



Biblioteca Central  
Fac. Cs. Exactas  
U.N.L.P

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
Facultad de Ciencias Exactas.  
Departamento de Ciencias Biológicas.



GENÓMICA FUNCIONAL DE *Bordetella pertussis*,  
IMPLICANCIAS SOBRE UNA ENFERMEDAD CONSIDERADA  
REEMERGENTE.

TESIS  
Nº 1237

María Emilia Gaillard

Tesis Doctoral 2009

DONACION.....

23.04.2010

Inv. E..... Inv..... B. 50769


*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 de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata bajo la dirección de la Dra. Daniela Hozbor.*

### **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.

A la Agencia Nacional de Promoción de Ciencia y Técnica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de las becas que posibilitaron mi dedicación exclusiva a la investigación científica.

# INDICE

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

Pertussis o tos convulsa, una enfermedad que sigue vigente	8
La enfermedad. Manifestaciones Clínicas	10
Agente causal	13
<i>Bordetella pertussis</i>	16
Proceso de infección y pato-fisiología.	16
Factores de virulencia	16
Regulación de los factores de virulencia	28
Respuesta del sistema inmune a a infección con <i>B. pertussis</i> .	32
Medidas de control contra la enfermedad. Vacunas	36
Epidemiología	39
Situación en Argentina	40
Resurgencia de la enfermedad. Hipótesis que podrían explicar el aumento de la incidencia	46
Objetivos	50

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

Cepas y aislamientos de <i>B. pertussis</i>	53
Medios y condiciones de cultivo para <i>B. pertussis</i>	54
Vacunas	55
Cepas de <i>E. coli</i> y plásmidos	56
Medio y condiciones de cultivo para <i>E. coli</i>	56
Preparación de proteínas totales	56
Obtención de cubiertas de <i>B. pertussis</i>	57
Obtención de proteínas de sobrenadante de cultivo de <i>B. pertussis</i>	57
Cuantificación de proteínas	57
Electroforesis unidimensionales en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	57
Tinción Coomassie Blue	58
Tinción con Nitrato de Plata	58
Obtención de muestras de proteínas enriquecidas en proteínas de membrana	58

para la resolución en geles bidimensionales	58
Electroforesis bidimensionales en geles de poliacrilamida	59
Rehidratación de las tiras para isoelectroenfoque	59
Isoelectroenfoque (IEF)	59
SDS-PAGE	60
Tinción con Coomassie Coloidal G -250	60
Adquisición y análisis de imagen	60
Identificación de proteínas mediante Espectrometría de Masa (EM)	60
Digestión trípica in-gel	60
Obtención de la huella peptídico mediante espectrometría de masa (EM)	61
Identificación de proteínas	61
Extracción de ADN genómico	61
Extracción de ARN total	62
Determinación de concentración de ácidos nucleicos	62
Electroforesis en geles de agarosa	62
Revelado geles de agarosa	63
Transcripción Reversa	63
Amplificación por PCR de ADNc	63
Clonado, expresión y purificación de la proteína Bsp22	
Amplificación por PCR y clonado del ORF del gen bsp22	64
Expresión de la proteína recombinante tag-(His) <sub>6</sub> -Bsp22	65
Purificación mediante cromatografía de afinidad de de la proteína His <sub>6</sub> -Bsp22	65
Inmunodetecciones de proteínas (Inmunoblot)	66
Obtención de antiseros policlonales en ratones	67
Criterio de selección de sueros humanos	67
Infección intranasal	67
Inmunización activa y desafío intranasal	67
Análisis estadístico	68

### **CAPITULO III**

#### **CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN CIRCULANTE DE *Bordetella pertussis* MEDIANTE ESTRATEGIAS PROTEÓMICAS.**

<b>INTRODUCCION</b>	<b>74</b>
---------------------	-----------

#### **PARTE I**

Identificación de componentes bacterianos inmunogénicos, comunes y diferenciales, entre la cepa vacunal y la población circulante de <i>B. pertussis</i>	75
--	----

Proteoma de membrana de la cepa vacunal Tohama y los aislamientos clínicos Bp006 y Bp106	77
Análisis transcripcional de las proteínas expresadas diferencialmente en los proteomas de membrana	88
<b>PARTE II</b>	
Evaluación de la expresión del Sistema de Secreción Tipo III (TTSS) funcional en aislamientos clínicos	105
Caracterización de propiedades inmunogénicas de Bsp22	112
<b>CONCLUSIONES</b>	114
<b>CAPITULO IV</b>	
<b>ESTUDIO DE LA RELEVANCIA DE LA DIVERGENCIA EN LA PROTECCIÓN CONTRA PERTUSSIS</b>	
Introducción	117
Modelo Murino de Infección	117
Estandarización del método de desafío sub-lethal intranasal	119
Evaluación de la protección conferida por inmunización con la vacuna de uso local frente a la Población Bacteriana Circulante (PBC)	121
Empleo del modelo animal de desafío intranasal utilizando como vacuna una formulación preparada a partir de aislamientos locales	124
Modelo de Coinfección y desafío múltiple. Marcado de las cepas a utilizar	126
Verificación de la estabilidad del plásmido. Cinética de infección	128
Evaluación de la protección	128
Evaluación de la protección conferida por inmunizaciones locales (PBC) frente a una cepa de desafío estándar y a otros aislamientos clínicos	128
Conclusiones	129
<b>CAPITULO V</b>	
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	132
<b>CAPITULO VI</b>	
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	136

# **CAPITULO I**

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## PERTUSSIS O TOS CONVULSA, UNA ENFERMEDAD QUE SIGUE VIGENTE.

Pertussis, coqueluche, tos ferina, tos convulsa son todos sinónimos para nombrar una enfermedad respiratoria aguda que luego de más de 60 años de vacunación aún produce en el mundo 30-40 millones de casos por año con más de 300 000 muertes (42, 188)

Esta enfermedad es una de las “pestes” de la infancia que aún sobrevive al avance de las ciencias médicas; pero que a diferencia de éstas, no tiene una larga historia en la humanidad (129). La primera mención de coqueluche se encuentra en *Moulton's The Mirror of Health* en 1540, pero también se hace referencia frecuentemente a un escrito de Nils Rosen van Rosenstein que sugiere que la enfermedad surgió en Francia en 1414. La primera descripción completa corresponde a Leo Schenk y Roger Baillon en el siglo XVI. Willis, Sydenham y Ettmüller la complementaron en el siglo XVII.

Hasta el advenimiento del siglo XX se creía fuertemente que el causante de la enfermedad era un hongo(120). De hecho, en 1870 Letzerich describió la existencia de hongos en 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 filamentosos que denominó *Ustilago maidis var Capnodium citri*. En 1883 ambos postulados fueron rebatidos por Burger, quien publicó el hallazgo de un bacilo pequeño y elipsoidal en la expectoración de los “coqueluchosos”. Sin embargo, la hipótesis de la etiología fúngica de coqueluche persistió hasta 1906, año en que Jules Bordet y Octave Gengou aislaron al agente causal. Estos autores describieron sus hallazgos con estas palabras: “*La pululación, 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*”.

A Bordet y Gengou, además de Burger en 1883, los antecedieron otros autores: Afanassjew en 1887 describió al agente causal como un bacilo pero no pudo cultivarlo, tarea en la que también fracasaron Czaplewski y Hensel. Diez años después Koplík cultivó en agar ascitis colonias perladas compatibles con las hoy descritas para *Bordetella pertussis*. Por la misma época, Spengler cultivó una bacteria similar. En 1901, Jochmann y Krause aislaron en agar sangre, del esputo de paciente, un bacilo que llamaron *Bacillus pertussis Eppendorf*, en honor del sector de Hamburgo donde se encontraba su Hospital. Si bien todos estos antecedentes existieron, el mérito de Bordet y Gengou no radica sólo en haber diseñado el medio de agar sangre-papa-glicerol que lleva sus nombres, sino, y fundamentalmente, haber logrado relacionar la sintomatología de la enfermedad con la presencia del bacilo. No obstante, el decenio que siguió al descubrimiento estuvo pleno de discusiones que sólo culminaron con los trabajos de Chievitz y Meyer en 1915, reafirmando las conclusiones de Bordet y Gengou.

Grandes dudas ha suscitado siempre el 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”). Mucho más oscuro es el origen del término usado por los franceses, *coqueluche*. Al respecto, existen al menos dos teorías: una es onomatopéyica y lo hace derivar del vocablo *coq* (gallo) refiriéndose



al sonido con que culminan las quintas de tos características de la enfermedad. La otra hace derivar a *coqueluche* de *coqueluchon*, que habría designado una caperuza aislante que se ponía a los niños tosedores, quizá la que usaban los primitivos 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*".

## LA ENFERMEDAD. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La tos convulsa (*pertussis*) es una enfermedad respiratoria aguda que se caracteriza por presentar una tos progresiva, repetitiva y con paroxismos. La duración de la enfermedad en los casos que cursan sin complicaciones, es de 6 a 12 semanas. El período de incubación normalmente se extiende entre 7 a 14 días. Luego de este período de incubación, la enfermedad se desarrolla en tres períodos secuenciales que se denominan: *catarral*, *paroxístico* y *de convalecencia* (31, 129). El *período de catarral* o *invasión* tiene una duración de una a dos semanas y se caracteriza por presentar manifestaciones clínicas propias de los fenómenos inflamatorios de las vías aéreas superiores. Comienza con una tos leve, seca, molesta y de predominio nocturno. Se acompaña de síntomas y signos inespecíficos tales como coriza, rinorrea, lagrimeo y ocasionalmente fiebre leve o moderada. Al final de este período la tos comienza a ser más frecuente y severa. Durante este período el agente etiológico, *Bordetella pertussis*, puede ser aislado a partir de las secreciones nasofaríngeas de los pacientes.

El *período paroxístico* también llamado convulsivo o espasmódico tiene una duración de 1- 6 semanas aunque puede persistir hasta diez semanas. Se caracteriza por estallidos o paroxismos de numerosos y rápidos accesos de tos propios de la enfermedad; aparentemente debido a la dificultad de expeler una mucosidad densa del tracto broncoalveolar. Antecediendo al ataque de tos se presentan síntomas de "aura" (cosquilleo, picor, opresión). El primer movimiento respiratorio que inicia la crisis es una inspiración no ruidosa, seguida de inmediato por una serie de sacudidas rápidas (de cinco a veinte) con el tórax fijo en inspiración. Luego se produce apnea que a veces puede llevar a la cianosis y finalmente termina con una inspiración profunda, sibilante y ruidosa (estridor). Junto con el paroxismo pueden ocurrir abultamiento de los ojos, salivación, lagrimeo y distensión de las venas del cuello. El paroxismo está asociado normalmente a una expectoración de una secreción mucosa clara, muy adherente. El vómito post-tusivo es común. En ocasiones se presentan convulsiones.

Los paroxismos ocurren más frecuentemente durante la noche, con un promedio de 15 ataques durante el día. Entre ataque y ataque los niños no parecen estar enfermos.

Durante las primeras dos semanas de este estadio los ataques se incrementan en frecuencia, permanecen al mismo nivel durante 2 ó 3 semanas y luego gradualmente disminuyen. Los pacientes pueden presentar pérdida de peso y ocasionalmente hipoglucemia. En este período es característica la leucocitosis (20 000 a 100 000 células/ml) con absoluta linfocitosis.

Durante este período es cuando usualmente se sospecha de la enfermedad y paradójicamente la confirmación de la misma en el laboratorio mediante el diagnóstico microbiológico resulta progresivamente más difícil.

La recuperación del paciente es gradual, y está asociada a una disminución en la frecuencia de los paroxismos y subsecuentemente a una disminución en la severidad de los mismos. El *período de convalecencia* tiene así una duración que es función de la gravedad de la enfermedad. Usualmente la tos

desaparece en 2 o 3 semanas. En algunos casos persisten accesos en forma aislada (tic coqueluchoide) que se mantienen durante tres o cuatro meses.

Dentro de las complicaciones de la enfermedad (89) se describen convulsiones, neumonía, encefalopatía y muerte; con mayor frecuencia ésta última en el primer año de vida (Tabla I.1).

Tabla I.1. Complicaciones de la Tos Convulsa

Convulsiones	0.8 %
Neumonía	5.2 %
Encefalopatía	0.1 %
primer mes de vida	1.3 %
Muerte	0.3 %
entre 2 y 11 meses de vida	

Hampl et al. 1995.

La neumonía puede constituir un evento primario en respuesta a la infección con *B. pertussis* o puede ser debida a un infección secundaria con otro patógeno. Esta última constituye la mayor causa de las muertes asociadas a pertussis. Las convulsiones y las encefalopatías son probablemente debidas a la hipoxia cerebral relacionada a los paroxismos severos. Otras complicaciones incluyen pneumotórax, epistaxis, hemorragia subconjuntival, ruptura del diafragma, hernia umbilical e inguinal, prolapso rectal, fractura de costilla y deshidratación.

Las manifestaciones clínicas antes descritas son las clásicas de pertussis, que se observan con más frecuencia en la infección primaria en niños no inmunizados (129, 176). Sin embargo existen distintos factores que condicionan la presentación clínica de la enfermedad. Entre estos factores podemos mencionar la infección o inmunización previa, tratamiento con antibióticos, sexo y edad. El estado de vacunación cambia significativamente la presentación clínica de la enfermedad siendo ésta más severa en los niños no inmunizados. La duración de los síntomas, particularmente la tos espasmódica, es menor en los niños vacunados. El tratamiento con antibióticos (ej. eritromicina), si se realiza tempranamente, reduce la severidad y la duración de la enfermedad pero no modifica el curso de la infección pero disminuiría la transmisión (129).

Se ha reportado que las niñas poseen un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad en forma severa. En relación con la edad, la severidad de la enfermedad se observa en los niños más pequeños, siendo particularmente grave en niños menores de 1 año de edad en los cuales tasas de hospitalización y riesgo de muerte son altos. En los menores de 6 meses la tos puede ser débil; siendo los síntomas principales la apnea y la cianosis. La enfermedad en niños mayores, adolescentes y adultos jóvenes previamente inmunizados es frecuentemente atípica (129, 184). Puede transcurrir como una infección asintomática o con síntomas leves de enfermedad respiratoria presentando tos persistente y prolongada habitualmente durante semanas a meses. En algunos casos sin embargo la enfermedad puede presentarse con la sintomatología clásica. Se ha reportado que adultos inmunizados por previa infección (no por

inmunización) son más propensos a cursar la enfermedad con los síntomas típicos (129, 191). En los últimos veinte años se ha reportado que las infecciones por pertussis en adolescentes y adultos son comunes y más aún que el número de casos se ha incrementado de manera sostenida (87, 97, 114)

## AGENTE CAUSAL

El principal agente etiológico de la enfermedad es *Bordetella pertussis*. *Bordetella parapertussis* también es capaz de causar la enfermedad aunque en general la sintomatología es más moderada (8). Estas especies pertenecen al género *Bordetella* incluido en la subclase  $\beta$  de las Proteobacterias. Las bacterias de este género son cocobacilos pequeños (0.2  $\mu\text{m}$  por 0.7  $\mu\text{m}$ ), Gram negativos, aerobios estrictos (con excepción de *B. petrii*) con un metabolismo no fermentativo.

Hasta el momento se han identificado 10 especies dentro del género *Bordetella*: *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* (humana), *B. parapertussis* (ovina), *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. petrii* y *B. ansorpii* (124) (Tabla I. 2).

El contenido de GC de las diferentes especies se encuentra entre 61 y 68 % y su temperatura de crecimiento óptimo está comprendida entre 35 y 37 °C. Todas las especies aglutinan eritrocitos de una gran variedad de mamíferos. Varias de las especies pueden ser distinguidas a través de pruebas bioquímicas.

De todas las especies, las más estudiadas son *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*. *B. pertussis*, agente etiológico de la tos convulsa, es un patógeno obligado del hombre sin evidencia, hasta el momento, de reservorios animales o ambientales.

*Bordetella parapertussis* produce en humanos una sintomatología similar a pertussis pero no causa linfocitosis; y en ovinos causa neumonía crónica.

*Bordetella bronchiseptica* presenta un amplio rango de hospedadores posibles, causando enfermedad respiratoria en diversos mamíferos incluyendo perros, gatos, conejos, ovejas, roedores, caballos, cerdos y osos. Recientemente se ha detectado la presencia de *B. bronchiseptica* en humanos, con un claro aumento de su incidencia en dicho hospedador en los últimos años. Usualmente la infección en humanos está asociada a hospedadores severamente comprometidos. Las infecciones causadas por esta especie son típicamente crónicas, asintomáticas y difíciles de eliminar mediante terapias con antibióticos.

A pesar de las diferencias presentadas respecto del rango de hospedadores y de la variedad de los síntomas de la enfermedad, se ha sugerido considerar a estos tres patógenos como subespecies de *B. bronchiseptica* con distintas adaptaciones (44, 50). Estas tres especies están relacionadas al nivel de secuencia de nucleótidos. Distintos análisis filogenéticos del género *Bordetella*, entre los que se destacan electroforesis de campo pulsante, análisis de secuencia y distribución de IS, hibridaciones ADN-ADN y comparación de secuencias de RNA 16s y 23s sugieren que *B. pertussis* y *B. parapertussis* surgieron independientemente de un ancestro común como *B. bronchiseptica*. Además comparaciones de secuencias de genomas de cepas representativas de cada especie confirman que hay similitud de secuencias nucleotídicas en regiones conservadas del genoma pero demuestran la evolución de *B. pertussis* y *B. parapertussis* a partir de *B. bronchiseptica* por pérdida de genoma (44).

Tabla I.2. Principales características de las especies del género *Bordetella*

	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. hinzii</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. trematum</i>	<i>B. ansorpi</i>	<i>B. petrii</i>
Hospedador	Hombre	Hombre, ovejas	Mamíferos, incluyendo al hombre Rinitis atrófica en cerdos, tos ferina en perros y gatos, infecciones respiratorias en humanos	Hombre	Aves y hombre	Aves y reptiles	Hombre	Hombre	Hombre
Enfermedad	Tos convulsa	Tos convulsa leve		Septicemia, enfermedad respiratoria	Septicemia	Enfermedad respiratoria en el pavo	Infecciones en heridas, otitis media	Infecciones oportunistas	Infecciones oportunistas
Lugar de aislamiento	Tracto respiratorio	Tracto respiratorio	Tracto respiratorio, sangre	Tracto respiratorio, sangre	Tracto respiratorio, sangre	Tracto respiratorio	Heridas, oído	Herida	Infección /Medio ambiente
Contenido G+C (% en moles)	66-68	66-68	66-68	61.5-62.3	65-67	62	64-65	ND	63.8
Tamaño del genoma (Kpb)	4086	4773	5338	ND	ND	3730	ND	ND	5287
Crecimiento en agar MacConkey	-	Variable	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+		+	+	+	+	ND	ND
Producción de ureasa	-	+(24 hs)	+(4 hs)	-	variable	-	-	-	-
Oxidasa	+	-	+	-	+	+	-	-	+
Asimilación de Citrato	+	+	+	+	+	+	-	ND	ND
Movilidad	-	-	+	-	+	+	-	+	-

Las tres subespecies presentan un sistema de control de la virulencia similar, codificado por el locus *bvg* (*Bordetella virulence genes*) y expresan una serie de factores comunes asociados a la colonización y virulencia.

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

## **BORDETELLA PERTUSSIS.**

### **Proceso de infección y pato-fisiología.**

Como se ha descrito más arriba, *B. pertussis* es un patógeno humano que es encontrado exclusivamente en el tracto respiratorio. Al igual que otros patógenos, el proceso infeccioso de esta bacteria comienza con la colonización y culmina en la diseminación a otros hospedadores. Es decir, la bacteria ingresa a las vías aéreas del hospedador mediante gotitas o aerosoles que contienen al patógeno y una vez dentro del mismo se adhiere a la mucosa nasofaríngea causando una inflamación leve en la zona. Esta fase de adhesión constituye, como en toda infección, la etapa inicial y crítica de la colonización. *B. pertussis* muestra tropismo por la cilia de la mucosa respiratoria, las cuales constituyen el principal sitio de infección de esta bacteria. Además de presentar tropismo por el epitelio traqueal, *B. pertussis* se adhiere a otros tipos celulares como los macrófagos alveolares, las células dendríticas y diferentes líneas de células epiteliales no ciliadas (155). La colonización es seguida por la proliferación sobre la superficie ciliada de la mucosa resultando en ciliostasis, daño en la epitelio respiratorio, inducción de la liberación de mucus, influencia inflamatoria en el lumen del tracto respiratorio e inhibición de funciones de células del sistema inmune del hospedador. La disrupción de la función normal de la mucosa ciliada y el daño del epitelio respiratorio son las patologías primarias asociada con la infección de *B. pertussis*

En 1943 Lapin ha revisado los datos *post-mortem* disponibles de chicos que fallecieron a causa de pertussis (130). Muy poca información ha sido agregada en los últimos 60 años y no existe información disponible respecto a los casos típicos de pertussis en pacientes que han sobrevivido. La mayoría de los pacientes, cuyo caso de pertussis fue fatal, muestran bronconeumonía debido probablemente a la infección secundaria con otra bacteria. El estado inicial de la infección comienza con congestión e infiltración de la mucosa por linfocitos y leucocitos polimorfonucleares y el lumen del bronquio contiene restos celulares a causa de la inflamación. Se ha sugerido que la lesión pulmonar inicial en pertussis es la hiperplasia linfoide del los nódulos linfáticos peribronquiales y traqueobronquiales. Asimismo, se ha reportado que pueden ocurrir necrosis y descamación de las capas superficiales epiteliales de los bronquios pequeños.

Estudios realizados con el modelo de infección intranasal en ratones permitieron analizar las distintas etapas de la infección causada por *B. pertussis* (138). En este modelo animal se pudo observar que el patógeno 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. Estas células

están distribuidas en todo el pulmón. Se observó inflamación del parénquima pulmonar con aflujo de linfocitos, mientras que el exudado intra-alveolar estaba compuesto principalmente por monocitos. Una afluencia de células T  $\gamma\delta$  también se ha observado en pulmones de ratones en la infección temprana así como un rápido reclutamiento de células dendríticas se ha reportado en ratas infectadas.

El patrón de infiltración celular en pulmones luego de una infección con pertussis es diferente en animales inmunes y está significativamente influenciado por el método utilizado para alzar la respuesta inmune. No sorprendentemente, el curso de la infección es menos prolongado y el influjo de células es más transitorio en animales inmunizados (138).

Para el desarrollo de cada una de las etapas de infección la bacteria requiere de una serie de factores, mucho de los cuales ya han sido identificados y caracterizados. A continuación describiremos los aspectos más sobresalientes de cada uno de ellos.

### Factores de virulencia

Las bacterias del género *Bordetella* expresan una serie de factores, denominados factores de virulencia, involucrados en la interacción patógeno -hospedador (Figura I.1).

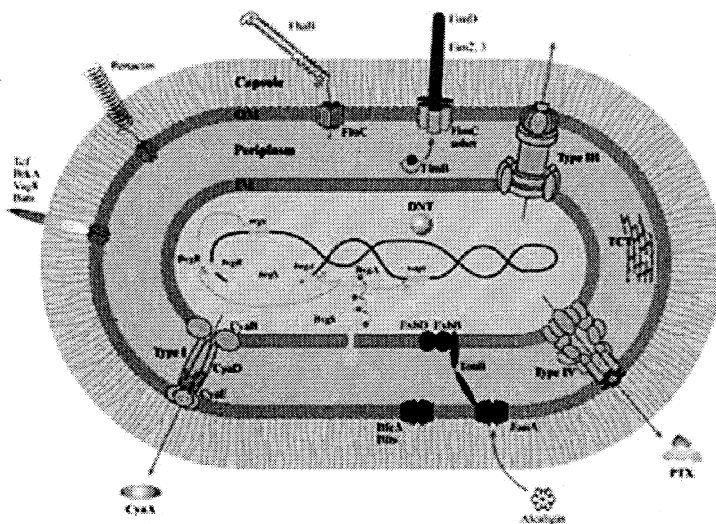


Figura I.1. Adhesinas y toxinas de *B. pertussis* ([www.ibl.fr/u447/u447.htm](http://www.ibl.fr/u447/u447.htm))

Entre los factores de virulencia se encuentran adhesinas, como hemaglutinina filamentosa, fimbrias y pertactina las cuales le permiten al patógeno sobrevivir en el tracto respiratorio del hospedador al mediar la adhesión al epitelio ciliado, macrófagos y neutrófilos. Estas bacterias también expresan toxinas como adenilato ciclasa - hemolisina, toxina dermonecrótica, toxina pertussis (sólo en *B. pertussis*) y lipopolisacárido, así como sistemas más complejos como el sistema de secreción tipo III.



Estas toxinas son conocidas por contribuir a la patogénesis y en muchos de los casos estar involucradas en la protección o evasión del sistema inmune. A continuación se describen las principales características de cada uno de las toxinas y adhesinas de *B. pertussis*.

### Adhesinas

**Hemaglutinina filamentosa (FHA).** Esta proteína (220 kDa) es considerada la principal adhesina producida por *B. pertussis* (129). Está asociada a la superficie de la bacteria y además es secretada al medio extracelular para facilitar la adhesión del patógeno a las células epiteliales ciliadas. Presenta una estructura filamentosa de 2 nm de diámetro y 45-50 nm de longitud que consiste en 19 hojas plegadas  $\beta$  que formarían un barril  $\beta$  que atraviesa la membrana externa. La estructura de esta proteína resulta del plegamiento de la cadena polipeptídica formando una horquilla dividida en tres partes. Las regiones N y C terminales de la cadena polipeptídica forman la cabeza de la horquilla, la región RGD (compuesta por el triplete arginina-glicina-aspartico) forma la cola y el resto forma la región central, que mantiene la integridad de la estructura.

El gen estructural de esta adhesina, *fhaB*, tiene aproximadamente 10.1 kb y codifica para una proteína precursora de Fha 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. La secreción de FHA requiere de una región de 115 aminoácidos presente en el extremo N terminal de FhaB. El precursor de la adhesina presenta una región de 22 aminoácidos iniciales seguida de un segmento catiónico y un fragmento hidrofóbico que actuaría como un péptido señal de inusual tamaño (71 aminoácidos) que es removido antes de la exportación. La proteólisis del péptido señal se realiza en un sitio consenso para la peptidasa de región líder (Lep), lo que sugiere que FhaB atraviesa la membrana interna por un mecanismo sec dependiente. El tercio C terminal de FhaB actuaría como chaperona en este proceso de secreción, estabilizando a la proteína, previniendo el plegado incorrecto de la misma y permitiendo el reconocimiento por parte del sistema Sec (131).

FHA posee varios dominios involucrados en la adhesión a las superficies del hospedador. Estos incluyen unión a fagocitos mediada por integrinas, unión a azúcares sulfatados de la matriz extracelular y de las células epiteliales y adhesión a células epiteliales ciliadas. La región responsable de esta adhesión es un dominio tipo lectina que se denomina CRD (Carbohydrate Recognition Domain) y se encuentra entre los residuos 1141 y 1279 de FHA. Este dominio tiene afinidad particular por carbohidratos y glicolípidos y participa en la unión de la bacteria a las células ciliadas y a los macrófagos.

Fha también puede unirse a heparina y a glicolípidos sulfatados no cargados. La región que permite esta adhesión comprende los aminoácidos 442-863 ubicados en el extremo amino terminal de la proteína que también es responsable de la actividad hemaglutinante.

El dominio RGD participa en la unión a receptores de la familia de las integrinas. Estos receptores se encuentran en la superficie de los macrófagos alveolares y en las células ciliadas del epitelio respiratorio y

contienen un dominio glucosídico con afinidad por los glicolípidos unidos a lactosa. El dominio RGD facilitaría la unión de FHA al receptor CR3 presente en la superficie de los macrófagos, y la formación de un complejo formado por la integrina LR1 y su proteína asociada CD47 presente en la membrana del leucocito. La acción cooperativa de FHA y las fimbrias permitiría la unión de la bacteria a los macrófagos, su posterior internalización y persistencia intracelular, sin activar el mecanismo de estallido respiratorio. Además, la unión a CR3 permitiría que una menor cantidad de toxinas liberadas eliminen eficientemente a neutrófilos y macrófagos.

Recientemente se ha demostrado la capacidad de *B. pertussis* para inhibir la proliferación de los linfocitos T a antígenos exógenos y FHA estaría involucrada en este proceso. Además, la interacción de esta proteína con los receptores de macrófagos inhibiría 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. FHA también sería capaz de inducir un proceso apoptótico en monocitos y células epiteliales de pulmón(138).

**Fimbrias (Fim).** Las fimbrias o aglutinógenos son estructuras filamentosas de naturaleza proteica que se extienden de la superficie bacteriana y participan en la adhesión de *Bordetella* (131). Las fimbrias están formadas por subunidades mayores y menores. Las subunidades mayores, Fim2 y Fim3 se disponen en forma apilada para formar la estructura helicoidal característica de las fimbrias. Estas subunidades son proteínas de 22 kDa y 22.5 kDa codificadas en dos loci cromosomales no ligados, *fim2* y *fim3*, respectivamente. Un tercer locus, *fimX* es expresado sólo en bajos niveles y recientemente se identificó un nuevo locus, *fimN*, en *B. bronchiseptica*. Además de la regulación positiva por BvgAs, los genes *fim* están sujetos a variación de fase por corrimiento del marco de lectura dentro de una región rica en citocinas ubicadas entre las regiones -10 y -35 de los promotores de *fim2*, *fim3*, *fimX* y *fimN* (189). En *B. pertussis* se encuentra un gen truncado, *fimA*, localizado en el extremo 5' del cluster *fimBCD*. Recientemente se demostró que *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis* son capaces de expresar esta subunidad. El promotor de *fimA* no contiene región rica en citocinas, y por lo tanto no estaría sometido a variación de fase. Este mecanismo afecta la transcripción de los genes fimbriales independientemente y la bacteria puede expresar en cualquier momento Fim2, Fim3, FimX, FimN, o combinaciones de las mismas. Todas las fimbrias comparten la subunidad menor FimD, de aproximadamente 40 kDa, que se ubica en el extremo distal de la adhesina. El gen *fimD* está localizado dentro del operón de biogénesis de las fimbrias downstream de *fimB* y *fimC*. El operón *fimBCD* está localizado entre los genes *fhaB* y *fhaC* requeridos para la síntesis y procesamiento de FHA. Más aún, *fimBCD* y *fhaC* se expresan a partir de un único promotor, el de *fimB* y son transcriptos en forma acoplada. Los productos del cluster *fimBCD* presentan homología con los genes *pap* de *E. coli* involucrados en la producción del pili de esta bacteria. En base a la homología de secuencia aminoacídica se ha propuesto que FimB (como PapD) actuaría como chaperona responsable de evitar la degradación de las fimbrias en el espacio periplásmico. FimC (como su homóloga PapC) permitiría el transporte de las subunidades de la fimbria a través de la membrana y participaría del posterior anclaje a la misma. Una mutación en cualquiera de los genes del locus *fimBCD* resulta en la pérdida completa de

la estructura fimbrial sobre la superficie de la bacteria. Esto sugiere que fimBCD constituye el único locus funcional para la biogénesis de la fimbria en el cromosoma de *Bordetella*.

En las primeras etapas de la infección de *Bordetella* las fimbrias pueden mediar la unión de la bacteria al epitelio respiratorio del hospedador (138). La subunidad menor, FimD, estaría involucrada en la adhesión a células epiteliales y monocitos, mientras que las subunidades mayores son capaces de adherirse a heparán sulfato, condroitín sulfato y dextrán sulfato, oligosacáridos presentes en el tracto respiratorio de todos los mamíferos.

Estudios *in vivo* realizados con mutantes Fim<sup>-</sup> han determinado el rol de las fimbrias en la infección y en la habilidad de *B. pertussis* para multiplicarse y persistir en la nasofaringe y tráquea del hospedador. Además, las fimbrias estarían involucradas en la generación de la respuesta inmune del hospedador, ya que la respuesta humoral desarrollada en las infecciones realizadas con estos mutantes es cualitativamente diferente y cuantitativamente menor a la desarrollada por las cepas salvajes. Estos resultados sugieren que las interacciones mediadas por las fimbrias con células epiteliales y con monocitos/macrófagos participarían no sólo en la adhesión, sino también en la naturaleza y magnitud de la respuesta inmune del hospedador.

**Pertactina (PRN).** La pertactina es una proteína autotransportadora presente en la membrana externa de *Bordetella* spp. que participa en el proceso de adhesión de bacteria al hospedador (131). Esta proteína posee un peso molecular de 68 kDa en *B. bronchiseptica*, 69 kDa en *B. pertussis* y de 70 kDa en *B. parapertussis*. La PRN es la primer proteína caracterizada en el género *Bordetella* dentro del grupo de proteínas que se autotransportan hacia la membrana externa. Estas proteínas son secretadas al espacio periplásmico por un mecanismo Sec dependiente y posteriormente se autoprocetan mediante clivaje proteolítico sobre su extremo C-terminal.

El polipéptido precursor de la PRN, P.93, tiene 93.5 kDa y es codificado a partir del gen *prn*. Este polipéptido es procesado proteolíticamente, eliminándose un polipéptido señal de 34 aminoácidos del extremo N-terminal y un polipéptido de 30 kDa (P.30) del extremo C-terminal. Este péptido participaría en el mecanismo de la secreción de la pertactina debido a que ha sido detectada su presencia en la membrana externa de la bacteria y presenta alta homología dentro de las especies del género.

La estructura de la PRN obtenida mediante cristalografía (56) sugiere que está formada por 16 cadenas paralelas  $\beta$ -hélice con una sección transversal en forma de V, siendo la mayor estructura  $\beta$ -hélice conocida hasta el momento (Figura 1.2). La estructura secundaria contiene dos regiones inmunodominantes de repeticiones. La región 1, (GGXXP)<sub>n</sub>, se encuentra ubicada a continuación del tripéptido RGD involucrado en la adhesión a las células del hospedador; y la región 2, (PQP)<sub>n</sub>, se encuentra en el extremo C terminal. Esta región es considerada el epítope inmunoprotector de mayor importancia.

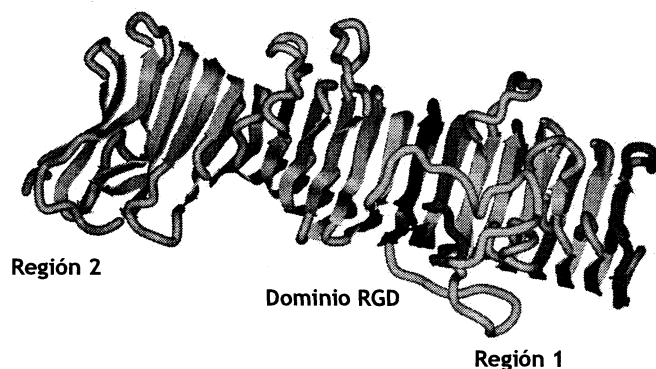


Figura 1.2. Estructura de la pertactina. Adaptado de Stenger et al. Infect. Immun, 2009

Con respecto a la función de esta proteína como adhesina existen datos contrapuestos (138). La PRN podría tener un rol en la adhesión a monocitos pero no a células epiteliales. Sin embargo, parecería que esta proteína no tendría un rol de importancia en la persistencia, debido a que mutantes de *B. pertussis* PRN<sup>-</sup> son capaces de colonizar y multiplicarse en el tracto respiratorio de ratones.

La importancia de la pertactina reside en que actúa como antígeno inmunoprotector. Los anticuerpos contra PRN han sido correlacionados con la protección. La región 1 es reconocida por el sistema inmune y la variación polimórfica de ésta afecta la unión de anticuerpos (36, 110, 138, 175). Actualmente se observa divergencia entre el tipo de pertactinas de las cepas vacunales y las de la población bacteriana circulante (141-143). Este fenómeno se considera una de las causas principales de la reemergencia de pertussis y lo analizaremos más adelante.

## Toxinas

**Toxina pertussis (PTX).** *B. pertussis* es la única especie del género que sintetiza y secreta esta toxina. Si bien *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* contienen en sus genomas al operón que la codifica, la expresión de PTX está silenciada debido a mutaciones en la región promotora (152). El peso molecular de PTX es de 106 kDa, está compuesta de 6 subunidades denominadas S1-S5 que están presentes en una proporción 1:1:1:2:1 (Figura 1.3). Cada subunidad es sintetizada con una secuencia señal en el extremo N-terminal, sugiriendo que el transporte hacia el espacio periplásmico ocurre vía un sistema de exportación general, análogo al sistema sec de *Escherichia coli* (129). Una vez clivado el péptido señal, la toxina es ensamblada en el espacio periplásmico y transportada a través de la membrana externa por un sistema de secreción tipo IV. Este sistema está compuesto de nueve proteínas Ptl (Pertussis toxin liberation). Los genes ptIA-I están localizados en la misma unidad transcripcional que los genes ptxA-E, los cuales codifican las subunidades de PTX.

La PTX posee la estructura clásica de las exotoxinas bacterianas AB. El monómero A está compuesto por la subunidad S1 y posee actividad ADP ribosiltransferasa (129, 138). El oligómero B posee estructura de anillo, está formado por las subunidades S2, S3, S4 y S5 y es el responsable de la unión de la toxina a las células blanco. Se une a glicoproteínas de superficie, incluidos lactosilceramida y gangliósidos, de una variedad de células de mamíferos, incluidas ciliadas, macrófagos y linfocitos. 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.

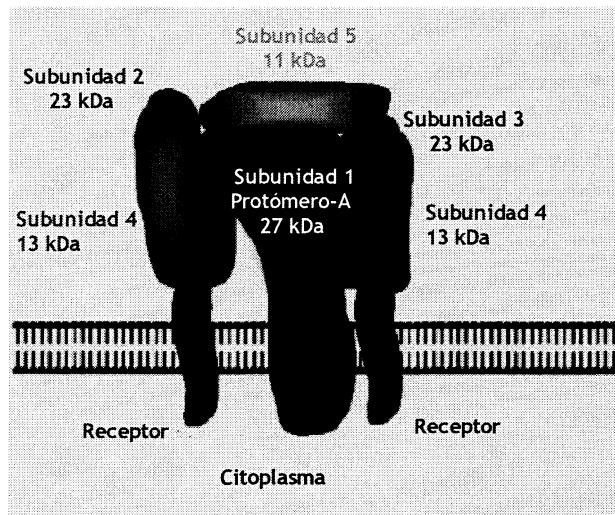


Figura 1.3. Esquemática de la estructura de la toxina pertussis

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  $\text{NAD}^+$  hacia la subunidad  $\alpha$  de proteínas G, 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 células del sistema inmune. PTX es capaz de inhibir la quimiotaxis de macrófagos (*in vivo*) y 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  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 e IL-6. PTX también es responsable de muchos de los efectos sistémicos de la infección de *B. pertussis* como linfocitosis, sensibilización a histamina, aumento de la secreción de insulina y respuestas neurológicas.

Comúnmente, la mayor parte de los síntomas presentes en la tos convulsa han sido atribuidos a la acción de la toxina pertussis, considerando a la infección causada por *B. pertussis* una infección mediada por PTX. Sin embargo, el rol de esta toxina en la colonización, infección y/o transmisión de pertussis no ha sido aún completamente determinado. Recientemente se ha sugerido que PTX sería importante en los primeros estadios de la infección (24) probablemente por un mecanismo que retarda el reclutamiento de neutrófilos y su afluencia a las vías respiratorias. También se ha demostrado que PTX posee una actividad inmunomoduladora; es capaz de reducir las habilidades de los anticuerpos anti-*B. pertussis* para eliminar la infección, reducir las moléculas MHCII sobre la superficie de monolitos y modular los marcadores de superficie de las células dendríticas (22). Al igual que la pertactina la toxina pertussis también posee epítopos protectores polimórficos, situados en la subunidad S1 y en la S3 (143).

**Adenilato ciclasa-Hemolisina (AC-Hly).** La AC-Hly es una proteína bifuncional que es secretada por todas las especies de *Bordetella* que infectan mamíferos (129, 131). Pertenece a la familia de citotoxinas formadoras de poro y dependientes de calcio conocidas como toxinas RTX (repeticiones en toxinas). Estas toxinas contienen un arreglo de repeticiones en tándem de 9 aminoácidos (L-X-G-G-X-G (N/D)-D-X) que están involucrados en la unión a calcio. Esta toxina se caracteriza por ser expresada sólo en el estado virulento de la bacteria y por esto es considerada un marcador de dicho estado. La toxina AC-Hly es codificada por el gen *cyaA*, el cual forma parte de un operón (*cyaABDE*) cuyos productos génicos están involucrados en la secreción y activación de esta proteína. La secreción de la toxina sólo ocurre cuando se expresan los genes *cyaB*, *cyaD* y *cyaE*. La expresión de *cyaC*, el cual está localizado adyacente al operón *cyaABDE* y se transcribe independientemente, es necesaria para la activación de la AC-Hly. La activación consiste en una modificación postraduccional de la proteína, más precisamente CyaC cataliza la adición de ácido palmítico en un residuo de lisina interno (Lys<sub>983</sub>).

La AC-Hly es sintetizada como una protoxina monomérica de 1706 aminoácidos. La actividad adenilato ciclasa está localizada en los primeros 400 aminoácidos del extremo N - terminal y es activada por calmodulina. Los 1300 aminoácidos restantes de la toxina forman el dominio hemolisina, que es capaz de formar canales selectivos en las membranas de los eritrocitos causando hemólisis. Este dominio es responsable también de la adhesión e internalización de la toxina dentro de la célula eucariota.

El ingreso de la toxina a la célula hospedadora utiliza un sistema especializado dependiente de calcio y temperatura. Este consta de tres etapas: inserción, translocación y clivaje.

