.is	.is	.is	si	10	42	desconocida
7	succinate deshydrogenase catalytic subunit	bp2360	27,2	6,2	si	si	·s	·s	si	5	20	citoplasmática
-9	outer membrane protein OMPQ	bp3405	39,1	2,7	si	.is	.is	.is	si	5	19	membrana externa*
-/	outer membrane porin protein precursor	bp0840	41	5,4	si	·is	.is	.is	si	13	28	membrana externa
∞	putative ABC transport ATP binding protein	bp 3757	29,6	5,1	si	si	·s	·s	si	6	54	desconocida
-6	putative periplasmic solute binding protein	bp1487	40	7,8	si	si	si	si	si	13	43	desconocida*
10-	putative binding protein - dependent transport protein	bp3322	40,9	6'9	si	no	.iz	no	.is	7	21	periplásmica
11-	putative membrane protein	bp1440	33,4	5,3	·is	si	·is	·is	si	14	52	desconocida*
12-	antioxidant protein	5960dq	23,7	2,7	si	·is	.is	.is	si	9	29	citoplasmática
13-	serin protease	bp2434	52,1	8,8	si	si	is	·is	si	6	30	periplásmica
14-	chaperonin 60 kDa	bp3495	57,4	4,9	si	si	·is	.is	si	2	28	citoplasmática**
15-	putative sigma factor regulatory protein	bp2435	39,2	9'6	is	.is	no	ou 0	.is	11	36	periplásmica
16-	elongation factor Tu	2000dq	42,9	5,1	si	si	·s	·s	si	9	26	citoplasmática**
17-	putative membrane protein	bp1485	51,6	6,79	si	si	is	si	si	5	78	desconocida
18-	DNA direct RNA α subunit polymerase	bp3642	36,1	2,7	is	no	no	.is	.is	6	46	citoplasmática
19-	pertactin	bp1054	93,4	10	si	si	·s	·s	si	18	47	membrana externa
-02	putative quino protein	bp2196	40	8,7	si	si	is	si	si	14	47	desconocida
21-	NADH dehydrogenase delta subunit	bp0844	47,7	2,8	si	si	ou	si	si	11	32	citoplasmática
22-	hypothetical protein	bp3559	37,9	4,7	is	.is	is	·is	si	6	36	citoplasmática
23-	outer membrane protein A precursor	bp0943	20,9	9,2	is	.is	is	.is	si	9	51	membrana externa*
24-	superoxide dismutase	bp2761	21,2	6,5	si	.is	.is	.is	si	4	30	desconocida
25-	putative exported protein	bp2513	34,9	10,2	is	.is	is	·is	si	6	44	membrana externa
-92	ubiquinol cytochromo C reductase iron sulfur subunit	bp0277	22,8	5,2	si	si	is	si	si	5	30	citoplasmática/membrana*
27-	NADH dehydrogenase subunit C	bp0843	24,1	5,1	is	si	.i2	no	·is	4	20	citoplasmática
-82	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase	bp2439	43,6	2,7	no	no	ou	si	si	5	16	citoplasmática
29-	putative bacterial secretion system protein	bp3794	29,4	8.9	si	si	si	si	si	7	47	desconocida*

Tabla III. 1A: Proteínas identificadas por espectrometría de masa en los 2D. Se resaltan en verde aquellas proteínas que son expresadas diferencialmente por alguna de las cepas estudiadas. También se muestran los resultados obtenidos de las identificaciones peptídicas empleando el software Mascot.

a) Los loci génicos se nombran según NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). b) Localización proteica predicha por PSORT2b (http://psort.nibb.ac.jp. Ref. * presencia de péptido señal, **proteína asociada a membrana en otras bacterias.

Nº spot	Nombre de la proteína / Función	Locus del gen PM (kDa)	PM (kDa)	₫		Presencia	Presencia del gen en la cepa	la cepa		Nº péptidos	Cobertura	Localización
				_	BpTohama	Bp509	Bp10536	Bp137	Bp106	matcheados	matcheados secuencia (%)	
30-	enolase	bp2386	45,9	4,5	si	si	si	si	si	11	35	citoplasmática**
31-	trigger factor	bp1774	47,5	4,9	si	si	si	si	si	8	25	citoplasmática
32-	serum resistence protein	bp3494	103,3	7,1	si	si	si	si	·is	2	18	membrana externa
33-	succinate deshydrogenase flavo subunit	bp2361	64,8	6,5	·is	si	si	si	si	2	36	citoplasmática
34-	putative ABC transport solute binding protein	bp2747	40,6	6,5	is	si	si	si	si	7	24	citoplas mática/membrana*
35-	ATP synthase subunit B	bp3288	50,5	4,7	·is	si	si	si	si	11	30	citoplas mática
36-	elongation factor Ts	bp1420	30,9	5,1	ou	ou	no	si	·is	11	44	citoplasmática**
37-	ribose phosphate pyrophosphokinase	bp3125	34,1	5,1	·is	si	no	si	si	7	33	desconocida
38-	alkyl hydroperoxide reductase	bp3552	20,1	4,9	·is	si	si	si	si	4	40	citoplasmática
39-	lipoprotein	bp2750	23,1	7,7	si	si	si	no	si	4	26	desconocida
40-	hypothetical protein	bp3515	35,9	9′9	·is	si	si	si	si	9	27	desconocida
41-	polysaccharide biosynthesis protein	bp3150	46,7	9,5	no	ou	no	si	.is	7	18	citoplas mática
42-	enoyl-acyl carrier protein	bp3215	27,6	5,8	si	si	si	si	si	9	25	desconocida
43-	putative L lactacto deshydrogenase	bp0379	37,2	2,8	ou	ou	ou	ou	:IS	9	24	desconocida
44-	hypothetical protein	bp2964	48,5	6,2	si	si	ou 0	ou	si	6	27	citoplasmática
45-	homoserine O-acetyltransferase	bp0047	44,9	2,7	si	si	ou 0	ou	si	∞	29	desconocida
46-	putative penicilin binding protein precursor	bp0102	44,9	2,8	ou	ou	ou	ou	si	7	23	desconocida
47-	hypothetical protein	bp3128	68,5	6,1	si	si	si	si	si	12	23	desconocida
48-	dihydrolipoamide deshydrogenase	2660dq	62,3	2,8	ou	ou	no	no	si	7	13	citoplasmática
49-	putative ABC transport protein, ATP binding component	bp2744	29,1	6,3	si	si	si	si	si	4	25	citoplas mática
-09	capsular polisaccharide biosyntesis protein	bp1630	37,3	5,5	ou	ou	ou	si	·is	7	21	citoplasmática
51-	2-oxoglutarate dehydrogenase complex, E3 component	bp1126	50,3	6,3	00	ou	no	si	si	8	26	citoplasmática
52-	putative type III secretion system	bp2235	63,3	5,9	on O	ou	ou	si	si	∞	16	desconocida
53-	glutathione synthetase	bp1499	34,7	5,4	ou	ou	no	si	si	3	11	citoplasmática
54-	seryl-tRNA synthetase	bp2470	20	5,4	si	si	si	si	si	14	38	citoplasmática
55-	probable phosphoglycerate mutase 2	bp1455	23,8	5,9	si	si	si	no	si	9	29	citoplas mática
-99	putative outer membrane protein	bp3077	7,77	6,1	si	si	si	si	.is	6	19	membrana externa

Tabla III. 1B: Proteínas identificadas por espectrometría de masa en los 2D. Se resaltan en verde aquellas proteínas que son expresadas diferencialmente por alguna de las cepas estudiadas. También se muestran los resultados obtenidos de las identificaciones peptídicas empleando el software Mascot.

a) Los loci génicos se nombran según NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). b) Localización proteica predicha por PSORT2b (http://psort.nibb.ac.jp. Ref. * presencia de péptido señal, **proteína asociada a membrana en otras bacterias.

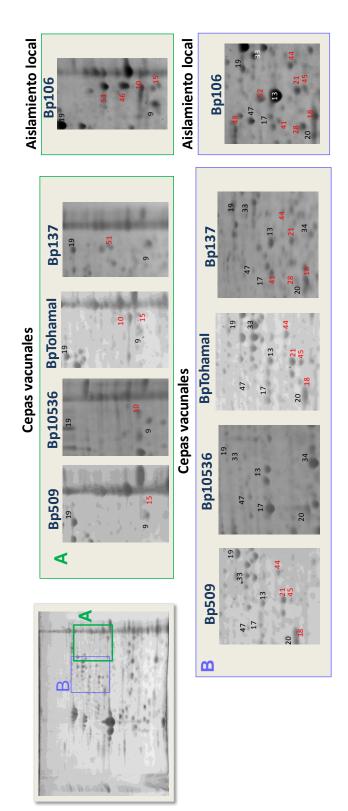
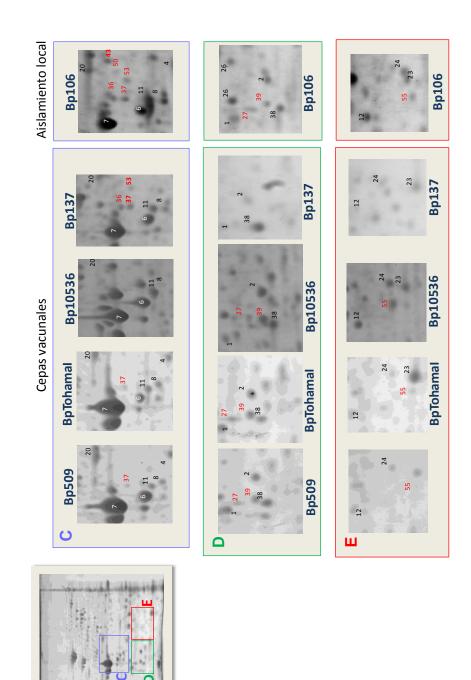


Figura III. 8: Imagen ampliada de los geles 2-D de las zonas que muestran expresión diferencial de proteínas entre las detectó expresión diferencial de proteínas. En los recuadros verdes y azules se muestran las imágenes ampliadas de cepas vacunales y el aislamiento clínico Bp106. Mediante recuadros se marca en el gel 2D las zonas A y B en las que se dichas zonas. Los números cercanos a cada spot se corresponden con los utilizados en la Tabla III. 1 para detallar las proteínas identificadas por EM. Los números en negro indican spots que no se expresan diferencialmente y los rojos los



las cepas vacunales y con el aislamiento clínico Bp106. Mediante recuadros se marca en el gel 2-D las zonas C, D y E Figura III. 9: Imagen ampliada de los geles 2D de las zonas que muestran expresión diferencial de proteínas entre en las que se detectó expresión diferencial de proteínas. En los recuadros verdes, rojos y azules se muestran las imágenes ampliadas de dichas zonas. Los números cercanos a cada spot se corresponden con los utilizados en la Tabla III. 1 A y B para detallar las proteínas identificadas por EM. Los números en negro indican spots comunes entre y los rojos aquellos que son diferencialmente expresados.

Como puede observarse en la figuras y tablas presentadas las cepas BpTohamal y Bp509 tienen un perfil de expresión proteico similar, sólo diferenciado en 2 proteínas (spots 10 y 18). Este resultado también fue observado en los geles SDS-PAGE en una dimensión. Las proteínas BP0844 y BP3125 están ausentes en el proteoma de la cepa Bp10536, ambas proteínas participarían en el metabolismo celular.

La cepa Bp137 presenta un perfil proteíco que contiene 7 spots que se observan sólo en esta cepa y no en las otras cepas vacunales: el factor de elongación Ts (spot 36 sector C Figura III. 9), la proteína BP3150 que interviene en la biosíntesis de polisacáridos, la proteína BP1630 que interviene en la biosíntesis del polisacárido capsular (spot 41, sector B Figura III. 8 y spot 50, sector C Figura III. 9 respectivamente), 3 proteínas del metabolismo (BP2439 spot 28 sector B Figura III. 8, BP1126 spot 51, sector A Figura III. 8 y BP1499 spot 53, sector C Figura III. 9) y la proteína BP2235 o posible proteína del sistema de secreción de tipo III (spot 52, sector B Figura III. 8).

Interesantemente estas 7 proteínas son expresadas también por el aislamiento local Bp106.

La detección de la proteína BP2235, posible proteína del sistema secreción de tipo III (spot 52 sector B Figura III. 8) en el aislamiento local y en la cepa vacunal Bp137 resulta un dato interesante de destacar ya que hasta el momento sólo fue descripta en B. bronchiseptica y más recientemente en aislamientos clínicos actuales de B. pertussis (48). Según la bibliografía esta proteína sería funcional en algunos aislamientos clínicos y no en las cepas vacunales, adaptadas a las condiciones de cultivo del laboratorio. El TTSS parece tener un rol en la colonización

bacteriana en el tracto respiratorio de los ratones, efecto que parece estar asociado con el aumento de respuesta inmune celular y humoral inflamatoria específica de antígeno a nivel local (48). Es decir parecería que la presencia de TTSS en los microrganismos que circulan provocando infecciones en la población, jugaría cierto rol en la modulación de la respuesta inmune para favorecer la colonización bacteriana en el huésped. dos proteínas diferenciales detectadas en las cepas Bp106 y en la cepa vacunal Bp137 y ausentes en el resto de las cepas vacunales son la proteína BP3150 y la BP1630 cuyas funciones asignadas son la de biosíntesis de polisacáridos (spot 41, sector B Figura III.8) y la biosíntesis de la capsula respectivamente (spot 50, sector C Figura III. 9). La expresión de estas proteínas resulta interesante ya que se conoce que las cápsulas bacterianas son estructuras que le permiten a los patógenos enfrentar las defensas del huésped (57, 127) por lo que la expresión de las mismas en estas cepas podría ser la consecuencia de la necesidad de evadir el sistema inmune del huésped inducido por la vacunación. El locus que codifica para el polisacárido capsular tipo II, presente en el genoma de Bordetella comprende 3 regiones que están involucradas en la exportación/modificación, biosíntesis y transporte (143). En la cepa BpTohamal la parte central de este locus está intacto pero en la región 3'del gen se observó un evento de inversión y en el extremo 5'del locus la deleción de parte de la región I, producto del re-arreglo mediado por un elemento de inserción y que movilizó a dos de los genes de exportación a una parte diferente del genoma.

Sería interesante entonces analizar la estructura de este locus en las cepas

Bp509 y Bp10536 para evaluar si han sufrido el mismo tipo de eventos o si la expresión ausencia de de proteínas se debe a causas a nivel de la transcripción, de la traducción o de la regulación de alguna de ellas. A pesar de no haber detectado ninguna de estas los geles proteínas por en recientemente se ha descripto presencia de una microcápsula en la cepa BpTohamal que se ha observado mediante técnicas inmunocoloraciones y microscopía de transmisión (133).

El factor de elongación Ts (spot 36, sector C Figura III. 9) que está involucrado en la biosíntesis de proteínas, es otra de las proteínas diferencialmente expresadas por la cepa vacunal Bp137 y Bp106. Si bien no es esperable la ausencia de este factor sí es posible que pueda encontrarse en cantidades y/o en localizaciones diferenciales.

Al incorporar en la comparación al aislamiento local Bp106, observamos un total de 20 proteínas diferenciales. Sólo 3 proteínas son expresadas únicamente por este aislamiento local, éstas son BP0379 putative L-lactacto deshydrogenase (spot 43, sector C Figura III. 9), BP0102 putative penicilin binding protein precursor (spot 46, sector A Figura III. 8) y BP0995 dihydrolipoamide deshydrogenase (spot 48, sector B Figura III. 8).