En la inserción la toxina es integrada a la membrana plasmática, posiblemente a través de gangliósidos presentes en la superficie de la célula eucariota. Para que este proceso sea exitoso es necesaria la modificación transcripcional realizada por CyaA y la integridad de la región C-terminal. La inserción del monómero de AC-Hly permite la salida de K<sup>+</sup>, este proceso es necesario para la posterior oligomerización de al menos tres monómeros de CyaA que se encuentran insertos en la membrana. La posterior translocación a través de la membrana plasmática requiere la presencia de concentraciones milimolares de calcio y temperaturas superiores a 15 °C. La región rica en glicina y aspartato que caracteriza a las toxinas RTX posee una alta afinidad por los iones calcio y presenta cambios conformacionales al producirse la unión de dicho ión, lo que sugiere su participación en este proceso. Una vez dentro de la célula, la AC-Hly es clivada por una proteasa intracelular, liberando de esta forma el dominio ciclasa catalítico. Luego, es activado por la calmodulina y comienza la producción de cantidades suprafisiológicas de AMPc.

Tanto la actividad hemolítica como la de ciclasa son esenciales para el inicio de la infección de *Bordetella* (138). Se ha observado que mutantes AC-Hly presentan una menor virulencia en el modelo de infección murino. Además se observaron deficiencias en la respuesta inmune desarrollada por ratones enfrentados a cepas mutantes, presentando un menor número de células inflamatorias a nivel pulmonar. Más aún, los períodos de colonización de *B. pertussis* en el tracto respiratorio del ratón se vieron significativamente acortados cuando los animales habían sido inmunizados activa o pasivamente con la proteína purificada o con anticuerpos anti- AC-Hly. Ensayos en modelos animales demostraron que inmunizaciones con esta proteína inducen protección contra la colonización bacteriana. Además, AC-Hly participaría también en

etapas posteriores a la colonización, modulando la respuesta del hospedador. Ensayos *in vivo* utilizando animales deficientes en distintos componentes del sistema inmune, demostraron la importancia de esta proteína en la evasión de la respuesta inmune innata. Esta proteína actuaría sobre los neutrófilos polimorfonucleares, sobre los que tendría además una actividad proapoptótica. Esta capacidad de inducir apoptosis se extiende a varios tipos de células eucariotas entre las que se encuentran los macrófagos. También se ha demostrado que la AC-Hly regula positivamente el MHCII y sus moléculas co-estimulatoiras sobre las células dendríticas, induciendo un estado semi-maduro que disminuye la producción de citoquinas pro-inflamatorias(172).

**Toxina dermonecrótica (TDN).** Es una toxina de ubicación citoplasmática termolábil que se inactiva al exponerla a 56 °C durante 10 minutos. El nombre de esta toxina se debe a que induce lesiones necróticas localizadas en ratones y otros animales de laboratorio cuando es inyectada en forma intradérmica. Cuando es administrada en forma intravenosa es letal en bajas dosis (131). La TDN en *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* están formadas por una única cadena polipeptídica de aproximadamente 140 kDa.

Estudios *in vitro* con TDN purificada demostraron la capacidad de esta toxina de inducir en las células eucarióticas un aumento en la replicación del ADN, de la síntesis proteica y del ensamblaje de las fibras de actina, dando como resultado un aumento en la división celular. Estos resultados se deben a la acción de la TDN sobre la GTPasa Rho, la cual constituye un regulador global de la organización del citoesqueleto de actina. La TDN, al mantener permanentemente a las GTPasas en su forma activa e impidiendo que hidrolice el GTP, modifica los procesos de migración, morfogénesis y fagocitosis de la célula eucariota (129).

Hasta el momento, es escaso el conocimiento con respecto al rol de la TDN en la patogénesis de *Bordetella*. Aunque mutantes de *B. pertussis* defectivos en la expresión de esta toxina no presentan diferencias con la cepa parental, recientemente se observó que sólo cepas de *B. bronchiseptica* productoras de TDN eran capaces de producir neumonía y atrofia nasal en cerdos(16)

**Toxina citotraqueal (TCT).** Esta toxina es la responsable de la citopatología del epitelio respiratorio durante la infección por *Bordetella*, es decir induce la destrucción de las cilias y del epitelio respiratorio causando ciliostasis y tos persistente. La ausencia de la depuración efectuada por el movimiento de las cilias, debida a la destrucción de éstas, predispone a los pacientes a infecciones secundarias. La TCT es un disacárido - tretapéptido derivado del peptidoglicano. Aunque este fragmento de peptidoglicano es producido por todas las bacterias Gram negativas, solamente *Bordetella* y *Neisseria gonorrhoeae* lo liberan durante la fase exponencial de su crecimiento(129).

Ensayos utilizando células derivadas de tráquea de hámster demostraron que sólo la región peptídica es la responsable de la actividad tóxica (125). La toxicidad es inducida por un mecanismo indirecto, a través de la inducción del aumento de la producción de IL-1. Esta interleucina activa a la enzima óxido nítrico sintasa, produciendo grandes cantidades de radicales NO. 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 hospedador(138). 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 (126).

**Lipopolisacárido (LPS).** El LPS constituye el componente estructural mayoritario de las membranas externas de las bacterias Gram negativas.

El LPS es una molécula anfifílica formada por el lípido A, a través del cual se inserta en la membrana, un core o núcleo de naturaleza oligosacáridica y un extremo distal constituido por un polisacárido lineal denominado antígeno O (129, 131). *B. pertussis* a diferencia de otras bacterias gram negativas no presenta antígeno O. Cuando se somete el LPS 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. Ésta está compuesta por la estructura de la banda B sustituida por un trisacárido formado por N-acetil-N-metil-fucosamina (FucNAcMe), ácido 2,3-dideoxi-di-N-acetilmanosaminurónico (2,2-deNAcManA) y N-acetilglucosamina (GlaNAc). El LPS de *B. bronchiseptica* está compuesto de las estructuras correspondientes a la banda A y la banda B más la estructura del antígeno O, un homopolímero de ácido 2,3-dideoxi-di-N-acetil-galactosaminurónico.

El LPS de *Bordetella*, como el de otras bacterias Gram negativas, actúa como una potente endotoxina durante el proceso infeccioso, produciendo efectos pirogénicos, mitogénicos y tóxicos, además de estimular la producción del factor de necrosis tumoral en los macrófagos.

En relación al rol del LPS en la patogénesis se ha observado, en ensayos con mutantes defectivos en distintas estructuras del LPS utilizando el modelo de infección murino, una capacidad disminuida en la colonización de tráquea y pulmones y en la persistencia (130) La ausencia de la mayor parte de las estructuras glucosídicas del LPS no permiten la efectiva colonización del hospedador, probablemente debido a la disminución en la capacidad que presenta la bacteria para adherirse a las células del epitelio respiratorio (4, 92, 138).

Recientes estudios han revelado que mucha de la respuesta inmune 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 y le permite al sistema inmune responder a una infección a través del reconocimiento del LPS de bacterias Gram negativas. Se ha demostrado que la infección por *B. pertussis* es más severa en ratones defectivos en TLR-4 y que la señalización vía este receptor induce la producción de la citoquina IL-10 en respuesta a la infección. (6, 99), lo cual podría inhibirla respuesta inflamatoria y limitarla patología en el tracto respiratorio. También se ha demostrado que el LPS actúa sinérgicamente con AC-Hly para inducir la producción de IL-10 y modular otras respuestas de las células dendríticas (166).



**Otras proteínas autotransportadoras: BrkA, TcfA y Vag8.** Las proteínas autotransportadoras constituyen una familia de proteínas que son exportadas al exterior de la célula a través de un mecanismo común pero que presentan funciones diversas. Todas estas proteínas son sintetizadas como un precursor polipeptídico que es sometido a clivaje proteolítico liberando un extremo C-terminal de 30 kDa. El dominio C-terminal, de la proteína forma barriles de hoja  $\beta$ -plegada en la membrana externa de la bacteria y la exportación se realiza sin participación de proteínas accesorias (95, 129).

El mecanismo propuesto para el proceso de secreción indica que la secuencia consenso presente en el extremo N-terminal de estas proteínas permite la translocación del precursor polipeptídico a través de la membrana citoplasmática. El clivaje de la proteína se realiza en el espacio periplasmático y el extremo C-terminal se inserta en la membrana externa donde forma un poro a través del cual se exporta el extremo N-terminal. Este extremo luego es clivado autoproteolíticamente o dependiente de proteasa, pero la proteína permanece anclada a la membrana.

La proteína **BrkA** participa en la protección de *Bordetella* contra la respuesta inmune innata y adquirida desarrolladas en las mucosas luego de una infección. Esta proteína impediría la lisis mediada por la vía clásica del complemento, conocida como acción bactericida del suero y contribuiría a la adhesión de *B. pertussis* a las células del hospedador (53, 154). También se ha descrito que protege contra la lisis por cierta clase de péptidos antimicrobianos (61). Recientemente se ha demostrado que esta proteína posee actividad protectora; en un ensayo utilizando el modelo murino de infección **BrkA** fue capaz de aumentar la eficacia de vacunas acelulares. Así, se la ha propuesto como un buen candidato para mejorar las formulaciones acelulares existentes (127).

**Vag8** es una proteína autotransportadora de 95 kDa que contiene una secuencia RGD involucrada en procesos de adhesión (130). 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 *Bordetella* aún no ha sido determinado.

El factor de colonización traqueal (**Tcf**) es una proteína autotransportadora expresada exclusivamente por *B. pertussis*. Ensayos *in vivo* que emplean en 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 descrito 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 (180).

**Sistema de Secreción de Tipo III (TTSS).** La secreción del tipo III constituye un proceso altamente regulado que le permite a bacterias patógenas Gram negativas liberar proteínas efectoras dentro de células eucariotas y alterar las funciones de señalización en la célula del hospedador. El Sistema de Secreción de Tipo III (TTSS) fue descrito por primera vez en *Yersinia* como una maquinaria molecular fuertemente relacionada al aparato flagelar con capacidad de secretar proteínas bacterianas al espacio extracelular (165). Luego este aparato ha sido descrito en una gran cantidad de bacterias Gram negativas patógenas (*Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* enteropatogénica) y comensales de mamíferos, plantas e insectos (38).

La estructura del TTSS es generalmente referida como una “aguja” compleja que está compuesta por una estructura extracelular hueca y un cuerpo basal cilíndrico que funciona como un canal que se extiende a través de las membranas bacterianas interna y externa (Figura I.4).

El TTSS está compuesto aproximadamente de 20 proteínas. Las proteínas secretadas por este sistema pueden clasificarse como proteínas efectoras y translocadoras. Éstas últimas son liberadas y translocadas dentro de la membrana celular del hospedador y forman un poro sobre ella. Luego, las proteínas efectoras pueden translocarse dentro de la célula del hospedador a través del TTSS y el poro mediado por las proteínas translocadoras. El proceso recién descrito se induce por el contacto de la bacteria con la superficie de la célula y requiere de energía, la cual es generada por una ATPasa que está localizada inmediatamente debajo del cuerpo basal. Las proteínas efectoras constituyen normalmente factores de virulencia que producen efectos en la célula del hospedador que le permiten al patógeno invadir para colonizar, multiplicarse y en algunos casos persistir de forma crónica (38). Mientras que las proteínas translocadoras están usualmente conservadas entre los diferentes patógenos, las proteínas efectoras son frecuentemente distintas y poseen funciones únicas relacionadas a la estrategia de virulencia de cada patógeno en particular.

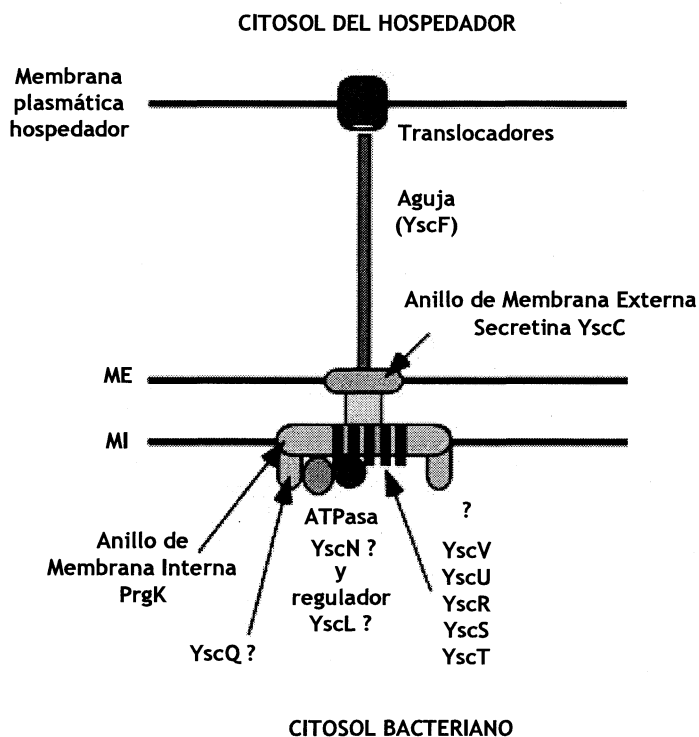


Figura I.4. Estructura del TTSS propuesta para *Yersinia*. Adaptado de Ghosh *et al.* Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004

Dentro de los miembros del género *Bordetella* que causan infección en mamíferos se ha descrito un cluster de genes del TTSS altamente conservados (194). 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 ATPasa 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 (151), a través de una búsqueda computacional en los genomas de las *Bordetella* 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 descrito un locus adicional denominado *btr*, por *Bordetella* 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 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 (132, 151).

Originalmente, la expresión funcional del TTSS se describió solamente para *B. bronchiseptica*. En *B. pertussis* si bien se ha descrito la transcripción de los genes *bsc* y *btr*, funcionalidad del sistema no ha podido ser corroborada al menos para cepas adaptadas en el laboratorio (132).

En este contexto, la mayoría de los estudios del TTSS en *Bordetella* se han focalizado sobre *B. bronchiseptica*. Se ha demostrado que las proteínas BopB y BopD, ortólogas de YopB y YopD de *Yersinia*, son proteínas translocadoras que interactúan entre sí para formar el poro en la membrana de la célula del hospedador y son requeridas para la actividad citotóxica del TTSS (117, 144). BopN aún no ha sido caracterizada en *Bordetella*. En *Yersinia* su ortóloga YopN previene la secreción de proteínas en ausencia de contacto con células del hospedador. A diferencia de las otras proteínas efectoras del TTSS, Bsp22 es exclusiva del género *Bordetella*. Esta proteína es la 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* descritos para el TTSS de *Bordetella* (194). Respecto a la proteína BopC/BteA, en *B. bronchiseptica* se ha descrito que es requerida para las actividades citotóxicas de TTSS, incluida la muerte celular en las células del hospedador (116)..

En *B. bronchiseptica* se ha descrito que el TTSS modula la maduración de células dendríticas (171, 172), posee actividad citotóxica e induce apoptosis en las células del hospedador. Asimismo, infecciones con mutantes defectivos en TTSS resultan en una elevada respuesta de anticuerpos en comparación con el fenotipo salvaje (193). El TTSS disminuye la producción citoquinas pro-inflamatorias como IFN- $\gamma$  y aumenta la producción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10. Los datos disponibles hasta el momento son consistentes con la idea de que el TTSS posee un rol inmunomodulador favoreciendo así la persistencia bacteriana al suprimir las respuestas protectoras del hospedador (60, 153)

## Regulación de de la expresión de los factores de virulencia

La expresión de la mayoría de los factores anteriormente descritos, excepto la citotoxina traqueal y el LPS, se encuentra bajo el control de un locus denominado *Bordetella* virulence gene (*bvg*, anteriormente designado *vir* por estar asociado con la regulación de la expresión de los factores de virulencia (103, 131). Ese locus *bvg* que codifica para un sistema de dos componentes denominado BvgAS, 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 *bvg*-regulada. 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 (40, 41). 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 descritos pero expresan otra serie de proteínas cuyo rol hasta hoy no ha podido ser dilucidado. La frecuencia de aparición de estos mutantes es de  $10^{-6}$ . Hasta el momento se han caracterizado dos tipos de mutaciones espontáneas que llevan al cambio de fase: en *B. pertussis* es el resultado de un corrimiento del marco de lectura dentro de una cadena de citosinas, alteración que puede revertir; mientras que en *B. bronchiseptica* se debe a pequeñas deleciones (de unos 50 a 500 pb) en el gen *bvgS*.

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  $MgSO_4$  o ácido nicotínico en el medio de cultivo (Figura 1.5). 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 negativamente los genes que se denominan *vrg* (*vir* repressed gene). En realidad, la modulación de fase no se trata de un proceso on - off sino que hay una variación continua de expresión en cuyos extremos se encuentra fase virulenta por un lado y la fase avirulenta por otro. De hecho, recientemente se ha descrito y caracterizado una tercer fase denominada fase intermedia o  $Bvg^i$  que se obtiene al emplear determinadas concentraciones de los moduladores. Esta fase se caracteriza por expresar algunos factores de virulencia, como hemaglutinina filamentosa, pertactina y adenilato ciclasa-hemolisina y una serie de proteínas cuya expresión es máxima y exclusiva de esta fase, entre las que se encuentra la proteína Bip (*Bordetella* intermediate protein). Esta es una proteína de membrana externa que presenta similitud de secuencia aminoacídica con la intimina de *E. coli* enteropatogénica y enterohemorrágica y con la invasina de *Yersinia* spp. La caracterización de esta fase intermedia ha permitido describir el funcionamiento del sistema BvgAS como un mecanismo tipo reóstato cuya actividad varía en respuesta a la intensidad de las señales sensadas y no del tipo interruptor de encendido apagado observado en otros sistemas de dos componentes. Los genes regulados por BvgAS se clasifican en cuatro clases según su cinética de expresión.

Los primeros genes en ser expresados son los de la clase 2 que incluyen el loci *vag* que codifica para adhesinas (FHA), fimbrias y a *BvgAS*. La región promotora de estos genes posee secuencias repetidas e invertidas de siete nucleótidos (TTC(C/G)TA) centradas en la posición -88.5 respecto del origen de la transcripción. Estas secuencias son sitios de unión de *BvgA*. Aunque *BvgA* desfosforilada puede unirse a este sitio es incapaz de activar la transcripción. La fosforilación de *BvgA* aumenta su afinidad por este sitio y también las interacciones entre los dímeros de *BvgA*-P. Para lograr la activación de la transcripción de estos genes otros dos dímeros de *BvgA*-P deben unirse a la zona -35. Esta unión, a diferencia de la anterior, es cooperativa e independiente de la secuencia nucleotídica. Finalmente, la RNA polimerasa interactúa con uno de estos dímeros a través de su subunidad  $\alpha$  y se inicia la transcripción.

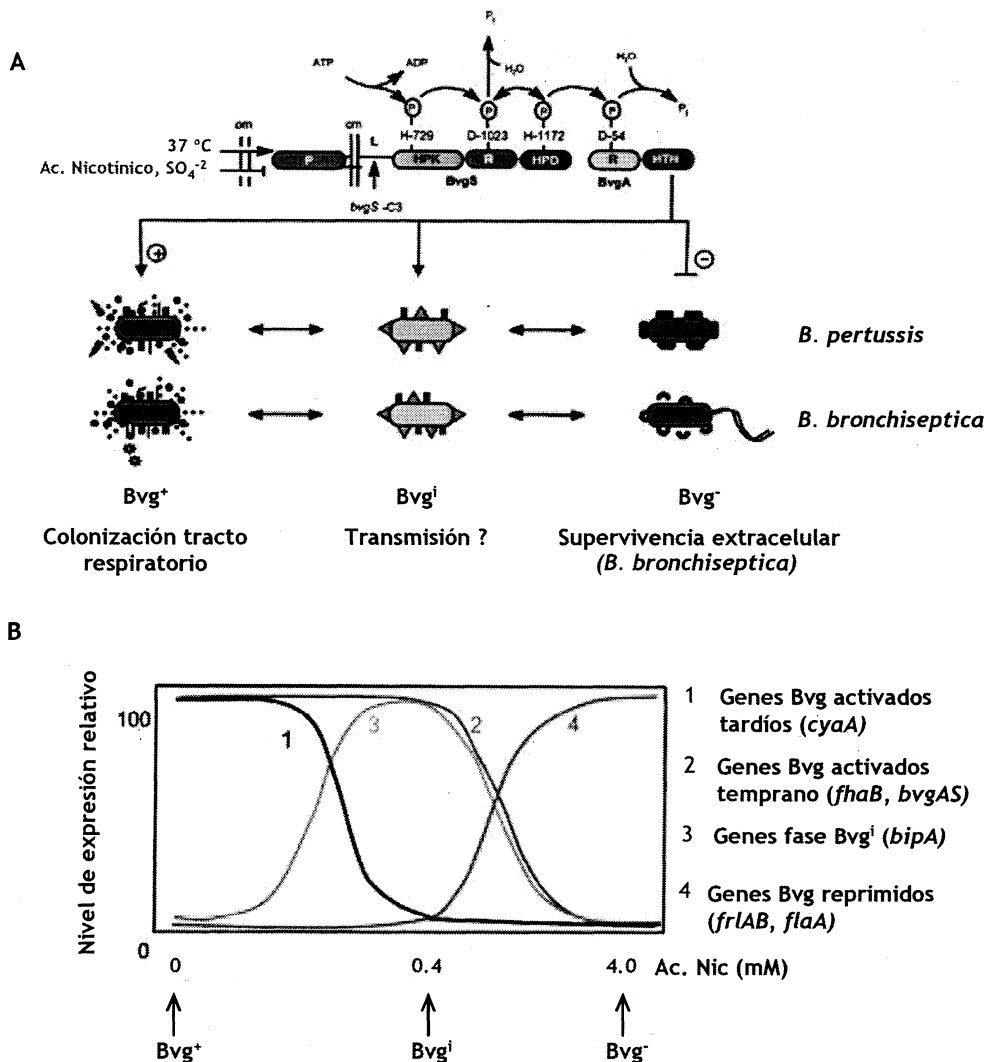


Figura 1.5. Regulación de los factores de virulencia de *Bordetella*. A: Cascadas de fosforilación involucradas en el funcionamiento del sistema de dos componentes *BvgAS*. B: Curvas de expresión de los cuatro tipo de genes regulados por *BvgAS*. Adaptado de Matoo and Cherry. Clin. Microbiol. Rev. 2005.

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

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

La información disponible acerca de los mecanismos de regulación de la transcripción de los genes clase 4 que corresponde a proteínas propias de la fase avirulenta (genes *vrg*) es relativamente escasa. En *B. pertussis* se ha descrito que el mecanismo de inactivación de estos genes durante la fase virulenta es de manera indirecta a través de la participación de una proteína reguladora denominada BvgR, la cual posee motivos de reconocimiento de secuencias consenso presentes en los promotores de los genes *vgr* (135).

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

En la actualidad se conocen algunas señales que 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<sup>+</sup> o Bvg<sup>-</sup> demostraron que la fase Bvg<sup>+</sup> es necesaria y suficiente para que se desarrolle la infección, mientras que la fase Bvg<sup>-</sup> 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

hospedador, se ha sugerido que la fase Bvg<sup>-</sup> 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 DEL SISTEMA INMUNE A LA INFECCION CON *B. pertussis*.

La evidencia experimental obtenida en el modelo animal de infección indica que en un hospedador naïve, la respuesta del sistema inmune frente a la infección con *B. pertussis* implica:

- ✓ el reconocimiento de los componentes bacterianos por las células de la respuesta innata y adaptativa,
- ✓ la producción de mediadores solubles y,
- ✓ el reclutamiento y activación de células y moléculas efectoras.

Estudios recientes han revelado que gran parte de la respuesta inmune frente a *B. pertussis* es iniciada y controlada a través de la señalización de los receptores TLR-4. Estos receptores están involucrados en el reconocimiento del LPS de muchas bacterias Gram negativas, incluida *B. pertussis* (6, 99).

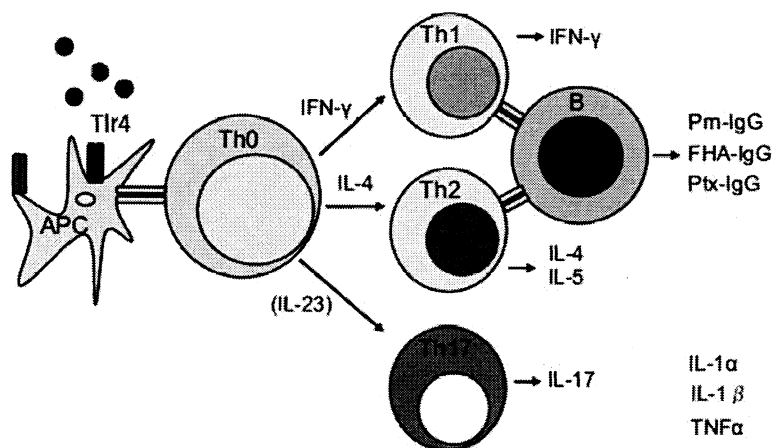


Figura 1.6. Señalización vía TLR-4 y respuesta del sistema inmunológico a la infección con *B. pertussis*. Banus et al. BMC Immunology, 2008.

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 1.6). *B. pertussis* parece aumentar, preferencialmente, la producción de IL-23 pero no de IL-12 y se ha sugerido que la toxina pertussis estaría involucrada en esto (7, 133).

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 (138). Mientras que la producción de IL-12 y IL-18 por las células de la respuesta innata llevan a una clásica respuesta del subtipo Th1 (caracterizada por la secreción de IFN- $\gamma$ ); la



producción de IL-23 polariza 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 IL17 de las células T residentes ( $\alpha\beta$ ,  $\gamma\delta$  y NK) promueve la producción citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, IL8 y TNF- $\alpha$ ) que reclutan neutrófilos al sitio de infección, controlando inicialmente la misma (133). La respuesta Th1 es 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 AC-Hly, media también la producción de IL-10 e IL-23 generando una polarización hacia la respuesta Th17 (22).

El NO y las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 y TNF- $\alpha$  inducidas por las toxinas bacterianas, especialmente LPS, TCT y PT, 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- $\gamma$  secretado por células de la respuesta innata temprano en la infección y más tardíamente por células Th1, estimulan el reclutamiento y la activación de macrófagos y neutrófilos y provee ayuda a las células B a secretar anticuerpos opsonizantes y fijadores del complemento. Las bacterias, opsonizadas o no opsonizadas, son internalizadas por neutrófilos y macrófagos y eliminadas por NO o especies reactivas a oxígeno (138).

#### **MECANISMOS GENERADORES DE PROTECCIÓN CONTRA *B. pertussis*.**

Luego de una infección natural con *B. pertussis* se adquiere una inmunidad que confiere una relativamente larga protección contra una subsiguiente infección (187). Para la prevención de pertussis existen vacunas a célula entera (vacunas celulares) y a componentes o acelulares. La inmunización, ya sea con vacunas celulares o acelulares también protege contra la enfermedad aunque no necesariamente éstas últimas son más efectivas que las primeras.

La identificación de correlaciones inmunológicas de protección contra *B. pertussis* ha sido el mayor objetivo de muchos estudios clínicos sobre este patógeno. Hemos visto que *B. pertussis* produce una gran cantidad de toxinas (PT, TCT, AC-Hly y LPS) que contribuyen a la patogénesis y muchas de ellas están también involucradas en la protección o en la evasión inmunológica. *B. pertussis* también produce otros factores de virulencia (FHA, PRN y FIM) los cuales le permiten sobrevivir en el tracto respiratorio del hospedador por medio de la adhesión a células ciliadas del epitelio, macrófagos y neutrófilos. Sin embargo, no ha sido posible correlacionar protección con una respuesta inmune cuantificable contra un único antígeno protector (138).

Se ha reportado que tanto la infección natural como la inmunización con vacunas contra pertussis son capaces de inducir respuestas de anticuerpos y de células T contra PT, FHA, PRN, FIM, AC-Hly y LPS. Experimentos utilizando el modelo animal han provisto evidencia que la respuesta inmune contra una gran cantidad de estos factores de virulencia puede contribuir a la protección contra *B. pertussis* y, que tanto las respuesta humoral como celular son requeridas para una óptima inmunidad. Asimismo, estos tipos de ensayo han demostrado que la vacuna celular confiere inmunidad por mecanismos similares a los

generados por la infección natural, pero sugieren que las vacunas celulares y acelulares confieren protección por distintas combinaciones de mecanismos efectores de la respuesta inmune (21, 138, 139).

### **Rol de los anticuerpos en la protección.**

Existe una gran cantidad de evidencia, basada principalmente en experimentos de inmunización pasiva; que los anticuerpos poseen un rol en la protección contra *B. pertussis*. Los anticuerpos podrían funcionar neutralizando las toxinas bacterianas, inhibiendo la unión a células de la bacteria extracelular en las mucosas o permitiendo la captura y destrucción de la bacteria por macrófagos y neutrófilos. Sin embargo, como mencionamos anteriormente y a diferencia de otros patógenos, para *B. pertussis* no se ha podido definir niveles de anticuerpos contra un antígeno o combinación de antígenos que puedan predecir protección.

**Evidencia del rol de los anticuerpos en ensayos clínicos.** Habitualmente, los ensayos clínicos de las vacunas contra pertussis incluyen protocolos para evaluar la respuesta por anticuerpos a través de ensayos de ELISA. La mayoría de los estudios con vacunas acelulares, aún con vacunas de demostrada baja eficacia; reportan altos títulos de anticuerpos contra los antígenos vacunales luego de la inmunización. Asimismo, también se ha demostrado que las vacunas celulares inducen respuesta de anticuerpos contra distintos antígenos aunque de manera más variable respecto de las vacunas acelulares (81, 147). Si bien no se ha demostrado directamente el rol de los anticuerpos contra PT, FHA, PRN o FIM en la protección, existen estudios clínicos que sugieren que anticuerpos contra PT, 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 PT solamente, PRN y PT o PRN y FIM (36, 175). Mas aún, un estudio en Suecia ha mostrado que la inmunización pasiva con antisuero específico para *B. pertussis* reduce la severidad de la enfermedad en individuos infectados (75). También se ha reportado que la respuesta de anticuerpos declina rápidamente con muchas de las vacunas acelulares (51, 119) pero, pese a esto, niños inmunizados parecen estar protegidos aún cuando los niveles de anticuerpos son indetectables (51, 71, 175).

**Evidencia del rol de los anticuerpos en estudios en el modelo murino de infección.** Un gran número de ensayos han demostrado que inmunizaciones con PT detoxificada, FHA, PRN, Fim o Ac-Hly pueden conferir niveles variables de protección en el modelo murino de desafío intranasal (in) o intracraneal (ic). Sin embargo no siempre estos resultados fueron acompañados de una correlación entre el nivel de anticuerpos y la protección (138). Experimentos de inmunización pasiva en ratones demostraron que anticuerpos contra los antígenos nombrados anteriormente pueden conferir protección. Ensayos de inmunización activa y pasiva demostraron también que existe una relación entre el número de componentes de las vacunas acelulares y el grado de protección conferida y que PT y PRN son los antígenos más protectivos (79, 139).

Experimentos con ratones SCID y Rag -1<sup>-/-</sup> indican que la inmunidad adaptativa es requerida para eliminar a *B. pertussis* del tracto respiratorio. Ratones deficientes en células B fallan en eliminar a esta bacteria

sugiriendo que los anticuerpos tienen un rol en la protección (113). Por medio de estudios en los que se utilizaron ratones deficientes en Inmunoglobulinas (Ig<sup>G</sup>) se ha demostrado que la infección de ratones naïve Ig<sup>G</sup> con *B. pertussis* resulta en una infección crónica. Por otra parte ratones Ig<sup>G</sup> previamente inmunizados, tanto con vacunas celulares como acelulares, muestran escasa pero no significativa protección frente a pertussis (139). Harvill y colaboradores han demostrado que si bien las células B son necesarias para eliminar a *B. pertussis* del tracto respiratorio, la transferencia de anticuerpos tiene un pequeño, sino nulo efecto, en eliminar a esta bacteria del pulmón de ratones por al menos los primeros 7 días después de la infección. Esta demora en la acción rápida de los anticuerpos se ha atribuido a la capacidad de la toxina pertussis de reducir la habilidad de los anticuerpos para eliminar la infección, proceso que involucraría la inhibición en el reclutamiento de neutrófilos (112). Asimismo, también se ha determinado que la toxina pertussis es capaz de suprimir la respuesta de anticuerpos después de la infección (23).

Se ha demostrado que distintos factores de virulencia (FHA, FIM, PRN y PT) son capaces de mediar la unión e internalización a macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y células epiteliales de tráquea. Así anticuerpos contra estos antígenos podrían prevenir la adhesión a estas células y en el caso de células que expresan receptores Fc promover la captura por opsonización (138).

*B. pertussis* es relativamente insensible a la acción bactericida dependiente de la activación de la vía clásica del complemento y la proteína BrkA podría conferir esta resistencia. Sin embargo también se ha demostrado que *B. pertussis* es sensible a la acción de la vía alternativa del complemento y se ha sugerido que la presencia de anticuerpos opsonizantes y fijadores del complemento podrían estar asociadas a la protección contra este patógeno (138).

### **Rol de la respuesta celular en la protección**

Hace más de 40 años que Cheers y colaboradores demostraron 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. Sin embargo *B. pertussis* falla en sobrevivir en neutrófilos y células dendríticas (59, 138). Esta aparente localización dual, intra y extracelular es consistente con la necesidad de la respuesta inmune humoral como así también la celular, para la eliminación de la bacteria del tracto respiratorio.

**Respuesta de células T en humanos.** Los primeros estudios sobre inmunidad celular en humanos demostraron la respuesta proliferativa antígeno específica en células monocucleares periféricas o en células T purificadas de adultos que habían sido inmunizados o habían sufrido tos convulsa en la niñez. Distintos estudios demostraron que la infección o la vacunación con vacunas celulares o acelulares inducen células T CD4<sup>+</sup> específicas para PT, FHA y PRN. Se ha demostrado también, que las respuestas de células T de niños infectados o convalecientes son del tipo CD4<sup>+</sup> y subtipo Th1. Respecto a las respuestas de células T en niños inmunizados, se ha sugerido que las vacunas celulares y acelulares, inducen distintas sub-

poblaciones de células T CD4<sup>+</sup>. Mientras que la inmunización con vacunas celulares, así como la infección natural, induce células Th1; la administración de vacunas acelulares aumentan significativamente las respuestas del tipo Th2 (138).

**Evidencia en ratones del rol de células T en la protección contra *B. pertussis*.** Distintos estudios han demostrado la importancia de células T en la inmunidad a este patógeno. La transferencia adoptiva de células Th1 de ratones convalecientes es capaz de inducir protección y ratones mutantes en el receptor para IFN- $\gamma$  desarrollan una diseminación letal de la infección. Ratones atímicos o SCID fallan en eliminar la infección pero la bacteria no se disemina por el pulmón; sugiriendo que la respuesta innata puede prevenir la diseminación de la bacteria antes del desarrollo de la respuesta adaptativa. Sin embargo, la inducción de IgG y la respuesta Th1 son suprimidas en los estadios tempranos de la infección (138). Esto último está relacionado a la secreción de IL-10 por células de la respuesta innata a partir de la señalización LPS/TLR-4 y al efecto inmunomodulador de la AC-HLY.

Cómo hemos mencionada anteriormente, los receptores TLR-4 son críticos para la eliminación y la generación de la inmunidad adaptativa (respuestas Th1 y Th17) en ratones no inmunizados. Más aún TLR-4 influye en la generación de la patología pulmonar y la producción de citoquinas pro-inflamatorias después del desafío con *B. pertussis*. Con todo lo dicho hasta el momento se deduce que la señalización vía TLR-4 tiene un rol importante en la inmunidad natural a la infección con *B. pertussis*.

Como hemos mencionado varias veces, las vacunas celulares y acelulares confieren protección por diferentes mecanismos y en general se ha observado que las acelulares son menos efectivas que las vacunas celulares. Estas diferencias radican probablemente en la ausencia de LPS en las vacunas acelulares. Recientemente se ha demostrado que, tal como ocurre con la infección, la inmunización con vacunas celulares induce células Th1 y Th17 y no así (o menos extendidamente) la inmunización con vacunas acelulares (7, 98).

## **MEDIDAS DE CONTROL CONTRA LA ENFERMEDAD. VACUNAS**

Desde que *B. pertussis* fue aislada en 1906 por Bordet y Gengou se comenzaron a desarrollar vacunas contra este microorganismo. Así en 1925 Madsen produjo vacunas contra pertussis consistentes en suspensiones de la bacteria entera muerta y detoxificada y en 1940 Perla Kendrick introdujo a estas formulaciones los componentes tetánicos, diftéricos y adyuvantes (108). Estas vacunas carecían de buenos controles ya que no se contaba con ensayos estandarizados para evaluarlas en cuanto a potencia y seguridad. En la década del cincuenta, gracias a nuevos desarrollos, se comenzaron a evaluar las vacunas existentes. Así se pudo comprobar que dichas formulaciones tenían una eficiencia adecuada que variaba entre 80 y el 85%, por lo que fueron introducidas en los planes masivos de inmunización. Dicha incorporación condujo a una disminución significativa en la incidencia, la morbilidad y la mortalidad debido a pertussis (129). Sin embargo, la administración de la vacuna parece inducir una serie de efectos secundarios adversos que pueden ir desde leves a muy graves (63, 177) tales como shock hipotónico y

convulsiones, encefalitis, encefalopatía, daño cerebral permanente y muerte (Tabla I.3) Estas respuestas controladas por el sistema nervioso central se pueden manifestar también, como hemos mencionado, durante la infección producida por *B. pertussis* y se cree que las toxinas activas como PT o el LPS pueden ser los responsables (63, 131).

Tabla I. 3. Efectos adversos asociados a la administración de la vacuna anti pertussis

<b>Efectos adversos locales</b>	Eritema (35 %)
	Dolor (50%)
	Tumefacción (40%)
	Induración (10 %)
	Abscesos estériles (1 cada 6 a 10 millones de dosis)
<b>Efectos adversos sistémicos</b>	Fiebre > 38 °C (45 %)
	Fiebre > 39 °C (6%)
	Fiebre > 40 °C (0.3 %)
	Somnolencia (30 %)
	Irritabilidad (55 %)
	Vómitos (5 %)
	Anorexia (20 %)
	Llanto prolongado > 3 horas (1%)
	Convulsiones
	Hipotonía con hiporrespuesta (3.5-291/100 000)
Anafilaxis (2/100 000)	

La asociación de los efectos colaterales con la vacunación contra pertussis llevó a mediados de los '70 a un descenso en la aceptación de la vacuna y muchos países desarrollados como Japón, Suecia, Alemania, Italia e Inglaterra suspendieron el uso de la vacuna celular de pertussis o implementaron una vacunación voluntaria. Esto llevó al resurgimiento de la enfermedad. Esta situación motivó la búsqueda de una nueva vacuna que fuera más eficaz y menos reactogénica que la clásica vacuna celular. La purificación y caracterización de distintos antígenos de *B. pertussis* en las décadas siguientes condujo al desarrollo de vacunas acelulares contra pertussis (129).

Paradójicamente, se observó que los componentes responsables de los efectos colaterales contribuyen a la eficacia (LPS como adyuvante) y a la protección (PTX), lo cual dificultó el diseño de dichas vacunas. Actualmente existen vacunas acelulares (DPaT) de diferente composición: vacunas monovalentes que contienen solamente la toxina pertussis, bivalentes compuestas por PTX y FHA, trivalentes compuestas por PTX, FHA y pertactina y pentavalentes: PTX, FHA, PRN, fimbrias FIM2 y FIM3. Todas estas vacunas contienen la toxina pertussis, en algunos casos modificada genéticamente y en otros detoxificada por tratamiento químico.

Todas las vacunas acelulares han mostrado ser seguras y menos reactogénicas (Tabla I.4). Tanto los efectos adversos locales como los sistémicos fueron reportados con mucho menor frecuencia en los niños que recibieron DTaP, independientemente de la formulación administrada, que en los que habían recibido formulaciones celulares. Sin embargo en lo que se refiere a la efectividad estas nuevas formulaciones no

lograron superar a las formulaciones celulares. Dicha eficiencia está asociada al número de componentes, siendo así la vacuna pentavalente la más eficaz. La contribución de cada componente es desconocida y no es posible correlacionar protección con una respuesta inmune cuantificable contra un único antígeno protector.

**Tabla I.4.** Efectos adversos de las vacunas celulares (DPT) y acelulares (DpaT)

<i>Efectos adversos</i>	<i>DPT (%)</i>	<i>DpaT (%)</i>
Fiebre > 38° C	90,4	36,9
Llanto persistente	54,6	12,8
Tumefacción en el sitio de aplicación	22,3	7,8

En la actualidad no existe un consenso respecto de qué vacuna utilizar ni que esquema de vacunación seguir. La vigencia de la enfermedad incluso en países con alta cobertura de vacunación marca claramente la necesidad de mejorar las estrategias de control de esta enfermedad que anualmente ocasiona alrededor de 300.000 muertes.

## EPIDEMIOLOGÍA

La descripción de la epidemiología de pertussis por caso reportado está fuertemente influenciada entre otras cosas por la definición de caso utilizada y los métodos diagnósticos empleados (34, 129). Esto hace que los datos epidemiológicos de distintos países sean difíciles de comparar. No obstante, el registro epidemiológico de países con buenos sistemas de vigilancia, tal el caso de USA, Canadá u Holanda; ayudan a evaluar la evolución de la enfermedad desde la introducción de la inmunización masiva hasta la actualidad. En la Figura I.6 y a modo de ejemplo, se pueden observar los datos obtenidos en USA desde 1922 hasta 2006.

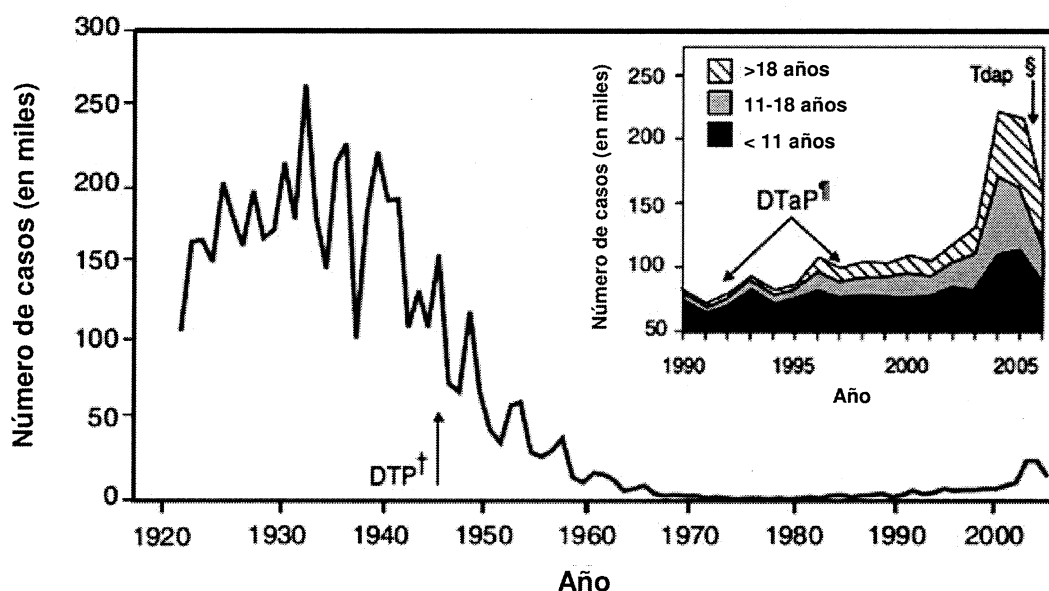


Figura I.7. Número de casos reportados (en miles) por año y por edad en EEUU, período 1922-2006.

\* Fuente: Sistema de vigilancia de enfermedades notificables, CDC. † La vacuna triple con componente para pertussis celular, DPT, se implementó después de 1940. ‡ La vacuna triple con componente pertussis acelular pediátrica, DTaP, fue recomendada en 1991 (4ª y 5ª dosis) y en 1997 (todas las dosis). § Para adolescentes y adultos la DTaP estuvo disponible en EEUU en 2005.

En la era pre- vacunal pertussis era la principal causa de morbi-mortalidad en niños. Con la introducción de la inmunización masiva (1945) se ha producido una dramática disminución en la incidencia.

Historiadamente, pertussis ha mostrado ciclos epidémicos que oscilaban entre 3 a 5 años. Actualmente, el patrón cíclico de las epidemias de pertussis es similar al de la era pre vacunal. Se ha sugerido que la inmunización ha controlado la enfermedad pero no ha disminuido la circulación de *B. pertussis*. Junto con la marcada reducción en los casos reportados de pertussis, quizás debido a la implementación de la inmunización pediátrica, se ha producido un drástico cambio en la distribución por edad de los infectados (ver recuadro interno en Figura I.6). En la era pre-vacunal la infección era reportada principalmente en niños menores de 10 años, usualmente 3-6 años. En los primeros años de la era post vacunal, la mayor incidencia se registró en niños menores de 1 año. En los últimos 20 años, junto con un aumento en los

casos reportados en poblaciones con alta cobertura de vacunación se ha observado también un aumento de los casos reportados en adolescentes y adultos (67). La incidencia en adolescentes adultos puede estar debida al menos en parte a pérdida de la inmunidad, ya sea esta conferida tanto por una infección como por vacunación. Se ha reportado que la inmunidad contra pertussis dura entre 5-10 años por lo que los individuos luego de este lapso de tiempo se vuelven susceptibles de contraer la enfermedad. En adolescentes adultos la enfermedad no es tan grave, sin embargo estos constituyen en el reservorio del patógeno con la potencialidad de diseminarlo entre los más susceptibles, los niños menores de 1 año de edad. Así, la epidemia ocurre cuando un pool crítico de individuos susceptibles crece en una población vacunada(87).

### **Situación epidemiológica en Argentina.**

En nuestro país la tos convulsa constituye una enfermedad endemo-epidémica de notificación obligatoria, que ha provocado importantes brotes en distintas provincias de nuestro país con casos mortales (164). Desde 1972 la enfermedad ha evolucionado en forma de brotes epidémicos cada cuatro años hasta 1986.

El esquema de vacunación nacional contiene 5 dosis, las tres primeras a los 2, 4 y 6 meses de edad con dos refuerzos; uno a los 18 meses y otro al ingreso escolar. Las cuatro primeras dosis se realizan con la cuádruple bacteriana celular (tétanos, difteria, pertussis y Haemophilus tipo b) y el segundo refuerzo con la triple bacteriana celular (tétanos, difteria y pertussis). El refuerzo de la triple bacteriana (DPT) al ingreso escolar se incorporó en 1985 en respuesta al brote del año anterior que, se supone, se produjo por acumulación de susceptibles en ese grupo etáreo.

La tasa de incidencia en la Argentina fue de 52,4/100.000 en 1984, y a partir de 1987 se notifican entre mil y dos mil casos (4/100.000). Estos valores se mantuvieron por años hasta la década del noventa donde se comenzó a registrar un aumento en el número de casos de pertussis (7,2/100.000 en 1992)

En el período 1997 - 2002 se redujo la notificación en todos los grupos de edades, siendo los menores de 1 año los que más casos notificados aportaron cada año.

En el 2002 el descenso de la notificación de casos de tos convulsa fue de 41,7% con relación al año 2001, intensificándose la tendencia descendente iniciada en 1998. Paralelamente, durante este año también se observó una disminución de la cobertura provocando nuevamente el aumento de susceptibles y favoreciendo la aparición de brotes.

En el 2003 aumentaron las notificaciones de casos un 50 %. Este aumento, se produjo fundamentalmente a expensas de los menores de 1 año. El otro grupo que más aportó al incremento de la notificación es el de 2 a 4 años.

Los datos reportados por el Ministerio de Salud de la Nación revelan un aumento significativo y sostenido de casos de pertussis desde el 2003 hasta el presente (Figura 1.8)



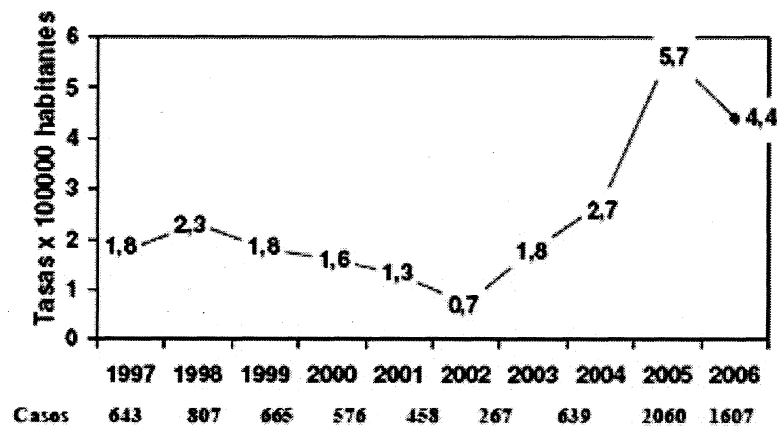


Figura 1.8. Tasa de notificación de casos en Argentina, período 1997-2006.  
Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE).

Desde el año 2003 nuestro laboratorio trabaja activamente en colaboración con el Ministerio de Salud de la Nación en la vigilancia de pertussis. En el 2004 se han sumado al grupo de trabajo, profesionales del INEI-ANLIS Malbrán.

Actualmente tanto nuestro grupo en el IBBM-FCE-UNLP como el INEI-ANLIS son considerados Laboratorios Nacional de Referencia (LNR) y en ambos se realiza el diagnóstico microbiológico y molecular de la enfermedad, recibiendo muestras de distintos lugares del país. Durante el período 2006-2007 se han recibido en los dos laboratorios de referencia, un total de 3476 muestras provenientes (2445 en el IBBM FCE UNLP y 1031 en el INEI - ANLIS Malbrán) de pacientes con sintomatología compatible con pertussis.

La mayoría de las muestras recibidas en el 2006 provino de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Tierra del Fuego, Tucumán y Río Negro. Mientras que en el 2007, la mayoría de las muestras provino de Buenos Aires, Córdoba y Río Negro. Las provincias de Tucumán y Tierra del Fuego desde que implementaron las técnicas diagnósticas en sus laboratorios no han informado los datos a los LNR, situación que esperamos revertir a la brevedad (Figura I.9)

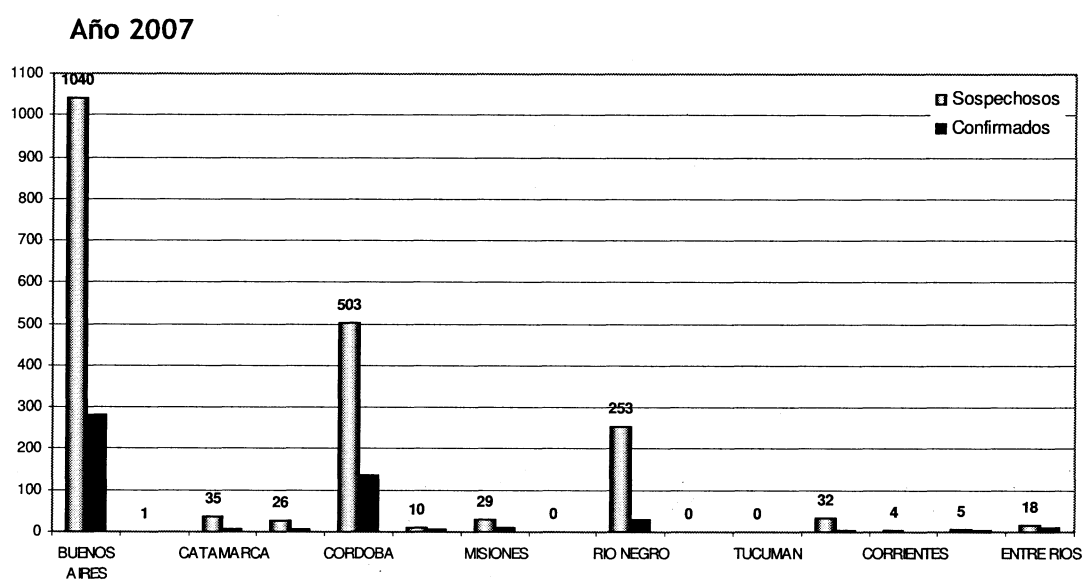
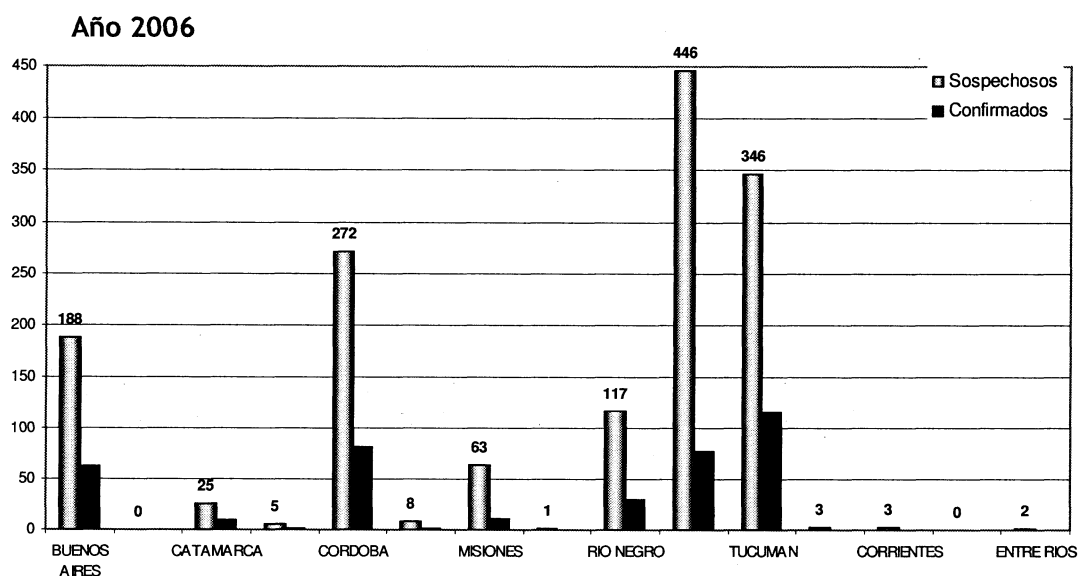


Figura I.9. Distribución de casos sospechosos y confirmados de coqueluche por provincia

De los casos sospechosos se confirmaron 523 y 617 en 2006 y 2007 respectivamente. Para ambos años, el mayor número de casos confirmados se registró en los niños menores de 6 meses de edad (224 casos en el 2006, 57% de los casos confirmados y 368 casos en el 2007, 71% de los casos confirmados). Gracias al trabajo de búsqueda de contactos se han podido confirmar casos en el grupo de mayores a 12 años de edad (Figura I.10).

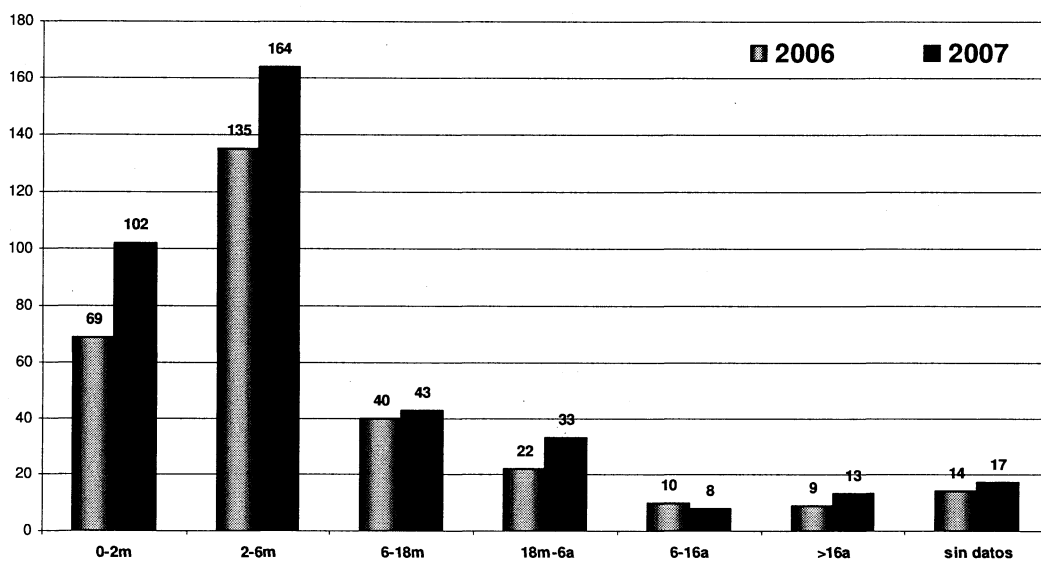


Figura I.10. Distribución de casos confirmados de coqueluche según edad del paciente.

Un aspecto importante de analizar es el estado de vacunación de los pacientes. A continuación se presenta la distribución de casos según el estado de vacunación y la edad del paciente tanto para el año 2006 como para el 2007 (Figura I.11). Como puede observarse en las gráficas la mayoría de los casos se registran en niños no vacunados o inmunizados con un número de dosis que no resulta efectiva para la protección. Sin embargo también se han registrado casos con tres y cuatro dosis con edades en la que no es esperable pérdida de inmunidad.

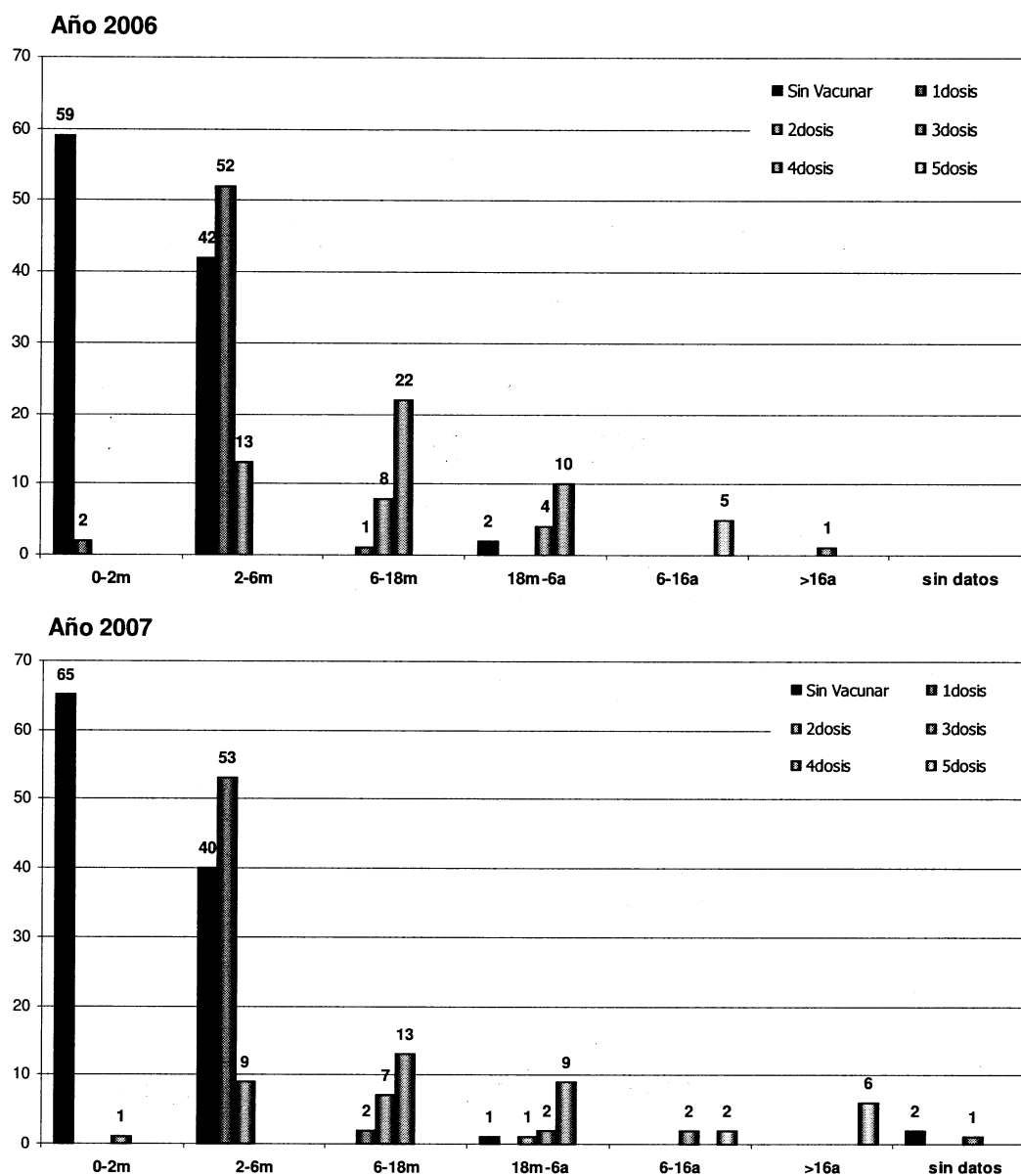


Figura I.11. Distribución de casos confirmados de coqueluche según la edad y estado de vacunación del paciente.

Los datos presentados permiten visualizar que pertussis sigue siendo un problema en nuestro país, que la población más afectada es la de los niños menores de 6 meses, los cuales no han sido inmunizados, o no tienen dosis suficientes, como para que estén protegidos adecuadamente. Sin embargo es de destacar que pese a no realizar un estudio poblacional se han registrado casos en adolescentes y adultos. Otro punto a marcar es que también se han registrado casos en población vacunada.

Esta situación, que debe describirse aún más acabadamente, hace que nos preguntemos acerca de las posibles causas que llevan a este bosquejo de perfil epidemiológico. Se podría pensar en que es

consecuencia de una mejora en la vigilancia y diagnóstico de la enfermedad, de una utilización de vacunas de baja efectividad, de utilización de vacunas que no inducen inmunidad por plazos largos, de la circulación de bacterias inmunogénicamente diferentes a las cepas vacunales en uso, o una combinación de todas ellas.

La implementación de nuevas metodologías de diagnóstico comenzó en el año 2003, según el tiempo transcurrido (6 años) es esperable que el registro de casos no se afecte significativamente.

En relación a la corta duración de la inmunidad conferida por las vacunas, este es un aspecto que se viene estudiando en varios países donde han registrado aumento de la incidencia de pertussis en adolescentes y adultos. En nuestro país no contamos aún con esa información de manera acabada. Es de fundamental importancia trabajar en este aspecto pues servirá de base para determinar la necesidad o no de incorporar la vacuna acelular para este grupo etario.

Todos los datos obtenidos en los últimos años, nos han permitido comenzar a delinear la problemática de pertussis y su perfil epidemiológico en nuestro país. Sobre este nuevo conocimiento hemos realizado propuestas de trabajo que esperamos contribuyan a un mejoramiento del control de esta enfermedad. Sin embargo, es claro que a la espera de mejores estrategias se debe continuar con el esquema de vacunación propuesto en el Calendario Nacional de Vacunación mejorando las actuales coberturas.

## RESURGENCIA DE LA ENFERMEDAD. HIPÓTESIS QUE PODRÍAN EXPLICAR EL AUMENTO DE LA INCIDENCIA.

Como se mencionó anteriormente, la incidencia de pertussis ha aumentado de manera importante, particularmente a partir de 1990, aún en países con alta cobertura de vacunación como Australia, Canadá, Estados Unidos, Francia, Holanda e incluso Argentina (2, 32, 46-48, 76, 142).

Varias son las causas que podría explicar esta situación, la mayoría de ellas asociadas a las vacunas hoy existentes contra esta enfermedad: baja efectividad de la vacuna (se estima alrededor del 70% de efectividad luego de la 3ra dosis) (63, 146, 157, 177), corta duración de la inmunidad conferida por vacunación (137), presencia de nuevas variantes de *B. pertussis* contra las cuales las vacunas en uso podrían no ser tan eficaces (29, 54, 64, 85, 128, 143, 182), y también podría contribuir al aumento de casos la presencia de cuadros clínicos atípicos sin diagnóstico o con diagnóstico tardío (35, 86).

En relación a la pérdida de inmunidad se ha reportado que en el caso de una infección natural la misma dura alrededor de 15 años y en el caso de inmunidad conferida por vacunación entre 5 a 10 años dependiendo de la formulación empleada (187). Esto determina que adolescentes y adultos se vuelvan nuevamente susceptibles pudiendo no sólo adquirir la infección sino además ser fuente de contagio para los niños más susceptibles, es decir los menores de 1 año de edad sin vacunación o con esquema incompleto (86).

La evidencia de infecciones en adolescentes y adultos llevó a considerar la necesidad de introducir en algunos países refuerzos en estos grupos etarios, empleando vacunas acelulares recientemente licenciadas (1, 17). En este sentido, países como EEUU, Canadá, Austria y Australia recomiendan o han incluido en el esquema de vacunación dicho refuerzo (45, 67). Dado que estas implementaciones son relativamente recientes, no es posible aún evaluar el impacto de este cambio en el esquema de inmunización, no sólo en lo que respecta al control de la circulación de *B. pertussis*, sino sobre todo en la incidencia en el grupo de alto riesgo que constituyen los niños menores de 6 meses. Los primeros datos obtenidos en Austria y Australia revelan que si bien la incorporación del refuerzo ha disminuido la incidencia en niños menores de 6 años, también ha ocurrido un aumento importante de la incidencia en adolescentes mayores de 16 años y sobre todo en adultos (156, 159).

Un dato que sorprendió en la década de los '90, junto con el aumento de la incidencia de pertussis, fue la observación de un aumento de casos en poblaciones con alta cobertura de vacunación. Esta situación epidemiológica planteó la posibilidad que la divergencia entre la población bacteriana circulante y las cepas de *B. pertussis* empleadas en la producción de vacunas fuera, al menos en parte, responsable de dicha situación. Los primeros datos experimentales que concuerdan con esta hipótesis fueron reportados por el grupo de Mooi y colaboradores en Holanda (143). Estos autores fueron quienes comenzaron a tipificar varios de los genes que codifican para inmunógenos protectores, en particular los genes de la subunidad 1 de la toxina pertussis y de la pertactina. En el caso de la toxina pertussis, el secuenciamiento del gen *ptx<sub>s1</sub>* de distintos aislamientos reveló la existencia de 4 variantes clasificadas como *ptx<sub>s1</sub>* A, B, C y

D. Estas variaciones se encuentran localizadas en regiones que codifican para epitopes involucrados en la unión de células T.

En el caso de la pertactina se pudo observar que el polimorfismo estaba restringido a dos regiones que se denominaron 1 y 2, y que involucran en la secuencia aminoacídica a las repeticiones GGxxP y PQP respectivamente. La región 1 se encuentra cerca de un motivo RGD, el cual está involucrado en la adhesión a receptores del hospedador. Se ha observado que la variación ocurre principalmente en la región 1 y en general ésta se corresponde a dos sustituciones aminoacídicas o a alteraciones en el número de repeticiones GGxxP. Aunque se han tipificado alrededor de 13 alelos diferentes para *prn*, las clasificadas como *prn1*, *prn2*, y *prn3* son las más frecuentes (140).

Aparte de Holanda, distintos países como por ejemplo Francia, Holanda, Canadá, Finlandia, Suecia, EEUU, Canadá, Taiwán y Polonia han realizado un relevamiento de la diversidad antigénica de los aislamientos de *B. pertussis* encontrando los polimorfismos antes descrito (9, 12, 29, 66, 83, 141, 185, 192). La frecuencia de las distintas variantes muestra cambios en el tiempo. Las tendencias temporales demuestran que ha ocurrido **divergencia en estos dos antígenos entre las cepas vacunales y los aislamientos clínicos posteriormente a la introducción de la vacuna**. En general estos países introdujeron el uso de vacuna celular contra pertussis entre 1950 y 1960. Las cepas vacunales utilizadas para la producción de vacunas poseen *prn1* y *ptx<sub>S1</sub>B* o D. Los aislamientos en los primeros años post vacunación son del mismo tipo de *prn1* y *ptx<sub>S1</sub>* que las cepas vacunales, pero posteriormente comienza a observarse un aumento en la incidencia de los tipos *prn 2* y *3*, y *ptx<sub>S1</sub>A*.

Desde la descripción del polimorfismo genético en la toxina pertussis y la pertactina, se han utilizado una gran variedad de metodologías basadas en ADN para analizar cambios en la población de *B. pertussis*: Fingerprint, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), VNTR (Variable Number Repeat Analyses), PFGE (Pulsed- Field- Gel -Electrophoresis) y MLST (Multiple -Locus variable- Number tandem repeat analysis) (149, 169). Así, el análisis por MLST de la población de *B. pertussis* se basó principalmente en el análisis de polimorfismo de genes correspondientes a proteínas de superficie: incluidas en la vacunas acelulares y otras que han demostrado tener un rol importante en la inmunidad (181). Al analizar estos genes se observó que el **polimorfismo genético no se restringe a la pertactina y la toxina pertussis**; observándose en *bipA*, (proteína de fase intermedia de *Bordetella*), *fhaB* (hemaglutinina filamentosa), *fim2* y *fim3* (serotipo 2 y 3 de fimbrias), *ompQ* (proteína integral de membrana), *tcfA* (factor de colonización traqueal) y *vag8* (proteína autotrasportadora). De estos últimos genes los más polimórficos son *tcfA* y *fim3*. Respecto del polimorfismo en el gen *tcfA* se han observado 6 variantes, asociadas tanto a deleciones de 2 Kb respecto al tipo *tcfA 1* como a la presencia de una inserción o deleción de una base en una zona correspondiente a un homopolímero de G, resultando en corrimientos en el marco de lectura y en algunos casos la terminación prematura de la traducción. Estas mutaciones determinan la pérdida de la habilidad de los aislamientos clínicos de producir TcfA. Se ha determinado que esta pérdida de la expresión de TcfA puede ser irreversible o reversible y se ha sugerido que ésta última forma podría conferir una ventaja en algún estadio particular del ciclo de transmisión de *B. pertussis* (72, 180).

Respecto al PFGE, en muchos países los estudios se ampliaron y hoy ya se han estandarizado protocolos para esta metodología y además de para el secuenciamiento de *ptx* y *prn*; de los otros genes polimórficos que codifican para antígenos protectores (2, 3, 10, 26, 28, 54, 84, 85, 90, 91, 115, 192). Dichas metodologías permiten establecer relaciones entre los aislamientos de *B. pertussis* en estudios epidemiológicos y monitorear los cambios temporales tanto de los pulsotipos como en los determinantes de virulencia. Esto permite abordar la caracterización de la población bacteriana circulante en cada país y luego realizar comparaciones de los resultados obtenidos en los distintos países. A partir de los estudios realizados en distintos países, se ha observado que existe una fuerte correlación entre la diferenciación de los aislamientos según PFGE y el tipo de pertactina y en menor medida con el tipo de fimbria que éstos expresan. Se ha observado luego de la introducción de la inmunización masiva, una expansión de la combinación alélica *ptxA1/ptxC2/prn2/tcfA2/fim3B*. Así, la evolución espacio-temporal de *B. pertussis* revela una disminución de la diversidad genética y una expansión gradual de ciertos pulsotipos coincidentes con ciclos de la enfermedad.

El secuenciamiento del genoma de *B. pertussis* en 2003, han dado lugar al desarrollo de microarrays para el estudio de este patógeno. Así, el estudio de la microevolución de pertussis ha sido abordado no sólo con análisis filogenéticos como los descriptos anteriormente, sino también con el análisis del contenido genético de la población bacteriana circulante. Experimentos de hibridación comparativa de genoma e hibridación substractiva, han determinado que la población de *B. pertussis* es altamente clonal, con pequeñas variaciones en el contenido génico de los aislamientos circulantes. También se ha determinado que dentro de la especie la evolución está dirigida por la pérdida de genoma asociada a recombinaciones homólogas entre secuencias de inserción IS481 adyacentes (11, 15, 25-27, 43, 44, 152). Asimismo, algunos países como Finlandia, han observado una correlación entre pérdida de determinadas regiones del genoma, el cambio en los tipos de antígenos para *prn*, *ptx* y *fim* y la expansión clonal de ciertos tipos de perfiles de PFGE (94).

A pesar de la limitada variación en el contenido génico se han descriptos al menos dos mecanismos por los cuales la población circulante de *B. pertussis* puede modificar la expresión génica; constituyendo ésta probablemente, una manera de responder a presiones selectivas (por ej, la inmunidad del hospedador). Uno de estos mecanismos involucra el reordenamiento de genes en el cromosoma bacteriano, mediado también por la recombinación homóloga entre elementos IS481. Los efectos de estos rearrreglos se podrían manifestar al nivel de la transcripción, debido a que genes cercanos a los puntos de rearrreglos podrían terminar bajo el control de nuevos elementos regulatorios (15, 43).

Otro mecanismo genético, que podría inducir diversidad en el genoma de *B. pertussis*, está relacionado a la expansión y contracción de secuencias de nucleótidos repetidas, más precisamente trectos de homopolímeros de nucleótidos (HPTs por sus siglas en inglés). En *B. pertussis* este mecanismo está asociado a la variación entre la fase virulenta y avirulenta. Como hemos mencionado anteriormente, el mecanismo molecular de este cambio fenotípico es la expansión y contracción de un HTP de Citosina en el gen *bvg5* (174). La expresión fase-variable de los dos genes que codifican para la subunidad mayor de la fimbria, *fim2* y *fim3*, también se ha atribuido a variaciones en un HTP localizado en la región promotora



de estos genes; dando lugar a la alteración de la abundancia de los correspondientes transcritos (189). Como también hemos mencionado más arriba, el gen *tcfA* también presenta un HTP en su marco de lectura abierto; cuya expansión y contracción podría resultar en la truncamiento reversible y presumiblemente la inactivación de la proteína TcfA (180). Recientemente, mediante un screening computacional de los genomas de *B. pertussis* y de las otras dos especies relacionadas *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis*, se describieron 69 homopolímeros, 74 % de los cuales fueron polimórficos entre las especies (72). Nueve loci de estos homopolímeros se genotipificaron en una colección de 90 aislamientos de *B. pertussis*, identificándose 6 polimórficos. Estos resultados revelan que podrían existir muchos genes más, que los hasta ahora identificados, sujetos a variación de fase.

Así, la **variación de fase** podría constituir otro de los medios por el cual *B. pertussis* podría crear **diversidad en un genoma clonal** sin necesidad de adquirir material genético. Se ha sugerido que este mecanismo podría dar lugar a múltiple fenotipos, algunos de ellos quizás involucrados en distintos aspectos de la patogénesis de *B. pertussis* como especificidad del huésped o modulación de la respuesta inmunológica del hospedador (72).

***En resumen, B. pertussis ha sido considerado históricamente un patógeno clonal, cuya evolución se ha observado que implica pérdida de genoma. A pesar de la falta de variación en el contenido genético se ha determinado que posee mecanismos generadores de diversidad, que van más allá del polimorfismo genético originalmente descrito en los antígenos protectores pertactina y toxina pertussis. Así, este patógeno parecería contar con mecanismos generadores de plasticidad genómica que le podrían permitir quizás, tanto la evasión como la adaptación al sistema inmune del hospedador.***

## OBJETIVOS

Pertussis, coqueluche o tos convulsa, hemos visto, son distintas formas de nombrar a una enfermedad con mucha historia, pero también una enfermedad vigente.

Hemos comentado que la implementación de la vacuna contra pertussis ha controlado la enfermedad, ha disminuido la transmisión, pero no ha eliminado la circulación de *B. pertussis*. En los últimos 20 años se ha determinado un aumento cierto de la incidencia de pertussis a nivel mundial, incluso en poblaciones con altas coberturas de vacunación, al punto de considerarla una enfermedad reemergente. Estos datos marcan que pertussis sigue siendo en la actualidad un problema en salud pública y resulta prioritaria la necesidad de realizar mejoras en las estrategias de control contra la enfermedad.

A través de la implementación de herramientas para analizar la epidemiología molecular y la estructura genética de la población bacteriana circulante se ha mostrado, desde el punto de vista genómico; suficiente evidencia de la existencia de la divergencia antigénica de los aislamientos clínicos de *B. pertussis* respecto a las cepas vacunales. Sin embargo, no está claro cuál es la relevancia funcional de los mecanismos generadores de variación del genoma antes descritos y más aun, cuál es el rol en lo que respecta a la adaptación de *B. pertussis* a la población inmunizada.

### OBJETIVOS GENERALES

Con el desarrollo de esta propuesta se espera 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 cepas / componentes a incluir en una nueva formulación.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

En este marco conceptual y tomando como hipótesis la divergencia de la población bacteriana circulante respecto a las cepas vacunales hoy en uso, se proponen los siguientes objetivos:

- ✓ **Caracterizar mediante la aplicación de técnicas de genómica funcional los aislamientos de *B. pertussis* locales. Identificar de nuevos inmunógenos.** Los aislamientos clínicos de nuestra colección han sido previamente agrupados en base a sus divergencias a nivel de las secuencias que codifican para antígenos específicos, así como en su genoma completo a través de los ensayos de PFGE y los años en que fueron aislados. Proponemos abordar la búsqueda de diferencias específicas, a nivel de expresión génica, entre los aislamientos circulantes y las cepas que hoy se usan en la producción de vacunas. Para ello hemos emplearemos herramientas de genómica funcional, proteómica e inmunoblot; para identificar potenciales candidatos vacunales a incorporar en una formulación acelular.

- ✓ **Analizar la relevancia de la divergencia genética entre la Población Bacteriana Circulante (PBC) y las cepas vacunales respecto a la protección contra pertussis.** Para abordar este punto emplearemos el modelo animal de desafío intranasal. Consideramos que la información obtenida marcará la necesidad o no de incluir determinadas variantes polimórficas para obtener una nueva vacuna más efectiva. El abordaje de este aspecto se espera también contribuya al conocimiento general de la adaptación y evolución bacteriana bajo la presión de selección ejercida por las diferentes estrategias de vacunación (celular/acelular).

## **CAPITULO II**

### **MATERIALES Y METODOS**

## 1. Cepas y aislamientos clínicos de *B. pertussis*.

Como cepa de referencia se empleó a la cepa Tohama CIP 8132 (empleada en producción de vacunas, obtenido en Japón en 1952 de un paciente infectado). Es genoma de esta cepa ha sido completamente secuenciado (152). Los aislamientos clínicos de *B. pertussis* empleados en este trabajo se obtuvieron de aspirados nasofaríngeos obtenidos de niños hospitalizados por pertussis en el Hospital de Niños Sor María Ludovica de La Plata (HNLP). Para sistematizar la nomenclatura de los aislamientos y preservar la identidad de los pacientes, a cada aislamiento se le asignó un número de 3 dígitos. El primer dígito pertenece al año en que se efectuó el aislamiento y los últimos dos al número de aislamiento de dicho año.

En la siguiente tabla se detallan las cepas de referencia y aislamientos clínicos, pertenecientes al género *Bordetella*, que fueron utilizados en esta etapa del trabajo.

Tabla II. 1. Cepas y aislamientos utilizados en esta tesis

Cepa o Aislamiento	Origen	Año de aislamiento	Genotipo <i>prn</i>	Genotipo <i>ptx</i>	PFGE <sup>a</sup>	
					Grupo	Perfil
<i>Bp 18323</i>	EEUU <sup>b</sup>	1947	<i>prn6</i>	<i>s1E</i>	I	R1
<i>Tohama I</i>	Japón <sup>c</sup>	1954	<i>prn 1</i>	<i>s1B</i>	II	V2
<i>Bp6901</i>	ANLIS(Malbrán)	1969	<i>prn 1</i>	<i>s1A</i>	IV	A7
<i>Bp8201</i>	ANLIS(Malbrán)	1982	<i>prn 1</i>	<i>s1A</i>	V	A9
<i>Bp005</i>	Hospital de Niños (La Plata)	2000	<i>prn 2</i>	<i>s1A</i>	VI	A33
<i>Bp006</i>	Hospital de Niños (La Plata)	2000	<i>prn 2</i>	<i>s1A</i>	VI	A23
<i>Bp007</i>	Hospital de Niños (La Plata)	2000	<i>prn 1</i>	<i>s1A</i>	IV	A5
<i>Bp101</i>	Hospital de Niños (La Plata)	2001	<i>prn 1</i>	<i>s1A</i>	IV	A8
<i>Bp102</i>	Hospital de Niños (La Plata)	2001	<i>prn 1</i>	<i>s1A</i>	IV	A8
<i>Bp106</i>	Hospital de Niños (La Plata)	2001	<i>prn 2</i>	<i>s1A</i>	VI	A20
<i>Bp204</i>	Hospital de Niños (La Plata)	2002	<i>prn 2</i>	<i>s1A</i>	VI	A21
<i>Bp301</i>	Hospital de Niños (La Plata)	2003	<i>prn 2</i>	<i>s1A</i>	VI	A18
<i>Bp305</i>	Hospital de Niños (La Plata)	2003	<i>prn 2</i>	<i>s1A</i>	VI	A29
<i>Bp314</i>	Hospital Garrahan (Bs As)	2003	<i>prn 1</i>	<i>s1A</i>	IV	A4
<i>Bp407</i>	Hospital de Niños (La Plata)	2004	<i>prn 2</i>	<i>s1A</i>	VI	A31
<i>Bp506</i>	Hospital Heller (Neuquén)	2005	<i>prn 2</i>	<i>s1A</i>	NT	NT
<i>Bp610</i>	Hospital de Niños (La Plata)	2006	<i>prn 2</i>	<i>s1A</i>	NT	NT
<i>Bp708</i>	Hospital Heller (Neuquén)	2007	<i>prn 2</i>	<i>s1A</i>	NT	NT
<i>Bp828</i>	Hospital de Niños (Córdoba)	2008	<i>prn 2</i>	<i>s1A</i>	NT	NT
Tohama I Gm <sup>r</sup>	Esta tesis	-	<i>prn 2</i>	<i>s1A</i>	-	-
Bp006 Tc <sup>r</sup>	Esta tesis	-	<i>prn 2</i>	<i>s1A</i>	-	-
Bp106 Km <sup>r</sup>	Esta tesis	-	<i>prn 2</i>	<i>s1A</i>	-	-

<sup>a</sup> Bottero *et al.* 2007. <sup>b</sup> Kasuga *et al.* 1954. <sup>c</sup> Pittman 1984.

NT: No Tipificado.

Para los ensayos de protección en los que se realizó el desafío con más de una cepa mediante se utilizaron la cepa vacunal Tohama y los aislamientos clínicos Bp006 y Bp106 marcados con una resistencia a antibiótico: Gentamicina (Gm), Tetraciclina (Tc) y Kanamicina (Km) respectivamente. Para esto, se obtuvieron competentes eléctricas (Zealey *et al.* 1990) y se transformaron mediante electroporación con vectores replicativos y estables en *Bordetella*: pBBR1MCS Gm, pBBR1MCS Tc y pBBR1MCS Km (Kovach *et al.* 1995).

## 2. Medios y condiciones de cultivo para *B. pertussis*

### ✓ Agar Bordet - Gengou Sangre (BGAS).

✓

Agar Bordet-Gengou comercial (Difco®)	15g/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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.50 g/l
KCl	0.20 g/l
MgCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0.10 g/l
CaCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0.02 g/l
Tris-HCl	1.52 g/l

Se lleva pH 7.2 con una solución de HCl concentrado y se esteriliza 15 minutos a 121 °C. Luego se le adiciona el complemento esterilizado por filtración:

#### Complemento (20 ml 10X)

L- Cisteína	800 mg
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	200 mg
Ac. Ascórbico	400 mg
Ac. Nicotínico	80 mg
HCl <sub>(c)</sub>	2 ml

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

Para cultivar las cepas marcadas con resistencia a antibiótico se adicionaron a las placas de BGAS (Agar Bordet-Gengou Sangre) los antibióticos correspondientes a las siguientes concentraciones: Gentamicina 10 µg/ml, Tetraciclina 5 µg/ml y Kanamicina 25 µg/ml.