De las 3 proteínas identificadas como diferenciales en Bp106, 2 están involucradas en el metabolismo de hidratos de carbono. Homologos de estas proteínas en otras bacterias gram negativas han sido descriptas con roles en la inmunogenicidad (37) o en la virulencia (92). Una de estas enzimas es la dihidrolipoamida deshidrogenasa (Lpd) (spot48, sector B Figura III. 8), que

constituye una subunidad funcional del multienzimático complejo piruvato deshidrogenasa (PDH). Este complejo está compuesto de múltiples copias de un complejo ternario de las enzimas dihidrolipoamida deshidrogenasa, dihidrolipoamida transacetilasa deshidrogenasa; piruvato está ٧ involucrado en la oxidación de piruvato a acetil CoA. La enzima dihidrolipoamida deshidrogenada permite el funcionamiento continuo de esta vía metabólica al mantener el poder reductor correcto para la bioconversión. Esta enzima ha sido descripta como un determinante de virulencia en otros patógenos. Para Mycobacterium se ha reportado que LpdA tiene un importante rol tanto en la colonización como en la patogénesis (107). En Haemophilus Influenzae Tipo B la inserción de un transposón en el gen homólogo convierte a la bacteria virulenta en una atenuada. Cuando el mutante en LpdA de H. influenzae se utilizó para infectar ratones, a diferencia de la wt, la cepa mutante no fue recuperada (83).En Neisseria meningitidis, se ha determinado que la enzima dihidrolipoamida deshidrogenasa es una proteína de membrana externa altamente inmunogénica. Debido a esto se la ha considerado un buen candidato vacunal. Últimamente, esta proteína ha sido utilizada de forma muy versátil como plataforma o carrier inmunológico de antígenos débiles (45, 66, 70, 105).

Respecto de la proteína BP102 o putative penicilin binding protein precursor es interesante destacar que en el caso de los patógenos humanos *Estreptococos* del grupo B o GBS, productores de infecciones graves en recién nacidos, se ha demostrado que las proteínas que unen penicilina (PBP) tienen un rol en la virulencia de estas cepas. En particular se ha observado

que la PBP1a no sólo es requerida para la virulencia sino que además promueve resistencia α -defensinas a las producidas por neutrófilos y a βhomólogos AMP defensina V catelicina liberados por macrófagos alveolares permitiendo la supervivencia de las bacterias en el pulmón en el modelo en ratas (94). Así, esta proteína identificada únicamente aislamiento circulante Bp106 podría desempeñar algún rol en la virulencia de aislamientos circulantes pertussis. Es necesario una mayor profundización en el estudio de esta proteína tanto en cuanto a su efecto en la virulencia de B. pertussis como en su potencialidad como candidato vacunal. La ausencia de expresión de algunas las distintas cepas proteínas en vacunales y en el aislamiento podría ser consecuencia de que se traten de pseudogenes y/o a una reducción en el tamaño del genoma como se ha descripto para B. pertussis. Para analizar estas posibilidades diseñamos primers específicos de las secuencias codificantes de las proteínas: BP2435 (spot 15), BP0047 (spot 45), BP0844 (spot 21) y BP3322 (spot 10) de forma de obtener en caso de presencia de la secuencia, un producto de amplificación de tamaño conocido. En el caso de las proteínas BP2435, BP0047 y BP0844 se observó que las cuatro cepas vacunales y la cepa Bp106 contenían la secuencia codificante en sus genomas. Estos resultados indicarían en principio que la expresión diferencial de estas tres proteínas no se debería a diferencias a nivel de la región codificante (presencia, ausencia o interrupción de la secuencia de ADN) sino podría ser consecuencia de diferencias a nivel transcripcional o postrancripcional.

En el caso de la expresión diferencial de la proteína BP3322, pudimos verificar

que la secuencia codificante sólo estaba presente en las cepas BpTohamal y Bp10536. En base a estos resultados decidimos analizar la presencia de dicho gen en las cepas y aislamientos que integran el mismo grupo de PFGE es decir en las cepas vacunales Bp137, Bp509 y Bp134 y en el aislamiento Bp8901 y en grupos de PFGE no relacionados. Llamativamente las cepas vacunales Bp137, Bp509 y Bp134 y el aislamiento Bp8901, cercanamente relacionados por PFGE parecen no contener la secuencia codificante de la proteína mientras que 30 aislamientos locales pertenecientes a otros grupos de PFGE (Grupos I, II, IV, V y VI) sí.

Todos estos datos resultan interesentes ya que concuerdan con otros estudios que muestran que algunas cepas /aislamientos contienen el gen bp3322 y otras no. Así, Brinig et al en 2006 (17) detectaron que una región genómica denominada región diferencial RD-18 que contiene al gen bp3322, estaba presente principalmente en cepas de la era postvacunal y en algunas pocas cepas prevacunales. Estos resultados hacen suponer que esta secuencia y más específicamente su producto en estos aislamientos no adaptados a condiciones de laboratorio es importante en la interacción bacteria huésped. La designación de secuencias RD surge de estudios de hibradación en los que se vió que de los 3.581 genes dispuestos en el microarray oligonucleotídico basado en el genoma de la cepa secuenciada BpTohamal el 2,7% (98 genes) estaban ausentes en los aislamientos estudiados. Los 98 genes fueron agrupados en 8 loci contiguos o regiones de diferencia (RDs). Estas regiones fueron: RD-3, RD-5, RD-6, RD-27, RD-10, RD-28, RD-29, RD-18 y RD-I*(parte de RD-I). De ellas la región RD-18 de 9,4 kb, está compuesta por 9 genes (BP3314- BP3322) y

contiene el locus para BP3322. De estos 9 genes contenidos en RD-18, 1 gen está incluido en la categoría de genes involucrados en procesos celulares, 2 genes se clasifican como proteínas hipotéticas, otro cumpliría funciones de transporte y unión, mientras que 5 de ellos pertenecen a la categoría de no clasificados.

La asociación entre un grupo de PFGE y una región RD como el detectado en nuestro caso fue reportada en Finlandia en donde observaron que la deleción en la región RD-10 (o locus 3 según la nomencatura empleada en la referencia 74) se asociaba a un grupo de PFGE al que pertenecía a un clon responsable de una epidemia a nivel nacional (80).

Resumen

En el caso de pertussis, la elección de una cepa o más de una cepa vacunal para incluir en una formulación no resulta un hecho trivial no sólo por haber un número considerable de cepas vacunales que actualmente están en uso, sino también por los recientes resultados respecto de la divergencia genómica entre las cepas vacunales y la población bacteriana circulante. En este capítulo hemos caracterizado fenotípicamente a 4 cepas vacunales que hoy se emplean en nuestro país (formulaciones importadas) diferentes países en la formulación de vacunas antipertussis. Mediante empleo de técnicas convencionales de caracterización, las 4 cepas (Bp Tohama, Bp509, Bp10536 У Bp137) presentaron prácticamente como

indistinguibles. Sin embargo, el empleo de estrategias inmunológicas y del tipo proteomico comparativo nos permitido vislumbrar no sólo diferencias entre las cepas vacunales sino entre ellas y los aislamientos de B. pertussis que están circulando en la actualidad en población. Hemos podido nuestra detectar que sólo una de las cepas vacunales, la cepa Bp137, expresa un set de proteínas que comparte solo con el aislamiento circulante estudiado y que diverge respecto de las otras cepas vacunales. Los hallazgos presentados posicionan a las estrategias basadas en la proteómica para la selección de candidatos vacunales y nos permiten diseñar ensayos funcionales más sencillos como los que se describen a continuación.

Capítulo IV

Análsis de la capacidad protectiva de distintas cepas vacunales de *Bordetella pertussis*

Introducción

Desde que se produjo el desarrollo de las vacunas contra la tos convulsa muchos modelos de protección en roedores fueron empleados usando diferentes rutas de administración para evaluar la calidad de las mismas. El modelo más antiguo empleado en la evaluación de las vacunas celulares, fue desarrollado por Perla Kendrick (1939). En este modelo las vacunas celulares se administran por intraperitoneal y el desafío se realiza intracranealmente con dosis letales de B. pertussis ya que esta es capaz de reproducirse en el cerebro de los ratones. La eficacia de las vacunas se calcula, con este modelo en función de la tasa de muerte de los ratones en los 14 días siguientes desafío al intracraneal. Las pruebas clínicas a correlacionaron con los campo resultados de eficiencia del test de Kendrick por lo que se lo validó como método de aprobación para las vacunas celulares (96).

Más tarde y con la aparición de las vacunas acelulares antipertussis se propuso un nuevo modelo de eficacia de vacunas ya que se observó que las vacunas de componentes o acelulares no protegían en el modelo de desafío intracraneal. Así fue como se comenzó a emplear el modelo murino con un desafío respiratorio en lugar del desafío intracraneal, ya que en primera presentaba instancia muchas similitudes con la infección natural. Así, realizando la infección en los bronquios de ratas con dosis subletales de B. pertussis se observó que esta inducía paroxismos de tos y leucocitosis característicos de la infección de pertussis en humanos (74). Por su parte, los ensavos en ratones han mostrado desarrollan la enfermedad estrictamente en el tracto respiratorio y

manifestaciones presentan post infección como alveolitis, linfocitosis, sensibilización histamina, por hipoglucemia e hiper-insulinemia (122, 151, 157). Aunque en la actualidad falta arribar a un consenso respecto de la metodología a emplear en el desafío por la vía respiratoria, distintos estudios han demostrado que el modelo respiratorio ya sea por desafío intranasal o por aerosol resulta útil para evaluar la eficacia no sólo de las vacunas acelulares sino también de las formulaciones celulares (122, 151). La necesidad de un equipamiento algo especializado y el tiempo de duración del ensayo que excede al que la WHO recomienda (178) ha ido desvalorizando el desafío mediante aerosol. Así Guiso et al desarrollaron un modelo murino de desafío intranasal más sencillo desde el punto de vista experimental, más rápido y con resultados reproducibles (71). El mismo consiste en la administración de dos dosis de vacuna separadas entre sí 14 días y una dosis desafío subletal (106-10⁹UCF) a los 10-14 días después de la última dosis de vacuna. Este desafío se realiza directamente colocando volumen de suspensión bacteriana en las narinas del ratón adormecido de manera que éste lo pueda inhalar fácilmente. Mediante la aplicación de metodología, estos esta autores analizaron distintos lotes de vacuna acelular y los resultados obtenidos se correlacionaron perfectamente con los obtenidos en ensayos clínicos empleando las mismas formulaciones. La nueva metodología fue capaz de discriminar de igual forma diferencias que se observaban en los ensayos a campo por lo que hoy su uso cuenta con mayor aceptación que la del desafío empleando aerosol.

El método descrito por Guiso fue entonces el que adoptamos en este trabajo de tesis para evaluar la capacidad protectiva de vacunas formuladas a partir de diferentes cepas vacunales frente a cepas de referencia y a aislamientos de *B. pertussis* propios de nuestra región.

Resultados y discusión

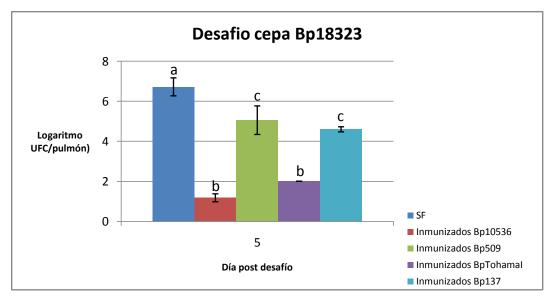
Como se describe en la sección de Materiales y Métodos los ensayos de realizados protección durante trabajo de tesis empleando el modelo de desafío intranasal en ratones, consistieron en inmunizar intraperitonealmente grupos de ratones hembras BalbC con vacunas preparadas a partir de las cepas BpTohamal, Bp10536, Bp137 y Bp509. En base a los resultados obtenidos en nuestro grupo sobre la dependencia directa entre la dosis de vacuna y la efectividad en la protección realizamos experimentos empleando diluciones 1/20 y 1/200 de la dosis que se emplea en humanos. En todos los casos se aplicaron 2 dosis de vacuna separadas por 14 días y a los diez días después de la última dosis se desafiaron por vía intranasal con la cepa de referencia Bp18323 o con aislamiento Bp106. Como control negativo de protección se emplea un grupo de ratones inmunizados con solución fisiológica (SF) y desafiados con la cepa de referencia o el aislamiento seleccionado. La medida de protección se asocia al recuento de bacterias recuperadas de los pulmones de los ratones, cuanto mayor sea el número de bacterias aisladas del pulmón de un ratón vacunado menor será la capacidad protectiva de la vacuna empleada. En nuestros experimentos empleamos grupos de 5 ratones para cada uno de los tiempos post desafío analizados (dos horas, 5 días posteriores al desafío). El grupo de ratones sacrificados el día 0 la cantidad permitió evaluar microrganismos que llega al pulmón

durante el desafío. En todos los experimentos realizados no hemos encontrado diferencias en el número de bacterias recuperadas de vacunados y el de no vacunados. Por simplicidad У para una mejor visualización de los datos en las gráficas sólo incluimos los datos obtenidos al día 5 post desafío. En la Figura IV. 1, paneles A y B se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de protección en ratón al emplear grupos de ratones vacunados con una dosis de 1/200 de la empleada en humanos. dosis resultados mostrados en los paneles A y B corresponden a los grupos desafiados con la cepa de referencia Bp18323 o con el aislamiento local Bp106 respectivamente. Como era esperado el número recuperadas de colonias de los pulmones de los ratones inmunizados (SF) fue significativamente mayor (p<0.05) a los encontrados en ratones inmunizados con algún tipo de vacuna tanto para aquellos desafiados con la cepa Bp18323 como con el aislamiento Bp106.

De manera interesante observamos que en el caso del desafío con la cepa de referencia Bp18323 en los ratones inmunizados con vacunas formuladas a partir de las cepas Bp10536 y BpTohamal el logaritmo del recuento microbiano encontrado en los pulmones fue aproximadamente 5 y 4 veces menor que el de los ratones no inmunizados mientras que para los vacunados con las cepas Bp509 y Bp137 la caída fue sólo de aproximadamente 1-2 logaritmos (Figura IV. 1, panel A).

Entre las cepas Bp10536 y BpTohamal y entre las cepas Bp509 y Bp137 no se observan diferencias significativas de protección.

Α



В

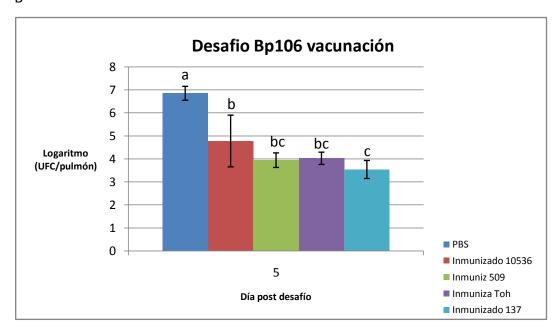


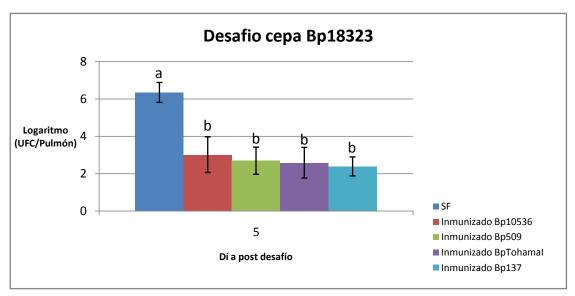
Figura IV. 1: Evaluación de la protección conferida por las diferentes cepas vacunales en el modelo murino de infección. Los ratones fueron inmunizados i.p. con una dosis equivalente a una dilución 1/200 de la dosis empleada en humanos. Para la inmunización se emplearon distintas cepas vacunales las cuales estan indicadas en la figura con distinto color. Se grafica la media y DS del Log(UFC/pulmón) obtenido cuando se emplea en el desafío la referencia Bp18323 (Panel A) o el aislamiento Bp106 (Panel B). SF: indica inmunización con solución fisiológica. Las diferentes letras indican los grupos en los que se encontraron diferencias significativas con p<0.05

Cuando los grupos de ratones inmunizados con estas cepas vacunales en dosis 1/200 son desafiados con el aislamiento circulante Bp106 (Figura IV. 1 Panel B), se observa que para las formulaciones que contienen a la cepa Bp10536 y BpTohamal el número de colonias recuperadas de los pulmones fue significativamente superior al de los ratones inmunizados con las mismas formulaciones pero desafiados con la cepa de referencia Bp18323. Este resultado no sólo es concordante al reportado por Gaillard ME (tesis doctoral 2009) sino que se exteniende a otra cepa vacunal como es el caso de la cepa Bp10536. En nuestras condiciones, la cepa Bp509 se comporta de la misma manera frente a la cepa de referencia y al aislamiento seleccionado aunque con niveles más altos que los observados en las otras formulaciones más protectivas (dilución 1/20 Hu). En el caso de la cepa vacunal Bp137 se observan resultados nuevamente interesantes en el sentido que para esta cepa la capacidad protectora parecería ser mayor frente al aislamiento clínico que la para cepa de referencia Bp18323. En suma las vacunas preparadas con las cepas Bp10536 y BpTohamal por un lado y Bp137 por otro se comportan de manera diferencial frente a las cepas empleadas para el desafío. Así la cepa Bp10536 y BpTohamal, presentan mejores niveles de protección frente al desafío con la cepa de referencia Bp18323 que frente al desafío con el aislamiento circulante Bp106. La cepa Bp137 presenta un comportamiento inverso, su capacidad protectiva es mayor frente al aislamiento local respecto de la cepa Bp18323.

Para evaluar si las diferencias observadas en la protección de las vacunas formuladas a partir de las distintas cepas eran observadas sólo en inmunidad. contexto de baia decidimos repetir estos experimentos de protección pero empleando una dosis más alta (dilución 1/20 de las dosis que se emplea en humanos). En la Figura III. 2, paneles A y B se muestran los resultados obtenidos. Nuevamente como era de esperar el número de colonias recuperadas de los pulmones de los ratones no inmunizados (SF) fue significativamente superior (p<0.05) a los encontrados en ratones inmunizados con algún tipo de vacuna tanto para aquellos desafiados con la cepa Bp18323 como con el aislamiento Bp106.

Cuando los ratones son desafiados con la cepa de referencia Bp18323, todas las cepas empledas como vacuna se presentan con buena capacidad protectiva (Panel A de la Figura IV. 2).

Α



В

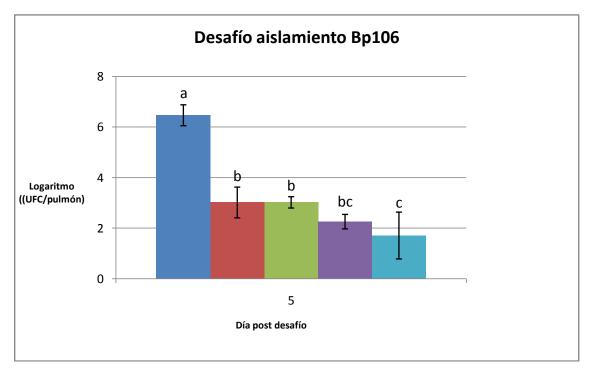


Figura IV. 2: Evaluación de la protección conferida por las diferentes cepas vacunales en el modelo murino de infección. Los ratones fueron inmunizados i.p. con una dosis equivalente a una dilución 1/20 de la dosis empleada en humanos. Para la inmunización se emplearon distintas cepas vacunales las cuales estan indicadas en la figura con distinto color. Se grafica la media y el DS Log(UFC/pulmón) obtenido cuando se emplea en el desafío la referencia Bp18323 (Panel A) o el aislamiento Bp106 (Panel B). SF: indica inmunización con solución fisiológica. Las diferentes letras indican los grupos en los que se encontraron diferencias significativas con p<0.05

Un dato por demás interesante es que frente al desafío con el aislamiento circulante Bp106. los ratones inmunizados con vacuna preparada a partir de la cepa Bp137 presentan recuentos significativamente menores en comparación a los obtenidos con las formulaciones Bp10536 y Bp509, es decir que esta formulación se presenta como más eficiente en la eliminación de bacterias de pulmón (p<0,05) que aquellas formulaciones. El grupo de ratones vacunados con la BpTohamal no presenta diferencias con ningún otro grupo excepto con aquellos ratones no inmunizados.

Es decir que a dosis de vacunación más elevadas, todas las cepas vacunales se presentan como adecuadas frente a la cepa Bp18323. En el caso del desafío con el aislamiento circulante, la cepa vacunal Bp137 se presenta significativamente más eficiente que las formulaciones realizadas a partir de Bp10536 y Bp509.

Todos estos resultados se asociarían al menos en parte a lo observado tanto en el PFGE como al aplicar la estrategia proteomica. Analizando los resultados obtenidos en el PFGE se puede ver que la cepa Bp10536 y la Bp18323 presentan una similitud de 90% mientras que la para el aislamiento Bp106 la similitud de Bp10536 es de 60%. Por otra la cepa Bp137 presenta una similitud del 62% con la cepa Bp18323 y 60% con el aislamiento Bp106 pero en relación a este último los estudios proteomicos permitieron visualizar que a nivel de superficie la cepa Bp137 expresa un perfil proteico más próximo al del aislamiento circulante. Más allá de las posibles explicaciones para los resultados observados, los estudios aquí presentados muestran claramente que las cepas vacunales estudiadas no son funcionalmente indistinguibles. aún, los resultados muestran a la cepa Bp137 como un mejor candidato a ser incluido en una formulación regional contra pertussis.

Capítulo V

Conclusiones

Antiguamente se creía que las enfermedades eran castigos enviados por los dioses a la humanidad. Sin embargo, en el lejano oriente comenzaron a aparecer soluciones heréticas para algunas enfermedades. La primera evidencia escrita relacionada con los procesos de vacunación data del siglo XI y se encuentran en la literatura china. Se le atribuye a una monja budista un texto llamado "El tratamiento adecuado de la viruela", otro libro chino "El espejo dorado de la Medicina" describe diferentes formas de inoculación antivariólica en la que se explica cómo se puede prevenir el contagio de viruela inoculándose con pus proveniente de pacientes que habían contraído la enfermedad. Esta práctica fue conocida en Gran Bretaña en 1721 cuando Lady Mary Wortley Montagu la introdujo en ese país tras su regreso de Constantinopla. Desde la corte británica, la práctica de la variolización se extendió a todo el país y, a partir del siglo XVIII al resto del continente europeo. Esta "variolización" constituye el primer intento de la humanidad por evitar las enfermedades infecciosas. El médico rural Edward Jenner luego desarrolló en Inglaterra la primera vacuna contra la viruela. Este hito en la historia de las vacunas fue seguido por las investigaciones de Louis Pasteur (1822-1895) que condujeron al desarrollo de la teoría microbiana de la enfermedad, y con ello, a la ampliación de la inmunización preventiva. Desde ese momento, los investigadores pudieron disponer de microorganismos vivos o muertos, a partir de los cuales les fue posible elaborar vacunas. Los desarrollos continuaron mejorándose a través de formulaciones de componentes o parte de los mismos en diferentes presentaciones que incluyen diferentes adyuvantes. El tercer hito lo constituyó el desarrollo de vacunas a ADN las cuales se basan en la inmunización con un plásmido que contiene la información genética de uno o varios genes que codifican para proteínas inmunogénicas de determinado patógeno. El plásmido actúa como un vector permitiendo la expresión del inmunógeno en el interior de las células que son transfectadas como resultado de la inmunización. La respuesta inmune generada, humoral o celular, prepara al individuo vacunado para contrarrestar una infección con el patógeno, de manera que su utilización de forma profiláctica constituye una potencial herramienta a aplicar, sobre todo en aquellas enfermedades que requieren ambas ramas de la respuesta inmune, como las causadas por virus (Davis y Whalen, 1995).

Con la invención de las vacunas y los sucesivos desarrollos pareció por un momento haberse derrotado a las enfermedades infecciosas pues gracias a ellas ya se ha podido erradicar o disminuir algunas enfermedades como la viruela y la poliomielitis, además de salvar a millones de personas de otras como el sarampión, la difteria y el tétano. Sin embargo, contra otras patologías muy importantes como la tuberculosis, la malaria o el SIDA faltan aún buenas vacunas; contra otras las vacunas existentes requieren ser mejoradas. En esta presentación se incluyó un ejemplo de una vacuna que requiere ser mejorada, la vacuna contra la tos convulsa o pertussis. Pertussis es una enfermedad infecciosa aguda de las vías respiratorias causada principalmente por Bordetella pertussis. Esta enfermedad no sólo no se ha podido erradicar, pese al uso masivo de vacunas desde 1940, sino que en la actualidad ha reemergido. Mundialmente se registran por año 40 millones de casos de los cuales 300.000 resultan ser fatales. En Argentina la enfermedad ha evolucionado en forma de brotes epidémicos cada cuatro años. Aún por encima de este perfil epidemiológico se ha registrado un aumento significativo de casos de pertussis que son reportados al Ministerio de Salud de la Nación en el marco de las notificaciones obligatorias. Esta situación de resurgencia de la enfermedad no es exclusiva de Argentina ya que la misma continúa registrándose en varios lugares del mundo desde 1990. Varias son las causas que podrían explicarla, la mayoría de ellas están asociadas a deficiencias en la vacuna. Para la prevención de la enfermedad, en un comienzo se utilizaron vacunas celulares, aunque más recientemente se fueron introduciendo diversos tipos de vacunas acelulares. El uso de estas formulaciones sin dudas permitió disminuir la mortalidad y morbilidad de esta enfermedad que en la era prevacunal era considerada la primera causa de muerte en chicos. Para la provisión de un insumo tan preciado como son las vacunas algunos países impulsan la producción nacional de las mismas mientras que otros las adquieren a través de estrategias de importación. En cualquiera de estos casos, las formulaciones se obtienen a partir de cepas vacunales de B. pertussis que corresponden a aislamientos clínicos obtenidos en la década del '50. Para la producción de vacunas acelulares también éste es el caso, ya que los componentes proteicos se obtienen mediante procesos de purificación a partir de cultivos de cepas como la BpTohamal, que fue aislada en Japón en el año 1952 de un paciente pediátrico. Este aspecto sobre la composición de las formulaciones vacunales

anti pertussis fue analizado cuando se comenzó a reportar la resurgencia de la enfermedad y la aparición de aislamientos circulantes divergentes respecto de las cepas vacunales en uso. Los datos de epidemiología molecular han puesto en discusión no sólo qué formulación emplear sino qué componente vacunal incluir en las formulaciones.

En nuestro país este aspecto resulta por demás relevante pues a través de los resultados presentados en este trabajo de tesis se ha podido visualizar que la población bacteriana circulante diverge de las cepas vacunales incluidas en las vacunas que se importan. En este contexto y de forma complementaria con los resultados presentados en la tesis doctoral de la Dra. M. E. Gaillard, es que hemos detectado genotipos y fenotipos diferenciales no sólo entre la población bacteriana circulante y las cepas vacunales sino también entre las cepas vacunales. Respecto de las cepas vacunales en este trabajo gracias al empleo de estrategias inmunológicas y de proteómica comparativa se ha podido detectar que el grupo de las cepas vacunales Bp10536, Bp509, BpTohamal y Bp137 no se comportan igualitariamente. Más aún una de estas cepas, la cepa Bp137, expresa un perfil proteico que es compartido más ajustadamente con un aislamiento local circulante de B. pertussis, el aislamiento Bp106. Estos resultados volvieron a hacerse explícitos en el modelo animal de desafio intranasal - la cepa Bp137, ya sea en el escenario de baja inmunidad o de alta, es la cepa vacunal que presenta mejor capacidad protectiva frente al aislamiento local tomado como representativo de la población de B.pertussis circulante en la actualidad en nuestra población. Nuestros resultados vuelven a mostrar la necesidad de incluir en las formulaciones vacunales a cepas similares a los aislamientos que están circulando. Nuestros resultados en este sentido posicionan de manera favorable la selección de la cepa Bp137 como cepa a incluir en una formulación que en principio se espera sea más efectiva en el control de la enfermedad. Este hallazgo significa un aporte sustancial para el proyecto VacSal dirijido a la reactivación de la producción nacional de vacunas ya que se podría realizar una mejora en la formulación vacunal con la incoporación de la cepa Bp137. Esta incorporación facilitaría el camino, pues se estaría incluyendo una cepa de historia conocida como lo recomienda la OMS evitándonos, al menos para una primera etapa, la necesidad de realizar ensayos

clínicos como el que requeriríamos al incluir un aislamiento novel como podrían ser los circulantes en nuestro país.

Capítulo VI

Materiales y Métodos

Cepas, aislamientos clínicos y medios de cultivo empleados

En las Tablas VI. 1 y VI. 2 se detallan las cepas de referencia, vacunales y aislamientos clínicos, pertenecientes a la especie *Bordetella pertussis*, que fueron utilizados en este trabajo de tesis.

Cepa vacunal	Genotipo ptxS1	Genotipo prn	Serotipo fim	Genotipo tcfA	Origen/Productor
BpTohama	В	1	2-1	2	Japón /Glaxo-Smith Kline
Bp 509	D	7	2 o 2,3	2	Holanda
Bp 137	no A	SD	SD	SD	Brasil
Bp10536	no A	SD	3	SD	SD
Ref Bp18323	Е	6	2-1,3	1	USA

Tabla VI. 1: Cepas vacunales de *Bordetella pertussis* utilizados en este trabajo de **tesis.** Bp: *Bordetella pertussis, ptx*S1: subunidad S1 de la toxina pertussis, *prn* pertactina, fim: fimbria, TcfA: factor de colonización traqueal. Ref: cepa de referencia, SD: sin dato.

Como cepa de referencia se empleó a la cepa Bp18323 la cual es recomendada por la OMS para evaluar la potencia de la vacunas. La cepa BpTohamal ha sido aislada en Tokyo de un paciente infectado en 1952 y fue entregada al NIID (National Institute of Infectious Diseases) en 1955 para su empleo en una vacuna. En 1980 después de numerosos subcultivos la cepa fue provista a los productores japoneses como candidato vacunal. Por otra parte su genoma ha sido completamente secuenciado (139). Esta cepa en la actualidad se utiliza para la producción de vacunas acelulares. El resto de cepas vacunales Bp509, Bp137 y Bp10536 se han empleado en distintas formulaciones de vacunas celulares, algunas importadas por nuestro país. La cepa Bp509 fue aislada en Holanda en el año 1950.