Los cultivos líquidos se realizaron en medio Stainer-Scholte a 37 °C con agitación a 160 rpm. Todos los cultivos que se realizaron para las obtener las muestras proteicas detalladas a continuación siguieron el siguiente esquema:

Pre inóculo: a partir de crecimiento bacteriano de 24 horas en placa de BGAS se cultivó en medio líquido SS durante 12 horas, partiendo de una  $DO_{650nm}$  inicial = 0.2. Luego se efectuó un subcultivo en medio líquido SS ( $DO_{650nm}$  inicial = 0.2) y se cultivó nuevamente durante 12 horas aproximadamente, hasta alcanzar la fase logarítmica de cultivo ( $DO_{650nm}$  final=1).

### 3. Vacunas

#### 3.1. Vacunas comerciales

Para evaluar el rol del polimorfismo genético en la protección se utilizaron las vacunas de uso local para el control de *B. pertussis*. Las características de las vacunas se muestran en la siguiente tabla

Vacuna	Cepa	Tipo de Antígenos polimórficos	Uso en el Esquema Nacional de Vacunación	Origen
Triple bacteriana (DPT)	Bp10536	<i>prn1</i> , <i>ptS1B</i>	Refuerzo a los 6 años	A
Cuádruple bacteriana (Act-HIB-DPT)	Bp1414 Bp1416	<i>prn1</i> , <i>ptS1B</i> , <i>fim2</i> <i>prn1</i> , <i>ptS1B</i> , <i>fim3</i>	Tres primeras dosis (1, 4 y 6 meses) y refuerzo 18 meses	B

#### 3.2. Preparación de vacunas a partir de la cepa vacunal y aislamientos locales.

Se prepararon las vacunas a partir de una suspensión bacteriana en solución fisiológica inyectable estéril partir de un crecimiento de 24 horas (obtenido como se mencionó anteriormente). Se realizó un lavado de la suspensión con solución fisiológica previo a medir la  $DO_{650nm}$  a fin de eliminar restos de BGAS.

Para inmunizar los ratones se utilizó una dosis correspondiente a 1/10 de la dosis utilizada en humanos (DH):  $1 \times 10^9$  UFC en 50 µl (DH: 4 UI=500 µl conteniendo  $1 \times 10^{10}$  UFC). Para preparar la vacuna se tuvo en cuenta que para *Bordetella* una suspensión bacteriana de  $DO_{650nm} = 1$  equivale a  $3 \times 10^9$  UFC/ml

Para las vacunas preparadas a partir de más de una cepa la concentración final de UFC también fue de  $1 \times 10^9$  UFC en 50 µl y la relación de las distintas cepas en la formulación final fue 1:1.

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 plaquéo en BGAS para determinar que no quedaran bacterias viables. Una vez verificado ésto, se agregó como adyuvante Al(OH)<sub>3</sub> en concentración final 1mg/ml y se conservaron las vacunas a 4°C.

#### 4. Cepas de *E. coli* y plásmidos

Para el clonado y expresión de la proteína recombinante His<sub>6</sub>-Bsp22 se utilizaron las cepas de *E. coli* TOP10 y BL21 DE3 respectivamente, obtenidas comercialmente (Invitrogen)

Los clonados fueron realizados utilizando los vectores comerciales pENTR/SD/D-TOPO y pDEST17 (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante.

#### 5. Medio y condiciones de cultivo para *E. coli*.

##### Luria-Bertani (LB)

Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Glucosa	1 g/l
NaCl	0,085M

Los stock bacterianos de *E. coli* se conservan a - 20 °C como una suspensión densa en el medio LB en presencia de glicerol 50 % v/v.

En los casos que fueron necesarios, los antibióticos Kanamicina o Ampicilina se adicionaron al medio LB, sólido o líquido, a concentraciones 25 µg/ml y 200 µg/ml respectivamente.

#### 6. Preparación de proteínas totales.

Las bacterias crecidas en medio sólido se resuspendieron en el volumen de agua bidestilada necesario para obtener una suspensión de DO=10 (DO<sub>650nm</sub> para *B. pertussis* y DO<sub>600nm</sub> para *E. coli*). 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 β-mercaptoetanol.

La muestra se hirvió durante 15 minutos, luego se centrifugó 5 minutos a 14000 g, se recuperó el sobrenadante y se lo incubó en sonicador de baño durante 10 minutos. Se sembraron 8 µl de muestra por calle de SDS-PAGE 12.5 %.

#### 7. Obtención de cubiertas de *B. pertussis*.

Se partió de un cultivo líquido de *B. pertussis* en fase logarítmica tardía ya sea para los distintos aislamientos o la cepa vacunal Tohama. Se centrifugó el cultivo durante 30 minutos a 8500 rpm (Centrífuga Sorvall, Rotor GSA) y posteriormente el pellet se resuspendió en buffer HEPES 10mM, pH 7.4



con PMSF 0.25 mM final, de modo de obtener una suspensión bacteriana de  $DO_{650nm}=10$ . La ruptura de las células se realizó mediante ultrasonido: se efectuaron 6 veces pulsos por 3' de potencia 3 en baño de hielo (Branson). Se separaron células remanentes por centrifugación, 20 min x 10.000G x 4°C. El lisado libre de células se ultracentrifugó (Beckman Coulter Optima LE-80K) durante 1 hora a 30000 rpm (Rotor 70Ti) a 4 °C. Al pellet obtenido, enriquecido en proteínas de la membrana externa y de la membrana citoplasmática lo denominamos "Cubierta" de *B. pertussis*. Estas cubiertas fueron solubilizadas en buffer UTIT (7 M Urea, 2 M Tiourea, 10 % Isopropanol, 2% Triton 100).

### **8. Obtención de proteínas de sobrenadante de *Bordetella spp.***

Se obtuvieron proteínas de sobrenadante provenientes, tanto de cultivos de las cepas y aislamientos clínicos de *B. pertussis* descritos en la Tabla III.1 como para la cepa de *B. bronchiseptica* CIP 9.73 (Collection of Institut Pasteur, Paris France). Para ambas especies se siguió un protocolo previamente descrito (60). Brevemente, se partió de cultivos líquidos en fase logarítmica tardía, los cuales fueron centrifugados a 4 °C, 2 veces durante 1 hora a 8000 g (Centrífuga Hettich). El pellet obtenido se descartó y se precipitaron las proteínas del sobrenadante a 4 °C, durante al menos 12 horas, con TCA 10 % p/v. Luego se centrifugó a 4 °C durante 45 minutos a 15000 g (Centrífuga Hettich) y el pellet obtenido se resuspendió en Buffer de Laemmli (118).

La muestra así obtenida se utilizó en ensayos de inmunoblot para evaluar la expresión de la proteína efectora del Sistema de Secreción de Tipo III (TTSS), Bsp22 en *Bordetella spp.* Con este fin, se corrió en SDS-PAGE 15% acrilamida/bisacrilamida el equivalente de muestra correspondiente a 5 ml del cultivo original.

### **9. Cuantificación de proteínas.**

Se realizó mediante la técnica de Bradford (14) con reactivo comercial (BioRad) según indicaciones del fabricante. Se utilizó Seroalbúmina bovina (BSA por sus siglas en inglés) cómo estándar.

### **10. Electroforesis unidimensionales en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Los geles de poliacrilamida se prepararon siguiendo el protocolo de Laemmli (118). El gel de apilamiento o stacking se preparó en una concentración de 4 % de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 30:0.8) en buffer Tris-HCl 1M a pH 6.8 y SDS 10 % p/v, mientras que el gel de separación se preparó en una concentración de 10, 12.5 ó 15 % de poliacrilamida (acrilamida : bisacrilamida 30:0.8), con Tris-HCl 1M a pH 8.8 y SDS 10 %p/v. Las corridas se realizaron en equipos Miniprotean II (BioRad) durante 40 a 60 minutos a 110 volts utilizando buffer de corrida (Glicina 0.37 M, SDS 10 % p/v, Tris-HCl 0.05 M pH 8.3). Alternativamente se utilizó un equipo Høefer (Mighty Small™ SE245, Dual Gel Caster), en el que las corridas se realizaron a 100 volts durante 2.5 horas.

Una vez finalizada la corrida, los geles se tñieron con Coomassie Blue R-250, Coomassie Coloidal o con nitrato de plata.

### **11. Tinción Coomassie Blue R-250**

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.

Luego el gel se destiñó en una solución 50% agua bidestilada, 40% metanol y 10 % ácido acético.

### **12. Tinción con Coomassie Coloidal G -250**

Las proteínas resueltas en los geles uni o bi- dimensionales se visualizaron mediante el método de detección con Coomassie Coloidal. Brevemente, los pasos seguidos fueron los siguientes:

- 1) Fijación del gel en solución de fijación 1 (30% etanol, 2% ácido fosfórico, en agua bidestilada.) 3 veces durante 30 minutos, con agitación moderada.
- 2) Lavado con solución de lavado (2% de ácido fosfórico en agua bidestilada), 3 veces durante 20 minutos, con agitación moderada.
- 3) Fijación con 15 ml solución de fijación 2 (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 adicionó 1,5% de su volumen de suspensión de Coomassie coloidal (G-250) 2% en agua bidestilada. Se incubó al menos 24 horas, hasta el desarrollo completo de la tinción.
- 5) Para remover el background que pudiera quedar se empleó agua bidestilada.

### **13. Tinción con Nitrato de Plata.**

Luego de fijar el gel por al menos 2 horas (solución de fijación: 50% metanol, 10% ac. acético y 40% agua), éste se lavó dos veces con etanol 50 % y una vez con etanol 30%. Se pretrató con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  0.02 % p/v durante 1 minuto y se realizaron tres lavados de 20 segundos cada uno con agua bidestilada. Luego se incubó durante 20 minutos con solución de  $\text{AgNO}_3$  0.2 % p/v con 75  $\mu\text{l}$  de HCOH 37 %. Seguidamente se realizaron dos lavados de 20 segundos cada uno con agua bidestilada. Finalmente se desarrolló con una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  6 % p/v,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  0.4 mg/100 ml, 50  $\mu\text{l}$  de HCOH 37 %. Una vez que se observó el desarrollo de las bandas correspondientes se lavó con agua bidestilada 2 veces de 2 minutos cada una. Luego se detuvo la reacción con metanol 50 %, ácido acético 12 %.

### **14. Obtención de muestras de proteínas enriquecidas en proteínas de membrana para la resolución en geles bidimensionales.**

Se partió de cultivos en fase logarítmica tardía ( $\text{DO}_{650} = 1$ ). Estos se centrifugaron durante 30 min a 8.500 rpm a 4 °C (Centrífuga Sorvall, Rotor GSA). El pellet obtenido se lavó dos veces con Buffer Low Salting (3 mM KCl, 68 mM NaCl, 1.5mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 9 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) y finalmente se resuspendió a una  $\text{DO}_{650 \text{ nm}^{-1}} = 10$  en buffer Tris 10 mM pH 8, al cual se le agregó PMSF, un inhibidor de serino proteasas, a una concentración final de 0,25 mM.

La ruptura de las células se realizó mediante ultrasonido: se efectuaron 6 veces pulsos por 3' a potencia 3 (Branson) en baño de hielo. Se separaron las células remanentes por centrifugación, 20 min x 10.000G x 4°C.

Al lisado libre de restos celulares obtenido se le agregó ADNsa (0.62 U ADNsa/ml de lisado) y ARNasa A (8 ul de 10mg/ml, cada 10 ml de lisado) y se incubó 1 hora a 37°C para lograr la degradación de los ácidos nucleicos.

Una vez transcurrida la incubación se procedió a ultracentrifugar (Beckman Coulter Optima LE-80K) el lisado durante 1 hora a 30.000 rpm (70Ti) a 4°C. El pellet obtenido corresponde a una fracción enriquecida en proteínas de membranas mientras que el sobrenadante así obtenido contiene las proteínas citoplasmáticas.

Proteínas de membrana: el pellet se resuspendió empleando buffer de rehidratación UTIT (7 M urea, 2 M tiourea, 10 % isopropanol, 2% Triton 100) sin azul de bromofenol y se incubó ON a 4°C 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 8000 rpm (Sorvall RC5, rotor GSA) durante 20 minutos a 4°C y se lavar el precipitado con 1 volumen de acetona 90% en agua bidestilada. Se centrifugaron 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.

## **15. Electroforesis bidimensionales en geles de poliacrilamida**

### **15.1. Rehidratación de las tiras para isoelectroenfoque.**

El isoelectroenfoque (IEF) fue realizado utilizando IPG strips (Immobiline™ DryStrip Amersham Biosciences-AB) con un rango de pH 4-7.

El volumen final de la solución de rehidratación, incluida la muestra, fue de 125 µl para rehidratar strips de 7 cm.

Preparación de la solución de rehidratación: volumen de muestra correspondiente a 500 µg de proteína (cuantificado mediante la técnica de Bradford) + 2 µl de DTT 28% + 0.62 µl de IPG buffer (anfolitos pH 4-7 Amersham Biosciences-AB) + azul de bromofenol 0.01% + buffer de rehidratación para membranas para completar los 125 µl.

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.

### **15.2. Isoelectroenfoque (IEF)**

El IEF se realizó en el sistema Amersham Bioscience (Temp. 20°C) según el siguiente programa

Paso 1: 500 volts 30 min step and hold

Paso 2: 1000 volts 30 min step and hold

Paso 3: 5000 volts 1 hora 40 min step and hold

El enfoque finalizó al alcanzan 8000 Vh. El strip se guardó a - 80 °C hasta su uso.

### 15.3. SDS-PAGE

Previo a la corrida electroforética se procedió a la reducción y alquilación de los tioles de la muestra. En primer lugar se incubó la tira con la muestra 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 /4 ml buffer. Luego se incubó la tira durante 1 hora, con agitación fuerte, en 4 ml de Buffer Equilibración II (5ml de Buffer E I + 225 mg de Iodoacetamida agregados 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.

### 16. Adquisición y análisis de imagen.

La imagen de los geles se obtuvieron utilizando el adquirente de imágenes Fluor-S Multilmager (Bio-Rad). Las imágenes fueron alineadas y analizadas utilizando el software Image Master™ 2D Platinum (GE Healthcare).

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

#### 17.1. Digestión trípica in-gel.

Las bandas (geles unidimensionales) o spots (geles bidimensionales) teñidos fueron cortados del gel y transferidos a distintos pocillos de placas multi-well. Los spots 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 20 µl de una solución de DTT 5 mM en bicarbonato de amonio 25 mM (30 minutos a 60 °C), luego se lavaron con acetonitrilo y se incubaron con 20 µl de iodoacetamida 55 mM en bicarbonato de amonio 25 mM; en oscuridad, durante 15 minutos y temperatura ambiente. Se realizó un nuevo lavado con bicarbonato de amonio 25 mM, seguidamente los spots fueron deshidratados con 3 lavados con acetonitrilo. Cuando los spots estuvieron completamente blancos, deshidratados y se hubo eliminado el acetonitrilo 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 4 °C.

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 37 °C, ON. Luego los digestos fueron recuperados para su posterior análisis mediante espectrometría de masa.

### 17.2. Obtención de la huella peptídico mediante espectrometría de masa (EM).

Se utilizó la matriz  $\alpha$ -ciano-4 hidroxí - ácido cinámico, en una concentración 0.2 g/l preparada en una solución 50 % acetonitrilo / 0.25 % TFA. Una mezcla de 0.4  $\mu$ l matriz y digesto (1:1) se sembró en el target (MTP Anchor Chip™ 600/384 TF). La muestra se secó durante 10 minutos a temperatura ambiente previo al análisis por EM. Se obtuvo el espectro de la muestra (Huella Peptídica) sometiéndola EM del tipo MALDI-TOF en 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.

### 17.3. Identificación de proteínas.

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 *B. 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,  $\pm$  50 ppm; (vi) carga del péptido, +; 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>) y la predicción de la función celular se realizó utilizando la clasificación de Ryley (<http://www.genedb.org/genedb/pert/>)

## 18. Extracción de ADN genómico.

Para la obtención de ADN genómico, las células provenientes de un cultivo sólido o líquido se resuspendieron en N-lauril sarcosina 0,1% p/v en Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM pH 8 (TE) y se lavaron con NaCl 1 M. Luego de una centrifugación a 8.000 X g durante 5 minutos, el sedimento celular obtenido se resuspendió en 500  $\mu$ l sacarosa 10% p/v en TE conteniendo lisozima 1 mg ml<sup>-1</sup>. Luego de 1 hora de incubación a 37° C, se agregaron 100  $\mu$ l de pronasa (2,5 mg ml<sup>-1</sup> de TE). La suspensión fue mezclada por inversión y se incubó a 37° C durante 1-2 horas. Transcurrido este tiempo se le agregó 70  $\mu$ l de NaAc 3 M, 100  $\mu$ l de cloroformo y 200  $\mu$ l de solución de Fenol-Tris-HCl pH 8.00. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 22000 X g y la fase superior acuosa obtenida se transfirió a un nuevo tubo y se repitió la

extracción fenólica. Recogida la fase acuosa se procedió a la precipitación del ADN mediante la adición de 3 volúmenes de etanol 96% v/v frío (-20°C). El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70% v/v, luego de evaporar todo el alcohol, el ADN se resuspendió en 25-50 µl de agua al que se añadió 1 µl de una solución de ARNasa 1mg ml<sup>-1</sup>.

### 19. Extracción de ARN total.

Para extraer RNA total, tanto de la cepa vacunal Tohama I como de los aislamientos clínicos Bp006 y Bp106, se utilizó el sistema comercial RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare).

Se partió de cultivos líquidos en fase logarítmica tardía (obtenidos como se detalló en el inciso 2). Para la extracción se siguieron las instrucciones del fabricante. Se centrifugó el volumen de cultivo equivalente a  $1 \times 10^9$  UFC (para *Bordetella*  $DO_{650nm} = 3 \times 10^9$  UFC/ml) y se resuspendió en 100 µl de buffer TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8) con 0,2 mg/ml de lisozima, se homogeneizó en vortex y se incubó a 37 °C durante 10 minutos.

Para realizar la lisis celular se agregaron 350 µl del buffer RA 1 (GE Healthcare) con 3,5 µl de β-mercaptoetanol y se homogeneizó en vortex. Luego se filtró el lisado y se ajustaron las condiciones del lisado a las necesarias para la unión del ARN en la columna de purificación mediante el agregado de 350 µl de etanol 70 %. Una vez unido el ARN a la columna de purificación se desaló la muestra (lavado con 350 µl de Membrane Desalting Buffer, GE Healthcare) y se digirió con ADNsa I libre de ARNsa (GE Healthcare).

Se lavó la columna con buffer RA 2 (GE Healthcare) para inactivar la ADNsa y luego se realizaron dos lavados con el buffer RA 3 (GE Healthcare). Finalmente se eluyó el ARN con agua libre de ARNsa y se guardó el eluato a -80 °C. El ARN obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría (Nanodrop® ND-1000).

**20. Determinación de la concentración de ácidos nucleicos.** Para la cuantificación de ADN y ARN se empleó el método espectrofotométrico (104). La absorbancia de las preparaciones de ADN fueron medidas a 260 y 280 nm ((Nanodrop® ND-1000). Las concentraciones fueron estimadas considerando que una  $DO_{260nm}=1$  corresponde a las siguientes concentraciones: 50µg ml<sup>-1</sup> de ADN de cadena doble, 40 µg ml<sup>-1</sup> de ADN de cadena sencilla o ARN, y 20 µg ml<sup>-1</sup> de oligonucleótidos. La relación  $DO_{260nm} / DO_{280nm}$  se utilizó como estimadora de la pureza de la preparación, considerándose valores por debajo de 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Para muestras de ADN de baja pureza o baja concentración se empleó preferencialmente el método de comparación de fluorescencias en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida, también descrito por Sambrook y col. (1989) (104).

### 21. Electroforesis en geles de agarosa.

El análisis cualitativo de las muestras de ADN y la separación de fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (0,8-2% p/v) empleando Tris-HCl 89 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 2,5 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 89 mM, pH 8,2 (TBE) como buffer de corrida. El voltaje de trabajo varió entre 5 y 12 volts/cm.

Como solución de siembra se utilizó sacarosa 40% p/v y azul de bromofenol 0,25% p/v en una relación 5  $\mu$ l solución de ADN en agua por cada 1  $\mu$ l solución de carga.

## **22. Revelado de los geles de agarosa.**

Para la visualización del ADN sobre los geles de agarosa se adicionó a los mismos 0,5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> 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.

## **23. Transcripción reversa (RT).**

La síntesis de ADNc se realizó utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). Para esto se siguieron las instrucciones del fabricante. Para 5  $\mu$ g de ARN total se utilizó un volumen de reacción final de 20  $\mu$ l. La mezcla de reacción fue la siguiente: 50 ng de primers al azar (1  $\mu$ l de dilución 1/10 del stock comercial), 1  $\mu$ l 10 mM de la mezcla de dNTP, 5  $\mu$ g de ARN y agua estéril hasta completar 12  $\mu$ l.

Se calentó la mezcla de reacción a 65°C durante 5 minutos y se transfirió a hielo. Luego se agregaron 4  $\mu$ l de First- Strand Buffer (Invitrogen), 2  $\mu$ l 0.1 M de DTT (Invitrogen) y 1  $\mu$ l de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 unidades/ $\mu$ l, Invitrogen); se mezcló y se incubó a 37 °C por 2 minutos. Luego se agregó 1  $\mu$ l (200 unidades) de la transcriptasa reversa M-MLV y se incubó a 25 °C durante 10 minutos. Se incubó a 37 °C durante 50 minutos y luego se inactivó la reacción a 70 °C por 14 minutos.

## **24. Amplificación por PCR sobre ADNc.**

Para analizar la expresión transcripcional de las proteínas expresadas diferencialmente a nivel del proteoma se diseñaron primers con el objetivo de amplificar una secuencia interna a cada uno de los ORFs (Open Reading Frame) evaluados. Sobre la información disponible de la secuencia de los ORF a evaluar (pertenecientes al genoma secuenciado de la cepa Tohama I), se utilizó el software Primer 3 disponible en Internet para el diseño de los primers, restringiendo el tamaño del producto de amplificación a 400-500 pb. Los ORF evaluados y los primers diseñados a tal fin se detallan en la Tabla III.2.

Tabla II.2.

Gen	Secuencias de primers	Tamaño del producto de amplificación
BP0995 (lpdA)	5' - GCTACAAGGACAGCGTGGT - 3'	450 pb
	5' - TGGTCTTGAGCATGATGTTG - 3'	
BP1630 (wbpP)	5' - GTTTCCTGAACATGCTGGTG - 3'	429 pb
	5' - CCACGTTGTAGACCTGGTTC - 3'	
BP2235 (bscC)	5' - CCTTGATCGTGCAGGATATT - 3'	402 pb
	5' - GGGTGCGAATGTAGAAGGTA - 3'	
BP2245 (bscN)	5' - CATGCCCAAGTTCTATCC - 3'	420 pb
	5' - GACCGAGTCCATCAGAAAAA - 3'	

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20  $\mu$ l. La mezcla de reacción fue la siguiente: 1  $\mu$ l de buffer de reacción 10 x (200 mM Tris-HCl pH 8.4), 1  $\mu$ l de  $MgCl_2$  50 mM, 2  $\mu$ l de mezcla de dNTPs 10 mM, 1  $\mu$ l de DMSO (Dimetilsulfóxido), 2  $\mu$ l de cada primer 0.5  $\mu$ M, 0.2  $\mu$ l de *Taq* ADN polimerasa (5 U/ml, Invitrogen), 2  $\mu$ l del ADNc obtenido anteriormente y agua hasta completar 20  $\mu$ l de volumen final. Las condiciones del ciclado fueron las siguientes:

- ✓ Desnaturalización inicial 45'' a 94 °C
- ✓ 35 ciclos:
  - 20'' a 94 °C
  - 10'' a 53 °C
  - 30'' a 72 °C
- ✓ Extensión final : 30'' a 72°C

Los productos obtenidos fueron corridos en un gel de agarosa 1.5 %.

## 25. Clonado, expresión y purificación de la proteína Bsp22.

### 25.1. Amplificación por PCR y clonado del ORF del gen bsp22.

Para amplificar el ORF correspondiente al gen que codifica para la proteína Bsp22 se diseñó un par de primers utilizando el software Primer 3 disponible en Internet (5'-CACCATGAGCATTGATCTCG-3'/5'-TTGCTCCTGCATGGAATACT-3'). El primer derecho contiene una secuencia adicional CACC en el extremo 5', antes de el codón de inicio, para direccional el clonado en el vector pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20  $\mu$ l. La mezcla de reacción fue la siguiente: buffer de reacción 1x (Invitrogen), solución enhancer 1x (Invitrogen),  $MgSO_4$  5 mM, dNTPs 0.2 mM, primers 0.5  $\mu$ M y 0.5 unidades de Pfx Platinum polimerasa (Invitrogen). Las condiciones del ciclado fueron las siguientes:



- ✓ Desnaturalización inicial 2' a 94 °C,
- ✓ 35 ciclos:
  - 30'' a 94 °C
  - 10'' a 50 °C
  - 40'' a 68 °C
- ✓ Extensión final : 1' a 68°C

El producto de PCR obtenido de 727 pb fue clonado en el vector de entrada pENTR/SD/D-TOPO de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los clones recombinantes fueron seleccionados mediante resistencia a Kanamicina y mediante PCR con primers específicos para el ORF de bsp22. Los plásmidos seleccionados fueron purificados mediante miniprep. El inserto clonado fue transferido al vector de destino Gateway pDEST17 de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen). El vector recombinante pDEST17:bsp22 fue transformado en bacterias *E. Coli* Top10 competentes y las transformantes fueron seleccionadas por resistencia al antibiótico Ampicilina. El clon recombinante seleccionado se confirmó mediante reacción de PCR con primers específicos para el ORF de bsp22.

#### 25.4. Expresión de la proteína recombinante His<sub>6</sub>-Bsp22.

El vector recombinante pDEST17:bsp22 conteniendo el ORF correspondiente Bsp22 fue purificado y transformado en las células utilizadas para la expresión BL21(DE3). Con parte de las UFC obtenidas se inocularon 5 ml de medio LB conteniendo 100 µg/ml de ampicilina (LB<sub>Amp</sub>) hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> =0.6. Luego, 250 µl del cultivo crecido se centrifugaron y lavaron con medio de cultivo fresco para evitar la acumulación de β-lactamasas en el medio de cultivo. Las células lavadas se subcultivaron en 5 ml LB<sub>Amp</sub> (DO<sub>600nm</sub> inicial aprox 0.05) hasta una DO<sub>600 nm</sub> de 0.5-0.8. Al cultivo en fase exponencial de crecimiento se le agregó IPTG (Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1 µM y 4 hs después se obtuvo una alícuota para preparar proteínas totales y evaluar la expresión de la proteína en un SDS-PAGE.

#### 25.5. Purificación mediante cromatografía de afinidad de la proteína His<sub>6</sub>-Bsp22.

Las células recombinantes *E. coli* DE3 obtenidas a partir de 100 ml de cultivo inducido con IPTG fueron resuspendidas en 4 ml de buffer de lisis desnaturalizante (8M urea, 20 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl, pH 7.8). La ruptura celular se efectuó mediante ultrasonido realizando 5 pulsos de 30 segundos c/u con intervalos de 30 segundos a potencia 3 (Sonicador Branson). Luego el lisado se centrifugó (HETICH) para eliminar restos celulares (15 minutos a 3000 g) y a partir del lisado libre de células se efectuó la purificación de la proteína His<sub>6</sub>-Bsp22 utilizando la resina Ni-NTA (Invitrogen). La purificación se realizó bajo condiciones desnaturalizantes (8M urea, 20 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl) y la elución en pasos mediante cambios en el pH (rango utilizado 7.8 - 4). Las fracciones recuperadas en cada paso se analizaron mediante SDS-PAGE y las fracciones conteniendo la proteína purificada fueron dializadas a 4 °C en PBS para remover la urea. La proteína pura fue cuantificada mediante la técnica de Bradford y posteriormente se almacenó a -20 °C hasta su uso.

La identidad de la proteína expresada fue confirmada mediante espectrometría de masa del tipo MALDI-TOF (Huella Peptídica).

## **26. Inmunodetecciones de proteínas (Inmunoblot).**

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.

Se armó el dispositivo de transferencia con el gel a transferir y la membrana previamente tratados con buffer de transferencia (Glicina 38.4 mM, Metanol 20 % v/v, Tris-HCl 5 mM, pH 8.3). Una vez armado el dispositivo se le aplicó una diferencia de potencial de 100 volts durante 1 hora en baño de agua-hielo. Transcurrido dicho tiempo se verificó la eficiencia del proceso mediante tinción con plata del gel transferido y tinción reversible de las proteínas transferidas a la membrana con Rojo Ponceau S (0.1 % p/v de Rojo Ponceau en ácido acético 1 % v/v). 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 °C y con agitación suave. Se retiró la solución con el anticuerpo y se realizaron 6 lavados con buffer TBS- leche 5 % p/v. Luego se agregó el segundo anticuerpo específico para IgG de ratón o de humano conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) disuelto en TBS-leche en una dilución 1/1000, se incubó durante 2.5 horas a temperatura ambiente y con agitación suave. Se retiró la solución del segundo anticuerpo y se realizaron tres lavados con TBS y un lavado en buffer para fosfatasa alcalina (PA, 50 mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl pH 9.5). Finalmente en el momento del revelado se preparó una solución con el sustrato de la fosfatasa alcalina y que consiste en 4,4 µl de NBT (Nitroblue Tetrazolium Chloride) y 3,3 µl de BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-indolylphosphate p-toluidine) en 1ml de buffer PA. Una vez que se desarrolló color se detuvo la reacción con agua bidestilada.

Se realizaron inmunodetecciones de proteínas correspondiente a las cubiertas o a proteínas de membrana de los distintos aislamientos y la cepa vacunal Tohama. Se analizó el perfil de reactividad frente a distintos sueros obtenidos en ratones.

También se utilizó esta metodología para el análisis de la expresión de la proteína efectora del Sistema de Secreción de Tipo III (TTSS), Bsp22, en los aislamientos clínicos con los que contamos en nuestra colección. Asimismo, se realizaron inmunodetecciones evaluando la reactividad de la proteína Bsp22 frente a sueros pertenecientes a individuos no infectados e infectados con *B. pertussis*.

## **27. Obtención de antisueros policlonales en ratones.**

En los ensayos de inmunoblot se utilizaron sueros de ratones sin inmunizar e inmunizados ya sea con las vacunas comerciales o con vacunas preparadas por nosotros partir de aislamientos locales (Capítulo II: Ensayos de protección en modelo murino).

Para obtener el anti - suero reactivo frente a la proteína Bsp22 se inmunizaron, mediante inyección i.p; 3 ratones con 6 ug de proteína His<sub>6</sub>-Bsp22 recombinante utilizando como adyuvante Al(OH)<sub>3</sub>. Se realizaron dos inmunizaciones con intervalos de 14 días, después de las cuales los ratones fueron sangrados a blanco.

## **28. Criterio de selección de los sueros humanos utilizados en ensayos de inmunoblot.**

Los sueros utilizados forman parte de las muestras recibidas en nuestro laboratorio para el diagnóstico molecular y serológico de *B. pertussis*. Proviene de individuos con sospecha clínica de pertussis o sus contactos epidemiológicos.

Para los ensayos de inmunoblot se utilizaron sueros que definimos previamente como pertenecientes a individuos no infectados e infectados (no vacunados) con *B. pertussis*. El criterio para la selección de los sueros se detalla a continuación. Consideramos como individuos infectados a aquellos que poseían sintomatología compatible con pertussis y diagnóstico confirmado mediante la técnica de PCR (77, 104). Así, utilizamos sueros pertenecientes a individuos **exclusivamente infectados**, considerados como aquellos individuos infectados menores de 6 meses o mayores de 16 años sin historia de vacunación reciente. En este punto es importante recalcar que en nuestro país recién este año se va a implementar, dentro del Calendario Nacional, la vacunación en adolescentes.

Los sueros de individuos no infectados utilizados pertenecen a individuos de los mismos grupos de edad que los infectados.

## **29. Infección intranasal.**

Se utilizaron grupos de ratones Balb/c hembras (Biol SAIC) de 3 a 4 semanas de edad (13 para cada tratamiento).

Para la infección se utilizó una suspensión bacteriana realizada a partir de un crecimiento de 24 horas BGAS. La infección se realizó por inoculación intranasal, en la nariz izquierda del ratón bajo leve anestesia, de 50 µl conteniendo  $5 \times 10^7$  -  $1 \times 10^8$  bacterias (se utilizó la relación  $DO_{650} = 1 = 3 \times 10^9$  bacterias/ml). En los ensayos de coinfección el inóculo final de infección también fue de 50 µl conteniendo  $5 \times 10^7$  -  $1 \times 10^8$  bacterias con las distintas cepas en una proporción 1:1.

Se efectuó el recuento de bacterias viables en el inóculo mediante el plaqueo en BGAS de diluciones seriadas de la suspensión bacteriana.

Los ratones infectados fueron sacrificados mediante dislocación cervical luego de 2 horas del desafío (3 ratones) y luego a los 5 y 8 días post-desafío (5 ratones por punto). Se extrajeron los pulmones en esterilidad y se homogeneizaron en PBS (Pro Scientific INC 200). Luego se realizaron diluciones seriadas 1/10 de los homogenatos de pulmón, se plaquearon en medio BGAS por duplicado y se realizó recuento de las UFC después de 3-4 días de incubación a 37 °C.

### 30. Inmunización activa y desafío intranasal.

Grupos de ratones Balb/c hembras de 3 a 4 semanas de edad (13 para cada tratamiento) fueron inmunizados 2 veces con intervalos de 15 días. Las inmunizaciones se realizaron mediante inyección intraperitoneal (i.p.) o subcutánea (s.c.), con  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{10}$  o  $\frac{1}{16}$  de la dosis humana de las vacunas bacterianas triple DPT, (Serum Institute of India LTD), cuádruple Act-HIB DPT (Aventis- Pasteur), o con  $\frac{1}{10}$  de la dosis humana de la vacuna preparada por nosotros a partir de los aislamientos locales. A los 15 días de la segunda inmunización se desafiaron los ratones mediante inoculación intranasal (50  $\mu$ l conteniendo  $5 \times 10^7$  -  $1 \times 10^8$  bacterias) con los aislamientos clínicos de *B. pertussis* y con la cepa vacunal Tohama. En los ensayos de protección en los que se realizó el desafío con más de una cepa, el inóculo final de desafío también fue de 50  $\mu$ l conteniendo  $5 \times 10^7$  -  $1 \times 10^8$  bacterias con las distintas cepas en una proporción 1:1.

Los controles de estos experimentos consistieron en un grupo de ratones inmunizados con la vacuna comercial y desafiados intranasalmente con una suspensión bacteriana de la cepa de referencia Tohama (control positivo de protección), y un grupo de ratones sin inmunizar (inyectados intraperitonealmente con PBS) y desafiados con la cepa Tohama o con los distintos aislamientos clínicos (control negativo de protección).

Los ratones desafiados fueron sacrificados mediante dislocación cervical luego de 2 horas del desafío (3 ratones) y luego a los 5 y 8 días post-desafío (5 ratones por punto). Se extrajeron los pulmones en esterilidad y se homogeneizaron en PBS (Pro Scientific INC 200). Luego se realizaron diluciones seriadas  $\frac{1}{10}$  de los homogenatos de pulmón, se plaquearon en medio BGAS por duplicado y se realizó recuento de las UFC después de 3-4 días de incubación a 37 °C.

### 31. 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  $\text{Log}_{10}(1+\text{UFC})$ . Para los recuentos de viables por debajo del límite de detección (<100 UFC/pulmón) se utilizó un valor correspondiente al  $\text{Log}_{10}$  de 50 UFC. Con el objetivo de comparar la diferencias de protección de las vacunas analizadas frente a las distintas cepas, teniendo en cuenta las posibles diferencias que hubiere en la colonización de éstas, se calculó el  $\text{Log}_{10}(\text{Protección})$  utilizando la siguiente fórmula:  $\text{Log}_{10}(\text{Protección}) = \text{Log}_{10}(\text{media UFC/pulmón de todos los ratones no inmunizados}) - \text{Log}_{10}(\text{UFC/pulmón de cada ratón inmunizado})$ . Las diferencias entre  $\text{Log}_{10}(\text{Protección})$  de las distintas cepas y el  $\text{Log}_{10}(\text{UFC})$  de las medias entre los distintos grupos fueron analizadas mediante Test de ANOVA. Se realizaron comparaciones a posteriori en las que se efectuaron 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.



## **CAPITULO III**

### **CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN CIRCULANTE DE *Bordetella pertussis* MEDIANTE ESTRATEGIAS PROTEÓMICAS**

## Introducción

A partir de los datos epidemiológicos presentados anteriormente es claro que *pertussis* constituye un problema de salud pública y que nuestro país no está ajeno a la situación de resurgencia de la enfermedad observada a nivel mundial. Así, varias son las causas que podrían explicar dicho incremento en el número de casos, entre otras podría mencionarse la mejora en la vigilancia de la enfermedad, corta duración de la inmunidad conferida por las vacunas, circulación de bacterias inmunogénicamente diferentes a las cepas vacunales en uso, o una combinación de todas ellas.

En nuestro país han transcurrido 5 años de la implementación del diagnóstico molecular y pese a que la vigilancia ha mejorado significativamente sobre todo durante el año 2004 y 2005, en los últimos años no se registra un aumento en la proporción de casos confirmados respecto a los sospechosos, por lo que el aumento de casos no debería ser consecuencia de la implementación de la metodología diagnóstica. En relación a la corta duración de la inmunidad conferida por las vacunas, este es un aspecto que se está estudiando en varios países donde han registrado aumento de la incidencia de *pertussis* en adolescentes y adultos (34, 106, 156, 184). En nuestro país no contamos aún con esta información acabadamente, no obstante es de fundamental importancia trabajar en este aspecto ya que permitirá determinar la necesidad o no de incorporar la vacuna acelular para este grupo etario.

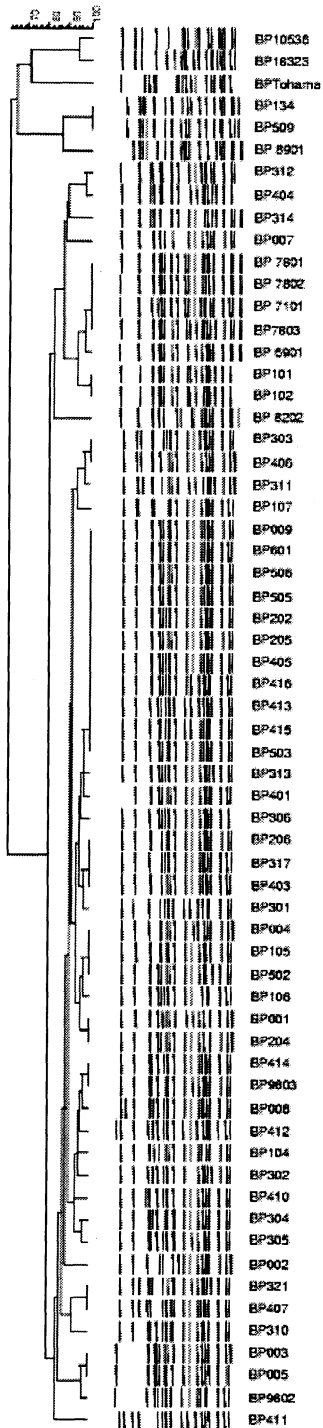
A continuación, dado el interés que reviste en el contexto de este trabajo de tesis, abordaremos el tema de la divergencia de la población bacteriana circulante respecto de las cepas vacunales.

## Caracterización genotípica de la población circulante de *B. pertussis* en Argentina

En los últimos años nuestro laboratorio ha comenzado con el aislamiento y la caracterización molecular de aislamientos de *B. pertussis* obtenidos en nuestro país (10, 64). El primer indicio de divergencia de la población bacteriana circulante se obtuvo a partir de la caracterización molecular de 28 aislamientos obtenidos en nuestro país durante el período 1997-2003. Esta divergencia pudo observarse mediante la utilización de diversas técnicas, entre ellas Fingerprinting basada en PCR empleando primers BoxA (64).

A partir del 2004, gracias al trabajo conjunto con el INEI-ANLIS, el Ministerio de Salud de la Nación y varios hospitales del país, hemos logrado obtener hasta la fecha alrededor de 150 aislamientos del agente causal de la tos convulsa. Gran parte de estos aislamientos han sido caracterizados a nivel genético mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE) y secuenciamiento los antígenos polimórficos, toxina *pertussis* (*ptx*) y *pertactina* (*prn*)

Mediante PFGE pudimos establecer relaciones genotípicas entre los aislamientos (período 1969-1989 y 1997-2006) y las cepas empleadas en la producción de vacunas (10). A partir de los perfiles de PFGE se han agrupado los aislamientos locales en seis clusters (I, II, III, IV, V y VI) basados en un criterio de similitud mayor a 0.7 (Figura II.1)



Grupos PFGE	Perfil	Año	ptxS1	prn
I	V1		1	no A
I	R1	1947	6	E
II	V2	1954	1	B
III	V3	1950	1	B
III	V3		7	D
III	A1	1989	1	no A
IV	A2	2003	1	A
IV	A3	2004	1	A
IV	A4	2003	1	A
IV	A5	2000	1	A
IV	A6	1978	1	A
IV	A6	1978	1	A
IV	A6	1971	1	A
IV	A6	1978	1	A
IV	A7	1969	1	A
IV	A8	2001	1	A
IV	A8	2001	1	A
V	A9	1982	1	no A
VI	A10	2003	2	A
VI	A10	2004	2	A
VI	A11	2003	2	A
VI	A12	2001	2	A
VI	A13	2000	2	A
VI	A13	2006	2	A
VI	A13	2005	2	A
VI	A13	2005	2	A
VI	A13	2002	2	A
VI	A13	2002	2	A
VI	A13	2004	2	A
VI	A13	2004	2	A
VI	A13	2004	2	A
VI	A13	2005	2	A
VI	A14	2003	2	A
VI	A15	2004	2	A
VI	A16	2003	2	A
VI	A17	2002	2	A
VI	A17	2003	2	A
VI	A17	2004	2	A
VI	A18	2003	2	A
VI	A19	2000	2	A
VI	A19	2001	2	A
VI	A19	2005	2	A
VI	A20	2001	2	A
VI	A21	2000	2	A
VI	A21	2002	2	A
VI	A22	2004	2	A
VI	A22	1998	2	A
VI	A23	2000	2	A
VI	A24	2004	2	A
VI	A25	2001	2	A
VI	A26	2003	2	A
VI	A27	2004	2	A
VI	A28	2003	2	A
VI	A29	2003	2	A
VI	A30	2000	2	no A
VI	A31	2004	2	no A
VI	A31	2004	2	A
VI	A32	2003	2	A
VI	A33	2000	2	A
VI	A33	2000	2	A
VI	A34	1998	2	A
VI	A35	2004	2	A

Bottero et al. Clinical and Vaccine Immunology, 2007.