Estado de vacunación (nro de dosis) S 8 112 2 9 9 29 25 0 3 1 1 1 2 4 6 7 7 4 7 1 5 13 S 1771 > 6a Edad del paciente 18m a 6a - -7 6 a 18 m 7 7 7 ≤ de 6 m **7 7 8 8 2 7 7** 17 27 5 CBA Lugar de aislamiento 5 11 2 NON 8 9 7 Nro de aislamientos 7 5 5 111 112 6 6 40 40 45 1982 1989 1998 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 1971

BsAs: aislamientos provincia de Buenos Aires

NQN: aislamientos provincia de Neuquén CBA: aislamientos provincia de Córdoba

m: meses

שי שוויים

SD: sin dato

Tabla VI. 2: Aislamientos clínicos de Bordetella pertussis de Argentina utilizados en esta Tesis

Para sistematizar la nomenclatura de los aislamientos y preservar la identidad de los pacientes a cada aislamiento se le asignó un número de 3 o 4 dígitos. El primer dígito pertenece al o a los últimos números del año en que se efectuó cada aislamiento y los últimos dos al número de aislamiento obtenido en dicho año. Por ejemplo: *Bp*106 corresponde al aislamiento Nº 6 obtenido en el año 2001.

Medios de cultivo empleados para el desarrollo de B. pertussis

✓ Agar Bordet – Gengou Sangre (BGAS)

Agar Bordet-Gengou comercial (Difco) 15 g/l cultivo Peptona (Difco) 10 % p/v Glicerina 1 % v/v

Una vez esterilizado se suplementa con 10 % v/v de sangre de carnero (Laboratorio Argentino).

√ Stainer- Scholte (SS)

Glutamato de sodio monohidrato	10.7 g/l
L- Prolina	0.24 g/l
NaCl	2.50 g/l
KH ₂ PO ₄	0.50 g/l
KCI	0.20 g/l
$MgCl_2$. 6 H_2O	0.10 g/l
CaCl ₂ . 6 H ₂ O	0.02 g/l
Tris-HCl	1.52 g/l

Se lleva pH7,2 con una solución de HCl concentrado y se esteriliza 15 minutos a 121ºC. Luego se le adiciona el complemento esterilizado por filtración.

Complemento (20 ml 10X)

L- Cisteína	800 mg
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	200 mg
Ac. Ascórbico	400 mg
Ac. Nicotínico	80 mg
HCI _(c)	2 ml

Los stock bacterianos se conservan como una suspensión en el medio Stainer - Scholte a –20 °C en glicerol 50% v/v. Las cepas/aislamientos de *B. pertussis* utilizados se cultivaron a partir del stock en glicerol a 37 °C durante 72 h en BGAS. Transcurridas las 72 h se efectuó un subcultivo en placa de BGAS y se incubó a 37°C durante 24 h.

Evaluación de la divergencia antigénica de la población bacteriana local

Análisis del polimorfismo en el gen de la Subunidad 1 de la toxina pertussis (ptxS1) y de la adhesina Pertactina (prn)

La genotipicación de *ptxS1* y *prn* de los aislamientos de *B. pertussis* locales y cepas vacunales se realizó mediante recciones de PCR empleando los primers que se describen más abajo. Para ello primeramente se obtuvo ADN a partir de una suspensión bacteriana realizada a partir de un cultivo sólido de cada aislamiento o cepa vacunal. A partir de las mismas se realizó la lisis mediante ebullición por 10 minutos. Los restos celulares y bacterias no lisadas fueron descartados por centrifugación a 8.000 xg durante 5 min y el sobrenadante conteniendo el ADN se empleo como molde de las reacciones de PCR.

A continuación se detallan la secuencias de los primers empleados:

Primers empleados para la detección de Polimorfismo en el gen *ptxS1*:**S1 684A**: TCGGCACATTGGTGCGCATA, **S1 684G**: TCGGCACATTGGTGCGCATG y **S1R**: TCAATTACCGG

AGTTGGGCG

Primers empleados para la detección de polimorfismo en el gen de la adhesina Pertactina (prn) fueron: prnC: GTGCGGTTCCCGGCGGTG, prnD: GCTCCACGCTGGAGCCCG, prnE: TGCGGTTCCCGGCGGCTTC

La mezcla de reacción emplea contenía: PrimerF y R 5μ M: 2μ I, dNTPs 2mM: 2μ I, MgCl $_2$ 25 mM: 2μ I, Buffer 10X: 2μ I, Taq polimerasa Invitrogen $5U/\mu$ I: $0,2\mu$ I, DMSO: 2μ I, H $_2$ O: $4,8\mu$ I, DNA molde: 3μ I, Volumen final de 20μ I.

La amplificación por PCR se llevó a cabo en un equipo MyCycler de BioRad El programa de ciclado para la amplificación de regiones polimórficas del gen *ptxS1* fue 94°C 1min; 12 ciclos de 94°C 15 seg, 60°C 15 seg, 72°C 15 seg y 1 ciclo de 72°C 30 seg. Para la amplificación de regiones polimórficas del gen *prn* se empleó el siguiente programa 94°C 1min; 35 ciclos de 94°C 15 seg, 52°C 10 seg, 72°C 20seg y 1 ciclo de 72°C 1 min.

Electroforesis en geles de agarosa

El análisis de los productos de reacción de los ensayos de PCR se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (0,8-2% p/v) empleando buffer TBE (Tris-HCl 89 mM, Na₂EDTA 2,5 mM, H₃BO₃ 89 mM, pH 8,2) como buffer de corrida. Como solución de siembra se utilizó sacarosa 40% p/v y azul de bromofenol 0,25% p/v en una relación 5 μl solución de ADN en agua por cada 1 μl solución de siembra. Para la visualización del ADN sobre los geles de agarosa se adicionó a los mismos 0,5 μg/ml de bromuro de etidio. Este compuesto permite la visualización del ADN por transiluminación con luz ultravioleta. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara digital Kodak modelo DC 290 (software-EDAS-Kodak) bajo iluminación ultravioleta.

Determinación de los serotipos fimbriales

La serotipificación de los aislamientos locales se realizó por aglutinación en portaobjetos. Para ello se prepararon suspensiones bacterianas en solución fisiológica, las cuales se mezclaron en un portaobjetos (una alícuota de 15µl) con 15µl de una dilución 1/1000 de anticuerpos monoclonales anti fimbria 2 obtenidos en ratón (OMS Reference Reagent for Anti–*B. pertussis* Fimbriae 3 y 2 Monoclonal Antibody-National Institute of Biological Standards and Control NIBSC (Potters Bar, Hertfordshire, United Kingdom-códigos de los productos: 04/156)) en solución fisiológica. El antisuero monoclonal anti fimbria 3 se diluyó 1/100 en solución fisiológica siguiendo las recomendaciones de la OMS.

La reacción de aglutinación se observa a ojo desnudo luego de 2 min de homogeneización manual suave. Como controles positivos de cada anti suero se emplearon, cepas de referencia con serotipo fimbrial conocido. Como control negativo de auto aglutinación se empleó una alícuota de la suspensión bacteriana y se la mezcló con 15µl de solución fisiológica.

Fingerprinting mediante la técnica de Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

Preparación de los tacos (plugs) de ADN y lisis bacteriana

A partir de cada aislamiento y de las cepas vacunales de *B. pertussis* obtenidas en medio sólido BGAS, se prepararon 200μl de suspensiones de DO_{650nm}:0,8 en buffer TE1X (10mM Tris-HCl pH=8,0, EDTA 1mM) conteniendo aproximadamente 2,4x10⁹UFC/ml. A estas suspensiones bacterianas se le agregaron 10 μl de Proteinasa K 20 mg/ml para favorecer la lisis. Luego se mezclaron partes iguales de la suspensión bacteriana preparada con agarosa SeaKem GTG (FMC Bioproducts) al 1% en buffer TBE 0,5X fundida y enfriada a 40°C. Se colocaron 200μl de esta mezcla en el molde para plugs y se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta solidificación. Los plugs así preparados se transfirieron a un tubo Falcon con 2,5ml de buffer de lisis (0,5M EDTA, 50mM Tris a pH:8 conteniendo 1% de lauril sarcosina y 0,8mg de proteinasa K). Y se incubaron ON en baño de agua a 56°C. Luego los plugs se lavaron 3 veces con 15 ml de agua tridestilada precalentada a 50°C y 4 veces con 15 ml de TE 1X a 50°C. Finalmente los plugs se lavaron con buffer TBE 0,5X pH=8, en frio. El almacenamiento de los plugs se realizó a 4°C en este buffer.

Tratamiento de ADN genómico con enzimas de restricción y corrida electroforética en geles de agarosa

Los plugs se colocaron en una placa de Petri y se cortaron en 3 partes, una de ellas es sometida al corte con la enzima *Xbal* (Promega) en 200 µl de solución de buffer provista por el productor conteniendo 30U, durante 4 horas a 37ºC. La reacción se detuvo con 500 µl de EDTA 0,5M a pH=8. Los 2/3 restantes del plug se volvieron a conservar a 4ºC en buffer TBE 0,5X pH=8 para futuras corridas.

Estos plugs digeridos se agregaron a un gel de agarosa al 1% (SeaKem GTG; FMC Bioproducts) preparada en buffer TBE 0,5X. Brevemente el procedimiento que se realizó fue el siguiente: la agarosa fundida se mantiene a 56°C y los plugs con el ADN digerido en 200 μl TBE 0,5X se enfriaron a 4°C. El peine para formar las calles se colocó horizontalmente y los pedacitos de plugs se colocaron en la punta de cada diente pegados con una gotita de agarosa, una vez fijos el peine se posicionó en la cama con los plugs apuntando en la dirección de migración. La agarosa fundida se agregó

cuidadosamente en la cama, se retiró el peine una vez que la agarosa estuvo sólida quedando los plugs embebidos en el gel de agarosa.

La electroforesis se llevó a cabo en buffer TBE 0,5X enfriada a 14°C, en un equipo CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories) a 6V/cm de ramping lineal de pulsos de 2,2 a 35,1 segundos con un ángulo de 120º y durante 19 horas.

Los geles se colorearon durante 40 minutos en 500 ml solución de bromuro de etidio 1 mg/ml. El bromuro de etidio no pegado se lava con agua destilada. Los fragmentos de ADN se visualizan en un trans iluminador de luz UV y se fotografían con un sistema Gel Doc 2000 (76).

La cepa vacunal BpTohamal se utilizó en cada gel como control externo de calidad y la reproducibilidad del patrón de bandas fue consistente con otros publicados anteriormente y entre corridas.

Toda esta metodología fue realizada de manera conjunta con los profesionales del ANLIS Malbran con quienes realizamos un trabajo de colaboración desde el año 2004.

Análisis de las imágenes y construcción de dendrograma

El software BioNumerics (Applied Maths Sint-Martens-Latem, Belgium) versión 3.5 se usó para normalizar las distancias de migración de los fragmentos de ADN relativas a aquellas obtenidas para la cepa *Salmonella braenderup* cepa H9812. Los fragmentos de ADN se analizaron con al menos una banda de discrepancia para discriminar entre perfiles. El diagrama de similitud de perfiles obtenidos del PFGE se construyó empleando el método de pares de grupos no pesados usando promedios aritméticos (UPGMA), con 1% de tolerancia de banda y 1% de optimización de parámetros. La similitud genética entre aislamientos (también expresado como porcentaje de similitud) se determinó de la semejanza en la distribución de tamaños de fragmentos usando el coeficiente de Dice: $D_{xy}=2M/(N_x+N_y)$ donde M es el número de fragmentos que concuerdan según su peso molecular, N_x es el número de fragmentos para el aislamiento x y N_y el correspondiente para el aislamiento y (4).

Todos los perfiles se verificaron mediante comparación visual.

Caracterización de cepas vacunales

Cinética de crecimiento microbiano empleando el medio sintético de Stainer Scholte

Para evaluar las cinéticas de crecimiento de las distintas cepas vacunales estudiadas se realizaron cultivos empleando el medio líquido Stainer-Scholte (SS) a 37ºC con agitación a 160 rpm. Para ello primeramente se obtuvo un pre inóculo en el medio SS a partir del desarrollo bacteriano de 24 hs en placa de BGAS. Luego se efectuó un subcultivo en medio líquido SS partiendo de una DO_{650nm} inicial de 0,25. Los cultivos fueron incubados hasta por los menos 36 tomando muestras cada una hora.

El desarrollo microbiando se evaluó mediante recuento de colonias en placas conteniendo medio BGAS. En los casos en que fue requerido realizar diluciones, las mismas se realizaron en forma seriada (1/10) en buffer PBS.

Otra metodología empleada para determinar el desarrollo microbiano fue mediante la medida de DO a 650nm (DO_{650nm}) en espectrofotómetro HITACHI U-1900 Spectrophotometer. Esta medida correlacionó con los recuentos en medio sólido por lo que se empleo esta mediada en la presentación de los resultados.

Detección de la toxina pertussis producida mediante técnicas de inmunoblot

Para la detección de la proteína PTx en preparaciones proteicas totales obtenidas de cultivos líquidos se utilizaron sedimentos bacterianos libres de medio de cultivo. El paquete celular se resuspendió en un volumen de agua bidestilada. Se agregó el volumen correspondiente a ¼ del anterior de Buffer de Laemmli 4X (Dodecil sulfato de sodio (SDS) 8% p/v, Glicerol 20% v/v, EDTA 0,004 M, Tris-HCl 0,2 M, pH 6,8, 0,01 % de azul de bromofenol) con 5 % v/v de β-mercaptoetanol. Luego de 15 minutos de ebullición, la muestra fue centrifugada durante 5 min a 14.000 xg y sembrada en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE 12,5% p/v). A este tipo de electroforesis también fueron sometidas las proteínas provenientes de sobrenadante de cultivos de las cepas vacunales de *B. pertussis* descriptos en la Tabla VI. 1. Los cultivos líquidos se realizaron según el protocolo previamente descripto. Brevemente, se partió de cultivos líquidos de 8 y 24 horas, se determinó la cantidad de células mediante la medida de DO_{650nm} de manera de poder comparar la producción de toxina

en base al mismo número de bacterias. Los sobrenadantes fueron centrifugados a 4ºC, 2 veces durante 1 hora a 8.000 xg. El sedimento bacteriano obtenido se descartó y las proteínas del sobrenadante se precipitaron a 4ºC durante al menos 12 horas con TCA 10% p/v. Luego se centrifugó a 4ºC durante 1 hora a 15.000 xg y el pellet obtenido se resuspendió en Buffer de Laemmli (102). Los geles de poliacrilamida para las proteínas totales y para la de los sobrenadantes se prepararon siguiendo el protocolo de Laemmli (102). El gel de apilamiento o stacking se preparó en una concentración de 4% de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 30:0.8) en buffer Tris-HCl 1M a pH 6,8 y SDS 10% p/v, mientras que el gel de separación se preparó en una concentración de 12,5% p/v de poliacrilamida (acrilamida : bisacrilamida 30:0.8), con Tris-HCl 1M a pH 8,8 y SDS 10 % p/v. Las corridas se realizaron en equipos Miniprotean II (BioRad) durante 40 a 60 min a 110 volts utilizando buffer de corrida (Glicina 0,37 M, SDS 10% p/v, Tris-HCl 0,05 M pH 8,3). Alternativamente se utilizó un equipo Höefer (Mighty Small™ SE245, Dual Gel Caster), en el que las corridas se realizaron a 100 volts durante 2,5 horas.

Las muestras de proteínas sometidas previamente a SDS- PAGE fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinildieno (PVDF) (Immobilon™, Millipore) utilizando el equipo Mini Trans-Blot transfer Cell (BioRad) según las indicaciones del fabricante. La eficiencia en la transferencia se verificó mediante la tinción reversible de las proteínas con Rojo Ponceau S (0,1% p/v de Rojo Ponceau en ácido acético 1% v/v) y el gel transferido se conservó para su tinción mediante tinción con plata. Luego se procedió al bloqueo de la membrana con leche en polvo descremada (San Regim[®]) 5% p/v en buffer TBS (Tris-HCl 12 mM, NaCl 4 mM). Seguidamente la membrana se trató con el anticuerpo a utilizar en una dilución 1/250 ó 1/500 en buffer TBS- leche 5 % p/v. La membrana con el anticuerpo se incubó ON a 4 ºC con agitación suave. Luego de retirar el anticuerpo y de lavar 6 veces con buffer TBS- leche 5 % p/v, se agregó el segundo anticuerpo específico de ratón o de humano conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson Immino Research Laboratories, Inc.) disuelto en TBS-leche en una dilución 1/1000. Se realizaron incubaciones de 2,5 h a temperatura ambiente con agitación suave. Luego de tres lavados con TBS y un lavado con buffer Fosfatasa Alcalina: 50mM NaCl, 2,5mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl pH 9,5. La membrana fue revelada empleando los sustratos NBT (Nitroblue Tetrazolium Chloride) y BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-

indolylphosphate p-toluidine) disueltos en buffer PA. Una vez que se desarrolló color se detuvo la reacción con agua bidestilada.

Identificación de componentes bacterianos inmunogénicos, comunes y diferenciales

Preparación de proteínas totales de B. pertussis crecidas en medio sólido

Las bacterias crecidas en medio sólido se resuspendieron de forma de obtener una suspensión de DO=10 (DO $_{650nm}$ para *B. pertussis* y DO $_{600nm}$ para E. coli). Estas suspensiones bacterianas fueron luego tratadas con Buffer de Laemmli (Dodecil sulfato de sodio (SDS) 8% p/v, Glicerol 20% v/v, EDTA 0.004 M, Tris-HCl 0.2 M, pH 6.8, 0.01 % de azul de bromofenol) con 5 % v/v β - mercaptoetanol. Antes de someterlas a corridas electroforética las muestras fueron calentadas a ebullición durante 15 minutos, centrifugas y sonicadas en baño para una mejor resolución de las mismas en los geles.

Electroforesis unidimensionales en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se empleó la metodología descripta más arriba. Una vez finalizada la corrida electroforética, los geles se tiñeron con Coomassie Blue R-250, Coomassie Coloidal o con nitrato de plata.

<u>Tinción Coomassie Blue R-250</u>: Para esta tinción el gel se incubó en solución de tinción (0.2% Coomassie Blue R-250 disuelto en agua bidestilada/metanol/ácido acético 45/45/10) por al menos 1 hora. Para la visualización de las bandas el gel se destiñó en una solución 50% agua bidestilada, 40% metanol y 10 % ácido acético.

<u>Tinción con Coomassie Coloidal G -250</u>: Las proteínas resueltas en los geles uni o bidimensionales se visualizaron mediante el método detección con Coomassie Coloidal. Brevemente, los pasos seguidos fueron los siguientes:

- 1) 3 incubaciones con solución de Fijación 1 conteniendo 30% etanol, 2% acido fosfórico, en agua bidestilada, cada una durante 30 minutos con agitación moderada.
- 2) 3 lavados con Solución de lavado conteniedno 2% de ácido fosfórico en agua bidestilada, cada una durante 20 minutos, con agitación moderada.

3) Fijación con 15 ml Solución de Fijación 2 conteniendo ácido fosfórico 2% v/v, etanol 18% v/v y sulfato de amonio 15% p/v en agua bidestilada durante 30 minutos con agitación moderada

- 4) A esta última solución se le adiciona 1,5% de su volumen de una suspensión de Coomassie coloidal (G-250) 2% en agua bidestilada. Se incuba al menos 24 horas, hasta el desarrollo completo de la tinción.
- 5) Para remover el background que pudiera quedar se empleó agua bidestilada.

<u>Tinción con Nitrato de Plata</u>: Luego de la corrida electroforética el gel se fija por al menos 2 horas en solución conteniendo: 50% metanol, 10% ac. acético y 40% agua. Posterioremente se procede al lavado del gel con etanol 50 % y una vez con etanol 30%. Se realiza luego un tratamiento con $Na_2S_2O_3$. 5 H_2O 0.02 % p/v durante 1 minuto con tres lavados posteriores de 20 segundos cada uno con agua bidestilada. Luego se incuba durante 20 minutos con solución de Ag NO_3 0.2 % p/v con 75 μ l de HCOH 37 %. Seguidamente se realizaron dos lavados de 20 segundos cada uno con agua bidestilada. Finalmente se revela con una solución de Na_2CO_3 6 % p/v, $Na_2S_2O_3$. 5 H_2O 0.4 mg/100 ml, 50 μ l de HCOH 37 %. Una vez que se observa la aparición de las bandas correspondientes se lava con agua bidestilada 2 veces de 2 minutos cada una. Luego se detiene la reacción con metanol 50 %, ácido acético 12 %.

Inmunodetecciones de proteínas (Inmunoblot)

Las muestras de proteínas sometidas previamente a corridas electroforéticas fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinildieno (PVDF) (Immobilon, Millipore) según se detalló más arriba. Los antisueros empleados para el revelado se obtuvieron del sangrado de ratones inmunizados con dos dosis de vacunas celulares preparadas en el laboratorio a partir de las cepas BpTohamal, Bp10536, Bp509 y Bp137. También se utilizó sueros de ratones sin inmunizar.

Las inmunizaciones de los ratones se realizaron mediante inyección i.p. de 3 ratones utilizando como adyuvante Al(OH)₃. Se realizaron dos inmunizaciones con intervalos de 14 días, después de las cuales los ratones fueron sangrados a blanco.

Análisis proteómico de muestras enriquecidas en proteínas de membrana

Obtención de muestras de proteínas enriquecidas en proteínas de membrana para la resolución en geles bidimensionales

Estas muestras fueron obtenidas a partir de cultivos en fase logarítmica (DO650 = 1). La biomasa obtenida en estos cultivos fue consechada por centrifugación durante 30 min a 10.000 xg a 4 $^{\circ}$ C. El sedimento obtenido se lavó dos veces con Buffer 3 mM KCl, 68 mM NaCl, 1,5mM KH2PO4 and 9 mM NaH $_{2}$ PO $_{4}$ (buffer Low Salting) y se resuspendió a una en buffer Tris 10 mM pH 8, conteniendo a un inhibidor de serino proteasas (PMSF, concentración final 0,25 mM) hasta alcanzar una DO $_{650 \text{ nm}}$ = 10.

La ruptura de las células se realizó mediante ultrasonido de acuerdo a la metodología descripta más arriba. Las células remanentes se separaron por centrifugación, 20 min x 10.000 gx 4ºC. Al lisado obtenido, libre de restos celulares, se le realizó un tratamiento con ADNasa (0.62 U ADNasa/ml de lisado) y ARNasa A (8 ul de 10mg/ml, cada10 ml de lisado) durante 1 hora a 37ºC. Posteriormente se procedió a ultracentrifugar (el lisado durante 1 hora a 100.000 xg (Rotor: 70Ti) a 4ºC en Ultracentrífuga Beckman. El sedimento obtenido corresponde a una fracción enriquecida en proteínas de membranas mientras que el sobrenadante así obtenido contiene las proteínas citoplasmáticas.

<u>Proteínas de membrana:</u> el pellet se resuspendió empleando buffer de rehidratación UTIT (7M urea, 2M tiourea, 10% isopropanol, 2% Triton 100) sin azul de bromofenol y se incubó ON a 4ºC para facilitar la completa solubilización.

Proteínas citoplasmáticas (sobrenadante): se procedió a la precipitación de las mismas con 4 volúmenes de acetona fría (4 horas a -20°C). Luego se centrifugó a 8.000rpm (Sorvall RC5, rotor GSA) durante 20 minutos a 4°C y se lavó el precipitado con 1 volumen de acetona 90% en agua bidestilada. El precipitado se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y se secó el pellet a temperatura ambiente. Una vez seco, se solubilizó el pellet con buffer de rehidratación (Urea 7M, tiourea 2M), sin azul de bromofenol.

Finalmente se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford y se verificó la calidad de la muestra mediante un SDS-PAGE unidimensional.

Cuantificación de proteínas

Se realizó mediante la técnica de Bradford (16) con reactivo comercial (BioRad) según indicaciones del fabricante. Se utilizó Seroalbúmina bovina (BSA por sus siglas en inglés) cómo estándar.

Electroforesis bidimensionales en geles de poliacrilamida

El isoelectroenfoque (IEF) fue realizado utilizando IPG strips (InmobilineTM DryStrip Amersham Biosciences-AB) con un rango de pH 4-7. El volumen final de la solución de rehidratación, incluida la muestra, fue de 125µl para rehidratar strips de 7 cm.

Para la rehidratación se trató a la muestra proteica conteniendo aproximadamente 500 μ g de proteína con 2 μ l de DTT 28% + 0.62 μ l de IPG buffer (anfolitos pH 4-7 Amersham Biosciences-AB) + azul de bromofenol 0.01% + buffer de rehidratación para membranas hasta completar los 125 μ l. Las tiras IPG se colocaron las tiras en la placa para rehidratación, cubiertas con aceite mineral (Cover Fluid, GE®) y se incubó durante por lo menos 12 horas a temperatura ambiente.

El IEF se realizó en el sistema Amersham Bioscience (Temp. 20ºC) según el siguiente programa: Paso 1: 500 volts 30 min step and hold, Paso 2: 1000 volts 30 min step and hold y Paso 3: 5000 volts 1 hora 40 min step and hold

El enfoque finalizó al alcanzar 8000 Vh. El strip se guardó a −80 ºC hasta su uso.

Previo a la corrida electroforética en geles SDS-PAGE se procedió a la reducción y alquilación de los tioles de la muestra. En primer lugar se incubó la tira previamente enfocada durante 1 hora con agitación fuerte en 4 ml de Buffer de Equilibración I (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6M urea, 30% glicerina, 2% SDS, en que se disolvieron en el momento 40 mg de DTT). Luego se incubó la tira durante 1 hora, con agitación fuerte, en 4 ml de Buffer Equilibración II (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6M urea, 30% glicerina, 2% SDS en el que se disolvieron 225 mg de Iodoacetamida inmediatamente antes del uso).

A continuación se equilibró la tira en el buffer de corrida (25mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3), se colocó la tira sobre un SDS-PAGE sin gel concentrador (12.5 % poliacrilamida, 10% p/v SDS y Tris HCl pH 8,8 1.5 M) y sobre este se agregó 1 ml de agarosa 0,5% fundida, en buffer de corrida con 0.01% azul de bromofenol.

Los geles se corrieron en equipos Miniprotean II (BioRad), a 40 V hasta que el frente de corrida alcanzó el final del gel.

Los geles fueron teñidos empleando las técnicas de Coomasie coloidal antes descriptas. La imagen de los geles de proteínas se obtuvo utilizando el adquisidor de imágenes Fluor-S Multilmager (Bio-Rad). Las imagénes fueron alineadas y analizadas utilizando el software Image Master™ 2D Platinum (GE Healthcare).

Identificación de proteínas mediante Espectrometría de Masa (EM), MALDI-TOF

Los spots de los geles bidimensionales teñidos fueron cortados del gel y transferidos a distintos pocillos de placas multi- well. Los mismos fueron lavados alternadamente con 100 µl de agua bidestilada y acetonitrilo (2 veces de 10 minutos con agitación moderada) para eliminar el colorante Coomassie Blue. Luego, los restos sulfhídricos fueron reducidos y alquilados. Se incubaron los spots con 20µl de una solución de DTT 5mM en bicarbonato de amonio 25mM (30 min a 60ºC), luego se lavaron con acetonitrilo y se incubaron con 20µl de iodoacetamida 55mM en bicarbonato de amonio 25mM; en oscuridad, durante 15 minutos y temperatura ambiente. Se realizó un nuevo lavado con bicarbonato de amonio 25mM y seguidamente los spots fueron deshidratados con 3 lavados con acetonitrilo. Cuando los spots estuvieron completamente blancos, deshidratados y libres de acetonitrilo eliminado por evaporación; éstos fueron rehidratados con pequeños volúmenes (15-20 μl) de 25 mM de bicarbonato de amonio conteniendo tripsina (20 µg/ml, Promega) e incubados durante 45 minutos a 4ºC. Una vez transcurrido este tiempo se verificó que los spots estuvieran perfectamente hidratados, se eliminó el exceso de tripsina, se cubrió los spots con una solución 25 mM de bicarbonato de amonio y se efectuó la digestión a 37ºC, ON. Luego los digestos fueron recuperados para su posterior análisis mediante espectrometría de masa.

Para realizar el análisis por espectrometría de masa se utilizó la matriz α- ciano-4 hidroxi - ácido cinámico, en una concentración 0,2 g/l preparada en una solución 50 % acetonitrilo / 0.25 % TFA. La muestra junto con la matriz en una relación 1:1 se colocó en el soporte MTP Anchor Chip™ 600/384 TF y dejó secar durante 10 minutos a temperatura ambiente previo al análisis por EM. El espectro de la muestra se obtuvo luego de shoteos suscesivos realizados empleando un equipo Ultraflex II Tof-Tof

(Bruker Daltonics). Los parámetros utilizados fueron los siguientes: potencia del láser 31-50 %, frecuencia del láser 100Hz, 100 shots por disparo, voltaje de aceleración 20 kV, detección de masa 800-3500 Da, señal deflectada por debajo de 850 Da, ganancia del detector 1650 V, ganancia electrónica 100mV. Los espectros fueron analizados utilizando el software Flex Analysis (Bruker Daltonics) y calibrados internamente utilizando los picos conocidos de autólisis de la tripsina.

La búsqueda e identificación de los péptidos fue realizada mediante el software MASCOT (Matrix Science a http://matrixscience.com) utilizando la base de datos derivada del secuenciamiento del genoma completo de В. pertussis (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Los parámetros de la búsqueda fueron los siguientes: (i) Especie, Bacteria (Eubacteria); (ii) Enzima, tripsina con posibilidad de un error en la digestión; (iii) modificaciones postraduccionales variables, oxidación de metioninas; (iv) modificaciones fijas, carbamidometilación;(v) tolerancia peptídica, ± 50 ppm;(vi) carga del pétido, +; y (vii) masa monoisotópica. Sólo fueron consideradas las identificaciones cuyo score fue mayor al score umbral definido por MASCOT como estadísticamente significativo (p<0.05).

La predicción de la localización celular de las proteínas identificadas se llevó a cabo utilizando el algoritmo PSORT (http://psort.nibb.ac.jp).