Figura II.1. Caracterización mediante PFGE de aislamientos clínicos de *B. pertussis* de nuestro país.



Los aislamientos clínicos de *B. pertussis* se agrupan en un cluster mayor conteniendo pequeñas diferencias entre ellos, identificándose 35 perfiles. Las cepas vacunales y de referencia representan un cluster significativamente diferente al de todos los aislamientos locales con un 61% de similitud entre ambos. Del total de los aislamientos analizados, el 91% correspondieron a la variante alélica *ptx<sub>s1</sub>A*, las restantes podrían corresponder a las variantes B, D o E. Al analizar el polimorfismo de la *prn*, se observó que las variaciones en este factor de virulencia se limitan a la región 1. Se encontraron 2 tipos de pertactina: 1 y 2, correspondiendo al 79 % de los aislamientos al tipo *prn* 2. En este punto, es importante tener en cuenta que la mayoría de las cepas de *B. pertussis* que se emplean en la producción de vacunas contienen la variante alélica *ptx<sub>s1</sub>B* o *ptx<sub>s1</sub>D* y *prn1* o *prn7*.

Tal como se observó en otros países, se pudo determinar una fuerte correlación entre el perfil de PFGE y el alelo de *prn* expresado por los aislamientos. A partir del año 1989 comienzan a predominar los aislamientos *prn2*, reflejado en una transición del grupo de PFGE IV a VI. Los resultados alcanzados por nuestro grupo muestran que los aislamientos clínicos locales de *B. pertussis* presentan marcadas diferencias genómicas con las cepas vacunales en uso. Es importante destacar que desde 1960 Argentina utiliza para el control de pertussis exclusivamente vacunas celulares desarrolladas en el exterior con cepas extranjeras.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que los brotes reportados en nuestro país fueron causados por variantes de *B. pertussis* diferentes a las incluidas en las vacunas en uso pero similares a las previamente encontradas en Europa, Estados Unidos, Canadá y Taiwán.

Debido a que en nuestro país contamos con escasos aislamientos pertenecientes al período previo a la introducción de la vacunación, no se puede afirmar que los genotipos actuales sean consecuencia de la presión de selección debida a la vacuna. Sin embargo, las claras diferencias entre las cepas vacunales y los aislamientos clínicos brindan un apoyo importante a la hipótesis de la inmunoselección causada por la vacunación.

# **PARTE I**

## **PROTEOMICA COMPARATIVA APLICADA APLICADA AL ESTUDIO DE UN PATÓGENO DIVERGENTE**

En el contexto de la divergencia antigénica observada entre las cepas vacunales y la población circulante de *B. pertussis*, y sobre la hipótesis de la adaptación de pertussis a la población inmunizada; hemos decidido abordar un estudio proteómico de tipo comparativo. En este sentido, nos propusimos intentar identificar diferencias de expresión e inmunógenos que puedan tener luego un rol en lo que respecta a la protección y la adaptación de pertussis a la vacuna. Para ellos planteamos el uso de estrategias metodológicas del tipo proteómicas de componentes de la superficie bacteriana en combinación con análisis serológicos. Esta metodología que permite identificar proteínas puede realizarse gracias al conocimiento de la secuencia del genoma completo de *B. pertussis* (152).

Desde la publicación de la primera secuencia completa del genoma de un organismo vivo en 1995, la velocidad en la que se han determinado las secuencias de distintos genomas ha crecido exponencialmente. Actualmente más de 500 especies bacterianas han sido secuenciadas. El estudio de genomas por medio de metodologías computacionales y experimentales ha permitido el avance de nuestro conocimiento respecto a la fisiología de microorganismos y los mecanismos de patogenicidad y evolución de los genomas de muchos patógenos. Con respecto a esto último, *B. pertussis* fue considerado históricamente un patógeno clonal, en el sentido de que el contenido de su genoma se creía invariante. Actualmente, desde el punto de vista genómico, existen suficientes evidencias que permiten considerar a *B. pertussis* como un patógeno divergente. A pesar de la escasa variación en el contenido génico de este patógeno, hemos visto que posee mecanismos que serían capaces de generar variación en el genoma. Sin embargo, no está claro cuál es la relevancia funcional de dichos mecanismos y más aun, cuál es el rol en lo que respecta a la adaptación de *B. pertussis* a la población inmunizada.

Teniendo en cuenta que no existe evidencia de que *B. pertussis* pueda adquirir genes relacionados a la virulencia mediante transferencia horizontal, la evolución de este patógeno en el contexto de una población inmunizada podría implicar al menos tres mecanismos diferentes(179):

✓ **Polimorfismo** en epitopes de los principales genes de virulencia, disminuyendo el reconocimiento de patógeno por el sistema inmune del hospedador después de la vacunación. Ejemplo de esto, el polimorfismo observado en los inmunógenos de superficie, toxina pertussis y la pertactina.

✓ **Adaptación de la virulencia** cambiando el nivel expresión de los genes de virulencia. Como consecuencia, *B. pertussis* podría volverse menos visible por el sistema inmune del hospedador (disminuyendo la expresión) o colonizar más eficientemente por aumento del nivel de expresión de genes de virulencia.

✓ **Aumento de la inmunosupresión**, aumentando la producción de moléculas inmunomoduladoras.

Para avanzar en el conocimiento en lo que respecta a estos dos últimos puntos, es claro que el conocimiento del genoma y su análisis no son suficientes.

Así, en la era post genómica, el desafío más importante es poder determinar la relevancia funcional de la información obtenida a través del secuenciamiento del genoma. Mientras que la disponibilidad de la secuencia completa de los genomas permite la identificación de todos los productos proteicos potenciales, esta información no es suficiente para la identificación del conjunto de proteínas o proteoma, que efectivamente son expresadas y hacen a la funcionalidad celular en un contexto determinado. Recientemente el avance en tecnologías de separación de proteínas, combinada con la espectrometría de masa y el secuenciamiento del genoma ha hecho posible la determinación completa de los componentes proteicos de un organismo en una condición dada.

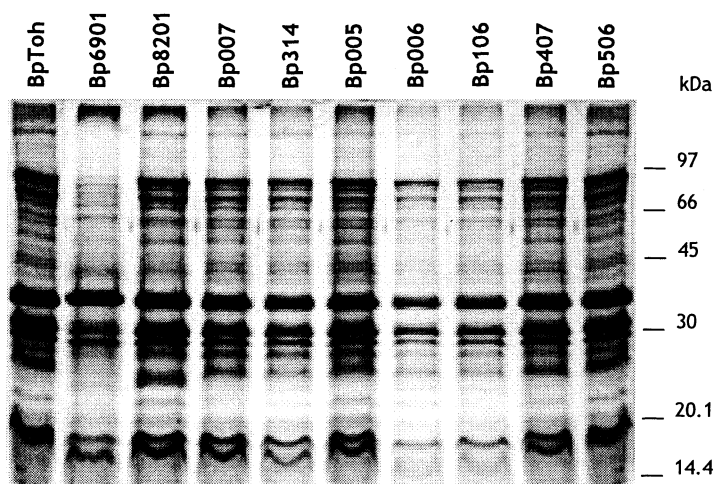
En este capítulo presentamos los resultados obtenidos sobre este aspecto y discutimos los mismos en el marco del objetivo propuesto.

## Identificación de componentes bacterianos inmunogénicos, comunes y diferenciales, entre la cepa vacunal y la población circulante de *B. pertussis*.

Como punto de partida de los estudios proteómicos que decidimos realizar en este trabajo de tesis y con el objetivo de comenzar a analizar si las divergencias genómicas entre las cepas vacunales y la población bacteriana circulante (PBC) de *B. pertussis* tienen implicancias funcionales; realizamos ensayos basados en inmunodetecciones. En éstos, evaluamos tanto el perfil de proteínas expresadas por la PBC como la respuesta que son capaces de generar en el hospedador.

Debido a que la superficie bacteriana constituye la interfase en la interacción patógeno - hospedador y está expuesta al sistema inmune, decidimos analizar en forma comparativa, fracciones proteicas enriquecidas en proteínas de superficie de aislamientos locales y la cepa vacunal Tohama. De aquí en más denominaremos más sencillamente a estas fracciones como cubiertas.

Para este análisis obtuvimos cubiertas tanto de la cepa vacunal Tohama (genotipo *ptS<sub>1</sub>B/prn1*), como de nueve aislamientos clínicos obtenidos en distintos años y elegidos en base a su divergencia genómica (mostraron distintos perfiles en los estudios de PFGE) y al tipo de alelos de los antígenos polimórficos: *ptS<sub>1</sub>A/prn1* y *ptS<sub>1</sub>A/prn2* respecto a la cepa Tohama I. En la Figura II.1 se muestra una imagen representativa del perfil obtenido al separar las cubiertas mediante un gel de poliacrilamida 12.5 % p/v en condiciones desnaturizante (SDS-PAGE 12.5 %).



**Figura II.1. Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12.5% p/v de cubiertas de *B. pertussis*.** Se resolvieron cubiertas de la cepa Tohama I y nueve aislamientos clínicos representativos de nuestra colección. A la derecha se indica la migración de los patrones de PM. La tinción del gel se realizó con Coomassie Blue R-250.

Una vez obtenidas las cubiertas, éstas fueron utilizadas para realizar inmunodetecciones. Para ello se emplearon antisueros obtenidos en ratones mediante inmunizaciones con la vacuna cuádruple comercial HIB-DPT (cepas vacunales *Bp1414* y *Bp1416*, genotipo *prn1* y *ptS<sub>1</sub>B/fim2* y *ptS<sub>1</sub>D/fim3* respectivamente) o con vacunas preparadas por nosotros a partir de la cepa vacunal Tohama y un aislamiento clínico, *Bp006* (*ptS<sub>1</sub>A/prn2*); y con sueros de ratones naïve.

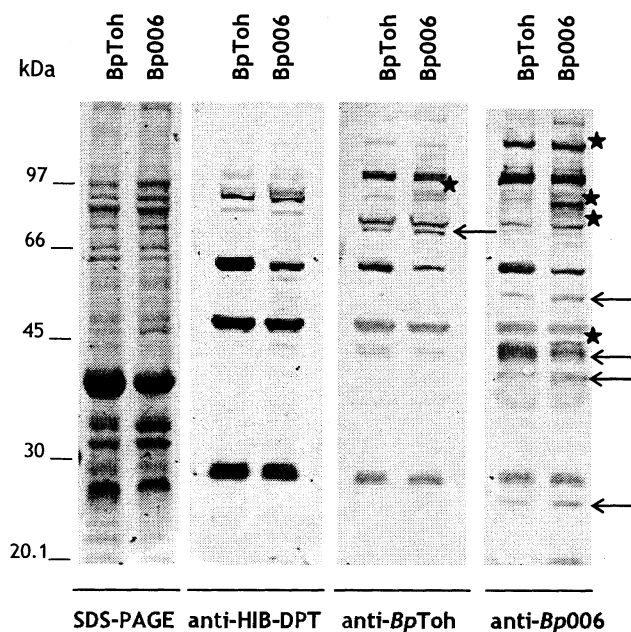
Con el objetivo de poder comparar los resultados obtenidos; ya sea para los distintos sueros como para las distintas cepa/aislamientos; sistemáticamente las cubiertas de los aislamientos fueron corridas en paralelo con la de la cubierta de la cepa Tohama. Las imágenes obtenidas de los geles y de los inmunoblots fueron alineadas y analizadas utilizando el software ImageMaster 2D Platinum (GE).

A modo de ejemplo, la Figura II.2 muestra las imágenes alineadas del SDS-PAGE y las membranas reveladas con los distintos antisueros para el aislamiento *Bp006*. En principio no se observaron diferencias en el perfil electroferético de las proteínas de la cubierta entre la cepa vacunal Tohama y los distintos aislamientos clínicos. Sin embargo, en los ensayos de inmunoblot, si se observaron diferencias en los perfiles de reactividad. En general se observó que componentes mayoritarios de la preparación de las cubiertas no muestran una reactividad proporcional a su abundancia; mientras proteínas que son apenas distinguibles en el SDS-PAGE muestran una fuerte respuesta. Todo esto indica que la metodología utilizada es sumamente sensible.

En los tres paneles de la Figura II.3 se muestran los resultados obtenidos para aislamientos del genotipo *prn1* y para aislamientos *prn 2* con los distintos sueros. Ninguna de la cubiertas mostró reactividad frente al antisuero de ratones naïve (no mostrado). Respecto a los otros tres sueros empleados, se observaron diferencias de reactividad entre las cubiertas de la cepa Tohama y los distintos aislamientos, tanto para un mismo suero como entre sueros.

Respecto al suero anti HIB-DPT, tanto la cepa Tohama como los aislamientos clínicos mostraron un perfil muy similar y con poca reactividad (Figura II.3, panel A). Sistemáticamente se detectaron al menos cuatro proteínas generadoras de una fuerte respuesta que no se corresponden en la corrida electroforética con proteínas que muestren un mayor nivel expresión. De estas cuatro proteínas, tres fueron también fuertemente reconocidas por los otros dos sueros indicando que son componentes inmunogénicos comunes de todas las cepas.

Respecto a la reactividad frente a los sueros anti-cepa vacunal Tohama I y anti-aislamiento *Bp006*, se detectaron diferencias de reactividad cuali y cuantitativas tanto entre la cepa Tohama I y los aislamientos clínicos como entre sueros (marcadas con estrellitas y flechas en Figura II.3, respectivamente). En general, las diferencias de reactividad de los aislamientos clínicos respecto a Tohama I fueron de falta de reactividad para el suero anti-Tohama (Figura II.3, panel B) y de reactividad, o aumento de ésta, con el suero dirigido contra el aislamiento (Figura II.3, panel C). En particular, las cubiertas de los aislamientos más recientes, cuyo background genético es *prn2* muestran un mayor reconocimiento por parte del suero anti-*Bp006* respecto a la cepa Tohama I y los aislamientos *prn1*.



**Figura II.2.** Análisis de la reactividad de componentes de la cubierta de Tohama I y el aislamiento clínico Bp006. Las muestras correspondientes a proteínas de la cubierta fueron resueltas en SDS-PAGE 12.5% y transferidas a membranas de PVDF. Luego se analizó la reactividad de las cubiertas frente a suero de ratones previamente inmunizados con la vacuna comercial HIB-DPT y con formulaciones preparadas a partir de la cepa Tohama I y el aislamiento clínico Bp006. Se compararon las reactividades, obtenidas con los distintos antisueros, del aislamiento clínico respecto a la cepa Tohama. ★ indica reactividad diferencial o aumentada. Mediante flechas se indica la diferencias de reactividad de las distintas cubiertas entre el suero anti-Tohama I y el suero anti-Bp006.

**Diferencia de reactividad entre sueros.** En principio se podría pensar, que un suero dado va a reconocer en mayor medida aquellos componentes más similares a los que generaron la respuesta del suero en cuestión (tal como ocurre con el suero anti-Bp006 y los aislamientos *prn2*). Sin embargo, de forma sistemática se detectaron, tanto para la cubierta de la cepa Tohama I como para las de los 9 aislamientos clínicos evaluados, cuatro bandas por debajo de los 66 kDa, que presentan reactividad en las inmunodetecciones realizadas con el suero anti-Bp006 pero no en las realizadas con el suero anti-Tohama I. Asimismo, también se observaron reactividades diferenciales de los aislamientos *prn2* con el suero anti-Tohama I, cuyo background genético es *prn1*. Al momento de interpretar estos resultados se podría pensar que podrían corresponder a reactividades producto de reacciones cruzadas. Quizás resulte más sencillo analizar estas observaciones desde el punto de vista de los anticuerpos presentes en los distintos sueros. Respecto a las cepas que dieron origen a ambos sueros, de las que sólo sabemos que divergen genéticamente, se observa que aparentemente generan una respuesta diferencial en el hospedador y que esto se traduce luego en reactividades diferenciales frente a las mismas proteínas.

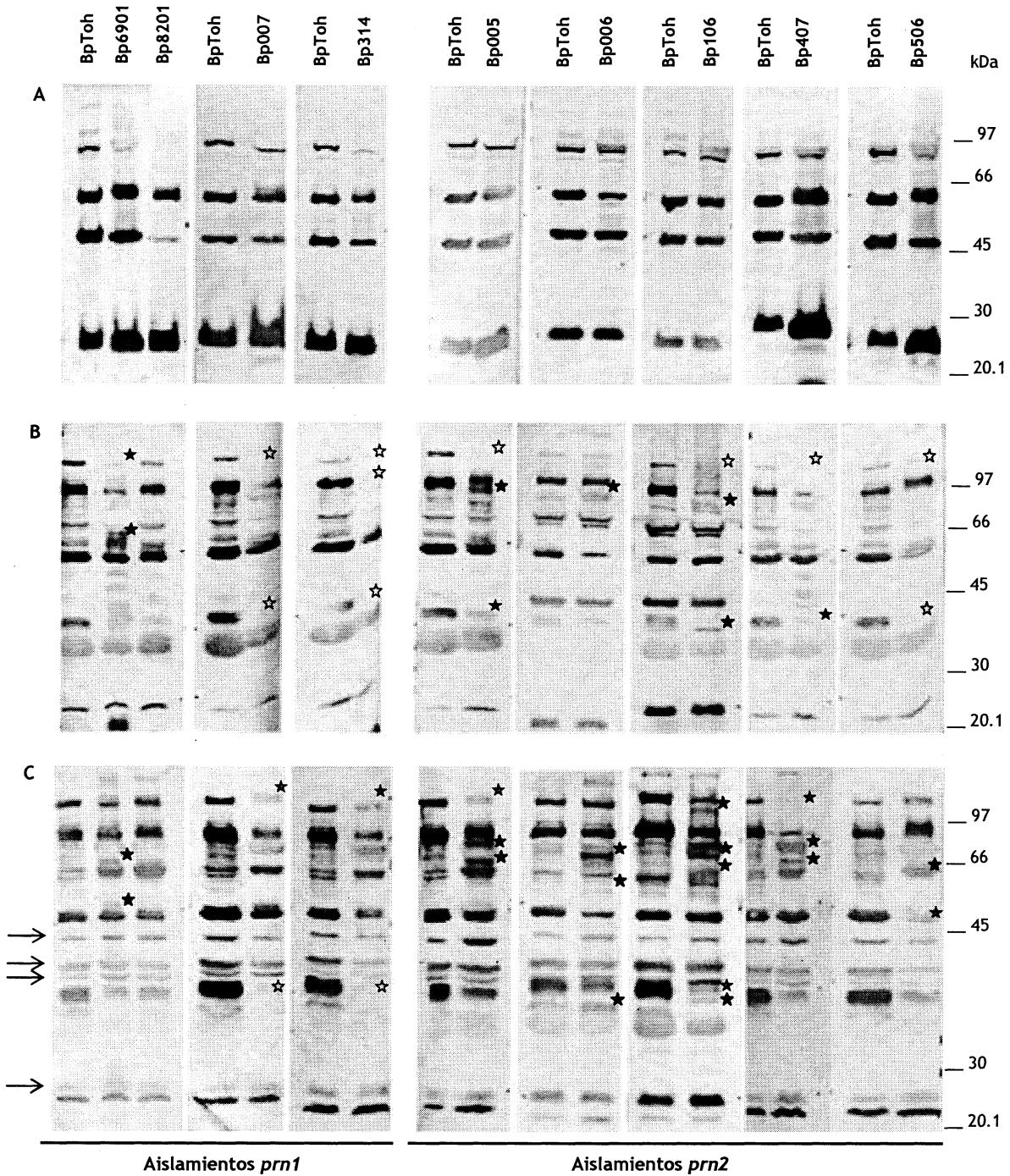


Figura II.3. Análisis de la reactividad de componentes de las cubiertas de *B. pertussis* mediante inmunoblot. Las muestras correspondientes a proteínas de la cubierta de aislamientos clínicos de *B. pertussis* obtenidos en distintos años y de la cepa Tohama I fueron resueltas en SDS-PAGE 12.5% y transferidas a membranas de PVDF. Luego se analizó la reactividad de las cubiertas frente a suero de ratones previamente inmunizados con la vacuna comercial HIB-DPT (Panel A) y con formulaciones preparadas a partir de la cepa Tohama I (Panel B) y un aislamiento clínico, Bp006 (Panel C). Para la detección de la reactividad se utilizó IgG anti-ratón conjugada con fosfatasa alcalina. Se compararon las reactividades, obtenidas con los distintos anti-sueros, de los aislamientos clínicos respecto a la cepa Tohama. ★ indica reactividad diferencial o aumentada, ☆ indica reactividad menor y la ausencia de reactividad es indicada por ☆. Mediante flechas se indica la diferencias de reactividad de las distintas cubiertas entre el suero anti-Tohama I y el suero anti-Bp006. Los resultados mostrados son representativos de los obtenidos en tres ensayos independientes.



Dado que las cubiertas fueron resueltas en electroforesis en condiciones desnaturalizantes se deduce que el reconocimiento de los anticuerpos presente en los distintos sueros corresponde a epitopes lineales y no a conformacionales. En particular, para la pertactina se ha demostrado que la variación en la región polimórfica 1 afecta la unión de anticuerpos conformacionales y que estos anticuerpos presentan escasa reacción cruzada en el reconocimiento entre pertactinas del tipo 1 y 2. Así, se ha sugerido que la pertactina induce anticuerpos tipo específicos (93). Sin embargo, anticuerpos dirigidos contra epitopes lineales de prn1 son capaces de reconocer tanto pertactinas del tipo 1 como 2 (110).

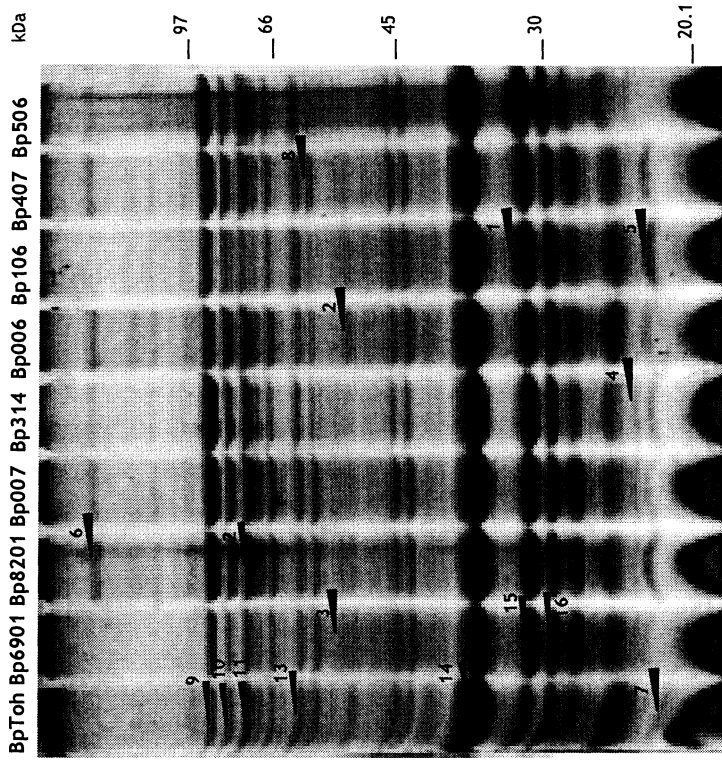
Los resultados presentados hasta aquí, son sólo descriptivos, pero sin embargo nos brindan alguna información; la cepa Tohama I y el aislamiento clínico utilizado (*Bp006*) no generan la misma respuesta y no son percibidos de igual manera al menos por el hospedador evaluado. Es más, se observó que cuantitativamente, aún para la cepa Tohama el suero obtenido con el aislamiento presenta una mayor reactividad, de modo que podría indicar que el aislamiento utilizado para obtener el antisuero es más inmunogénico que la cepa vacunal.

**Diferencias de reactividad entre las distintas cubiertas.** Respecto a las diferencias de reactividad entre los aislamientos y la cepa vacunal; y en particular con el suero anti-*Bp006*, muchas son comunes a varios de los aislamientos ensayados. Estas podrían corresponder a proteínas inmunogénicas expresadas diferencialmente por los distintos aislamientos o alternativamente a un componente común pero que muestra una reactividad cuantitativamente diferencial. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, con la metodología empleada no pudieron detectarse diferencias en el perfil electroforético.

Para avanzar en este último aspecto decidimos aumentar la resolución del perfil de las cubiertas en las corridas electroforéticas. Así, variamos tanto el porcentaje de acrilamida de los geles como la longitud de los mismos, de modo de resolver mejor proteínas de pesos moleculares altos e intermedios. Los resultados obtenidos en estas corridas electroforéticas se muestran en la Figura II.4. En estos geles pudimos detectar proteínas cuya expresión es variable entre las cubiertas de la cepa Tohama I y los aislamientos clínicos. Estas variaciones en la expresión para algunos casos fueron aparentemente del tipo *on-off* (en Figura II.4 bandas 1, 3, 4, 5 y 7) y en otros se detectó una variación del tipo cuantitativa (en Figura II.3 bandas 2, 6 y 8). Algunas proteínas mostraron expresión diferencial para todos los aislamientos respecto a Tohama I (presencia de banda 3 y ausencia de 7 en los aislamientos). Otras mostraron expresión única en determinados aislamientos, como la banda 1 en *Bp106* y la 2 en *Bp006*.

Las proteínas resueltas fueron sometidas a Espectrometría de Masa (EM) del tipo MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight). Para esto, las proteínas fueron sometidas a digestión enzimática con la proteasa tripsina y el digesto se sometió a EM, obteniéndose para cada una el registro de su huella peptídica (PMF, Peptide Mass Fingerprint). La identidad de las proteínas se pudo determinar entonces, a partir de la comparación de la esta huella peptídica experimental con la obtenida *in silico*, a partir de la digestión virtual de todas las proteínas potenciales de ser expresadas por el genoma anotado de *B. pertussis*.

SDS-PAGE 10%



SDS-PAGE 12.5%

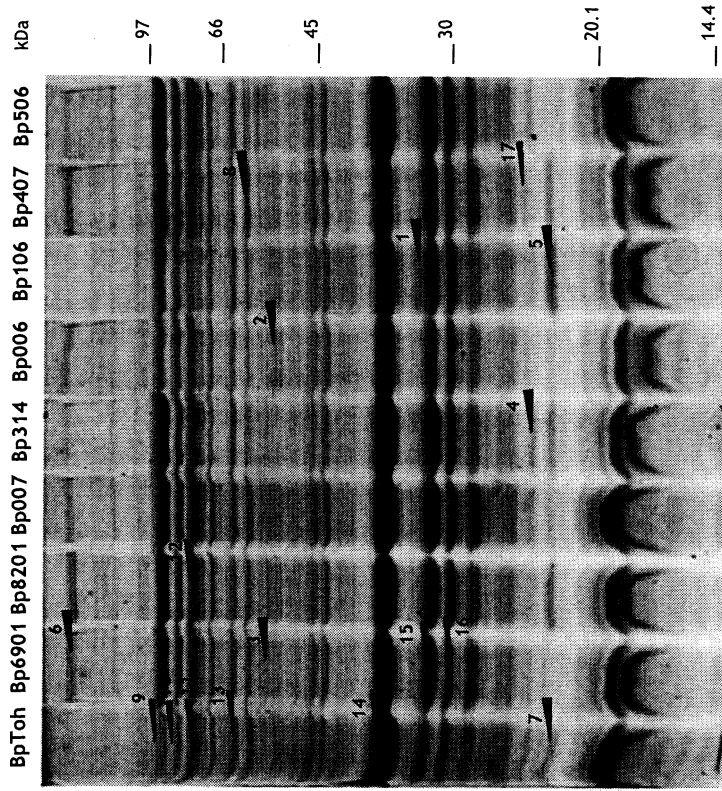


Figura II.4. Electroforesis en gels de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) de cubiertas de *B. pertussis*. Se resolvieron cubiertas de la cepa Tohama I y nueve aislamientos clínicos, representativos de nuestra colección, en gels de poliacrilamida 10 % p/v y 12.5 % p/v. A la derecha de cada uno de los gels se indica las bandas correspondientes a los marcadores de PM resueltos en cada gel. La tinción de los gels se realizó con Coomassie Coloidal. Las cuñas rojas indican proteínas cuya expresión no fue común a todas las cubiertas. Las cuñas azules indican proteínas de expresión común. Los números corresponden al código utilizado en la Tabla II.3 en la que se detalla la identidad de las proteínas

Tabla III.1. Identificación de proteínas correspondientes a las cubiertas de Tohama I y aislamientos de *B. pertussis*.

Nº	Producto	Gen	Nº acceso	PM (kDa)	pI	Localización celular <sup>1</sup>	Función bioquímica <sup>2</sup>
1	Autotransporterr (Vag8)	<i>vag8</i>	<i>bp2315</i>	94.8	6.3	M. externa	Islas patogenicidad/ determinantes
2	ND						
3	ND						
4	ND						
5	ND						
6	Filamentous Hemagglutinin (FHA)	<i>fhaB</i>	<i>bp1879</i>	367.1	8.76	M. externa	Estructura de superficie
7	ND						
8	Chaperonin 60 kDa	<i>groEI</i>	<i>bp 3495</i>	57.4	4.9	Citoplasmática	Chaperona
9	Autotransporterr (Vag8)	<i>vag8</i>	<i>bp 2315</i>	94.8	6.3	M. externa	Islas patog/ determinantes
10	Probable TonB-dependent receptor for iron transport	<i>bfrD</i>	<i>bp 0856</i>	81.5	10.0	M. externa	Almacenamiento de Fe
11	Putative outer membrane protein	-	<i>bp 3077</i>	77.6	6.09	M. externa	Constituyente de membrana externa
12	Serum resistance protein	<i>brkA</i>	<i>bp 3494</i>	103.3	6.62	M. externa	Islas patogenicidad/ determinantes
13	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	<i>sdhA</i>	<i>bp 2361</i>	65.7	6.08	Citoplasmática	Ciclo TCA
14	Outer membrane porin protein precursor	-	<i>bp 0840</i>	41.0	5.4	M. externa	Constituyente de membrana externa
15	Tracheal colonization factor A	<i>tcfA</i>	<i>bp1201</i>	65.8	5.68		Islas patog/ determinantes

ND: No Determinado. <sup>1</sup> de acuerdo a predicción por PSORT. <sup>2</sup> de acuerdo a clasificación de Riley.

Tabla III.1. Identificación de proteínas correspondientes a las cubiertas de Tohama I y aislamientos de *B. pertussis*.

N°	Producto	Gen	N° acceso	PM (kDa)	pl	Localización celular <sup>1</sup>	Función bioquímica <sup>2</sup>
16	Serum resistance protein	<i>brkA</i>	<i>bp3494</i>	103.4	6.62	M. externa	Islas patog/ determinantes
17	Virulence factors transcription regulator	<i>bvgA</i>	<i>Bp1878</i>	22.9	8.6	Citoplasmática	Global regulatory functions

ND: No Determinado. <sup>1</sup> de acuerdo a predicción por PSORT. <sup>2</sup> de acuerdo a clasificación de Riley.

Utilizando diferentes herramientas bioinformáticas se realizó una predicción de la localización celular así como también una asignación de funciones bioquímicas para las proteínas identificadas por EM (Tabla II.3). El algoritmo PSORT se utilizó para asignar localización celular. Este programa utiliza distintos métodos para predecir la localización de proteínas en alguno de los 5 compartimentos celulares en bacterias Gram negativas: membrana externa, membrana interna, periplasma, membrana citoplasmática y citosol. Entre otras cosas el algoritmo tiene en cuenta la presencia de secuencias consenso de aminoácidos (péptidos señal, secuencias transmembrana) y homología con proteínas cuya localización se conoce a partir de datos experimentales (70). Para asignar funciones bioquímicas a las proteínas identificadas se utilizó la clasificación de Riley, la cual se basa en las anotaciones realizadas sobre el genoma de *E. coli* K12. Estas anotaciones surgen a partir de la descripción de las funciones de productos génicos, las cuales fueron determinadas experimentalmente (107). A partir de esta clasificación y por homología genética se pueden establecer funciones bioquímicas para los genes de otros microorganismos.

Así, mediante EM se pudo determinar la identidad de algunas proteínas, con lo cual comenzamos a definir la composición de lo que habíamos definido anteriormente como cubiertas de *B. pertussis* (Tabla III.1). En la literatura se han reportado distintos análisis de la composición de fracciones de proteínas superficiales o proteínas de membrana externa (OMP por sus siglas en inglés) así como de análisis serológicos. Sin embargo, a menudo, estos análisis fueron más bien descriptivos. Robinson y colaboradores describieron la composición de proteínas de la envoltura de *B. pertussis* como proteínas de 90, 86, 81, 33, 31 y 30 kDa específicas de la fase virulenta y ausentes en *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis*. Asimismo han destacado la presencia de una proteína mayoritaria de 41.5 kDa y la protección conferida por estas preparaciones frente al desafío intracerebral con *B. pertussis* (162). En otro trabajo, Redhead y colaboradores determinaron que la OMP de 41.5 kDa no parece estimular respuesta de anticuerpos en ratón así como tampoco lo hacen las proteínas de 30 y 32 kDa. Sin embargo proteínas de alto peso molecular entre las que se encuentran la FHA y otras proteínas de 62, 45 y 27 kDa que aparecen en baja proporción en los geles de poliacrilamida muestran una extremadamente fuerte reactividad frente al suero de ratones vacunados. En particular estos autores determinaron que la reactividad a la altura de 27 kDa corresponde a la toxina pertussis (158).

Los resultados obtenidos en esta parte de nuestro trabajo, tanto en el perfil de las cubiertas como en las inmunodetecciones, son similares a las observaciones reportadas por Robinson y Redhead. Como se destacó en la introducción de este capítulo, la aplicación de la EM y el conocimiento del genoma de *B. pertussis* permiten identificar las proteínas expresadas por este patógeno. Así, en este trabajo se ha avanzado en el conocimiento de la identidad de las proteínas de la cubierta de *B. pertussis*. Varias de las proteínas identificadas, cuya expresión es común en todas las cubiertas analizadas, han sido previamente caracterizadas y algunas constituyen factores de virulencia de *B. pertussis* ampliamente estudiados.

**Proteínas identificadas de alto PM.** Fha, Vag 8, BfrD, SdhA y BrkA (bandas 6,9, 10, 11 y 12 en Figura II.4) podrían corresponder a las proteínas de alto PM que mostraron alta reactividad en las inmunodetecciones (ver Figura II.2 y II.3). No obstante, no se puede afirmar que las reactividades diferenciales observadas en esa zona de PM se deban a dichas proteínas. Estas reactividades podrían corresponder también a proteínas

de baja abundancia que no son detectables en el perfil del SDS-PAGE y/o no fueron resueltas con el método de separación de proteínas empleado.

La chaperona de 60 kDa, GroEl (banda 8 en Figura II.4), podría corresponder a la banda por debajo de 66 kDa que mostró fuerte reactividad en las inmunodetecciones. En este sentido, en otros patógenos se ha determinado que esta proteína es inmunogénica (18, 80). Recientemente, en *B. pertussis* se ha demostrado que GroEl, junto con BrkA, presentan actividades inmunogénicas y adyuvantes y confiere protección parcial en el modelo animal de infección (20).

**Proteínas identificadas de bajo PM.** Las bandas 15,16 y 1 (detectada sólo en el aislamiento *Bp106*), pertenecerían a las proteínas autotransportadoras TcfA, BrkA y Vag8 respectivamente. Los autotransportadores de *Bordetella* forman una familia de proteínas homólogas definidas sobre la base de un extremo C-terminal conservado y la presencia de un motivo RGD implicado en la unión a integrinas. En general estas proteínas son sintetizadas como un precursor polipeptídico que es sometido a clivaje proteolítico liberando el extremo C-terminal de 30 kDa. El dominio C-terminal, de la proteína forma barriles de hoja  $\beta$ -plegada en la membrana externa de la bacteria y facilita la exportación del polipéptido remanente, la cual se realiza sin participación de proteínas accesorias (95, 130).

Para las tres proteínas identificadas el PM predicho para estas proteínas no coincide con el observado en los SDS-PAGE. Sin embargo el procesamiento que sufren estas proteínas puede explicar nuestro hallazgo. BrkA es sintetizada como un precursor de 103 kDa que luego es procesado durante su secreción para producir un dominio N-terminal que es transportado y un dominio C-terminal transportador de 30 kDa. Aunque clivado, el dominio de 73 kDa permanece fuertemente asociado a la superficie y el dominio C-terminal posee la habilidad de formar un poro en la bicapa lipídica de la membrana. El clivaje del polipéptido precursor tiene lugar entre la asparagina 731 y la alanina 732 (148). Nuestros resultados sugieren que la banda 12 (en la zona de alto PM) y la banda 16 corresponderían a los dominios N-terminal y C-terminal de BrkA, respectivamente. Al someter a la banda 16 a digestión trípica y EM se identificaron 10 péptidos los cuales representaron el 13 % de cobertura de la secuencia. La localización de estos péptidos dentro de la proteína mostró que todos pertenecían al extremo C-terminal y el primero de ellos en una posición posterior a la alanina 732. Así, teniendo en cuenta toda esta información se podría afirmar que la banda 16 corresponde al dominio C-terminal del BrkA.

La proteína TcfA es sintetizada como un precursor de 90 kDa asociada a la célula que es procesado para liberar una proteína madura de 60 kDa (95, 130). El dominio C-terminal transportador remanente posee un PM de 34 kDa. Al identificar la banda 15 por EM se observó, al igual que para BrkA, que los péptidos identificados cubrían el extremo C-terminal.

Respecto a Vag8, esta proteína es una proteína de membrana externa de 95 kDa. A pesar de que posee un dominio C-terminal homólogo a los otros autotransportadores, hasta el momento se cree que éste no sufriría clivaje (65, 130). Sería interesante determinar entonces, si la banda 1 es un producto de degradación del polipéptido de 95 kDa o si Vag8 podría sufrir algún tipo de modificación.

Hasta aquí nos hemos referido a proteínas que fueron en su mayoría expresadas por todos los aislamientos. Lamentablemente, no se logró determinar la identidad de todas las proteínas cuya expresión se detectó como diferencial en las distintas cubiertas. Tampoco se lograron identificar las proteínas de alrededor de 45 kDa y las mayores de 97 kDa que mostraron una fuerte reactividad, sobre todo con el suero anti-*Bp006*. Si bien la EM es una técnica muy poderosa, a menudo es dificultoso identificar de manera confiable, es decir estadísticamente significativa, proteínas tanto de baja abundancia como de bajo peso molecular. Con el objetivo de poder aumentar la resolución en la separación de las cubiertas e identificar marcadores diferenciales entre los aislamientos clínicos y la cepa Tohama I; en la próxima sección de este trabajo abordamos un análisis proteómico comparativo más profundo, basado SDS-PAGE en dos dimensiones.