Estudios in vivo de la capacidad protectiva empleando el modelo de desafío intranasal en ratón

Preparación de vacunas en el laboratorio

Para inmunizar los ratones se utilizaron dosis correspondiente a 1/10, 1/20 y 1/200 de la dosis utilizada en humanos (DH): 1×10^9 UFC en 50 μ l de solución fisiológica inyectable (DH: $4 \text{ UI}=500 \ \mu$ l conteniendo $1 \times 10^{10} \text{ UFC}$).

Para preparar las vacunas se partió de un crecimiento de 24 horas en medio sólido BGAS, obtenido como se mencionó anteriormente. Se realizó una suspensión bacteriana en solución fisiológica inyectable estéril y a fin de eliminar restos de BGAS, previo a medir la DO_{650nm}, se realizó un lavado de la suspensión con solución fisiológica.

Para preparar la vacuna se tuvo en cuenta que para Bordetella una suspensión bacteriana de DO_{650nm} = 1 equivale a 3 x 10^9 UFC/ml. Una vez preparada la suspensión, para determinar efectivamente el número de UFC/dosis de vacunas se realizaron diluciones seriadas y recuento en placa en BGAS.

Posteriormente la suspensión bacteriana se detoxificó con formol al 0,35 % final (20 horas a 37°C) y las bacterias fueron muertas por calor (30 minutos a 56°C). La vacuna así obtenida de plaqueó en BGAS para determinar que no quedaran bacterias viables. Una vez verificado ésto, se agregó como adyuvante Al(OH)₃ (Biol SAIC) en una concentración final 1mg/ml. Las vacunas se conservaron a 4°C por no más de una semana.

Inmunización activa y desafío intranasal

después de 3-4 días de incubación a 37ºC.

Se utilizaron grupos de ratones Balb/c hembras (Biol SAIC) de 3 a 4 semanas de edad (5 para cada tratamiento). Los ratones fueron inmunizados 2 veces con intervalos de 15 días. Las inmunizaciones se realizaron mediante inyección intraperitoneal (i.p.), con $^{1}/_{10}$, $^{1}/_{20}$ o $^{1}/_{200}$ de DH preparada por nosotros a partir de las cepas vacunales BpTohamal, Bp509, Bp137 y Bp10536.

Para el desafio se utilizó una suspensión bacteriana realizada a partir de un crecimiento de 24 horas en BGAS. La infección se realizó por inoculación intranasal, en las narinas del ratón bajo leve anestesia, con 50 μ l de una suspensión conteniendo 5×10^7 - 1×10^8 bacterias (para preparar el inóculo se utilizó la relación $DO_{650} = 1 = 3\times10^9$ bacterias/ml) con la cepa de referencia Bp18323 o con el aislamiento clínico de B. pertussis Bp106. Para verificar el número de bacterias presentes en el inóculo, se realizaron diluciones seriadas de la suspensión bacteriana, se plaquearon en BGAS y luego de 3-4 días de incubación a 37° C se efectuó el recuento de bacterias viables. Los ratones desafiados fueron sacrificados mediante dislocación cervical luego de 2 horas del desafío (5 ratones) y luego a los 5 y 8 días post-desafío (5 ratones por punto). Se extrajeron los pulmones en esterilidad y se homogeneizaron (Pro Scientific

INC 200) en PBS. Luego se realizaron diluciones seriadas 1/10 de los homogenatos de

pulmón, se plaquearon en medio BGAS por duplicado y se realizó recuento de las UFC

Análisis estadístico

Los datos correspondientes a la media y desviaciones estándares de los recuentos de UFC/pulmón de ratón, correspondientes a los distintos tratamientos, fueron transformados a $Log_{10}(1+UFC)$. Para los recuentos de viables por debajo del límite de detección (<100 UFC/pulmón) se utilizó un valor correspondiente al Log_{10} de 50 UFC. Las diferencias entre $Log_{10}(UFC)$ de las medias entre los distintos grupos fueron analizadas mediante Test de ANOVA. Posteriormente se realizaron comparaciones múltiples y se establecieron diferencias entre grupos mediante los Test LSD y Tukey's HSD. Valores de p<0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software STATISTICA.

Referencias Bibliográficas

 Abramson, T., H. Kedem, and D. A. Relman. 2008. Modulation of the NFkappaB pathway by Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin. PLoS ONE 3:e3825.

- 2. **Abramson, T., H. Kedem, and D. A. Relman.** 2001. Proinflammatory and proapoptotic activities associated with Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin. Infect Immun **69:**2650-8.
- 3. **Advani, A., D. Donnelly, and H. Hallander.** 2004. Reference system for characterization of Bordetella pertussis pulsed-field gel electrophoresis profiles. J Clin Microbiol **42**:2890-7.
- 4. **Anderberg, M. R.** 1973. Cluster Analysis for Applications. Academic Press, New York.
- 5. Andorn, N., J. B. Kaufman, T. R. Clem, R. Fass, and J. Shiloach. 1990. Large-scale growth of Bordetella pertussis for production of extracellular toxin. Ann N Y Acad Sci **589**:363-71.
- 6. **Baillou, G.** 1965. Constitutio aestiva. Classic Description of Disease3rd ed. :210-212.
- 7. Banus, H. A., R. J. Vandebriel, H. de Ruiter, J. A. Dormans, N. J. Nagelkerke, F. R. Mooi, B. Hoebee, H. J. van Kranen, and T. G. Kimman. 2006. Host genetics of Bordetella pertussis infection in mice: significance of Toll-like receptor 4 in genetic susceptibility and pathobiology. Infect Immun 74:2596-605.
- 8. Bassinet, L., P. Gueirard, B. Maitre, B. Housset, P. Gounon, and N. Guiso. 2000. Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by Bordetella pertussis. Infect Immun 68:1934-41.
- 9. Bauche, C., A. Chenal, O. Knapp, C. Bodenreider, R. Benz, A. Chaffotte, and D. Ladant. 2006. Structural and functional characterization of an essential RTX subdomain of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. J Biol Chem 281:16914-26.
- Bergfors, E., B. Trollfors, J. Taranger, T. Lagergard, V. Sundh, and G. Zackrisson. 1999. Parapertussis and pertussis: differences and similarities in incidence, clinical course, and antibody responses. Int J Infect Dis 3:140-6.
- 11. Bisgard, K. M., P. Rhodes, B. L. Connelly, D. Bi, C. Hahn, S. Patrick, M. P. Glode, and K. R. Ehresmann. 2005. Pertussis vaccine effectiveness among children 6 to 59 months of age in the United States, 1998-2001. Pediatrics 116:e285-94.
- 12. **Bordet, J. G., O.** 1906. Le microbe de la coqueluche. Ann. Inst. Pasteur **20**:731-741.
- 13. Borisova, O., S. Y. Kombarova, N. S. Zakharova, M. van Gent, V. A. Aleshkin, I. Mazurova, and F. R. Mooi. 2007. Antigenic divergence between Bordetella pertussis clinical isolates from Moscow, Russia, and vaccine strains. Clin Vaccine Immunol 14:234-8.
- 14. Bottero, D., M. E. Gaillard, M. Fingermann, G. Weltman, J. Fernandez, F. Sisti, A. Graieb, R. Roberts, O. Rico, G. Rios, M. Regueira, N. Binsztein, and D. Hozbor. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms, and surfaceome analysis of vaccine and clinical Bordetella pertussis strains. Clin Vaccine Immunol 14:1490-8.

15. **Bouchez, V., D. Brun, T. Cantinelli, G. Dore, E. Njamkepo, and N. Guiso.** 2009. First report and detailed characterization of B. pertussis isolates not expressing pertussis toxin or pertactin. Vaccine.

- 16. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72**:248-54.
- 17. Brinig, M. M., C. A. Cummings, G. N. Sanden, P. Stefanelli, A. Lawrence, and D. A. Relman. 2006. Significant gene order and expression differences in Bordetella pertussis despite limited gene content variation. J Bacteriol 188:2375-82.
- Brockmeier, S. L., K. B. Register, T. Magyar, A. J. Lax, G. D. Pullinger, and R. A. Kunkle. 2002. Role of the dermonecrotic toxin of Bordetella bronchiseptica in the pathogenesis of respiratory disease in swine. Infect Immun 70:481-90.
- 19. **Carbonetti, N. H.** 2007. Immunomodulation in the pathogenesis of Bordetella pertussis infection and disease. Curr Opin Pharmacol **7:**272-8.
- 20. Carbonetti, N. H., G. V. Artamonova, R. M. Mays, and Z. E. Worthington. 2003. Pertussis toxin plays an early role in respiratory tract colonization by Bordetella pertussis. Infect Immun **71**:6358-66.
- 21. Carbonetti, N. H., G. V. Artamonova, N. Van Rooijen, and V. I. Ayala. 2007. Pertussis toxin targets airway macrophages to promote Bordetella pertussis infection of the respiratory tract. Infect Immun **75:**1713-20.
- 22. Caro, V., V. Bouchez, and N. Guiso. 2008. Is the Sequenced Bordetella pertussis strain Tohama I representative of the species? J Clin Microbiol 46:2125-8.
- 23. **Caro, V., A. Elomaa, D. Brun, J. Mertsola, Q. He, and N. Guiso.** 2006. Bordetella pertussis, Finland and France. Emerg Infect Dis **12**:987-9.
- 24. **Casey, J. R., and M. E. Pichichero.** 2005. Acellular pertussis vaccine safety and efficacy in children, adolescents and adults. Drugs **65:**1367-89.
- 25. Cassiday, P., G. Sanden, K. Heuvelman, F. Mooi, K. M. Bisgard, and T. Popovic. 2000. Polymorphism in Bordetella pertussis pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935-1999. J Infect Dis 182:1402-8.
- 26. **Connor, J. D.** 1970. Evidence for an etiologic role of adenoviral infection in pertussis syndrome. N Engl J Med **283**:390-4.
- 27. **Cotter, P. A., and A. M. Jones.** 2003. Phosphorelay control of virulence gene expression in Bordetella. Trends Microbiol **11**:367-73.
- 28. **Cotter, P. A., and J. F. Miller.** 2000. Genetic analysis of the Bordetella infectious cycle. Immunopharmacology **48:**253-5.
- 29. Coutte, L., S. Alonso, N. Reveneau, E. Willery, B. Quatannens, C. Locht, and F. Jacob-Dubuisson. 2003. Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen. J Exp Med 197:735-42.
- 30. **Crowcroft, N. S., and R. G. Pebody.** 2006. Recent developments in pertussis. Lancet **367**:1926-36.
- 31. **Crowcroft, N. S., C. Stein, P. Duclos, and M. Birmingham.** 2003. How best to estimate the global burden of pertussis? Lancet Infect Dis **3:**413-8.
- 32. **Cherry, J. D.** 2005. The epidemiology of pertussis: a comparison of the epidemiology of the disease pertussis with the epidemiology of Bordetella pertussis infection. Pediatrics **115**:1422-7.

33. **Cherry, J. D., J. Gornbein, U. Heininger, and K. Stehr.** 1998. A search for serologic correlates of immunity to Bordetella pertussis cough illnesses. Vaccine **16**:1901-6.

- 34. **Christie, P. J.** 2001. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. Mol Microbiol **40**:294-305.
- 35. de Melker, H. E., M. A. Conyn-van Spaendonck, H. C. Rumke, J. K. van Wijngaarden, F. R. Mooi, and J. F. Schellekens. 1997. Pertussis in The Netherlands: an outbreak despite high levels of immunization with whole-cell vaccine. Emerg Infect Dis 3:175-8.
- 36. **De Serres, G., N. Boulianne, M. Douville Fradet, and B. Duval.** 1995. Pertussis in Quebec: ongoing epidemic since the late 1980s. Can Commun Dis Rep **21:**45-8.
- 37. Delvecchio, V. G., J. P. Connolly, T. G. Alefantis, A. Walz, M. A. Quan, G. Patra, J. M. Ashton, J. T. Whittington, R. D. Chafin, X. Liang, P. Grewal, A. S. Khan, and C. V. Mujer. 2006. Proteomic profiling and identification of immunodominant spore antigens of Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Bacillus thuringiensis. Appl Environ Microbiol 72:6355-63.
- 38. **Di Sant Agnese, P. A.** 1949. Combined immunization against diphtheria, tetanus and pertussis in newborn infants, duration of antibody levels; antibody titers after booster dose; effect of passive immunity to diphtheria on active immunization with diphtheria toxoid. Pediatrics **3**:181-94.
- 39. Diavatopoulos, D. A., C. A. Cummings, L. M. Schouls, M. M. Brinig, D. A. Relman, and F. R. Mooi. 2005. Bordetella pertussis, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of B. bronchiseptica. PLoS Pathog 1:e45.
- 40. Dingle, K. E., F. M. Colles, D. R. Wareing, R. Ure, A. J. Fox, F. E. Bolton, H. J. Bootsma, R. J. Willems, R. Urwin, and M. C. Maiden. 2001. Multilocus sequence typing system for Campylobacter jejuni. J Clin Microbiol 39:14-23.
- 41. **Edwards, K. M.** 2001. Is pertussis a frequent cause of cough in adolescents and adults? Should routine pertussis immunization be recommended? Clin Infect Dis **32**:1698-9.
- 42. **Elder, K. D., and E. T. Harvill.** 2004. Strain-dependent role of BrkA during Bordetella pertussis infection of the murine respiratory tract. Infect Immun **72:**5919-24.
- 43. **Elomaa, A., A. Advani, D. Donnelly, M. Antila, J. Mertsola, H. Hallander, and Q. He.** 2005. Strain variation among Bordetella pertussis isolates in finland, where the whole-cell pertussis vaccine has been used for 50 years. J Clin Microbiol **43**:3681-7.
- 44. **Emsley, P., I. G. Charles, N. F. Fairweather, and N. W. Isaacs.** 1996. Structure of Bordetella pertussis virulence factor P.69 pertactin. Nature **381:**90-2.
- 45. Exposito Raya, N., M. Mestre Luaces, R. Silva Rodriguez, C. Nazabal Galvez, M. Pena Rivero, N. Martinez de la Puente, M. Font Batista, and G. Guillen Nieto. 1999. Preformulation study of the vaccine candidate P64k against Neisseria meningitidis. Biotechnol Appl Biochem 29 (Pt 2):113-7.

46. **Farizo, K. M., S. Fiddner, A. M. Cheung, and D. L. Burns.** 2002. Membrane localization of the S1 subunit of pertussis toxin in Bordetella pertussis and implications for pertussis toxin secretion. Infect Immun **70:**1193-201.

- 47. Feavers, I. M., S. J. Gray, R. Urwin, J. E. Russell, J. A. Bygraves, E. B. Kaczmarski, and M. C. Maiden. 1999. Multilocus sequence typing and antigen gene sequencing in the investigation of a meningococcal disease outbreak. J Clin Microbiol 37:3883-7.
- 48. **Fennelly, N. K., F. Sisti, S. C. Higgins, P. J. Ross, H. van der Heide, F. R. Mooi, A. Boyd, and K. H. Mills.** 2008. Bordetella pertussis expresses a functional type III secretion system that subverts protective innate and adaptive immune responses. Infect Immun **76:**1257-66.
- 49. Ferrari, G., I. Garaguso, J. Adu-Bobie, F. Doro, A. R. Taddei, A. Biolchi, B. Brunelli, M. M. Giuliani, M. Pizza, N. Norais, and G. Grandi. 2006. Outer membrane vesicles from group B Neisseria meningitidis delta gna33 mutant: proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles. Proteomics 6:1856-66.
- 50. **Fiett, J., I. Letowska, M. Gniadkowski, and W. Hryniewicz.** 2003. The new strategy for allele identification of the genes coding for pertussis toxin subunit S1 (ptx S1) and pertactin (prn) in Bordetella pertussis. J Microbiol Methods **55:**651-66.
- 51. **Fine, P. E., and J. A. Clarkson.** 1987. Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. Rev Infect Dis **9:**866-83.
- Fingermann, M., J. Fernandez, F. Sisti, M. E. Rodriguez, B. Gatti, D. Bottero, A. Graieb, M. E. Gaillard, S. G. Ayala, F. R. Mooi, H. Lopardo, and D. Hozbor. 2006. Differences of circulating Bordetella pertussis population in Argentina from the strain used in vaccine production. Vaccine 24:3513-21.
- 53. **Flak, T. A., and W. E. Goldman.** 1999. Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. Cell Microbiol **1:**51-60.
- 54. **Flak, T. A., L. N. Heiss, J. T. Engle, and W. E. Goldman.** 2000. Synergistic epithelial responses to endotoxin and a naturally occurring muramyl peptide. Infect Immun **68:**1235-42.
- 55. Floret, D., I. Bonmarin, P. Deutsch, J. Gaudelus, E. Grimprel, N. Guerin, N. Guiso, and I. Morer. 2005. [Action to be taken when facing one or more cases of whooping-cough]. Arch Pediatr 12:1281-91.
- 56. **Friedman, R. L., K. Nordensson, L. Wilson, E. T. Akporiaye, and D. E. Yocum.** 1992. Uptake and intracellular survival of Bordetella pertussis in human macrophages. Infect Immun **60**:4578-85.
- 57. Frosch, M., U. Edwards, K. Bousset, B. Krausse, and C. Weisgerber. 1991. Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in gramnegative bacteria expressing group II capsular polysaccharides. Mol Microbiol 5:1251-63.
- 58. Fry, N. K., S. Neal, T. G. Harrison, E. Miller, R. Matthews, and R. C. George. 2001. Genotypic variation in the Bordetella pertussis virulence factors pertactin and pertussis toxin in historical and recent clinical isolates in the United Kingdom. Infect Immun 69:5520-8.
- 59. **Fukui, A., and Y. Horiguchi.** 2004. Bordetella dermonecrotic toxin exerting toxicity through activation of the small GTPase Rho. J Biochem **136:**415-9.

60. **Gao, R., and A. M. Stock.** 2009. Biological insights from structures of two-component proteins. Annu Rev Microbiol **63:**133-54.

- 61. **Geuijen, C. A., R. J. Willems, and F. R. Mooi.** 1996. The major fimbrial subunit of Bordetella pertussis binds to sulfated sugars. Infect Immun **64:**2657-65.
- 62. **Ghosh, P.** 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. Microbiol Mol Biol Rev **68:**771-95.
- 63. Gilberg, S., E. Njamkepo, I. P. Du Chatelet, H. Partouche, P. Gueirard, C. Ghasarossian, M. Schlumberger, and N. Guiso. 2002. Evidence of Bordetella pertussis infection in adults presenting with persistent cough in a french area with very high whole-cell vaccine coverage. J Infect Dis 186:415-8.
- 64. **Gilchrist, M. J. R. B., . In A. Balows, W. J.Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy, and (ed.).** 1991. Manual of clinical microbiology, 5th ed ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 65. **Girard, D. Z.** 2002. Which strategy for pertussis vaccination today? Paediatr Drugs **4:**299-313.
- 66. **Gonzalez, S., A. Alvarez, E. Caballero, L. Vina, G. Guillen, and R. Silva.** 2000. P64k meningococcal protein as immunological carrier for weak immunogens. Scand J Immunol **52:**113-6.
- 67. **Goodnow, R. A.** 1980. Biology of Bordetella bronchiseptica. Microbiol Rev **44:**722-38.
- 68. Gotto, J. W., T. Eckhardt, P. A. Reilly, J. V. Scott, J. L. Cowell, T. N. Metcalf, 3rd, K. Mountzouros, J. J. Gibbons, Jr., and M. Siegel. 1993. Biochemical and immunological properties of two forms of pertactin, the 69,000-molecular-weight outer membrane protein of Bordetella pertussis. Infect Immun 61:2211-5.
- 69. **Gueirard, P., C. Weber, A. Le Coustumier, and N. Guiso.** 1995. Human Bordetella bronchiseptica infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. J Clin Microbiol **33:**2002-6.
- 70. Guillen, G., A. Alvarez, R. Silva, V. Morera, S. Gonzalez, A. Musacchio, V. Besada, E. Coizeau, E. Caballero, C. Nazabal, T. Carmenate, L. J. Gonzalez, R. Estrada, Y. Tambara, G. Padron, and L. Herrera. 1998. Expression in Escherichia coli of the lpdA gene, protein sequence analysis and immunological characterization of the P64k protein from Neisseria meningitidis. Biotechnol Appl Biochem 27 (Pt 3):189-96.
- 71. **Guiso, N., C. Capiau, G. Carletti, J. Poolman, and P. Hauser.** 1999. Intranasal murine model of Bordetella pertussis infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines. Vaccine **17**:2366-76.
- 72. **Gzyl, A., E. Augustynowicz, I. van Loo, and J. Slusarczyk.** 2001. Temporal nucleotide changes in pertactin and pertussis toxin genes in Bordetella pertussis strains isolated from clinical cases in Poland. Vaccine **20:**299-303.
- 73. **Halperin, S. A.** 2005. Pertussis--a disease and vaccine for all ages. N Engl J Med **353**:1615-7.
- 74. **Hall, E., R. Parton, and A. C. Wardlaw.** 1998. Responses to acellular pertussis vaccines and component antigens in a coughing-rat model of pertussis. Vaccine **16:**1595-603.
- 75. Hallander, H. O., A. Advani, D. Donnelly, L. Gustafsson, and R. M. Carlsson. 2005. Shifts of Bordetella pertussis variants in Sweden from 1970 to 2003,

during three periods marked by different vaccination programs. J Clin Microbiol **43**:2856-65.

- 76. Hardwick, T. H., P. Cassiday, R. S. Weyant, K. M. Bisgard, and G. N. Sanden. 2002. Changes in predominance and diversity of genomic subtypes of Bordetella pertussis isolated in the United States, 1935 to 1999. Emerg Infect Dis 8:44-9.
- 77. Harvill, E. T., A. Preston, P. A. Cotter, A. G. Allen, D. J. Maskell, and J. F. Miller. 2000. Multiple roles for Bordetella lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. Infect Immun **68:**6720-8.
- 78. Hazenbos, W. L., B. M. van den Berg, C. W. Geuijen, F. R. Mooi, and R. van Furth. 1995. Binding of FimD on Bordetella pertussis to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases. J Immunol 155:3972-8.
- 79. **He, Q., J. Makinen, G. Berbers, F. R. Mooi, M. K. Viljanen, H. Arvilommi, and J. Mertsola.** 2003. Bordetella pertussis protein pertactin induces type-specific antibodies: one possible explanation for the emergence of antigenic variants? J Infect Dis **187:**1200-5.
- 80. Heikkinen, E., T. Kallonen, L. Saarinen, R. Sara, A. J. King, F. R. Mooi, J. T. Soini, J. Mertsola, and Q. He. 2007. Comparative genomics of Bordetella pertussis reveals progressive gene loss in Finnish strains. PLoS ONE 2:e904.
- 81. Heikkinen, E., D. K. Xing, R. M. Olander, J. Hytonen, M. K. Viljanen, J. Mertsola, and Q. He. 2008. Bordetella pertussis isolates in Finland: serotype and fimbrial expression. BMC Microbiol 8:162.
- 82. **Hellwig, S. M., A. B. van Spriel, J. F. Schellekens, F. R. Mooi, and J. G. van de Winkel.** 2001. Immunoglobulin A-mediated protection against Bordetella pertussis infection. Infect Immun **69:**4846-50.
- 83. **Herbert, M., A. Kraiss, A. K. Hilpert, S. Schlor, and J. Reidl.** 2003. Aerobic growth deficient Haemophilus influenzae mutants are non-virulent: implications on metabolism. Int J Med Microbiol **293:**145-52.
- 84. **Hewlett, E. L.** 1997. Pertussis: current concepts of pathogenesis and prevention. Pediatr Infect Dis J **16:**S78-84.
- 85. **Hewlett, E. L., and K. M. Edwards.** 2005. Clinical practice. Pertussis--not just for kids. N Engl J Med **352**:1215-22.
- 86. **Higginbotham, T. W., and K. W. Cleveland.** 2008. Decreasing childhood pertussis infection through vaccination of the elderly. Consult Pharm **23:**976, 979-81.
- 87. Higgins, S. C., E. C. Lavelle, C. McCann, B. Keogh, E. McNeela, P. Byrne, B. O'Gorman, A. Jarnicki, P. McGuirk, and K. H. Mills. 2003. Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to Bordetella pertussis by inhibiting inflammatory pathology. J Immunol 171:3119-27.
- 88. Hoe, N., K. Nakashima, D. Grigsby, X. Pan, S. J. Dou, S. Naidich, M. Garcia, E. Kahn, D. Bergmire-Sweat, and J. M. Musser. 1999. Rapid molecular genetic subtyping of serotype M1 group A Streptococcus strains. Emerg Infect Dis 5:254-63.
- 89. **Hovinga, J., E. R. Kraal, and L. A. Roorda.** 1979. A follow-up of osteotomies for dysgnathia. J Maxillofac Surg **7:**271-82.

Hozbor, D., F. Mooi, D. Flores, G. Weltman, D. Bottero, S. Fossati, C. Lara, M. E. Gaillard, L. Pianciola, E. Zurita, A. Fioriti, D. Archuby, M. Galas, N. Binsztein, M. Regueira, C. Castuma, M. Fingermann, and A. Graieb. 2009. Pertussis Epidemiology in Argentina Trends Over 2004-2007. J Infect.

- 91. http://www.msal.gov.ar/htm/site/vacuna.cal2.asp, M. d. S. d. I. N., posting date. [Online.]
- 92. Hudson, P., T. S. Gorton, L. Papazisi, K. Cecchini, S. Frasca, Jr., and S. J. Geary. 2006. Identification of a virulence-associated determinant, dihydrolipoamide dehydrogenase (lpd), in Mycoplasma gallisepticum through in vivo screening of transposon mutants. Infect Immun 74:931-9.
- 93. **Inatsuka, C. S., S. M. Julio, and P. A. Cotter.** 2005. Bordetella filamentous hemagglutinin plays a critical role in immunomodulation, suggesting a mechanism for host specificity. Proc Natl Acad Sci U S A **102:**18578-83.
- 94. **Jones, A. L., R. H. Mertz, D. J. Carl, and C. E. Rubens.** 2007. A streptococcal penicillin-binding protein is critical for resisting innate airway defenses in the neonatal lung. J Immunol **179**:3196-202.
- 95. **Kendrick, P. L.** 1942. Use of Alum-Treated Pertussis Vaccine, and of Alum-Precipitated Combined Pertussis Vaccine and Diphtheria Toxoid, for Active Immunization. Am J Public Health Nations Health **32:**615-26.
- 96. **Kendrick, P. L., G. Eldering, M. K. Dixon, and J. Misner.** 1947. Mouse Protection Tests in the Study of Pertussis Vaccine: A Comparative Series Using the Intracerebral Route for Challenge. Am J Public Health Nations Health **37**:803-10.
- 97. **Khelef, N., A. Zychlinsky, and N. Guiso.** 1993. Bordetella pertussis induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. Infect Immun **61**:4064-71.
- 98. King, A. J., G. Berbers, H. F. van Oirschot, P. Hoogerhout, K. Knipping, and F. R. Mooi. 2001. Role of the polymorphic region 1 of the Bordetella pertussis protein pertactin in immunity. Microbiology **147**:2885-95.
- 99. **Kirimanjeswara, G. S., P. B. Mann, and E. T. Harvill.** 2003. Role of antibodies in immunity to Bordetella infections. Infect Immun **71:**1719-24.
- 100. **Kohn, G.** 1998. Cough of Perinthus. . The Wordsworth Encyclopedia of Plague and Pestilence:66.
- 101. Kuwae, A., M. Ohishi, M. Watanabe, M. Nagai, and A. Abe. 2003. BopB is a type III secreted protein in Bordetella bronchiseptica and is required for cytotoxicity against cultured mammalian cells. Cell Microbiol 5:973-83.
- 102. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-5.
- 103. Lapin, J. H. C. C. T. 1943. Whooping cough.
- 104. **Lenz, D. H., C. L. Weingart, and A. A. Weiss.** 2000. Phagocytosed Bordetella pertussis fails to survive in human neutrophils. Infect Immun **68:**956-9.
- 105. Li de la Sierra, I., L. Pernot, T. Prange, P. Saludjian, M. Schiltz, R. Fourme, and G. Padron. 1997. Molecular structure of the lipoamide dehydrogenase domain of a surface antigen from Neisseria meningitidis. J Mol Biol 269:129-41.
- 106. **Lieburg, M. J. v.** 1997. De Geschiedenis vas de Kindergeneeskunde in Nederland. Rotterdam; Erasmus Publishing **25:**159.

107. Lin, Y. C., S. M. Yao, J. J. Yan, Y. Y. Chen, M. J. Hsiao, C. Y. Chou, H. P. Su, H. S. Wu, and S. Y. Li. 2006. Molecular epidemiology of Bordetella pertussis in Taiwan, 1993-2004: suggests one possible explanation for the outbreak of pertussis in 1997. Microbes Infect 8:2082-7.

- 108. Madsen, T. 1925. Pertussis in Feroe Islands. Boston Med Surg J 192:50.
- 109. Madsen, T. 1933. Vaccination against Whooping cough. JAMA 101:187-188.
- 110. Makinen, J., J. Mertsola, M. K. Viljanen, H. Arvilommi, and Q. He. 2002. Rapid typing of Bordetella pertussis pertussis toxin gene variants by LightCycler real-time PCR and fluorescence resonance energy transfer hybridization probe melting curve analysis. J Clin Microbiol 40:2213-6.
- 111. Marr, N., D. C. Oliver, V. Laurent, J. Poolman, P. Denoel, and R. C. Fernandez. 2008. Protective activity of the Bordetella pertussis BrkA autotransporter in the murine lung colonization model. Vaccine **26**:4306-11.
- 112. Mastrantonio, P., P. Spigaglia, H. van Oirschot, H. G. van der Heide, K. Heuvelman, P. Stefanelli, and F. R. Mooi. 1999. Antigenic variants in Bordetella pertussis strains isolated from vaccinated and unvaccinated children. Microbiology 145 (Pt 8):2069-75.
- 113. Mata-Haro, V., C. Cekic, M. Martin, P. M. Chilton, C. R. Casella, and T. C. Mitchell. 2007. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. Science **316**:1628-32.
- 114. **Mattoo, S., and J. D. Cherry.** 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to Bordetella pertussis and other Bordetella subspecies. Clin Microbiol Rev **18:**326-82.
- 115. **Mattoo, S., and J. D. P. a. o. B. i. Cherry.** 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to Bordetella pertussis and other Bordetella subspecies. Clin Microbiol Rev **18:**326-82.
- 116. Mattoo, S., A. K. Foreman-Wykert, P. A. Cotter, and J. F. Miller. 2001. Mechanisms of Bordetella pathogenesis. Front Biosci **6**:E168-86.
- 117. **Mattoo, S., M. H. Yuk, L. L. Huang, and J. F. Miller.** 2004. Regulation of type III secretion in Bordetella. Mol Microbiol **52:**1201-14.
- 118. **McGuirk, P., and K. H. Mills.** 2000. Direct anti-inflammatory effect of a bacterial virulence factor: IL-10-dependent suppression of IL-12 production by filamentous hemagglutinin from Bordetella pertussis. Eur J Immunol **30:**415-22.
- 119. McKenzie, B. S., R. A. Kastelein, and D. J. Cua. 2006. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. Trends Immunol **27:**17-23.
- 120. Mills, K. H. 2001. Immunity to Bordetella pertussis. Microbes Infect 3:655-77.
- 121. **Mills, K. H., A. Barnard, J. Watkins, and K. Redhead.** 1993. Cell-mediated immunity to Bordetella pertussis: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. Infect Immun **61**:399-410.
- 122. **Mills, K. H., M. Ryan, E. Ryan, and B. P. Mahon.** 1998. A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against Bordetella pertussis. Infect Immun **66:**594-602.
- 123. Mooi, F. R., H. Hallander, C. H. Wirsing von Konig, B. Hoet, and N. Guiso. 2000. Epidemiological typing of Bordetella pertussis isolates:

recommendations for a standard methodology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **19:**174-81.