## **Proteoma de membrana de la cepa vacunal Tohama y los aislamientos clínicos Bp006 y Bp106.**

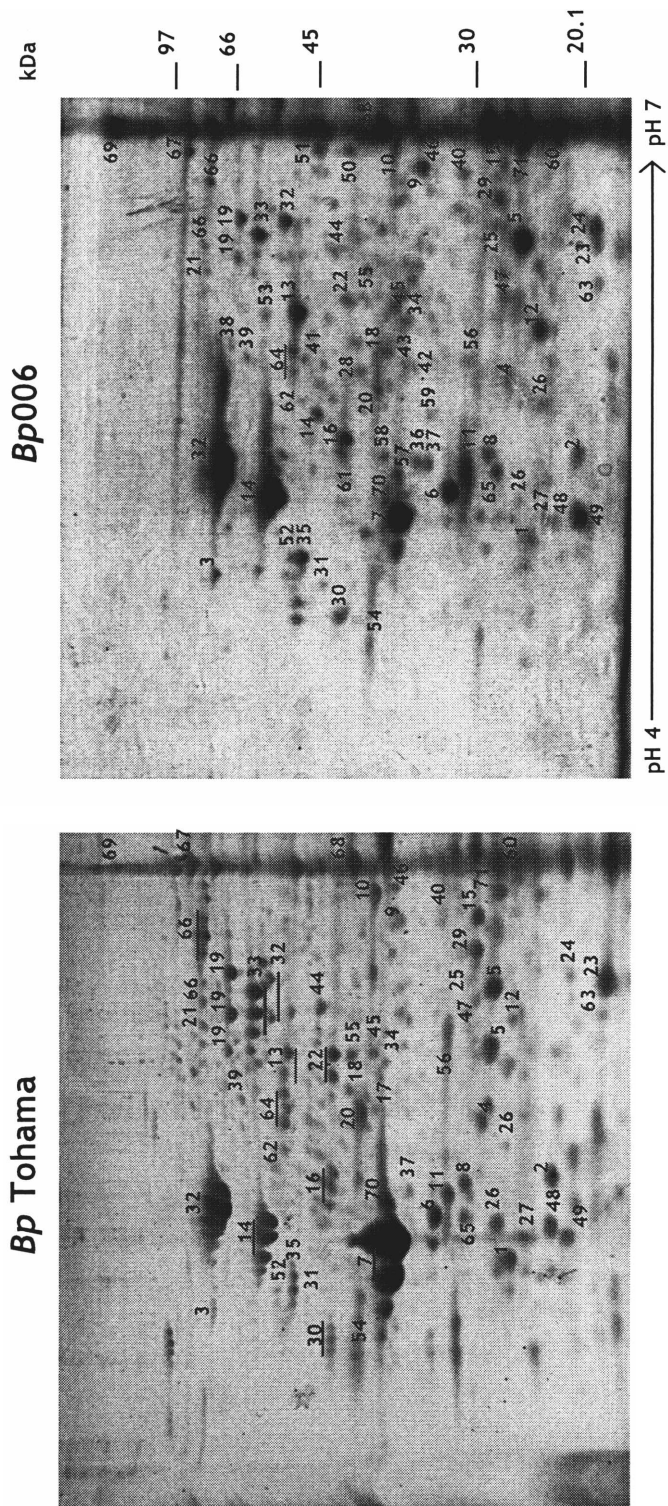
Para avanzar en el análisis de la divergencia de la población bacteriana circulante en nuestro país, desde el punto de vista fenotípico; en esta parte de la tesis abordamos un estudio proteómico del tipo comparativo. Para esto, elegimos dos aislamientos clínicos de nuestra colección, Bp006 y Bp106, con el objetivo de analizar proteínas enriquecidas en componentes de membrana y compararlas con las de la cepa vacunal Tohama I. La elección de estos dos aislamientos se basó, fundamentalmente, en los resultados obtenidos anteriormente. Tanto Bp006 como Bp106 mostraron diferencias de reactividad en los ensayos de inmunoblot así como también diferencias en el perfil electroforético en geles unidimensionales.

Así, para abordar el análisis del proteoma de membrana de *B. pertussis* realizamos electroforesis bidimensionales en geles de poliacrilamida, en condiciones desnaturizantes (2D SDS-PAGE). La metodología utilizada para la obtención de las proteínas enriquecidas en componentes de membrana posee pequeñas diferencias respecto a la utilizada para obtener las cubiertas que se analizaron anteriormente. Este es debido, principalmente, a requerimientos de la calidad de la muestra para someterla a un isoelectroenfoque. No obstante, se cuidaron especialmente las condiciones de cultivo para la obtención de la biomasa a partir de la cual se extrajeron las proteínas, de modo que el material de partida para la preparación de la muestra fuera el mismo que el utilizado para obtener las cubiertas. Asimismo, a efecto de que los resultados obtenidos sean comparables, tanto los cultivos, como la obtención de las muestras enriquecidas en proteínas de membrana y la separación de las mismas de acuerdo a su punto isoelectrico (pI) y masa fueron realizadas en paralelo para las tres cepas. La separación de acuerdo al pI de las proteínas se realizó en un rango de pH 4-7 y luego, la separación de acuerdo al PM en un SDS-PAGE 12.5 % de acrilamida.

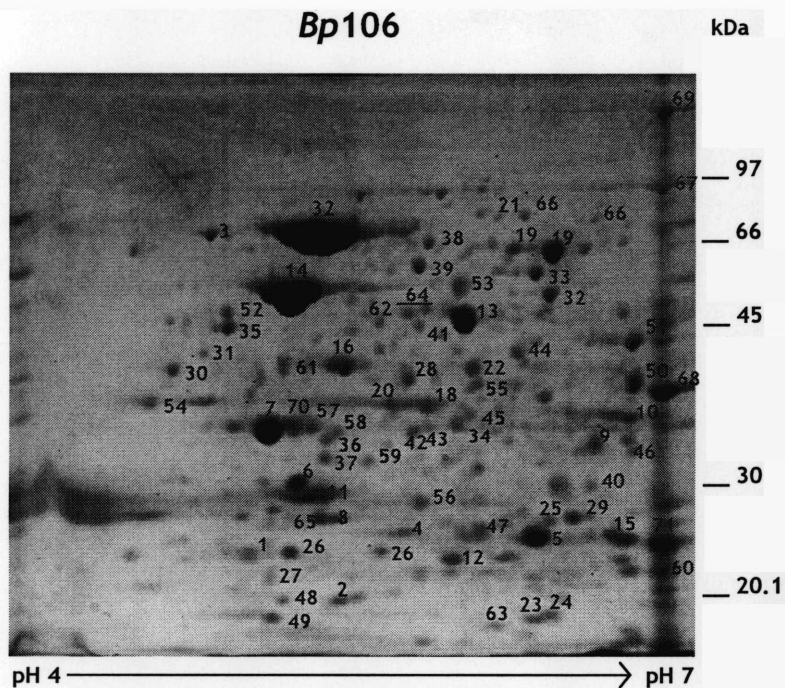
La 2D SDS-PAGE acoplada Espectrometría de Masa (EM) del tipo MALDI-TOF, nos permitió obtener una visión global del proteoma de membrana de la cepa vacunal Tohama I y los aislamientos clínicos Bp006 y Bp106. En las figuras II.5. A y II.5.B se muestran 2D SDS-PAGE representativos de los obtenidos para las tres cepas. Utilizando el software Image Master™ 2D Platinum se analizaron las imágenes de estos geles, detectándose alrededor de 100 manchas o spots asignables a cadenas polipeptídicas diferentes. De estos spots, 13 se detectaron diferencialmente (On-Off) en los dos aislamientos clínicos respecto de la cepa vacunal. En la Figura II.6 se muestran en detalle las zonas y los spots correspondientes a las proteínas expresadas diferencialmente, al menos en las condiciones evaluadas, por los aislamientos clínicos Bp006 y Bp106.

Mediante PMF (Peptide Mass Fingerprint) MALDI - TOF se logró identificar la identidad de 57 proteínas comunes a las tres cepas, 13 exclusivas de los aislamientos clínicos y 1 exclusiva de la cepa vacunal Tohama I (Tabla II.4).





**Figura II.5.A.** Electroforesis en geles bidimensionales de muestras enriquecidas en proteínas de membrana de la cepa Tohama y el aislamientos clínico *Bp006*. La primera dimensión consistió en un isoelectrofoque en gradiente de pH 4-7 y la segunda dimensión en un SDS-PAGE 12.5 %. Los números sobre los geles corresponden a las proteínas identificadas por EM, las cuales se detallan en la Tabla II.4. En azul se indican las proteínas de expresión común y en rojo las proteínas cuya expresión se detectó como diferencial entre los aislamientos clínicos y la cepa Tohama. Sobre la derecha de la figura se indica la migración de los marcadores de PM. Abajo se indica los extremos del gradiente de pH en el que se realizó el isoelectrofoque. 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 independientes.



**Figura II.5.B.** Electroforesis en gel bidimensional de una muestra enriquecida en proteínas de membrana del aislamiento clínico *Bp106*. La primera dimensión consistió en un isoelectroenfoque en gradiente de pH 4-7 y la segunda dimensión en un SDS-PAGE 12.5 %. Los números sobre el gel corresponden a las proteínas identificadas por EM, las cuales se detallan en la Tabla II.4. En azul se indican las proteínas de expresión común y en rojo las proteínas cuya expresión se detectó como diferencial entre los aislamientos clínicos y la cepa Tohama. Sobre la derecha de la figura se indica la migración de los marcadores de PM. Abajo se indican los extremos del gradiente de pH en el que se realizó el isoelectroenfoque. La tinción de los geles se realizó con Coomassie Coloidal. El gel que se muestra es representativo de los obtenidos en al menos tres corridas electroforéticas de muestras obtenidas en cultivos independientes.

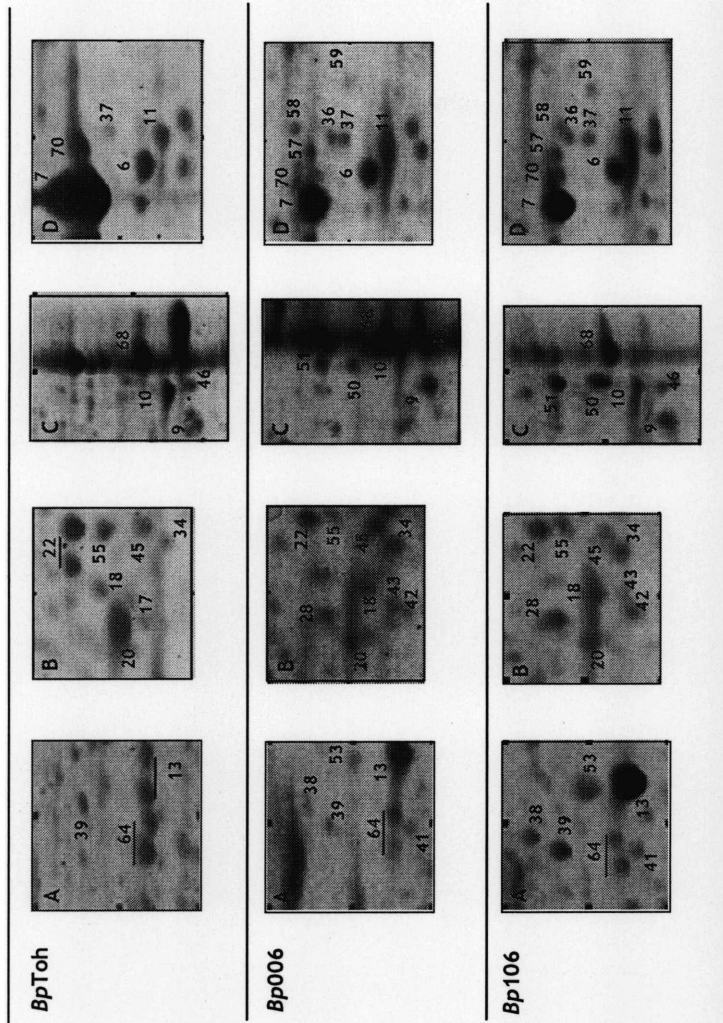


Figura 11.6. Detalle de proteínas de expresión diferencial entre la cepa Tohama I y los aislamientos clínicos Bp006 y Bp106. Mediante recuadros rojos se marca en el SDS-PAGE bidimensional cuatro zonas (A, B, C y D) en las que se detectó expresión diferencial de proteínas. En los paneles de la derecha se muestran las imágenes ampliadas de dichas zonas. Los números corresponden a los utilizados en la Tabla 11.4 para detallar las proteínas identificadas por EM. Los números en rojo corresponden a proteínas comunes y los números en azul corresponden a proteínas de expresión diferencial entre la cepa Tohama I y los aislamientos clínicos estudiados.

Tabla III.2. Proteínas identificadas por Espectrometría de Masa en 2D SDS-PAGE.

Spot	Proteína/Función	PM (kDa)	pI	Presencia de la proteína	Score Mascot	Péptidos matcheados	Cobertura de secuencia (%)
				BpToh Bp006 Bp106			
1	competence lipoprotein precursor	29.8	5.0	si si si	146	8	44
2	conserved hypothetical protein	19.8	5.1	si si si	119	6	51
3	molecular chaperone DnaK	69.7	4.9	si si si	106	8	17
4	putative lipoprotein	30.6	7.4	si si si	159	10	42
5	succinate dehydrogenase catalytic subunit	27.2	6.2	si si si	92	5	20
6	outer membrane protein OMPQ	39.1	5.7	si si si	87	5	19
7	outer membrane porin protein precursor	41.0	5.4	si si si	216	13	58
8	putative ABC transport ATP binding protein	29.6	5.1	si si si	102	9	54
9	putative periplasmic solute binding protein	40.0	7.8	si si si	181	13	43
10	putative binding protein -dependent transport protein	40.9	6.9	si si si	83	7	21
11	putative membrane protein	33.4	5.3	si si si	247	14	52
12	antioxidant protein	23.7	5.7	si si si	101	6	29
13	serin protease	52.1	8.8	si si si	140	9	30
14	chaperonin 60 kDa	57.4	4.9	si si si	139	5	28
15	putative ABC transport protein, ATP-binding component	29.1	6.3	si si si	70	4	25
16	elongation factor Tu	42.9	5.1	si si si	82	6	26
17	leu-ile-Val protein precursor	39.6	6.8	si si no	99	8	24
18	DNA direct RNA $\alpha$ subunit polymerase	36.1	5.7	si si si	146	9	46
19	peractin precursor	93.4	10.0	si si si	144	18	47
20	putative quino protein	40.0	8.7	si si si	167	14	47
21	malate synthase G	78.8	5.7	si si si	77	8	16
22	NADH dehydrogenase delta subunit	47.7	5.8	si si si	111	11	32
23	outer membrane protein A precursor	20.9	9.2	si si si	122	6	51
24	superoxide dismutase	21.2	6.5	si si si	83	4	30
25	putative exported protein	34.9	10.2	si si si	172	9	44
26	ubiquinol cytochromo C reductase iron sulfur subunit	22.8	5.2	si si si	87	5	30

Tabla III.2. Proteínas identificadas por Espectrometría de Masa en 2D SDS-PAGE.

Spot	Proteína/Función	PM (kDa)	pI	Presencia de la proteína			Score Masco	Péptidos matcheados	Cobertura de secuencia (%)
				BpToh	Bp006	Bp106			
27	NADH dehidrogenase subunit C	24.1	5.1	si	si	si	87	4	20
28	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase II	43.6	5.7	no	si	si	87	5	16
29	putative bacterial secretion system protein	29.4	6.8	si	si	si	143	7	47
30	enolase	45.9	4.5	si	si	si	128	11	35
31	two component sensor protein	97.4	8.7	si	si	si	132	9	17
32	serum resistance protein	103.3	7.1	si	si	si	178	5	18
33	succinate dehidrogenase flavo subunit	64.8	6.5	si	si	si	159	5	36
34	putative ABC transport solute binding protein	40.6	6.5	si	si	si	82	7	24
35	ATP synthase subunit B	50.5	4.7	si	si	si	146	11	30
36	elongation factor Ts	30.9	5.1	no	si	si	139	11	44
37	ribose phosphate pyrophosphokinase	34.1	5.1	si	si	si	94	7	33
38	dihydrolipoamide dehidrogenase	62.3	5.8	no	si	si	88	7	13
39	hypothetical protein	68.5	6.1	si	si	si	88	12	23
40	hypothetical protein	35.9	6.6	si	si	si	122	6	27
41	polysaccharide biosynthesis protein	46.7	5.6	no	si	si	80	7	18
42	capsular polysaccharide biosynthesis protein	37.3	5.7	no	si	si	84	7	21
43	putative L lactacto dehidrogenase	37.2	5.8	no	si	si	96	6	24
44	hypothetical protein	48.5	6.2	si	si	si	130	9	27
45	hypothetical protein	42.7	6.0	si	si	si	87	5	17
46	putative sigma factor regulatory protein	39.2	9.6	si	si	si	138	11	36
47	enoyl-acyl carrier protein	27.6	5.8	si	si	si	89	6	25
48	lipoprotein	23.1	7.7	si	si	si	87	4	26
49	alkyl hydroperoxide reductase	20.1	4.9	si	si	si	85	4	40
50	putative penicilin binding protein precursor	44.8	7.9	no	si	si	87	7	23
51	dihydrolipoamide dehidrogenase	50.1	6.7	no	si	si	89	8	26
52	trigger factor	47.5	4.9	si	si	si	82	8	25

Tabla III.2. Proteínas identificadas por Espectrometría de Masa en 2D SDS-PAGE.

Spot	Proteína/Función	PM (kDa)	pI	BpToh	Bp006	Bp106	Score Mascot	Péptidos matcheados	Cobertura de secuencia (%)
53	putative type III secretion protein	63.3	5.9	no	si	si	98	8	16
54	hypothetical protein	37.9	4.7	si	si	si	87	9	36
55	homoserine O-acetyltransferase	44.9	5.7	si	si	si	132	8	29
56	dihydrodipicolinate synthase	31.1	5.1	no	si	si	88	7	43
57	rod shape-determining protein	37.0	5.2	no	si	si	97	5	15
58	ADP-heptose synthase	33.8	5.3	no	si	si	81	4	20
59	glutathione synthetase	34.7	5.41	no	si	si	75	3	11
60	tresponse regulator protein	27.7	6.5	si	si	si	83	4	17
61	S-adenosylmethionine synthetase	42.3	5.1	no	si	si	133	9	27
62	seryl-tRNA synthetase	50.0	5.4	si	si	si	184	14	38
63	probable phosphoglycerate mutase 2	23.8	5.9	si	si	si	87	6	29
64	hypothetical protein BP1485	51.6	6.8	si	si	si	179	13	75
65	putative septum site-determining protein	29.7	5.2	si	si	si	150	10	49
66	putative outer membrane protein	77.7	6.1	si	si	si	80	9	19
67	autotransporter	94.8	6.8	si	si	si	118	17	22
68	translocation protein TolB precursor	47.1	9.4	si	si	si	79	6	22
69	filamentous hemagglutinin/adhesin	367.1	9.6	si	si	si	101	18	12
70	putative lipoprotein	41.5	5.75	si	si	si	148	11	38
71	putative amino acid ABC transporter ATP-binding protein	28.3	6.3	si	si	si	80	4	30

Utilizando el software PSORT se predijo la localización celular de las proteínas identificadas: 10 estarían asociadas a membrana externa, 6 localizadas en periplasma, 23 con localización desconocida (3 con péptido señal), 4 tendrían localización en membrana/citoplasma (3 llevan péptido señal) y 28 tendrían localización citoplasmática (Tabla II.5). De éstas últimas, sin embargo, algunas proteínas como la enolasa, chaperonina de 60 kDa, dihidrolipoamida deshidrogenasa y los factores de elongación Tu y Ts podrían estar asociadas a membrana como fue demostrado para otras bacterias, entre ellas *Neisseria meningitidis*(62). Estos datos, junto con la información obtenida con el análisis bioinformático utilizando el programa PSORT, validan la metodología utilizada para obtener las muestras de proteínas enriquecidas en componentes de membrana.

Aplicando la clasificación de Riley se asignaron posibles funciones bioquímicas a las proteínas identificadas. Entre las funciones asignadas se destacan en número las relacionadas a proteínas periplásmicas/exportadas o lipoproteínas (5 proteínas) y proteínas involucradas en transporte o unión a otras proteínas (7 proteínas). Curiosamente para dos proteínas hipotéticas, BP1485 y BP3559, para las cuales el algoritmo PSORT no predice ninguna localización, la clasificación funcional les asigna pertenencia a la membrana interna. Por otro lado a las lipoproteínas BP2750 y BP1569, también con localización desconocida, la clasificación de Riley las agrupa como proteínas periplásmicas o exportadas.

Tabla III.3. Localización celular y posible función de las proteínas identificadas por PMF MALDI-TOF.

Spot	Proteína/Función	N° Acceso <sup>a</sup>	Gen	Localización celular <sup>b</sup>	Función celular <sup>c</sup>
1	competence lipoprotein precursor	bp1146	<i>comL</i>	desconocida	Periplasmic/exported/lipoproteins
2	conserved hypothetical protein	bp3441		citoplasmática/membrana*	Conserved in other organisms
3	molecular chaperone DnaK	bp2499	<i>dnaK</i>	citoplasmática	Chaperones
4	putative lipoprotein	bp1296		desconocida	Periplasmic/exported/lipoproteins
5	succinate dehydrogenase catalytic subunit	bp2360	<i>sdhB</i>	citoplasmática	TCA cycle
6	outer membrane protein OMPQ	bp3405	<i>ompQ</i>	membrana externa*	Outer membrane constituents
7	outer membrane porin protein precursor	bp0840		membrana externa	Outer membrane constituents
8	putative ABC transport ATP binding protein	bp3757		desconocida	Transport/binding proteins
9	putative periplasmic solute binding protein	bp1487	<i>smoM</i>	desconocida*	Transport/binding proteins
10	putative binding protein -dependent transport protein	bp3322		periplasmática	Transport/binding proteins
11	putative membrane protein	bp1440		desconocida*	Inner membrane
12	antioxidant protein	bp0965		citoplasmática	Detoxification
13	serin protease	bp2434	<i>mucD</i>	periplasmática	Degradation of proteins, peptides, glyco
14	chaperonin 60 kDa	bp3495	<i>groEL</i>	citoplasmática**	Chaperones
15	putative ABC transport protein, ATP-binding component	bp2744		desconocida	Transport/binding proteins
16	elongation factor Tu	bp0007	<i>tufA</i>	citoplasmática**	Proteins - translation and modification
17	leu-ile-Val protein precursor	bp1285	<i>livJ</i>	periplasmática	Amino acids and amines
18	DNA direct RNA $\alpha$ subunit polymerase	bp3642	<i>rpoA</i>	citoplasmática	DNA - replication, repair, restriction/modification
19	peritactin precursor	bp1054	<i>prn</i>	membrana externa	Pathogenicity islands/determinants
20	putative quino protein	bp2196		desconocida	Not classified (included putative assignments)
21	malate synthase G	bp3680	<i>glcB</i>	desconocida	Carbon compounds
22	NADH dehydrogenase delta subunit	bp0844	<i>nuoD</i>	citoplasmática	Energy metabolism, carbon



Tabla III.3. Localización celular y posible función de las proteínas identificadas por PMF MALDI-TOF.

Spot	Proteína/Función	N° Acceso <sup>a</sup>	Gen	Localización celular <sup>b</sup>	Función celular <sup>c</sup>
23	outer membrane protein A precursor	bp0943	ompA	membrana externa*	Outer membrane constituents
24	superoxide dismutase	bp2761	sodB	desconocida	Detoxification
25	putative exported protein	bp2513		membrana externa	Periplasmic/exported/lipoproteins
26	ubiquinol cytochromo C reductase iron sulfur subunit	bp0277	petA	citoplasmática/membrana*	Electron transport
27	NADH dehydrogenase subunit C	bp0843	nuoC	citoplasmática	Energy metabolism, carbon
28	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase II	bp2439	fabF/ fabJ	citoplasmática	Fatty acid and phosphatidic acid biosynth
29	putative bacterial secretion system protein	bp3794		desconocida*	Transport/binding proteins
30	enolase	bp2386	eno	citoplasmática**	Glycolysis
31	two component sensor protein	bp2483	kdpD	citoplasmática/membrana	Global regulatory functions
32	serum resistance protein	bp3494	brkA	membrana externa	Pathogenicity islands/determinants
33	succinate dehydrogenase flavo subunit	bp2361	sdhA	citoplasmática	TCA cycle
34	putative ABC transport solute binding protein	bp2747		citoplasmática/membrana*	Transport/binding proteins
35	ATP synthase subunit B	bp3288	atpD/lucD/papB	citoplasmática	ATP-proton motive force
36	elongation factor Ts	bp1420	tsf	citoplasmática**	Proteins - translation and modification
37	ribose phosphate pyrophosphokinase	bp3125	pisA	desconocida	Purine ribonucleotide biosynthesis
38	dihydroliipoamide deshydrogenase	bp0995	lpdA	citoplasmática	Energy metabolism, carbon
39	hypothetical protein	bp3128		desconocida	Conserved in other organisms
40	hypothetical protein	bp3515		desconocida	Conserved in other organisms
41	polysaccharide biosynthesis protein	bp3150	wbpO	citoplasmática	Surface polysaccharides & antigens
42	capsular polysaccharide biosynthesis protein	bp1630	wbpP/vipB/tviC	desconocida	Surface polysaccharides & antigens
43	putative L lactacto deshydrogenase	bp0379	ldh	desconocida	Glycolysis
44	hypothetical protein	bp2964		citoplasmática	Not classified (included putative assignments)
45	hypothetical protein	bp1203		desconocida	Conserved in other organisms
46	putative sigma factor regulatory protein	bp2435	mucB/rseB	periplasmática	Global regulatory functions
47	enoyl-acyl carrier protein	bp3215	fabI/envM	desconocida	Fatty acid and phosphatidic acid biosynth
48	lipoprotein	bp2750		desconocida	Periplasmic/exported/lipoproteins

Tabla III. 3. Localización celular y posible función de las proteínas identificadas por PMF MALDI-TOF.

Spot	Proteína/Función	Nº Acceso <sup>a</sup>	Gen	Localización celular <sup>b</sup>	Función celular <sup>c</sup>
49	alkyl hydroperoxide reductase	bp3552	ahpC	citoplasmática	Detoxification
50	putative penicillin binding protein precursor	bp0102		periplasmática	Murein sacculus, peptidoglycan
51	dihydroipoamide dehydrogenase	bp1126	odhL	citoplasmática	TCA cycle
52	trigger factor	bp1774	tig	citoplasmática	Chaperones
53	putative type III secretion protein	bp2235	bscC	membrana externa	Other Transport/binding proteins
54	hypothetical protein	bp3559		citoplasmática	Inner membrane
55	homoserine O-acetyltransferase	bp0047	metX	desconocida	Methionine
56	dihydrodipicolinate synthase	bp1570	dapA	desconocida	Lysine
57	rod shape-determining protein	bp0374	mreB/envB/rodY	citoplasmática	Murein sacculus, peptidoglycan
58	ADP-heptose synthase	bp0954	rfaE	citoplasmática	Lipopolysaccharide
59	glutathione synthetase	bp1499	gshB/gsh-II	citoplasmática	Thioredoxin, glutaredoxin, glutathione
60	tresponse regulator protein	bp3554	risA	citoplasmática	Global regulatory functions
61	S-adenosylmethionine synthetase	bp3071	metK	citoplasmática	S-adenosyl methionine
62	seryl-tRNA synthetase	bp2470		citoplasmática	Amino acyl tRNA synthesis; tRNA modification
63	probable phosphoglycerate mutase 2	bp1455	gpmB	citoplasmática	Glycolysis
64	hypothetical protein BP1485	bp1485		desconocida	Inner membrane
65	putative septum site-determining protein	bp3228	minD	desconocida	Cell Division
66	putative outer membrane protein	bp3077		membrana externa	Outer membrane constituents
67	autotransporter	bp2315	vag8	membrana externa	Pathogenicity Islands/determinants
68	translocation protein TolB precursor	bp3343		periplasmática	Transport/binding proteins
69	filamentous hemagglutinin/adhesin	bp1879	fhaB	membrana externa	Surface structures
70	putative lipoprotein	bp1569		desconocida	Periplasmic/exported/lipoproteins
71	putative amino acid ABC transporter ATP-binding protein	bp3828		citoplasmática	Amino acids and amines
49	alkyl hydroperoxide reductase	bp3552	ahpC	citoplasmática	Detoxification

\* Posee péptido señal. \*\* Asociada a membrana en otras bacterias.

a Nomenclatura de acuerdo a base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

b Localización celular predicha por PSORT (<http://psort.nihs.ac.jp/>)

c Función celular en base a clasificación de Riley (<http://www.genedb.org/genedb/pert/>)

Entre las proteínas identificadas de expresión común en las tres cepas, se encuentran determinantes de virulencia de *B. pertussis* como pertactina, FHA, Vag8 y BrkA. Estas proteínas y otras como GroEL, DnaK, Serin proteasa (BP2434), y los factores de elongación Tu y Ts han sido determinadas como inmunogénicas en un análisis inmuno-proteómico de *B. pertussis*. Otras proteínas como la subunidad B de la ATP sintasa, succinato deshidrogenasa y la proteína determinante de forma bacilar (BP0374) fueron detectadas como inmunogénicas en *H. pylori* (123)

Como mencionamos anteriormente, de las 71 proteínas identificadas 13 se detectaron exclusivamente en los aislamientos clínicos. Algunas de estas proteínas merecen especial mención; ya sea por su posible rol en la patogénesis, en la protección o en la modulación de la respuesta inmunológica del hospedador.

**3-oxoacil-ACP sintasa II, FabF (BP2439).** Como componentes hidrofóbicos claves de los fosfolípidos, los ácidos grasos son centrales para la formación de las membranas biológicas, así como también tienen funciones importantes en el metabolismo y transducción de señales(19). Las proteínas transportadoras de acilos (ACP por sus siglas en inglés) pertenecen a una familia de proteínas transportadoras altamente conservadas. Son cofactores indispensables de varias vías metabólicas primarias y secundarias, incluidas aquellas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos, fosfolípidos, endotoxinas, glicolípidos, cofactores metabólicos y moléculas señal. FabF pertenece a las ACP involucradas en los sistemas de síntesis de ácidos grasos del tipo II, más precisamente en la elongación. Éstos son encontrados en las mayorías de las bacterias (a diferencia de los tipo I, principalmente eucariotas); y las enzimas que forman parte de este sistema han sido ampliamente estudiadas en *E. coli*. La mayoría de las enzimas son esenciales para el crecimiento y viabilidad bacteriana. Debido a esto y a las diferencias estructurales y de mecanismos de reacción de los sistemas de síntesis bacterianos tipo II y los del tipo I eucariotas, las enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos han sido, en el último tiempo, target para el desarrollo de nuevos antibióticos. En particular FabF ha sido descrita como target de un antibiótico de amplio espectro en bacterias Gram negativas, y a la vez se determinó, en otros patógenos, que este tipo de ACP son inmunogénicas(19, 58, 195).

**Dihidrolipoamida Deshidrogenasa, LpdA (BP0995).** Esta enzima constituye una subunidad funcional esencial del complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (PDH). Este complejo está compuesto de múltiples copias de un complejo ternario de las enzimas dihidrolipoamida deshidrogenasa, dihidrolipoamida transacetilasa y piruvato deshidrogenasa; y está involucrado en la oxidación de piruvato a acetil CoA. La enzima dihidrolipoamida deshidrogenada permite el funcionamiento continuo de esta vía metabólica al mantener el estado redox correcto para la bioconversión.

Esta enzima ha sido descrita 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(105). En *Haemophilus Influenzae* Tipo B la inserción de una 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(96).

En *Neisseria meningitidis*, se ha determinado que la enzima dihidrolipoamida deshidrogenasa expresada a partir del gen lpdA es una proteína de membrana externa altamente inmunogénica en distintos animales. Esta proteína de alto peso molecular (P64k) es reconocida por sueros de pacientes convalescente para meningitis, se ha determinado su expresión de forma ubicua en diferentes cepas de *Neisseria meningitidis* y debido a esto se ha considerado un buen candidato vacunal. Últimamente, P64k se ha utilizado de forma muy versátil como plataforma o carrier inmunológico de antígenos débiles (57, 73, 78, 122).

**Proteína de biosíntesis de la cápsula (BP1630).** La expresión de la cápsula frecuentemente contribuye a la habilidad de los patógenos a resistir los mecanismos de defensa del hospedador. En la literatura se han hecho referencias a la expresión de la cápsula en *Bordetella*, pero no está claro cuál es la estructura referida a la cápsula y ésta no ha sido aislada ni caracterizada. El arreglo del locus para la cápsula de *Bordetella* es el típico para el descripto para polisacáridos de la cápsula del tipo II; comprende tres regiones involucradas en la exportación/modificación, biosíntesis y transporte. De las tres especies consideradas como *Bordetellas* clásicas (*B. bronchiseptica*, *B. pertussis* y *B. parapertussis*), sólo *B. bronchiseptica* posee un locus intacto que codifica para la cápsula (BB2918-BB2934) (152). En el genoma de Tohama I la parte central del locus está intacta (BP1619-BP1631) pero la región 3' del gen BP1618 sufrió un evento de inversión y en el otro extremo un rearrreglo mediado por IS que deleteó parte de la región I (contiene genes involucrados en la exportación/modificación) y movió dos genes de exportación a una parte diferente del cromosoma (BP1654 y BP1655 interrumpidos por IS).

Así, dado que existen loci intactos, es posible que *B. pertussis* pudiera expresar algún tipo de cápsula. Por otro lado, sería interesante analizar la estructura de este locus en los aislamientos clínicos y analizar la expresión/composición de la cápsula como también su rol en la patogénesis y en la evasión inmunológica.

**Proteína de secreción tipo III, BscC (BP2235).** Las bacterias producen un complejo arreglo de factores de virulencia, que incluyen toxinas y adhesinas, que facilitan la colonización y/o suprimen la respuesta inmune y permiten a la bacteria establecer una infección en el hospedador. Uno de estos factores es el Sistema de Secreción del Tipo III (TTSS); un aparato secretor especializado que permite a las bacterias Gram negativas inyectar proteínas, conocidas como efectores, directamente en el citosol de las células eucariotas modulando la función celular (38).

En *Bordetella*, el locus *bsc* incluye 22 genes que codifican para componentes del TTSS, proteínas secretadas y posibles chaperonas. BscC es una proteína de membrana externa (600 aa) que pertenece a la familia de las secretinas y muestra 33 % de similitud con *yscC* de *Yersinia*. Es una proteína estructural del TTSS que se polimeriza para formar un anillo, con un poro central de 50 Å, que se ubica en la membrana externa bacteriana; y partir del cual se proyecta la estructura tipo "aguja" característica de este sistema.

A pesar de que en *B. pertussis* Tohama I se ha descrito la transcripción de los genes *bsc*, esta cepa no ha mostrado la secreción de las proteínas efectoras del TTSS tanto *in vitro* como *in vivo* (132). Nuestro hallazgo de la expresión de una proteína estructural del TTSS (10), junto con la demostración hecha recientemente por Fenelly y colaboradores de la secreción de la proteína efectora Bsp22 por aislamientos clínicos de *B. pertussis* (60); son los primeros indicios de la expresión de un TTSS funcional en *B. pertussis*.

## Análisis transcripcional de proteínas expresadas diferencialmente en los proteomas de membrana.

Con el objetivo de verificar y validar la expresión diferencial de ciertas proteínas por parte de los aislamientos clínicos *Bp006* y *Bp106*, respecto a la cepa vacunal Tohama I; en esta parte de la tesis abordamos un análisis de la expresión génica a nivel transcripcional.

Se analizó la presencia del transcripto correspondiente a los genes *lpdA* (BP0995), *wbpP* (BP1630), *bscC* (BP2235) y *bscN* (BP2245). Respecto a este último gen, si bien no se detectó en los geles bidimensionales la expresión de la proteína BscN; decidimos evaluar la presencia del transcripto correspondiente dado que esta una proteína, que funciona como una ATPasa, constituye no sólo un marcador de la expresión del TTSS sino también un componente necesario para la funcionalidad del mismo.

En primer lugar, sobre la información de la secuencia del genoma completo de Tohama I, disponible en Internet; se diseñaron primers para amplificar fragmentos internos de entre 400 - 450 pb sobre el ORF de los genes *lpdA*, *wbpP*, *bscC* y *bscN*. Se determinaron las condiciones para la amplificación de un producto específico y se realizaron luego, amplificaciones sobre el ADN genómico de la cepa vacunal Tohama I y los aislamientos clínicos *Bp006* y *Bp106* (Figura III.X). Se obtuvo una amplificación positiva sobre el ADN genómico tanto de la cepa Tohama como el de los aislamientos clínicos. Esto indicaría en principio, que en el genoma de los aislamientos estos genes no han sufrido rearrreglos ni deleciones, al menos en la zona amplificada.

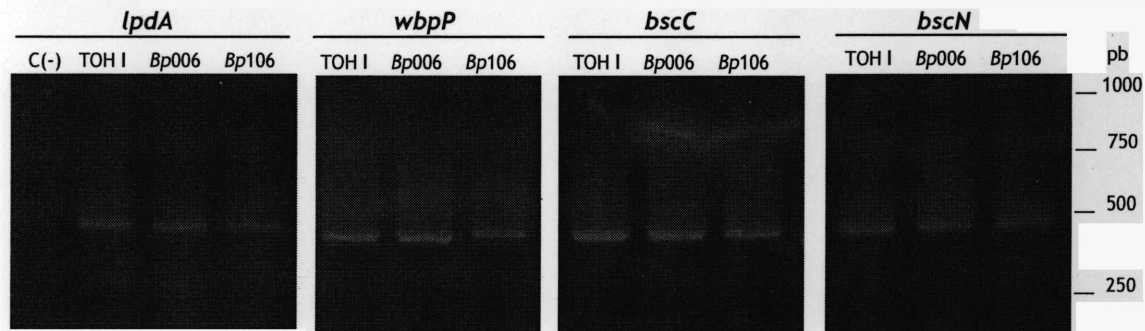


Figura III. X. Amplificación mediante PCR de los ORFs de los genes *lpdA*, *wbpP*, *bscC* y *bscN* sobre ADN genómico. Gel 1.5 % en el que se visualizaron los fragmentos amplificados. Estos corresponden a fragmentos internos de los ORF de cada uno de los genes evaluados. La amplificación se realizó utilizando como molde ADN genómico de la cepa vacunal Tohama I (TOH) y los aislamientos clínicos *Bp006* y *Bp106*. El control negativo ( C-) corresponde a la utilización de agua como molde para la amplificación.

En segundo lugar, se procedió a la purificación de ARN total de la cepa Tohama y los aislamientos clínicos *Bp006* y *Bp106* para la posterior síntesis de ADNc y análisis de la expresión de los genes descritos anteriormente.

El ARN total se obtuvo a partir de cultivos bacterianos en fase logarítmica tardía, es decir, en las mismas condiciones de crecimiento en las que fueron obtenidas las muestras de proteínas de membrana analizadas en los geles bidimensionales. Para evaluar la calidad del ARN purificado y corroborar que no estuviera contaminado con ADN genómico, se realizó una reacción de PCR sobre el ARN obtenido, previo a la

síntesis del ADNc con la transcriptasa reversa. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura III.X1. Como se puede observar en esta figura, para las 3 preparaciones analizadas no se observaron productos de amplificación al utilizar el ARN total obtenido como molde para la reacción de PCR.

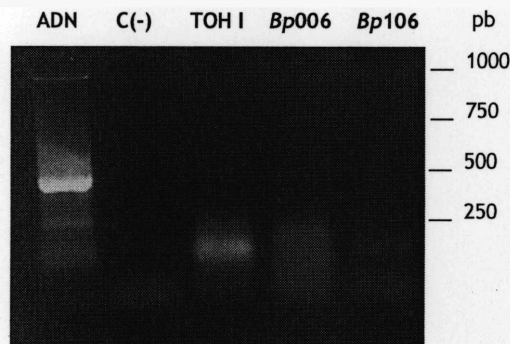


Figura III.X1. Amplificación por PCR del fragmento interno del ORF de *IpdA* (450 pb) sobre ARN total. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando como molde ARN purificado de cultivos en fase logarítmica tardía de la cepa Tohama I y los aislamientos clínicos *Bp006* y *Bp106*. Para los controles positivo y negativo de la reacción de PCR se utilizó como molde ADN genómico de la cepa Tohama y agua respectivamente. Los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa 1.5 %.

A partir del ARN obtenido, libre de ADN genómico, se procedió a la síntesis del ADNc utilizando la transcriptasa reversa M-MLV y primers de secuencias al azar. Una vez obtenido el ADNc tanto de la cepa Tohama I como de los aislamientos, se llevó a cabo la amplificación por PCR de cada uno de los genes cuya expresión transcripcional se quería evaluar.

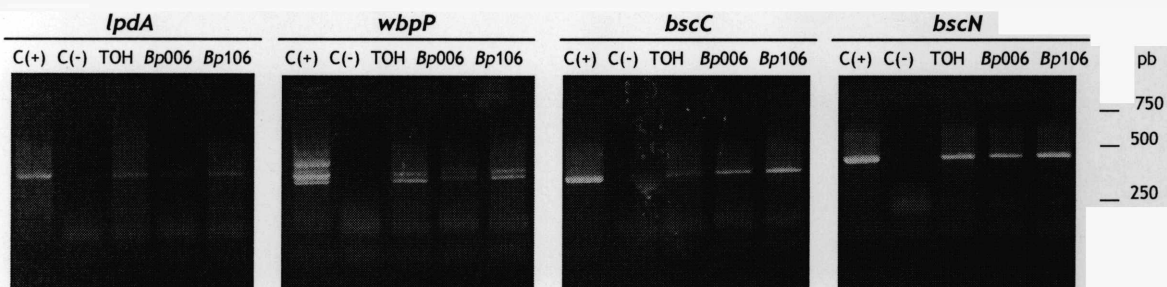


Figura III. X2. Amplificación mediante PCR de los ORFs de los genes *IpdA*, *wbpP*, *bscC* y *bscN* sobre ADNc. Gel 1.5 % en el que se visualizaron los fragmentos amplificados. Estos corresponden fragmentos internos de los ORF de cada uno de los genes evaluados. La amplificación se realizó utilizando como molde ADNc de la cepa vacunal Tohama I (TOH) y los aislamientos clínicos *Bp006* y *Bp106*. El control positivo, C (+) y negativo C(-), de la reacción de PCR corresponden a la utilización como molde para la amplificación de ADN genómico de la cepa Tohama I y agua respectivamente.

Como se puede observar en la Figura III.X2, para los cuatro genes evaluados y tanto para la cepa vacunal como para los aislamientos clínicos se obtuvo un amplicón del tamaño esperado. Es decir, que a diferencia de lo que se había observado a nivel del proteoma, por esta metodología no se detectó expresión diferencial de los genes *IpdA*, *wbpP* y *bscC*. En principio, dado los resultados obtenidos en el análisis proteómico y teniendo en cuenta que estos resultados no corresponden una RT-PCR del tipo cuantitativa; podemos afirmar aún que al menos a nivel del proteoma la expresión de los genes evaluados es diferencial para los aislamientos clínicos respecto a la cepa vacunal Tohama I. En particular, para dos genes representativos del locus *bsc* (*bsp22* y *bopN*), que como *bscC* y *bscN*, codifican para componentes del Sistema de Secreción del Tipo III, se ha descrito su transcripción por parte de la cepa Tohama I pero no

así su traducción (132). Matoo y colaboradores han propuesto oportunamente que esta transcripción del locus *bsc* pero no traducción se debe a una regulación post-transcripcional en la cepa vacunal Tohama. Como mencionamos anteriormente, Fennelly y colaboradores (60) han demostrado recientemente que aislamientos clínicos de *B. pertussis* son capaces de expresar un TTSS funcional. En este sentido, en la última parte de esta tesis hemos abordado un análisis similar.