- 124. **Mooi, F. R., Q. He, H. van Oirschot, and J. Mertsola.** 1999. Variation in the Bordetella pertussis virulence factors pertussis toxin and pertactin in vaccine strains and clinical isolates in Finland. Infect Immun **67:**3133-4.
- 125. **Mooi, F. R., I. H. van Loo, and A. J. King.** 2001. Adaptation of Bordetella pertussis to vaccination: a cause for its reemergence? Emerg Infect Dis **7:**526-8.
- 126. Mooi, F. R., H. van Oirschot, K. Heuvelman, H. G. van der Heide, W. Gaastra, and R. J. Willems. 1998. Polymorphism in the Bordetella pertussis virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. Infect Immun 66:670-5.
- 127. **Moxon, E. R., and J. S. Kroll.** 1990. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. Curr Top Microbiol Immunol **150**:65-85.
- 128. Munoz, J. J., H. Arai, R. K. Bergman, and P. L. Sadowski. 1981. Biological activities of crystalline pertussigen from Bordetella pertussis. Infect Immun 33:820-6.
- 129. **Musser, J. M., E. L. Hewlett, M. S. Peppler, and R. K. Selander.** 1986. Genetic diversity and relationships in populations of Bordetella spp. J Bacteriol **166:**230-7.
- 130. Muyldermans, G., D. Pierard, N. Hoebrekx, R. Advani, S. Van Amersfoorth, I. De Schutter, O. Soetens, L. Eeckhout, A. Malfroot, and S. Lauwers. 2004. Simple Algorithm for Identification of Bordetella pertussis Pertactin Gene Variants. J Clin Microbiol 42:1614-9.
- 131. Nagamatsu, K., A. Kuwae, T. Konaka, S. Nagai, S. Yoshida, M. Eguchi, M. Watanabe, H. Mimuro, S. Koyasu, and A. Abe. 2009. Bordetella evades the host immune system by inducing IL-10 through a type III effector, BopN. J Exp Med 206:3073-88.
- 132. **Nelson, K. E., F. Gavitt, M. D. Batt, C. A. Kallick, K. T. Reddi, and S. Levin.** 1975. The role of adenoviruses in the pertussis syndrome. J Pediatr **86:**335-41.
- 133. Neo, Y., R. Li, J. Howe, R. Hoo, A. Pant, S. Ho, and S. Alonso. 2010. Evidence for an intact polysaccharide capsule in Bordetella pertussis. Microbes Infect 12:238-45.
- 134. **Njamkepo, E., T. Cantinelli, G. Guigon, and N. Guiso.** 2008. Genomic analysis and comparison of Bordetella pertussis isolates circulating in low and high vaccine coverage areas. Microbes Infect **10**:1582-6.
- 135. **Nogawa, H., A. Kuwae, T. Matsuzawa, and A. Abe.** 2004. The type III secreted protein BopD in Bordetella bronchiseptica is complexed with BopB for pore formation on the host plasma membrane. J Bacteriol **186**:3806-13.
- 136. **Ntezayabo, B., G. De Serres, and B. Duval.** 2003. Pertussis resurgence in Canada largely caused by a cohort effect. Pediatr Infect Dis J **22:**22-7.
- 137. **O'Neill, L. A.** 2006. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. Curr Opin Immunol **18:**3-9.
- 138. Panina, E. M., S. Mattoo, N. Griffith, N. A. Kozak, M. H. Yuk, and J. F. Miller. 2005. A genome-wide screen identifies a Bordetella type III secretion effector and candidate effectors in other species. Mol Microbiol **58**:267-79.
- 139. Parkhill, J., M. Sebaihia, A. Preston, L. D. Murphy, N. Thomson, D. E. Harris, M. T. Holden, C. M. Churcher, S. D. Bentley, K. L. Mungall, A. M. Cerdeno-

Tarraga, 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, and D. J. Maskell. 2003. Comparative analysis of the genome sequences of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica. Nat Genet 35:32-40.

- 140. Peppler, M. S., S. Kuny, A. Nevesinjac, C. Rogers, Y. R. de Moissac, K. Knowles, M. Lorange, G. De Serres, and J. Talbot. 2003. Strain variation among Bordetella pertussis isolates from Quebec and Alberta provinces of Canada from 1985 to 1994. J Clin Microbiol 41:3344-7.
- 141. **Pishko, E. J., D. J. Betting, C. S. Hutter, and E. T. Harvill.** 2003. Bordetella pertussis acquires resistance to complement-mediated killing in vivo. Infect Immun **71**:4936-42.
- 142. **Preston, A.** 2005. Bordetella pertussis: the intersection of genomics and pathobiology. CMAJ **173:**55-62.
- 143. **Preston, A., J. Parkhill, and D. J. Maskell.** 2004. The bordetellae: lessons from genomics. Nat Rev Microbiol **2:**379-90.
- 144. **Purdy, K. W., J. W. Hay, M. F. Botteman, and J. I. Ward.** 2004. Evaluation of strategies for use of acellular pertussis vaccine in adolescents and adults: a cost-benefit analysis. Clin Infect Dis **39:**20-8.
- 145. **Rambow-Larsen, A. A., and A. A. Weiss.** 2004. Temporal expression of pertussis toxin and Ptl secretion proteins by Bordetella pertussis. J Bacteriol **186:**43-50.
- 146. Rennels, M. B., M. A. Deloria, M. E. Pichichero, G. A. Losonsky, J. A. Englund, B. D. Meade, E. L. Anderson, M. C. Steinhoff, and K. M. Edwards. 2000. Extensive swelling after booster doses of acellular pertussis-tetanus-diphtheria vaccines. Pediatrics 105:e12.
- 147. **Robinson, V. L., D. R. Buckler, and A. M. Stock.** 2000. A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. Nat Struct Biol **7:**626-33.
- 148. Romano, F., M. L. Quintana C. de Dahaer, L. Bogni, P. Thumas, M. Moreschi, A. Pérez Maldonado, J. M. Maravilla, J. Telechea, M., and G. G. Batistesa, P. Lamy, and A. Gentile. 2002. . 2002. Brote de coqueluche en Esquel. Arch.Argent.Pediatr.:11-18.
- 149. **Ross, P. J., E. C. Lavelle, K. H. Mills, and A. P. Boyd.** 2004. Adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis synergizes with lipopolysaccharide to promote innate interleukin-10 production and enhances the induction of Th2 and regulatory T cells. Infect Immun **72:**1568-79.
- 150. **Roush, S. W., and T. V. Murphy.** 2007. Historical comparisons of morbidity and mortality for vaccine-preventable diseases in the United States. JAMA **298:**2155-63.
- 151. Sato, Y., K. Izumiya, H. Sato, J. L. Cowell, and C. R. Manclark. 1980. Aerosol infection of mice with Bordetella pertussis. Infect Immun 29:261-6.
- 152. Simpson, J. A. 1989 additions 1993-7. Oxford English Dictionary, 2nd edn. .

153. **Skinner, J. A., M. R. Pilione, H. Shen, E. T. Harvill, and M. H. Yuk.** 2005. Bordetella type III secretion modulates dendritic cell migration resulting in immunosuppression and bacterial persistence. J Immunol **175:**4647-52.

- 154. **Skinner, J. A., A. Reissinger, H. Shen, and M. H. Yuk.** 2004. Bordetella type III secretion and adenylate cyclase toxin synergize to drive dendritic cells into a semimature state. J Immunol **173**:1934-40.
- 155. Spensieri, F., G. Fedele, C. Fazio, M. Nasso, P. Stefanelli, P. Mastrantonio, and C. M. Ausiello. 2006. Bordetella pertussis inhibition of interleukin-12 (IL-12) p70 in human monocyte-derived dendritic cells blocks IL-12 p35 through adenylate cyclase toxin-dependent cyclic AMP induction. Infect Immun 74:2831-8.
- 156. **Stainer, D. W., and M. J. Scholte.** 1970. A simple chemically defined medium for the production of phase I Bordetella pertussis. J Gen Microbiol **63:**211-20.
- 157. **Standfast, A. F.** 1958. The comparison between field trials and mouse protection tests against intranasal and intracerebral challenges with Bordetella pertussis. Immunology **1:**135-43.
- 158. **Storsaeter, J., H. O. Hallander, L. Gustafsson, and P. Olin.** 1998. Levels of antipertussis antibodies related to protection after household exposure to Bordetella pertussis. Vaccine **16**:1907-16.
- 159. **Strebel, P., J. Nordin, K. Edwards, J. Hunt, J. Besser, S. Burns, G. Amundson, A. Baughman, and W. Wattigney.** 2001. Population-based incidence of pertussis among adolescents and adults, Minnesota, 1995-1996. J Infect Dis **183**:1353-9.
- 160. **Sturdy, P. M., S. D. Court, and P. S. Gardner.** 1971. Viruses and whooping-cough. Lancet **2:**978-9.
- 161. Tanaka, M., C. R. Vitek, F. B. Pascual, K. M. Bisgard, J. E. Tate, and T. V. Murphy. 2003. Trends in pertussis among infants in the United States, 1980-1999. JAMA 290:2968-75.
- 162. Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 33:2233-9.
- 163. **Tsang, R. S., A. K. Lau, M. L. Sill, S. A. Halperin, P. Van Caeseele, F. Jamieson, and I. E. Martin.** 2004. Polymorphisms of the fimbria fim3 gene of Bordetella pertussis strains isolated in Canada. J Clin Microbiol **42:**5364-7.
- 164. **Tsang, R. S., M. L. Sill, I. E. Martin, and F. Jamieson.** 2005. Genetic and antigenic analysis of Bordetella pertussis isolates recovered from clinical cases in Ontario, Canada, before and after the introduction of the acellular pertussis vaccine. Can J Microbiol **51:**887-92.
- 165. van Amersfoorth, S. C., L. M. Schouls, H. G. van der Heide, A. Advani, H. O. Hallander, K. Bondeson, C. H. von Konig, M. Riffelmann, C. Vahrenholz, N. Guiso, V. Caro, E. Njamkepo, Q. He, J. Mertsola, and F. R. Mooi. 2005. Analysis of Bordetella pertussis populations in European countries with different vaccination policies. J Clin Microbiol 43:2837-43.
- van der Zee, A., F. Mooi, J. Van Embden, and J. Musser. 1997. Molecular evolution and host adaptation of Bordetella spp.: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences. J Bacteriol 179:6609-17.

167. van der Zee, A., S. Vernooij, M. Peeters, J. van Embden, and F. R. Mooi. 1996. Dynamics of the population structure of Bordetella pertussis as measured by IS1002-associated RFLP: comparison of pre- and post-vaccination strains and global distribution. Microbiology 142 (Pt 12):3479-85.

- 168. van der Zeijst, B. A., M. I. Dijkman, W. Luytjes, A. J. van Alphen, and G. P. van den Dobbelsteen. 2007. On the design of national vaccination programmes. Vaccine 25:3143-5.
- 169. van Gent, M., D. Pierard, S. Lauwers, H. G. van der Heide, A. J. King, and F. R. Mooi. 2007. Characterization of Bordetella pertussis clinical isolates that do not express the tracheal colonization factor. FEMS Immunol Med Microbiol 51:149-54.
- 170. van Loo, I. H., K. J. Heuvelman, A. J. King, and F. R. Mooi. 2002. Multilocus sequence typing of Bordetella pertussis based on surface protein genes. J Clin Microbiol 40:1994-2001.
- 171. Van Loo, I. H., and F. R. Mooi. 2002. Changes in the Dutch Bordetella pertussis population in the first 20 years after the introduction of whole-cell vaccines. Microbiology 148:2011-8.
- 172. van Loo, I. H., H. G. van der Heide, N. J. Nagelkerke, J. Verhoef, and F. R. Mooi. 1999. Temporal trends in the population structure of Bordetella pertussis during 1949-1996 in a highly vaccinated population. J Infect Dis 179:915-23.
- 173. **Walker, K. E., and A. A. Weiss.** 1994. Characterization of the dermonecrotic toxin in members of the genus Bordetella. Infect Immun **62:**3817-28.
- 174. Ward, J. I., J. D. Cherry, S. J. Chang, S. Partridge, H. Lee, J. Treanor, D. P. Greenberg, W. Keitel, S. Barenkamp, D. I. Bernstein, R. Edelman, and K. Edwards. 2005. Efficacy of an acellular pertussis vaccine among adolescents and adults. N Engl J Med 353:1555-63.
- 175. Weber, C., C. Boursaux-Eude, G. Coralie, V. Caro, and N. Guiso. 2001. Polymorphism of Bordetella pertussis isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years. J Clin Microbiol 39:4396-403.
- 176. **Wendelboe, A. M. V. R. A., Salmaso S., Englund J.A.** 2005. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. Pediatr Infect Dis J **24 (5 supl):**58-61.
- 177. **WHO World Health Organization.** 1979. Expert Committee on Biologycal Standardization, 30th report.
- 178. **WHO.** 1964. International requirements for biological substances. Annex I. Requirements for pertussis vaccine. **274:**25-40.
- 179. Willems, R. J., J. Kamerbeek, C. A. Geuijen, J. Top, H. Gielen, W. Gaastra, and F. R. Mooi. 1998. The efficacy of a whole cell pertussis vaccine and fimbriae against Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis infections in a respiratory mouse model. Vaccine 16:410-6.
- 180. Wolfe, D. N., G. S. Kirimanjeswara, E. M. Goebel, and E. T. Harvill. 2007. Comparative role of immunoglobulin A in protective immunity against the Bordetellae. Infect Immun **75**:4416-22.
- 181. Woolfrey, B. F., and J. A. Moody. 1991. Human infections associated with Bordetella bronchiseptica. Clin Microbiol Rev 4:243-55.

182. Yuk, M. H., E. T. Harvill, and J. F. Miller. 1998. The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in Bordetella bronchiseptica. Mol Microbiol 28:945-59.

183. **Zaretzky, F. R., M. C. Gray, and E. L. Hewlett.** 2002. Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of Bordetella pertussis: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction. Mol Microbiol **45:**1589-98.