## **PARTE II**

### **ANALISIS DE LA EXPRESIÓN FUNCIONAL DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III EN *B. pertussis***

Los patógenos bacterianos utilizan diversos mecanismos para lograr un objetivo común, interactuar y potencialmente alterar y controlar las funciones celulares del hospedador. Asegurar su preservación dentro del hospedador, evadir la respuesta inmune y facilitar su replicación y proliferación son pasos esenciales para el éxito de cualquier patógeno.

Una de las formas claves que utilizan los patógenos para evadir la respuesta inmune del hospedador (tanto innata como adaptativa), es secretar proteínas efectoras. Usualmente, estas proteínas especializadas son inyectadas directamente en el citosol de las células del hospedador por Sistemas de Secreción de Tipo III (TTSS).

En *Bordetella*, el locus *bsc* incluye 21 genes que codifican para componentes del TTSS, proteínas secretadas y posibles chaperonas (Figura III.X). Las proteínas secretadas por TTSS son codificadas por los genes *bopB*, *bopD*, *bopN* y *bsp22*. Asimismo, el locus *btr* codifica para proteínas implicadas en la regulación del funcionamiento del TTSS (109, 132).

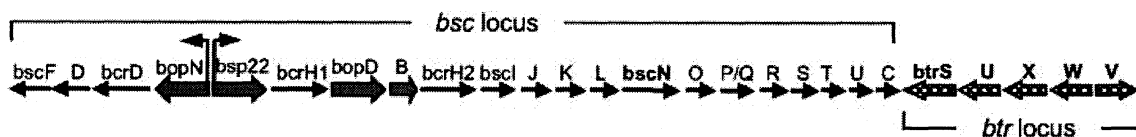


Figura III. X. Organización genómica y ORFs de los genes del TTSS de *Bordetella*. Se detallan los genes pertenecientes al locus *bsc* y el locus *btr*. Los genes que codifican proteínas secretadas son mostrados con flechas pintadas en gris. *bscN* codifica para una posible ATPasa. La figura fue extraída de Matoo et al. 2004. (Molecular Microbiology, 52,1201-1214.)

La expresión funcional de TTSS originalmente se describió en *B. bronchiseptica*. A pesar de que en *B. pertussis* Tohama I se ha descrito la transcripción de los genes *bsc*, esta cepa no ha mostrado la secreción de las proteínas efectoras del TTSS tanto *in vitro* como *in vivo* (132). Estos hallazgos iniciales han sido sumamente sorprendentes por distintos motivos. En primer lugar, en *B. pertussis* los genes TTSS están intactos, altamente conservados, son transcritos y regulados (132). En segundo lugar, las mayorías de las sustituciones nucleotídicas observadas en el loci *bsc*, entre *B. bronchiseptica* y *B. pertussis*, son silenciosas o resultan en sustituciones aminoacídicas conservativas (152). Sin embargo, luego de 10 años de haberse descrito el TTSS en *Bordetella*, empieza a haber indicios de cuál podría ser el rol de este sistema en la infección en humanos. Recientemente, Fenelly y colaboradores han demostrado la secreción de la proteína efectora Bsp22 por una significativa cantidad de aislamientos clínicos de *B. pertussis* pero no por las cepas adaptadas al laboratorio Tohama I y Wellcome 28 (60). Por otro lado, la mutación en *bscN*, que codifica para un componente esencial para la secreción de los efectores de TTSS a través de la membrana bacteriana, elimina la secreción *in vitro* de estos efectores por un aislamiento clínico de *B. pertussis*. Esto resulta, en una habilidad reducida de la bacteria para colonizar el tracto respiratorio de ratones asociado con una disminución en la respuesta inflamatoria local y en la respuesta tanto celular como humoral antígeno específica (supresión de respuestas Th1, Th17 y mediadas por anticuerpos). Estos datos sugieren que la expresión de un TTSS funcional podría ser una característica de la infección natural

de *B. pertussis*, y que podría conferir a la bacteria una mayor virulencia al suprimir las respuestas protectoras, tanto innatas como adaptativas, del hospedador (22).

En la primera parte de este capítulo nos referimos a los resultados obtenidos en los proteomas de superficie de la cepa Tohama I y los aislamientos clínicos *Bp006* y *Bp106*. En el contexto recién descrito y a partir de la identificación en los aislamientos clínicos de la expresión diferencial de la proteína BP2235 (BscC), decidimos evaluar la funcionalidad del TTSS en los aislamientos clínicos de nuestra colección.

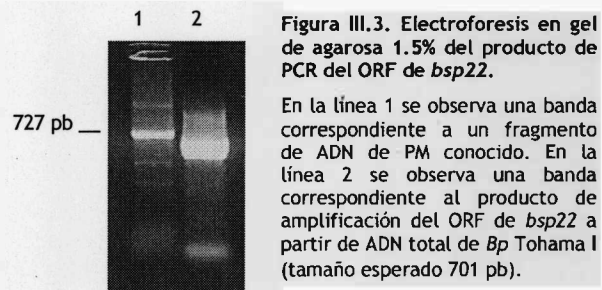
El gen de la proteína Bsp22, al igual que el de la proteína BscC, está localizado en el operón del TTSS tanto en *B. pertussis* como en *B. bronchiseptica*. A diferencia de las otras proteínas efectoras del TTSS, Bsp22 es exclusiva del género *Bordetella*, y es la proteína en mayor proporción expresada y secretada por *B. bronchiseptica* durante el crecimiento *in vitro*. Por otra parte, esta proteína constituye, habitualmente, un marcador de la función secretora del TTSS (194).

En la última parte de esta tesis y con el objetivo anteriormente planteado; realizamos ensayos de inmunoblot para evaluar la secreción de la proteína efectora del TTSS, Bsp22, en aislamientos clínicos de *B. pertussis*. Más aún, avanzamos en la caracterización de las propiedades inmunogénicas de Bsp22 con el objetivo último de evaluar sus aptitudes como candidato vacunal a incorporar en las formulaciones existentes.

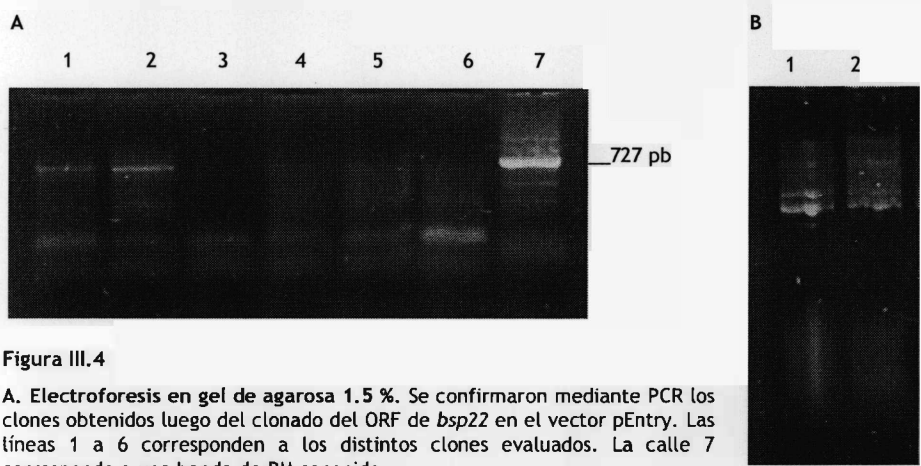
### Evaluación de la expresión del Sistema de Secreción Tipo III (TTSS) funcional en aislamientos clínicos.

En esta etapa del trabajo, se clonó y expresó en *E. coli* y luego se purificó la proteína His<sub>6</sub>-Bsp22. Luego, ésta fue utilizada para generar en ratones un anticuerpo policlonal anti-Bsp22. Este anticuerpo fue utilizado para evaluar, mediante Inmunoblot, la expresión de la proteína efectora del TTSS en distintos aislamientos clínicos de *B. pertussis*.

En primer lugar se diseñaron los pares de primers necesarios para amplificar, mediante la técnica de PCR, el marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en inglés) de la proteína de interés. Se establecieron las condiciones de la reacción de PCR, de manera de obtener un amplicón específico del tamaño esperado: 701pb (Figura III.3).



Para clonar y expresar la proteína Bsp22 se utilizó la tecnología Gateway®. Esta tecnología utiliza reacciones de recombinación para transferir segmentos de ADN a través de distintos vectores. Así, en primer lugar se ligó el producto de PCR obtenido en el vector de clonado pENTR™/ SD/ D-TOPO® y luego éste fue transformado y propagado en *E. coli*. Se analizaron los transformantes mediante reacción de PCR, utilizando los primers específicos para amplificar el ORF del gen *bsp22* (Figura III.4 A). Una vez que se identificaron los clones positivos se purificó el vector recombinante pENTR: *bsp22* (Figura III.4 B) y se llevó a cabo la reacción de recombinación entre éste y el vector de expresión pDEST™17.



A. Electroforesis en gel de agarosa 1.5 %. Se confirmaron mediante PCR los clones obtenidos luego del clonado del ORF de *bsp22* en el vector pEntry. Las líneas 1 a 6 corresponden a los distintos clones evaluados. La calle 7 corresponde a una banda de PM conocido.

B. Electroforesis en gel de agarosa 0.8 %. Se evaluó la purificación del vector recombinante pEntry: *bsp22* a partir de los clones positivos 1 y 2.

Nuevamente se propagó en vector en *E. coli* y se analizaron los transformantes mediante reacción de PCR utilizando primers específicos para el ORF de bsp22, (Figura III.5 A). A partir del vector recombinante pDEST17: bsp22 se indujo la expresión de la proteína His-Bsp22.

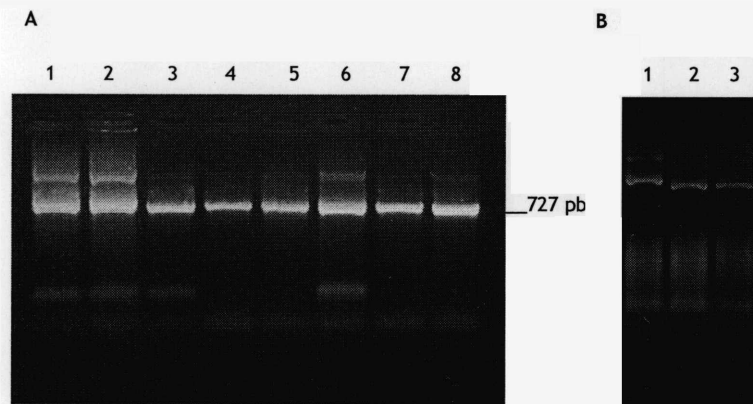


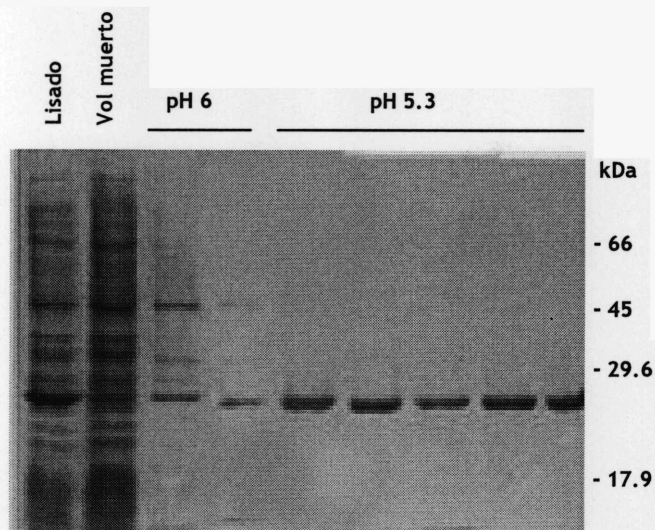
Figura III.5

A. Electroforesis en gel de agarosa 1.5 %. Se confirmaron mediante PCR los clones obtenidos luego de la recombinación del fragmento clonado entre el vector pEntry al vector de destino pDest17. Las líneas 1 a 6 corresponden a distintos clones evaluados por reacción de PCR. La línea 7 corresponde al control positivo de amplificación: producto de amplificación a partir de ADN total de *Bp* Tohama.

B. Electroforesis en gel de agarosa 0.8 %. En las líneas 1 a 3 se observan los vectores recombinantes pDest17:bsp22 purificados a partir de los clones 3, 4, y 5.

Una vez evaluada (mediante SDS-PAGE) la inducción de una proteína del peso molecular esperado para Bsp22 (22 KDa), se confirmó que efectivamente ésta correspondiera a Bsp22 mediante espectrometría de masa del tipo MALDI-TOF.

Posteriormente se procedió a la purificación de dicha proteína mediante cromatografía de afinidad con una resina  $Ni^{+2}$ , utilizando la interacción con la cola de 6 de Histidinas ubicada en el extremo N-terminal de la proteína recombinante His<sub>6</sub>-Bsp22. Para esto, a partir de un cultivo líquido inducido para la expresión de la proteína se procedió a la purificación de la proteína recombinante en un sistema del tipo batch con la resina  $Ni^{+2}$  (Figura III.6). La purificación se realizó bajo condiciones desnaturizantes y la elución en pasos mediante cambios en el pH (rango utilizado 7.8 - 4). La proteína His<sub>6</sub>-Bsp22 recombinante se obtuvo pura en las fracciones eluidas con buffer fosfato pH 5.3.



**Figura III.6. Evaluación de la purificación de His-Bsp22 recombinante mediante SDS-PAGE 12.5 %.** La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad  $Ni^{2+}$  bajo condiciones desnaturalizantes. La línea 1 corresponde al lisado celular; la línea 2 al volumen muerto de la columna cromatográfica, líneas 2 y 3 al lavado de la columna con buffer pH 6 y las líneas 5-9 a la elución de His-Bsp22 con buffer pH 5.3. Sobre la derecha se muestra la corrida correspondiente al patrón de PM. La tinción del SDS-PAGE se realizó con Coomassie Blue.

Con la proteína purificada His-Bsp22 recombinante se obtuvo un anticuerpo policlonal anti-Bsp22 en ratón. Con este antisuero se evaluó mediante inmunoblot la expresión de la proteína efectora del TTSS en distintos aislamientos clínicos de *B. pertussis* pertenecientes a nuestra colección.

Dado que la proteína Bsp22 es secretada al medio extracelular, se analizaron muestras provenientes de sobrenadante de cultivos bacterianos. Se realizaron preparaciones de proteínas de sobrenadante de cultivos de *B. pertussis* de las cepas Tohama I y Bp18323 y de 16 aislamientos clínicos obtenidos en distintos años, divergentes genéticamente (pertenecientes a distintos grupos del PFGE, Capítulo II, página 44), tanto del genotipo *ptxS1A/prn1* como *ptxS1A/prn2* (ver Tabla III.1., pág. 68). De los 16 aislamientos evaluados para la expresión de Bsp22, todos mostraron reactividad en los inmunoblots, no así la cepa vacunal Tohama y la cepa de referencia Bp18323 (Figura III.7). Como se esperaba, la cepa de *B. bronchiseptica* CIP 9.73, y la proteína recombinante His<sub>6</sub>-Bsp22 reaccionaron con el anticuerpo dirigido contra esta proteína. La Figura III.7 muestra que la reactividad contra la proteína recombinante es de un PM ligeramente superior respecto a los aislamientos, debido a que la cola de 6 histidinas, clonada en marco con el ORF de bsp22 y utilizada luego para la purificación, incrementa levemente el PM de la proteína recombinante.

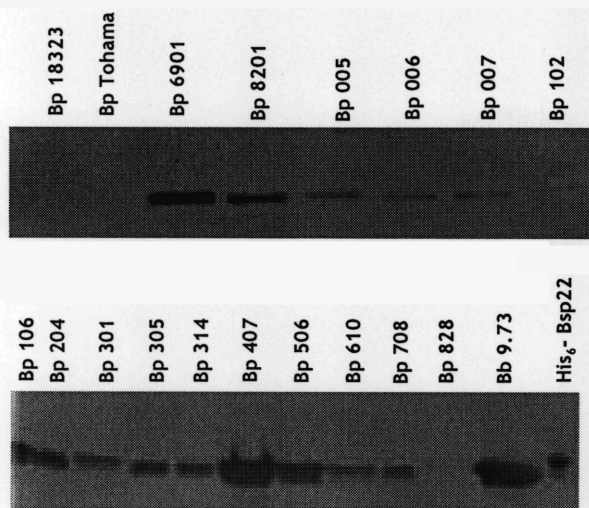


Figura III. 7. Inmunodetección de la proteína efectora del TTSS, Bsp22, en aislamientos clínicos de *B. pertussis*. Muestras correspondientes a proteínas del sobrenadante de cultivos de 16 aislamientos clínicos de *B. Pertussis* (período 1969-2008) fueron resueltas en SDS-PAGE 15 % w/v, transferidas a una membrana PVDF y probadas con un suero policlonal  $\alpha$ -Bsp22. En este ensayo fueron también incluidas muestras igualmente obtenidas de las cepas *B. pertussis* 18323, Tohama I and *B. bronchiseptica* 9.73 así como la proteína recombinante purificada His<sub>6</sub>-Bsp22.

En nuestro trabajo y en concordancia con los resultados recientemente reportados por Fennelly y colaboradores demostramos que *B. pertussis* expresa un TTSS funcionalmente activo pero que las cepas adaptadas a laboratorio como la cepa vacunal Tohama y la cepa Bp18323 no presentan esta capacidad. Recientemente, se ha reportado que aislamientos clínicos pueden mostrar cambios significativos en la transcripción de genes a través de varios pasajes (subcultivos) en el laboratorio (15). Esto indica que *B. pertussis*, como otras bacterias, es capaz de alterar su expresión génica cuando es introducida en un nuevo ambiente. Como se mencionó anteriormente, la expansión de secuencias IS481 promueve rearrreglos en el cromosoma bacteriano aportando a la vez una gran plasticidad.

Interesantemente, en este trabajo no sólo demostramos la expresión de la proteína Bsp22 por un número significativo de aislamientos clínicos representativos de nuestra colección, sino también; que dicha expresión es aparentemente independiente tanto del año en que se obtuvo el aislamiento como de sus características genotípicas. Hemos encontrado expresión de Bsp22 tanto en aislamientos obtenidos en el año 1969 así como también en aquellos obtenidos en años más recientes. Asimismo, observamos dicha expresión tanto en aislamientos de background genético *prn1* como *prn2*.

Hasta el momento, el rol de la proteína Bsp22 en el funcionamiento del TTSS, tanto *in vitro* como *in vivo*; sólo ha sido descrito para *B. bronchiseptica*. Yuk y colaboradores han demostrado que Bsp22, altamente inmunogénica, posee un rol integral en el funcionamiento del TTSS y está asociada a una gran variedad de

fenotipos. *In vitro*, es requerida para la inducción de apoptosis en macrófagos. *In vivo*, Bsp22 media la colonización e infección persistente en el tracto respiratorio inferior de ratones e induce apoptosis en células inflamatorias del hospedador. Asimismo, la infección con una cepa de *B. bronchiseptica*  $\Delta$ bsp22 muestra un incremento en la inducción de anticuerpos anti-*Bordetella* respecto a la cepa salvaje.

Recientemente Medhekar y colaboradores (134) demostraron que la proteína efectora Bsp22 es capaz de autopolimerizarse para exponerse en la superficie bacteriana formando filamentos flexibles. Aunque una mutación en bsp22 no afecta la secreción de la proteína efectora BopC y otros sustratos del TTSS (193) sí elimina la citotoxicidad y afecta la formación del complejo BopB/BopD translocador del poro. Estos autores también mostraron que anticuerpos contra Bsp22 son capaces de eliminar, *in vitro*, la actividad citotóxica del TTSS y más interesante aún; la inmunización de ratones con Bsp22 es capaz de generar protección al menos parcial, contra la infección con *B. bronchiseptica*.

La expresión en los aislamientos clínicos de *B. pertussis* de la proteína efectora Bsp22 y consecuentemente la de un TTSS funcional; podría promover, como en *B. bronchiseptica*, una colonización bacteriana más eficiente y la persistencia en el hospedador a través de mecanismos de inmunosupresión. En este contexto, se podría considerar, quizás, a la expresión de Bsp22 como indicadora de un estado de mayor virulencia.

A partir de los resultados recién presentados, resulta interesante profundizar los estudios sobre esta proteína, sobre todo respecto a sus potencialidades inmunogénicas.

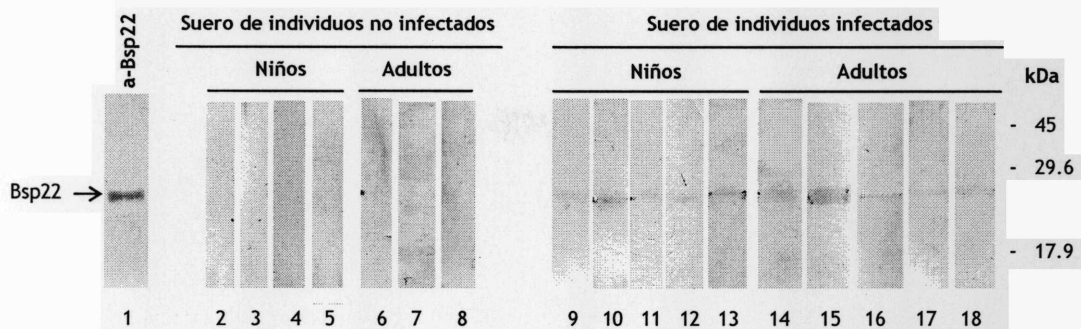
### **Caracterización de las propiedades inmunogénicas de Bsp22.**

Dado que Bsp22 mostró ser expresada de forma ubicua por los aislamientos de *B. pertussis* y no así por las cepas adaptadas al laboratorio; decidimos evaluar sus capacidades inmunogénicas en el hospedador natural.

Mediante ensayos de inmunoblot, nos propusimos evaluar la reactividad de Bsp22 frente a sueros humanos, más específicamente, pertenecientes a individuos infectados. Con este objetivo definimos dos categorías de individuos infectados: menores de 6 meses o mayores de 16 años sin historia de vacunación reciente.

Debido a las condiciones estrictas que se establecieron como criterio de individuo infectado, el número de sueros disponibles para analizar fue relativamente bajo. Así, en este ensayo se evaluó la reactividad de Bsp22 frente a 16 sueros de individuos infectados y a 17 de individuos no infectados. Parte de los resultados obtenidos se muestran en la Figura III.8. Todos los sueros evaluados, considerados como pertenecientes a individuos no infectados (10 sueros obtenidos de individuos menores de 6 meses y 7 de individuos mayores de 16 años) no mostraron reactividad frente a Bsp22 (Figura III. 8, líneas 2 a 8). Respecto a los sueros pertenecientes a individuos considerados como infectados; 6 de 7 sueros evaluados pertenecientes a individuos menores de 6 meses y 5 de 9 individuos mayores de 16 años mostraron reactividad positiva frente a Bsp22 (Figura III. 8, líneas 9 a 18).





**Figura III. 8. Inmunodetección de la proteína recombinante His<sub>6</sub>-Bsp22 con sueros humanos.** Se evaluó la reactividad de Bsp22 frente a sueros pertenecientes a: individuos no infectados menores de 6 meses (líneas 2-5) o mayores de 16 años (líneas 6-8) o a individuos infectados con *B. pertussis* y sin historia de vacunación reciente de los mismos grupos de edad (líneas 9-13 y 14-18 respectivamente). También se evaluó la reactividad de Bsp22 frente a un suero policlonal a-Bsp22 (línea 1).

El hecho que la proteína Bsp22 sea reconocida específicamente por sueros de individuos infectados con *B. pertussis* indica no sólo que ésta última es expresada durante la infección natural, sino que también es capaz de generar una respuesta inmune en el hospedador.

Finalmente, teniendo en cuenta el grado de conservación dentro del género *Bordetella*, la expresión ubicua dentro de la población bacteriana circulante de *B. pertussis* y éstos últimos resultados respecto a sus propiedades inmunogénicas, Bsp22 podría constituir un atractivo candidato vacunal para mejorar las formulaciones acelulares existentes.

## CONCLUSIONES

Como lo hemos remarcado a lo largo de este trabajo de Tesis, pertussis continúa siendo una de las 10 enfermedades infecciosas con mayores tasas de morbilidad y mortalidad del mundo pese a la disponibilidad de vacunas. Más aún, en algunos países con alta cobertura de vacunación la enfermedad continúa siendo endémica e incluso con características de enfermedad resurgente. Los cambios observados en la población bacteriana, en particular, en proteínas de superficie e inmunógenos, podrían estar al menos en parte asociados a la nueva epidemiología de esta enfermedad. Estos cambios podrían ser consecuencia de una presión de selección, como la que podría ejercer la inmunización masiva, aunque su efecto en la resurgencia de pertussis es un área de fuerte discusión.

Gracias a la disponibilidad en algunos países de colecciones de cepas que incluyen aislamientos de la era pre como post vacunal, *B. pertussis* brinda una posibilidad única para el estudio de la vacunación sobre la microevolución de los patógenos. Distintas metodologías han sido utilizadas para estudiar la población de pertussis que no involucran secuenciamiento de ADN y a las cuales ya nos hemos referido en esta Tesis (RFLP, MLST, MLVA, PFGE). Estos estudios revelan cambios significativos en la población de pertussis respecto de aislamientos obtenidos en la era pre-vacunal, una disminución en la diversidad genotípica después de la introducción de la vacunación asociada a la expansión de ciertos clones menos afectados, probablemente, por la inmunidad inducida por la vacuna.

En los últimos años la población circulante de pertussis ha sido extensivamente analizada mediante PFGE. Los cambios detectados por esta metodología podrían ser en parte consecuencia de arreglos genómicos, esperables que ocurran con alta frecuencia en el genoma de *B. pertussis* debido a la presencia de un alto número de secuencias de inserción (IS). Se ha sugerido que la variación estructural del genoma podría afectar la adaptación de los aislamientos de *B. pertussis* a las nuevas condiciones encontradas dentro del hospedador. La disponibilidad del genoma entero de pertussis y el desarrollo de microarrays basados en esta información ofrecieron la posibilidad de tener una visión global tanto del contenido génico como de los perfiles de expresión génica de la población bacteriana circulante. Si bien en el último tiempo se ha extendido la aplicación de los arrays para el primer tipo de estudios (11, 25, 27, 94, 111), no se ha avanzado de la misma forma en lo que se refiere al análisis de los perfiles de expresión génica en los aislamientos circulantes(15, 43).

Un aspecto interesante de analizar, más allá de la tipificación genómica, son los cambios fenotípicos; pues son estos los que finalmente indicarán o no la relevancia de las divergencias en la protección. Teniendo en cuenta esto último, en este trabajo hemos decidido aplicar metodologías basadas en la proteómica para avanzar en la comparación de los perfiles de expresión de los aislamientos circulantes respecto a las cepas vacunales. Para los estudios comparativos se incluyó la cepa cuyo genoma se conoce completamente. Esta cepa, Tohama I es la que se ha empleado en la mayoría de los estudios tendientes a conocer mecanismos moleculares relacionados a la patogénesis y a la protección, así como para la producción de vacunas acelulares.

Mediante la aplicación de esta metodología hemos podido observar que la divergencia genómica previamente descrita se acompaña con diferencias a nivel de proteoma sobre todo el correspondiente a la superficie de la bacteria. El hallazgo de la expresión funcional del sistema de secreción tipo III, y el indicio de la posible expresión de alguna forma de polisacárido capsular, demuestra que la divergencia fenotípica podría tener implicancias tanto en la adaptación de pertussis a la población vacunada como en la modulación de las respuestas del hospedador y la evasión inmunológica.

La identificación de proteínas expresadas diferencialmente por los aislamientos clínicos, que se han descrito como inmunogénicas en otros patógenos, nos permite validar las diferencias de reactividad encontradas en los ensayos de western blot. La expresión diferencial de proteínas podría ser responsable de la inducción en el hospedador de respuestas también diferenciales y que podrían estar involucradas en la protección.

La combinación del análisis proteómico de componentes de la superficie bacteriana con análisis serológicos ha sido utilizada para otros patógenos (33, 37, 58, 74, 145, 163), con el objetivo de desarrollar nuevas vacunas. La combinación de estas dos metodologías permite identificar nuevos inmunógenos, expresados *in vivo*, posibles candidatos vacunales. Sorprendentemente, varias de las proteínas que se han identificado aquí y en otros trabajos; con rol en la patogenicidad, capaces de generar una respuesta inmunológica e incluso ligadas a la protección; están ligadas también al metabolismo. Este hallazgo da lugar a dos reflexiones. Por un lado, como se ha sugerido en la literatura, este tipo de resultados llaman a revisar el concepto de determinante de virulencia. Evidentemente, la definición de qué constituye un determinante asociado a virulencia no está limitado a toxinas y adhesinas, sino que también puede incluir proteasas, proteínas regulatorias, de respuesta a stress, proteínas de transporte e incluso asociadas al metabolismo (150). Algunos autores proponen considerar como determinantes de virulencia a aquellos factores que confieren al patógeno una ventaja selectiva y le permiten colonizar un hospedador, persistir, propagarse y causar enfermedad(105).

Por otro lado, la otra reflexión tiende a validar y posicionar a las estrategias basadas en la proteómica para la búsqueda de nuevos candidatos vacunales. Probablemente, metodologías como la vacunología reversa, que se basan en la información del genoma y utilizan herramientas bioinformáticas para buscar antígenos expuestos en superficie y susceptibles de reconocimiento por anticuerpos; no se hubiera detenido en principio en proteínas relacionadas al metabolismo(74, 168, 170). Para la proteína LpdA se predice por bioinformática una localización citoplasmática (ver Tabla III.2) pero en otras bacterias y por otras metodologías se ha determinado que está expuesta en superficie. En principio, esta proteína tradicionalmente considerada un factor metabólico, no sería evaluada respecto a su rol en la patogenicidad y menos aún en la protección.

Estos resultados muestran a las metodologías genómicas como proteómicas como herramientas válidas, complementarias, útiles para el desarrollo racional de un aspecto tan importante como son las vacunas.

## **CAPITULO IV**

# **ESTUDIO DE LA RELEVANCIA DE LA DIVERGENCIA ANTIGÉNICA EN LA PROTECCIÓN CONTRA PERTUSSIS**

Desde el punto de vista de la vacunación y el control de la enfermedad, y la erradicación del patógeno es importante analizar las posibles consecuencias del polimorfismo en las cepas circulantes de *B. pertussis* y los mecanismos que pueden influenciar la adaptación bacteriana a la población inmunizada.

Cómo hemos planteado anteriormente, un importante interrogante a responder es si la adaptación de la población de *B. pertussis* ha afectado la eficacia de la vacuna y contribuido a la reemergencia. Este aspecto a diferencia de la caracterización genotípica y molecular no está tan ampliamente estudiado y existen algunas posiciones contrapuestas respecto al rol del polimorfismo genético en la protección (13, 49, 79, 82, 110)

Para avanzar en el conocimiento de este aspecto, en nuestro laboratorio estandarizamos el modelo murino de desafío intranasal para evaluar la eficacia de las vacunas utilizadas en nuestro país respecto a la protección conferida frente a la población bacteriana circulante.

Antes de avanzar específicamente en la metodología y los resultados de estos ensayos, haremos una reseña breve del modelo animal de infección de *B. pertussis*.

### **Modelo Murino de Infección**

El desarrollo de cualquier vacuna requiere comprender la patogénesis de la enfermedad y los mecanismos efectores de protección. Esto requiere el uso de un modelo animal adecuado que refleje estos mecanismos.

Aunque el hombre es el único hospedador natural de *B. pertussis*, un gran esfuerzo se ha realizado para reproducir la enfermedad en distintas especies animales: conejos, cerdos, perros, monos, ratas y ratones(52).

El modelo murino es el más ampliamente usado y ha tenido un importante rol en el avance del actual conocimiento respecto a los mecanismos de patogenicidad e inmunidad (129, 131, 138). Asimismo este modelo es el utilizado para todos los estudios preclínicos de vacunas contra pertussis, incluidos los procedimientos reglamentarios y de control.

La respuesta pato-fisiológica en ratones infectados depende de la edad y la dosis de desafío (186)(la dosis letal no sólo depende de edad del ratón sino también de la ruta de infección). Los ratones adultos generalmente no muestran síntomas clínicos marcados, mientras que los recién nacidos expuestos a un desafío con *B. pertussis* muestran retardo en la ganancia de peso, atrofia del bazo, hipoglucemia y leucocitosis. Aunque los ratones infectados con *B. pertussis* no manifiestan tos paroxística y fallan en transmitir la enfermedad a ratones sanos; la infección se asemeja a la observada en humanos en varios aspectos: alta susceptibilidad a la infección de ratones recién nacidos respecto a los adultos, períodos similares de infección pulmonar y manifestaciones de la acción de la toxina pertussis, tales como hipoglucemia, leucocitosis y sensibilización a la histamina(52, 138).

Junto con el desarrollo de las primeras vacunas, en 1950 se demostró que la protección contra el desafío letal intracerebral (ic) en ratones inmunizados correlacionaban con la eficacia de las vacunas estimada en

ensayos clínicos conducidos por la UK Medical Research Council. Desde ese momento, el modelo de inyección intracerebral o Test de Kendrick fue establecido como el procedimiento Gold Standard para evaluar la potencia de vacunas celulares (108, 136, 173).

Para la nueva generación de vacunas acelulares desarrolladas en Europa y EEUU, este test no resulta adecuado en predecir su eficacia en humanos. Es decir, las vacunas acelulares no pasan el Test de Kendrick original a pesar de tener relativamente alta eficacia en ensayos clínicos (139, 190). Una versión modificada del Test de Kendrick se utiliza para controlar la vacunas acelulares en Japón, Corea y China. En los últimos años se está evaluando la posibilidad de reemplazarlo por la utilización del modelo de desafío respiratorio (39)

Debido a que el desafío intracerebral no constituye, obviamente, la ruta natural de infección y a la falta de semejanza del modelo respecto a la enfermedad en humanos; los modelos respiratorios de infección han sido usados extensamente para los estudios de patogénesis e inmunidad a *B. pertussis* (13, 79, 82, 138, 139, 183). Luego del desafío por una ruta respiratoria, *B. pertussis* es capaz de replicarse en el tracto respiratorio y alcanzar un pico (aprox.  $10^6$ - $10^7$  UFC/pulmón) después de 7-10 días de desafío. Luego la eliminación natural puede llevar hasta 5-7 semanas, dependiendo del método de desafío, la cepa de *B. pertussis* y el haplotipo de MHC del ratón (52). Las rutas de infección más comunes son el desafío por aerosol e intranasal siendo este último más efectivo. Para este último, un pequeño volumen ( $\leq 50 \mu\text{l}$ ) de una suspensión bacteriana es depositado en las narinas de ratón bajo anestesia. Aunque este método es más simple y no requiere disponer de un equipamiento especial; se ha reportado que el desafío por aerosol es más reproducible, con menos variación en la recuperación bacteriana y la infección se distribuye regularmente en los lóbulos del pulmón (88, 167).

En los últimos años, distintos estudios han demostrado que el modelo respiratorio de infección de *B. pertussis*, ya sea por desafío intranasal o por aerosol resultan útil para evaluar la eficacia tanto de vacunas celulares como acelulares. Tanto Mills (1998) como Xing (1999) demostraron que es posible utilizar el modelo de desafío por aerosol para discriminar entre vacunas que han mostrado diferentes eficacias en ensayos clínicos (139, 190). Asimismo, se ha demostrado que el modelo desafío intranasal es capaz de discriminar entre vacunas acelulares con 2 y 3 componentes con distintas eficacias (13, 79).

En base a estos últimos reportes en el laboratorio decidimos trabajar empleando el desafío intranasal.

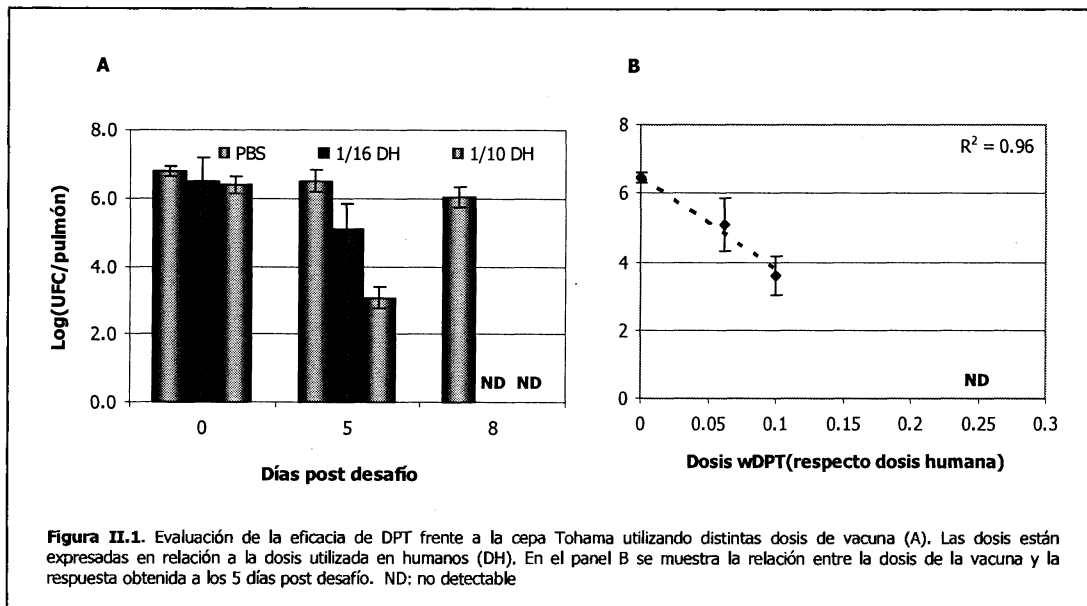
### **Estandarización del método de desafío sub-letal intranasal.**

A partir de los resultados reportados que muestran la utilidad del modelo animal para predecir la protección conferida por las vacunas utilizadas para controlar a *B. pertussis* (79, 139), nos propusimos utilizar este modelo para evaluar y comparar la inmunidad inducida por las dos vacunas utilizadas en nuestro país frente a la población bacteriana circulante. Para esto, decidimos utilizar el modelo de infección respiratoria mediante desafío intranasal. Consideramos que era un método sencillo y rápido para lograr la infección pulmonar, sin necesidad de equipamiento adicional. El modelo utilizado debía ser lo suficientemente reproducible y sensible para poder comparar y diferenciar la protección conferida por las vacunas frente a distintos aislamientos clínicos de *B. pertussis*. Para lograr esto, estandarizamos el método en nuestro laboratorio, sobre todo respecto a la dosis de la vacuna empleada y la vía de inmunización.

Respecto al esquema de inmunización y a la dosis de desafío existe consenso en realizar 2 inmunizaciones con intervalos de 14 días y posteriormente, a los 14 días de la segunda inmunización desafiar intranasalmente con 50 µl de una suspensión bacteriana conteniendo  $5 \times 10^7$ - $1 \times 10^8$  bacterias(79). Se ha determinado que con este esquema de inmunización y desafío es posible correlacionar la eficacia de las vacunas celulares en ensayos clínicos con un alto nivel de protección en ratones. Vacunas con 95 % de eficacia en ensayos clínicos muestran una eliminación bacteriana completa de los pulmones de los ratones entre los 5-8 días post desafío (110, 139).

La cepa de referencia recomendada por la OMS para evaluar la eficiencia de las vacunas contra pertussis es la 18323 (aislamiento obtenido en EEUU en 1947). Sin embargo, teniendo en cuenta que esta cepa está filogenéticamente más relacionada con la especie *B. bronchiseptica* y expresa un tipo inusual de pertactina (*prn7*) y que nuestro objetivo es evaluar el rol del polimorfismo en este y otros antígenos respecto a la protección; decidimos utilizar como control de protección a la cepa Tohama que se emplea en la producción de vacunas y cuyo genoma es conocido (aislada en Japón en 1952; a partir de esta cepa se purifican los componentes de las vacunas acelulares). Consideramos que esta cepa es más representativa de las cepas vacunales hoy en uso, cuyos antígenos polimórficos son del tipo *prn1/ptS<sub>1</sub>B*. Así, asumimos como criterio de alta eficiencia de la vacuna y buena protección conferida, a la eliminación completa de la cepa Tohama de los pulmones del ratón, a los 8 días post-desafío. Asimismo, utilizamos como control negativo de protección a un grupo de ratones inmunizados con PBS y desafiados con la cepa vacunal Tohama. Este grupo además de constituir un control de infección (cinética de infección), también nos permite analizar, comparando los recuento de viables de la suspensión bacteriana utilizada para desafío (inóculo de desafío) y el obtenido el día 0 post desafío; la reproducibilidad del desafío y la virulencia del inóculo bacteriano utilizado para desafiar.

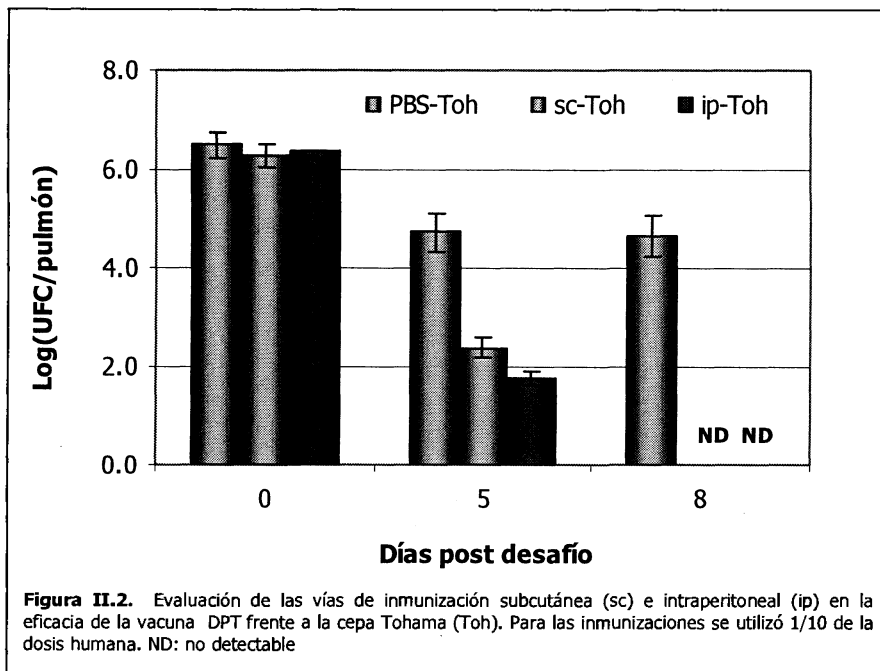
En primer lugar, ensayamos distintas dosis para inmunizar a los ratones correspondientes a  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{10}$  y  $\frac{1}{16}$  de la dosis humana. Todas ellas fueron eficientes en la eliminación de la cepa de referencia Tohama. (Figura II. 1 A).



Como había sido reportado anteriormente para vacunas celulares (190), se observó una relación lineal entre el recuento de viables en pulmón y la dosis utilizada para la inmunización. La linealidad se mantiene para dosis menores a  $1/10$  dosis humana (Figura II.3.1 B). Para la dosis correspondiente a  $1/4$  de la dosis humana el recuento de viables al día 5 post desafío fue menor al límite de detección del método ( $< 100$  UFC/pulmón). A partir de este resultado, para los ensayos posteriores utilizamos dosis de inmunización correspondientes a  $1/10$  o  $1/16$  de la dosis humana.

Respecto a la vía de inmunización, evaluamos la protección obtenida por inmunización intraperitoneal y subcutánea frente a la cepa de referencia Tohama. Los resultados obtenidos mostraron que ambas vías muestran respuestas comparables (Figura II.2). En base a estos resultados decidimos emplear en los ensayos siguientes la vía de inmunización intraperitoneal.





### Evaluación de la protección conferida por inmunización con la vacuna de uso local frente a la Población Bacteriana Circulante (PBC).

Al comienzo de este trabajo, contábamos en nuestro laboratorio con alrededor de 40 aislamientos clínicos obtenidos de pacientes pediátricos hospitalizados en su mayoría en el Hospital de Niños Sor María Ludovica de la ciudad de La Plata. Sobre la base de sus divergencias a nivel de las secuencias que codifican para antígenos inmunoprotectores (*prn* y *ptx*), así como en su genoma completo a través de los ensayos de fingerprint y posteriormente PFGE, hemos clasificado a los aislamientos de nuestra colección en grupos divergentes

Para realizar los ensayos en animales se eligieron aislamientos con distintos perfiles en el PFGE y divergentes desde el punto de vista del polimorfismo para los antígenos pertactina y toxina pertussis (*prn2* y *ptxS1A*); basándonos en el año en que se obtuvieron, de modo de tener un aislamiento representativo de cada año: Bp005, Bp006; Bp106; Bp204; y Bp301. Se utilizó la cepa vacunal japonesa Tohama como cepa control y representativa del background genético *prn1* y *ptxS1B*

Con estos aislamientos evaluamos la protección conferida por la vacuna triple bacteriana de uso local (Origen denominado A), luego de dos inmunizaciones i.p. con 1/16 de la dosis humana.

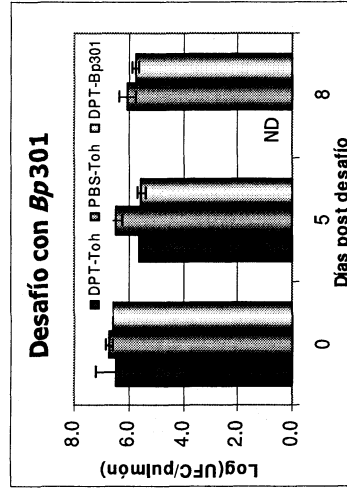
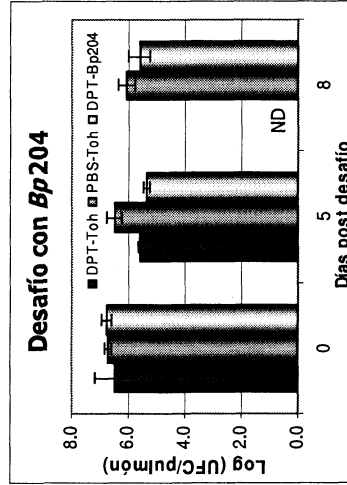
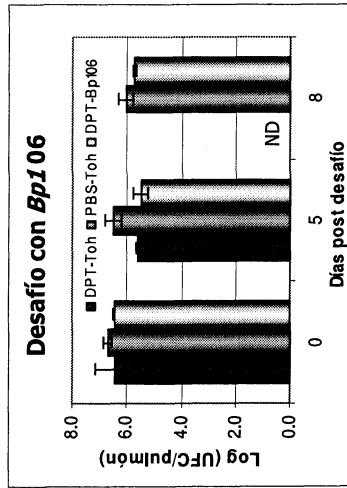
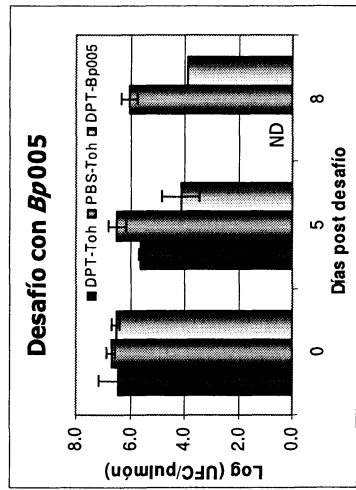
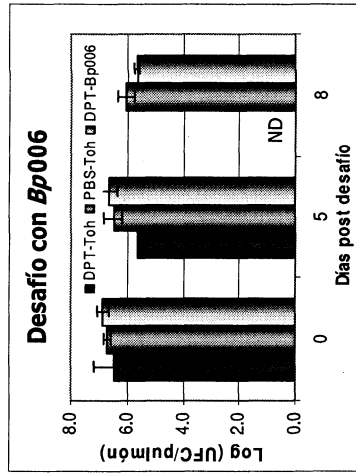
Más allá de las pequeñas diferencias que puedo haber en la preparación de la suspensión bacteriana para el desafío, las recuperaciones de bacterias viables a las dos horas del desafío y la eficiencia del desafío fueron similares para todos los tratamientos (Tabla II.2). Estos resultados nos permiten verificar que tanto la virulencia de las bacterias como el procedimiento del desafío fueron óptimos.

**Tabla II.2.** Eficiencia del desafío intranasal.

Tratamiento	Dosis Desafío	Día 0	Eficiencia del desafío (%)
	Log(UFC/Dosis)	Log(UFC/pulmón)	
DPT-Toh	7,6	6,3	82,9
DPT-Bp005	7,4	6,5	88,1
DPT-Bp006	7,8	6,9	87,4
DPT-Bp106	7,9	6,5	81,6
DPT-Bp204	7,5	6,8	90,1
DPT-Bp301	7,8	6,6	84,5
PBS-Toh	7,6	6,7	88,2

Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la Figura II.3. En esta figura puede observarse que la inmunidad conferida por la vacuna no es tan eficaz frente a los aislamientos como lo es frente a la cepa Tohama I, ya que los aislamientos clínicos evaluados fueron capaces de persistir en los pulmones de los ratones inmunizados, mientras que la cepa de referencia no fue detectable en pulmón ( $p < 0.001$ ) a los 8 días post desafío. Estos resultados, coincidentes a los publicados en Holanda (King *et al.* 2001) y Polonia (Gzyl *et al.* 2004) marcarían que la divergencia observada previamente sería relevante en cuanto a la protección.

Respecto a la pertactina, un gran número de trabajos han demostrado su rol en la adhesión y en la inmunidad protectora (36, 121, 175). King y colaboradores ha analizado la importancia inmunológica del polimorfismo en la pertactina, en particular en la región 1 (dominio polimórfico expuesto en la superficie de la proteína y cercano a un motivo RGD involucrado en la adhesión a células del huésped(121). Este autor demostró que la región polimórfica 1 es inmunogénica tanto en ratones como en el hombre, que esta región posee epitopes protectivos y que la variación en esta región afecta la unión de anticuerpos. Otros autores han sugerido que durante la infección y la vacunación se generaría anticuerpos contra un epitope conformacional que involucraría a las regiones 1 y 2 de la pertactina y que si bien los anticuerpos inducidos por epitopes lineales (contra secuencias repetitivas de la región 1) aunque capaces de generar protección cruzada serían menos efectivos que los anticuerpos conformacionales(100-102). Estos últimos anticuerpos tendrían con cierta especificidad para los distintos tipos de pertactina (93). Debido a que el motivo RGD implicado en la adhesión, está separado de las primeras repeticiones de la región 1 por sólo 3 aminoácidos, las variaciones en esta última podrían tener importancia tanto en la evasión, disminuyendo la respuesta inmune generada por dominios funcionales de la pertactina como en la protección cruzada.



**Figura II.3.** Modelo de desafío intranasal en ratones empleando la vacuna DPT comercial en uso (inmunización i.p. con 1/16 la dosis humana) y como cepa de desafío los aislamientos Bp005, Bp006, Bp106, Bp204 y Bp 301. Como control se emplearon ratones no inmunizados, es decir tratados sólo con PBS. En el eje de las ordenadas se grafica el Log<sub>10</sub> del número de unidades formadoras de colonias recuperadas de los ratones a distintos días después del desafío intranasal. ND: no detectable.

Por otro lado, el trabajo publicado por Gzyl muestra que incluso con altas dosis de vacuna (utilizan  $\frac{1}{4}$  de la dosis humana) la vacuna de uso local en Polonia elimina rápidamente a las cepas vacunales (*prn1,pt<sub>S1</sub>B*) pero no es eficaz en la eliminación tanto de aislamientos *prn2,pt<sub>S1</sub>A*, como de aislamientos *prn1,pt<sub>S1</sub>A* asignándole un rol también al polimorfismo observado en la toxina pertussis(82).

### **Empleo del modelo animal de desafío intranasal utilizando como vacuna una formulación preparada a partir de aislamientos locales.**

#### **Modelo de Coinfección y desafío múltiple. Marcado de las cepas a utilizar.**

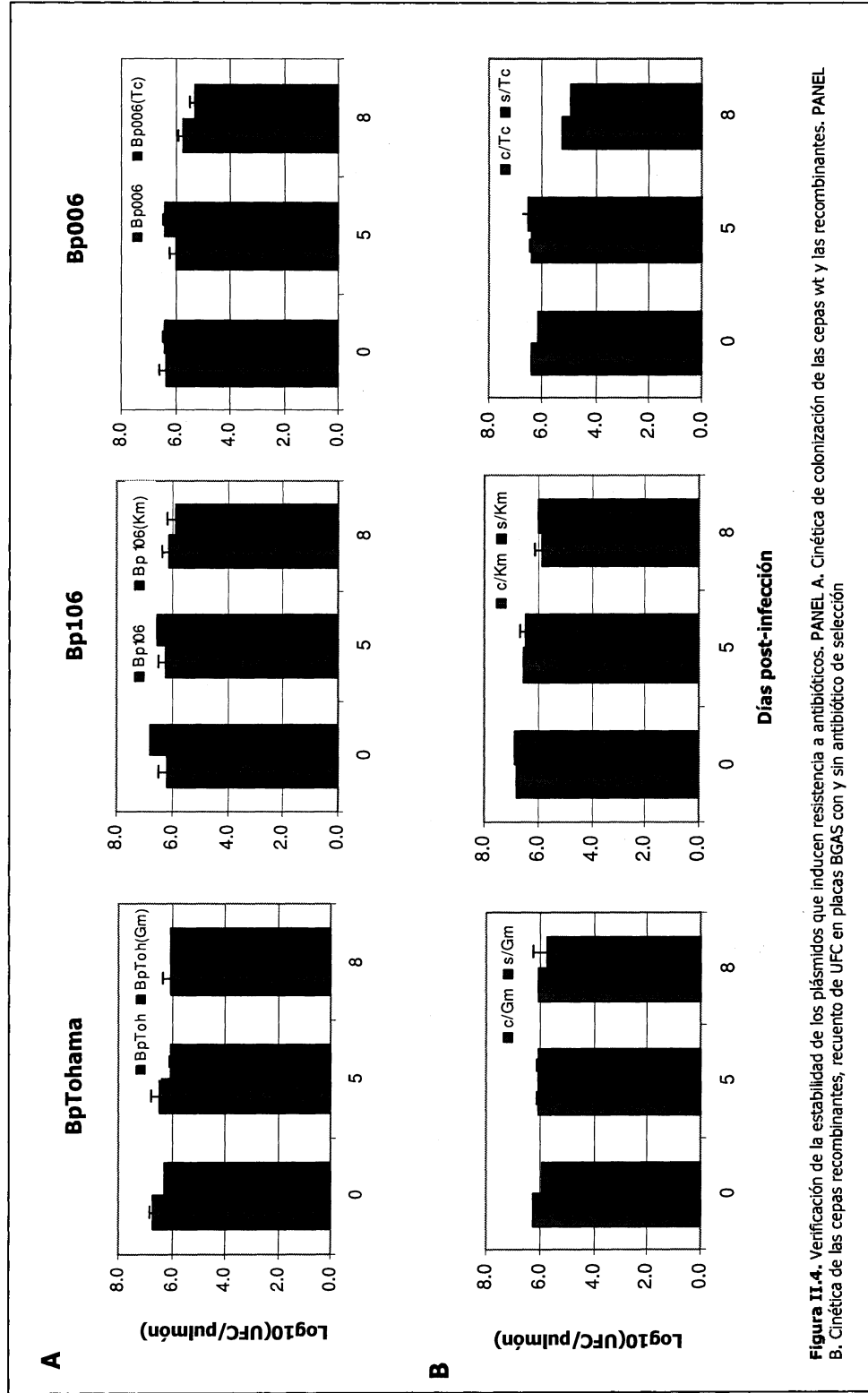
A partir de los resultados obtenidos anteriormente nos propusimos evaluar la protección conferida por inmunizaciones realizadas con aislamientos clínicos (cepas circulantes) frente a la cepa vacunal y frente a las mismas cepas u otras de la población circulante

Dado que esto último da lugar a múltiples ensayos y combinaciones cepa para inmunizar/cepa desafío, elegimos la estrategia de realizar ensayos de coinfección con la cepa vacunal Tohama y dos aislamientos representativos de la población circulante. Esta estrategia requiere, en ensayos de protección del tipo que describimos anteriormente, realizar un recuento en placa diferencial de cada uno de los aislamientos provenientes del pulmón del ratón infectado. Así, se incorporaron vectores replicativos estables en los aislamientos *Bp006* y *Bp106* y la cepa de referencia Tohama I, de manera de lograr que cada uno expresara resistencia a un antibiótico diferente: Tetraciclina, Kanamicina y Gentamicina respectivamente.

#### **Verificación de la estabilidad del plásmido. Cinética de infección**

Antes de comenzar con los ensayos de protección propuestos, verificamos la estabilidad del vector plasmídico durante el curso de la infección en la que no teníamos la posibilidad de mantener la presión selección ejercida por los antibióticos.

Se realizó una cinética de colonización con cada una de las cepas y se evaluó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en pulmón a distintos tiempo post infección, mediante recuento en placa con o sin el antibiótico de selección (Figura II.4). El número de colonias recuperadas de los pulmones en placas sin antibiótico fueron muy similares a las contadas en las placas con antibiótico, es decir no se determinaron diferencias significativas ( $p > 0.001$ ) en los recuentos de UFC realizados.



**Figura II.4.** Verificación de la estabilidad de los plásmidos que inducen resistencia a antibióticos. **PANEL A.** Cinética de colonización de las cepas wt y las recombinantes. **PANEL B.** Cinética de las cepas recombinantes, recuento de UFC en placas BGAS con y sin antibiótico de selección

Estos resultados nos permitieron determinar que el vector plasmídico que codifica para la resistencia al antibiótico no se pierde durante la infección, al menos durante los días post infección que nos interesa analizar.

Con estos ensayos, también pudimos determinar que tanto la cepa de referencia Tohama como los aislamientos *Bp006* y *Bp106* presentan una cinética de colonización similar (infección individual), independientemente de la presencia del vector plasmídico que les confiere resistencia a los distintos antibióticos.

#### **Evaluación de la protección**

El modelo de coinfección planteado resultó más sensible y reproducible y con menos dispersión en los resultados (elimina las variaciones que surgen de la manipulación de los animales: inmunización y desafío)

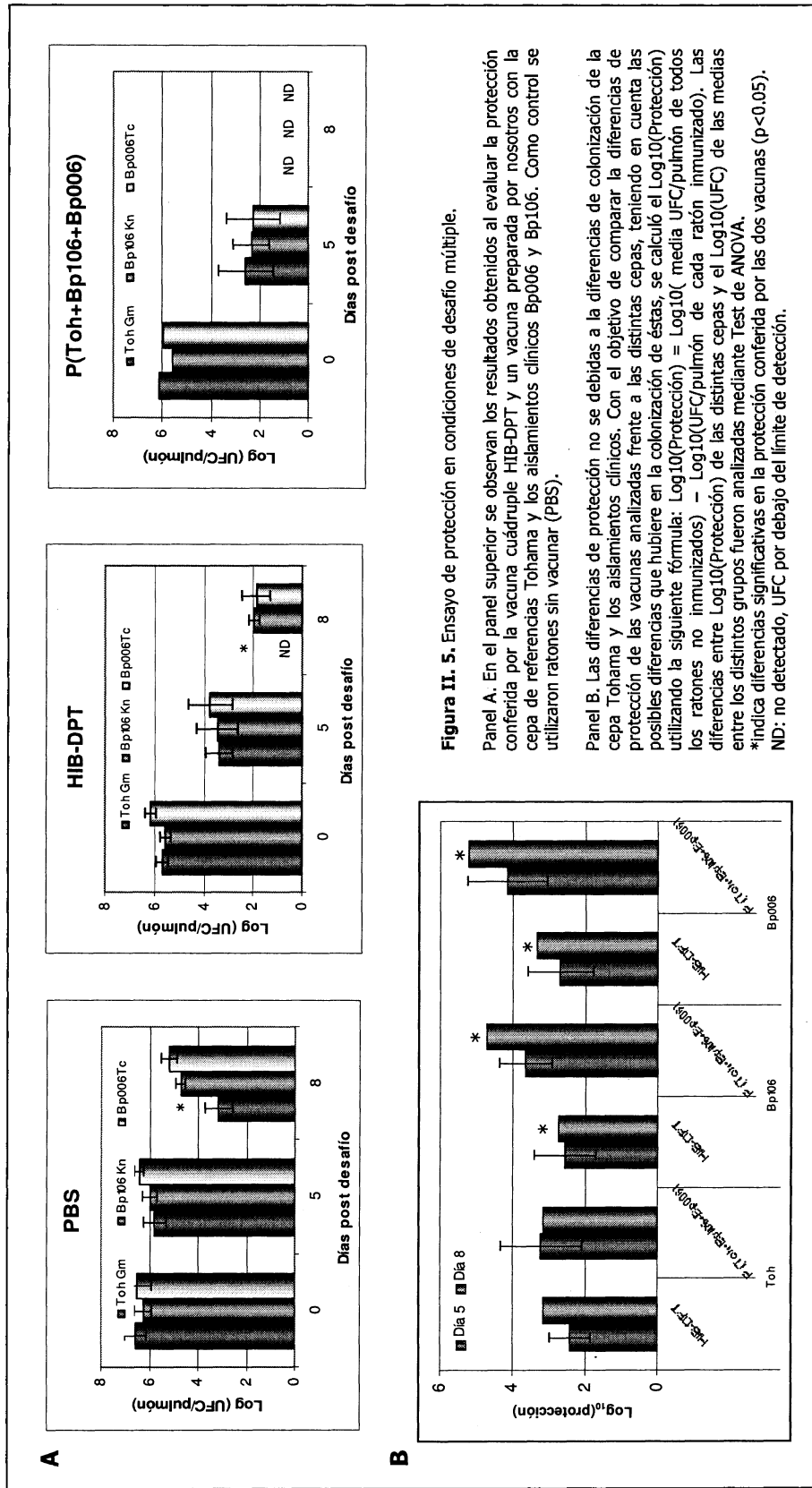
Con este modelo de coinfección y desafío múltiple intranasal, evaluamos la protección conferida por la vacuna cuádruple bacteriana (HIB-DPT) utilizada en nuestro país y una formulación preparada por nosotros compuesta por la cepa de referencia Tohama (*prn1* y *ptS1B*) y los aislamientos clínicos *Bp006* y *Bp106* (ambos *prn2* y *ptS1A*) en una proporción 1:1:1. Para ambas inmunizaciones, la dosis utilizada fue la correspondiente a 1/10 de la dosis humana.

En condiciones de coinfección observamos una diferencia de colonización entre la cepa de referencia Tohama y los aislamientos clínicos (Figura II.5 A). Podríamos asumir que estas diferencias no se habían observado tan claramente en los ensayos con desafío individual. Estos resultados podrían indicar que durante la coinfección, al establecerse una competencia, los aislamientos circulantes tendrían una capacidad de colonización (fitness) mayor, atribuible en parte al polimorfismo observado en la adhesina pertactina (Van Loo, Tesis doctoral 2002).

Al igual que la vacuna triple, la cuádruple tampoco fue efectiva en eliminar a los aislamientos clínicos del pulmón. Si bien los modelos animales son diferentes, la vacuna cuádruple podría ser más efectiva que la triple las vacunas utilizadas en estos ensayos poseen distintos orígenes (ambas son importadas), diferencias en los procesos de producción pueden determinar vacunas con distintas concentraciones de antígenos, distinta potencia o eficacia. Por otro lado, no habría que descartar que la mayor protección se deba a un efecto dosis-respuesta.

En el contexto de coinfección, la menor eficacia de la vacuna cuádruple frente a los aislamientos podría atribuirse en parte a la diferencia en la colonización de éstos respecto a la cepa vacuna Tohama. Sin embargo, más allá de esta diferencia, al utilizar una vacuna que incluye cepas con componentes antigénicos divergentes, obtuvimos una mayor protección que la vacuna cuádruple eliminando tanto a la cepa vacunal Tohama como a los aislamientos circulantes (Figura II.5 B).

Este resultado confirma que en el modelo animal empleado el polimorfismo genético, más allá de que pueda determinar que las cepas circulantes sean más virulentas, tiene un peso importante en lo que se refiere a la protección.



**Figura II. 5.** Ensayo de protección en condiciones de desafío múltiple.

Panel A. En el panel superior se observan los resultados obtenidos al evaluar la protección conferida por la vacuna cuádruple HIB-DPT y un vacuna preparada por nosotros con la cepa de referencias Tohama y los aislamientos clínicos Bp006 y Bp106. Como control se utilizaron ratones sin vacunar (PBS).

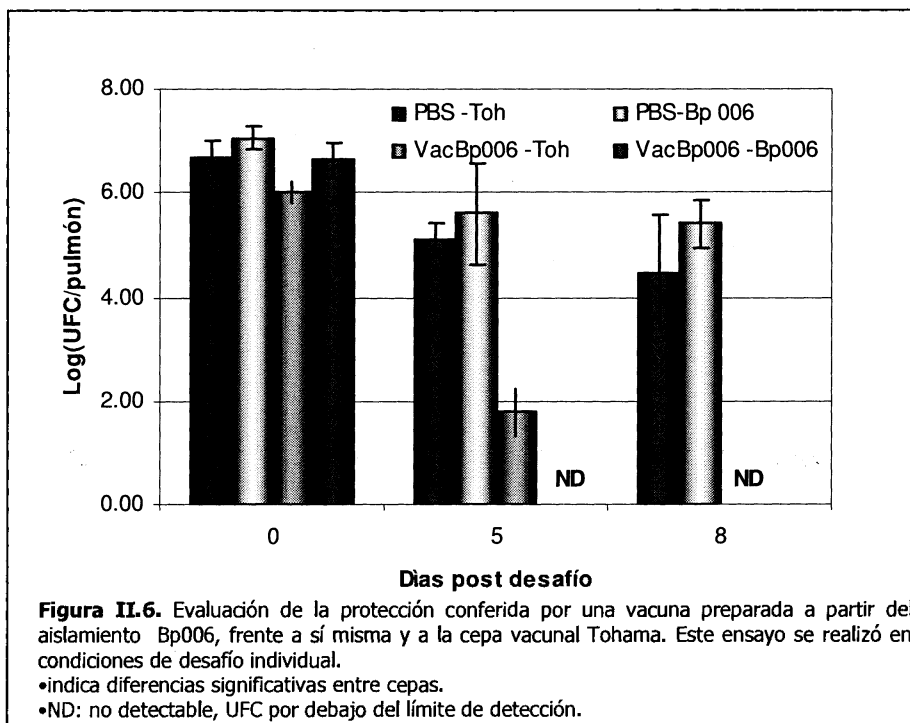
Panel B. Las diferencias de protección no se debidas a la diferencias de colonización de la cepa Tohama y los aislamientos clínicos. Con el objetivo de comparar la diferencias de protección de las vacunas analizadas frente a las distintas cepas, teniendo en cuenta las posibles diferencias que hubiere en la colonización de éstas, se calculó el Log<sub>10</sub>(Protección) utilizando la siguiente fórmula:  $\text{Log}_{10}(\text{Protección}) = \text{Log}_{10}(\text{media UFC/pulmón de todos los ratones no inmunizados}) - \text{Log}_{10}(\text{UFC/pulmón de cada ratón inmunizado})$ . Las diferencias entre Log<sub>10</sub>(Protección) de las distintas cepas y el Log<sub>10</sub>(UFC) de las medias entre los distintos grupos fueron analizadas mediante Test de ANOVA.

\*indica diferencias significativas en la protección conferida por las dos vacunas ( $p < 0.05$ ).  
 ND: no detectado, UFC por debajo del límite de detección.

Por otro lado, aunque el modelo de coinfección surgió como una estrategia experimental, en el huésped natural de pertussis la coinfección es factible. Recientemente se reportó un caso de coinfección con dos cepas de *B. pertussis* en un niño de 48 días. Sorprendentemente estos dos aislamientos poseían distintos tipo de prn y resistencia a antibióticos (30)

### Evaluación de la protección conferida por inmunizaciones locales (PBC) frente a una cepa de desafío estándar y a otros aislamientos clínicos

En un ensayo preliminar, utilizamos el aislamiento Bp006 para preparar una formulación (correspondiente a 1/10 de la dosis humana) y utilizarla como vacuna. Al evaluar la protección conferida por esta vacuna, en un ensayo de desafío individual, determinamos que la vacuna preparada por nosotros con el aislamiento clínico Bp006 no era tan eficiente en eliminar del pulmón a la cepa de referencia Tohama I (Figura II. 6). Los mismos argumentos expuestos anteriormente respecto a la especificidad de los anticuerpos generados frente a los distintos tipos de pertactina podrían explicar, en parte, la escasa protección cruzada(93).





## CONCLUSIONES

La implementación de cualquier vacuna tiene por objetivo generar mecanismos que generen una respuesta inmune similar a la generada por la infección natural y de esta manera protejan a los individuos de la infección, disminuyan la prevalencia del patógeno en la población y en última instancia erradiquen al patógeno y a la enfermedad. Históricamente, las vacunas que fueron capaces de generar los mecanismos antes mencionados (polio, viruela, difteria) han sido capaces de controlar la enfermedad o extinguir al patógeno. Es evidente que las vacunas existentes para *B. pertussis* no lo han logrado, y es así que por distintas causas, entre ellas la corta inmunidad conferida, se la considera una vacuna imperfecta.

La implementación de una vacuna “imperfecta” es capaz de producir un cambio en el escenario y el ambiente en que los patógenos viven; perturbando y modificando la epidemiología de los patógenos y la forma en que la selección natural actúa sobre ellos. Al comienzo de esta tesis hemos comentado que la implementación de la vacuna contra pertussis ha controlado la enfermedad, ha disminuido la transmisión, pero no ha eliminado la circulación de *B. pertussis*. Junto con la marcada reducción en los casos reportados de pertussis debido a la implementación de la inmunización pediátrica se ha producido, una disminución del número de individuos susceptibles, así como un drástico cambio en la distribución por edad de lo infectados.

Este tipo de vacunas, a través de la respuesta inmunológica que generan en el hospedador, también pueden estructurar la diversidad presente en una población bacteriana. En la última década, más allá del aumento en la vigilancia de la enfermedad y al mejoramiento de las técnicas diagnósticas se ha determinado un aumento cierto de la incidencia de pertussis a nivel mundial, incluso en poblaciones con altas coberturas de vacunación, al punto de considerarla una enfermedad re-emergente. A través de la implementación de herramientas para analizar la epidemiología molecular y la estructura genética de la población bacteriana circulante, se ha mostrado suficiente evidencia de la existencia de la divergencia antigénica de los aislamientos circulantes de *B. pertussis* respecto a las cepas vacunales. En particular, el hecho que estos cambios en la estructura de la población incluyan variaciones antigénicas en epitopes inmunodominantes de antígenos protectores (PRN y PT) y que los alelos no vacunales sean más frecuentes en individuos vacunados en que en los no vacunados ha llevado a la hipótesis de la selección debida a la vacunación(128).

La divergencia antigénica de los aislamientos de *B. pertussis* a nivel genético es evidente, pero esta divergencia debe ser acompañada de estudios que indiquen las posibles consecuencias de este polimorfismo, si es responsable de la adaptación de la población de *B. pertussis* a la población inmunizada y si esto ha afectado la eficacia de la vacuna y contribuido a la reemergencia.

Los resultados obtenidos en esta tesis utilizando el modelo murino de infección, han mostrado de forma contundente que la divergencia antigénica tiene un rol importante en la protección. Estos resultados, si bien son coincidentes con los publicados en otros países (Holanda y Polonia) en los que también evalúan la eficacia de las vacunas locales, no dejan de presentar cierta resistencia.

Como hemos mencionado anteriormente, existen posiciones contrapuestas respecto al posible rol del polimorfismo genético en la protección. Los resultados obtenidos en estudios epidemiológicos referidos

tanto incidencia poblacional como de la estructura de la población bacteriana circulante de *B. pertussis* ha dado lugar a distintas interpretaciones.

Existen posturas que sugieren que la ocurrencia y expansión de los distintos grupos filogenéticos (aislamientos con distintos perfiles de PFGE y tipos de *prn* y *ptx*) se debe a la evolución natural del patógeno (producto del azar y la expansión clonal), coincide con la ocurrencia de brotes epidémicos y es ubicua; ya que se observarían el mismo tipo de cepas en distintos países con distintas historias de vacunación, que utilizan distintas vacunas y esquemas de vacunación, e incluso en poblaciones con baja cobertura en las que el patógeno no estaría sujeto a una presión de selección(13, 49).

La posición más generalizada sugiere que el polimorfismo genético y la expansión de ciertas cepas (*prn*2, *pt*<sub>51</sub>A), coincidentemente con la implementación de la inmunización masiva (con vacunas *prn*1, *pt*<sub>51</sub>B) y se podría deber a un mayor adaptación de los aislamientos circulantes en el contexto inmunológico actual. Ambos, la caída de la inmunidad derivada de la vacuna y la variación antigénica pueden tener un rol importante en la persistencia de pertussis en la población. Las epidemias de pertussis en poblaciones vacunadas pueden deberse no sólo a la emergencia de nuevas cepas con cambios inducidos y seleccionados por la vacuna, sino también a la corta inmunidad inducida por ésta. El principal evento de evolución bacteriana y transmisión podría ocurrir en la población adolescente y adulta con inmunidad disminuida. Las bacterias antigénicamente distintas podrían tener características que le permitan tanto escapar de la inmunidad del hospedador como adaptarse a huéspedes parcialmente inmunizados. Así, la población adolescente y adulta con inmunidad disminuida (producto del cambio de la edad de la población susceptible con la implementación de la vacuna) podría tener un efecto notable no sólo como reservorio para la infección de niños pequeños sino también sobre la evolución bacteriana (3, 55, 82, 84, 110, 124). En nuestro trabajo, también hemos demostrado que la protección conferida contra pertussis dependería de la fuerza y el tipo de inmunidad inducida por la vacuna. Los resultados obtenidos con la utilización de un modelo animal más sensible nos indujeron a pensar que los aislamientos podrían tener diferencias en la virulencia y por lo tanto en la colonización y adaptación de huéspedes con distintos niveles de inmunidad. Más importante aún, es que pudimos determinar que la inclusión de componentes antigénicos en la vacuna indujo una inmunidad más fuerte y aumentó su eficacia.

A partir de estos resultados surgen varios interrogantes. En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento y la descripción referida a los mecanismos generadores de protección, es decir, que tipo de respuesta inmunológica es necesaria para inducir en el hospedador protección frente a pertussis; también de qué herramientas se vale *B. pertussis* para modular esta respuesta y evadir la respuesta generada por hospedador. Sin embargo, más allá de los resultados que muestran en particular el rol del polimorfismo de la pertactina en la protección, no se conoce en profundidad si existen otros mecanismos responsables de que las vacunas actuales no protejan contra los aislamientos circulantes y cuan relevante puede ser la existencia o no de protección cruzada.

Nuestros resultados respecto al aumento de la eficacia de la vacuna con la inclusión de cepas divergentes; más allá de que provienen de la utilización de un modelo animal, resultan atractivos a la hora de pensar en cómo disminuir la circulación de pertussis en la población. Sin embargo, desde el punto de vista de la

vacunación y de un mejoramiento racional, tanto de las vacunas como de los esquemas de inmunización; una pregunta importante está relacionada a si es posible erradicar a pertussis y qué consecuencias podría tener en la estructura de la población bacteriana la inclusión en la vacuna de cepas divergentes. Sin duda, es muy temprano aún para predecir cuál va a ser el producto de la evolución de pertussis en el contexto inmunológico actual.

En los últimos años se comenzó a considerar a *B. pertussis* como un modelo de patógeno que evoluciona debido a la presión ejercida por la vacuna; y a partir de la información disponible se han desarrollado modelos matemáticos (5, 68, 69, 160, 161, 178, 179). Estos modelos tienen por objetivo ayudar a entender qué factores, a corto plazo, pueden promover la emergencia de cepas que escapan de la inmunidad conferida por la vacuna y predecir a largo plazo cómo la vacunación puede llevar a cambios evolutivos en la virulencia de los patógenos. La erradicación de una enfermedad depende del tipo de vacuna así como de la cobertura de la vacunación. Los resultados obtenidos sugieren, que debido a que la inmunidad contra pertussis es temporaria, una alta cobertura (aún en ausencia de evolución del patógeno) no necesariamente disminuiría la incidencia de la enfermedad si la transmisibilidad del patógeno es mayor en infecciones secundarias (adolescentes y adultos) que en infecciones primarias (niños no inmunizados). Por otro lado, altas coberturas de inmunización con vacunas con limitada protección cruzada podrían favorecer la aparición de nuevas cepas. La prevalencia de una nueva cepa podría ser minimizada si existen niveles intermedios de protección cruzada y si la protección inducida por la inmunización reduce el período de infección más que la susceptibilidad a la infección. Finalmente, desde una perspectiva más integral, a largo plazo y después de décadas de evolución en una población inmunizada, no necesariamente los patógenos evolucionarían disminuyendo la virulencia para evadir al sistema inmunológico. Las cepas favorecidas por la vacuna podrían aumentar su persistencia maximizando su fitness (combinación de transmisión y virulencia) en los huéspedes inmunizados. En última instancia las cepas que persistan probablemente serán aquellas que asuman el costo de alcanzar un balance óptimo de virulencia, maximizando su transmisión a costa de disminuir la virulencia, de modo de ser capaces de infectar y explotar tanto a huéspedes no inmunizados como inmunizados.

La investigación en torno a la evolución de patógenos debida a las vacunas es relativamente reciente. Qué tipos de vacunas y estrategias de vacunación resultarán más eficientes para erradicar patógenos divergentes como *B. pertussis* continúa siendo un gran interrogante.

## CAPITULO V

# CONCLUSIONES GENERALES

Pertussis, tos convulsa o coqueluche, es una enfermedad infecciosa aguda de las vías respiratorias causada principalmente por *Bordetella pertussis*. Antes de la introducción de la vacunación, pertussis era una de las mayores causas de mortalidad infantil.

Las primeras vacunas desarrolladas para prevenir la tos convulsa fueron implementadas en los años '40 y consistieron en formulaciones celulares. Posteriormente, debido a la reactogenicidad de estas vacunas se desarrollaron otras, acelulares (menos reactogénicas pero también menos eficaces), compuestas de antígenos protectores. La morbilidad y mortalidad debido a pertussis fueron significativamente reducidas por la introducción de las vacunas celulares/acelulares. Sin embargo, pertussis continúa siendo una de las 10 enfermedades infecciosas, prevenibles por vacunación, con mayor morbi-mortalidad en el mundo. Aun en países con larga historia de vacunación esta enfermedad ha permanecido endémica y en algunos de ellos se ha observado una dramática reemergencia. Esta reemergencia reveló una vez más la ineficiencia de las formulaciones actuales para prevenir la enfermedad, sugiriendo que las cepas de las vacunas celulares o componentes de las vacunas acelulares son estructuralmente diferentes a los presentados por la bacteria, o que la composición es inadecuada, o bien que la proporción de los antígenos no es la correcta.

Paralelamente, se han conducido investigaciones tendientes a establecer las causas de la reemergencia de pertussis. La implementación de la vacuna contra pertussis ha controlado la enfermedad, ha disminuido la transmisión, pero no ha eliminado la circulación de *B. pertussis*; y las dos principales causas propuestas para explicar la reemergencia están asociadas a los efectos de implementar vacunas consideradas "imperfectas".

Junto con la marcada reducción en los casos reportados de pertussis debido a la implementación de la inmunización pediátrica se ha producido, un drástico cambio en la distribución por edad de lo infectados. La inmunidad a *B. pertussis*, ya sea adquirida por inmunización o naturalmente por infección, no es duradera. Debido a esta caída de la inmunidad, niños mayores y adultos son susceptibles a la infección. Esto determina que adolescentes y adultos constituyan el principal reservorio y fuente de contagio para niños no vacunados.

La otra hipótesis planteada es la divergencia antigénica entre las cepas vacunales y la población bacteriana circulante. A partir de la implementación de la vacunación se ha observado en muchos países un cambio en la estructura de la población de pertussis circulante. Este cambio está relacionado a cambios temporales (pre y post vacunación), más específicamente referidos al polimorfismo genético en proteínas de superficie e inmunógenos asociadas a la protección tales como la toxina pertussis y la pertactina. Tanto las vacunas celulares como las acelulares actualmente están constituidas por cepas o componentes que poseen una única variante de cada uno de los antígenos protectores detectados como polimórficos. Así, se ha sugerido que esta divergencia antigénica pueden deberse a la inmunoselección o adaptación de *B. pertussis* a la población inmunizada.

En Argentina la enfermedad ha evolucionado en forma de brotes epidémicos cada cuatro años, pero por encima de este perfil epidemiológico se ha venido registrando un aumento significativo y sostenido de casos de pertussis reportados al Ministerio de Salud de la Nación en el marco de las notificaciones obligatorias, sobre todo durante los últimos cinco años.

Nuestro laboratorio ha comenzado hace ya varios años, un relevamiento de la diversidad antigénica y de las cepas de *B. pertussis* de prevalencia en nuestro país. Dicho relevamiento es, hasta nuestro conocimiento, el único realizado en América Latina. Hemos detectado que el 89 % de los aislamientos obtenidos a partir de muestras de pacientes pediátricos hospitalizados, poseen variantes alélicas de los inmunógenos protectores, pertactina y toxina pertussis, diferentes a las de la cepa que forma parte de las vacunas en uso (actualmente importadas en su totalidad).

La divergencia antigénica de los aislamientos de *B. pertussis* a nivel genético es evidente, pero no está claro si la adaptación de la población de *B. pertussis* ha afectado la eficacia de la vacuna y contribuido a la reemergencia. Tampoco se han identificado que características de estos aislamientos pueden afectar la virulencia y la transmisión de la bacteria. Por otro lado, desde el punto de vista del control de la enfermedad, es clara la necesidad de desarrollar nuevas formulaciones sobre la base de conocimientos que no sólo incluyan los referidos al patógeno, al hospedador y a su interacción, sino también a la epidemiología molecular de pertussis, el grado de divergencia entre la población bacteriana circulante y las cepas vacunales, como así también su relevancia en la protección.

En este sentido, nos hemos propuesto analizar la relevancia del polimorfismo genético entre las cepas vacunales y la población circulante de *B. pertussis*, desde el punto de vista fenotípico y funcional.

Los resultados obtenidos en esta tesis utilizando el modelo murino de infección, han mostrado que la divergencia antigénica tiene un rol importante en la protección al menos cuando la inmunidad conferida por las vacunas no es cuali-cuantitativamente la adecuada. En nuestro trabajo hemos demostrado que la protección conferida contra pertussis dependería del nivel y el tipo de inmunidad inducida por la vacuna. Los aislamientos podrían tener diferencias en la virulencia y por lo tanto en la colonización y adaptación de huéspedes con distintos niveles de inmunidad. Más importante aún, es que pudimos determinar que la inclusión de componentes antigénicos en la vacuna podría inducir una inmunidad tal de manera que determinaría el mejoramiento de su eficacia.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la divergencia antigénica observada en los aislamientos clínicos puede haber sido dirigida por la inmunización masiva y que *B. pertussis* se ha adaptado a las poblaciones inmunizadas. Como ya hemos mencionado, la implicancia de la divergencia en la persistencia y resurgencia de pertussis es un área de fuerte discusión. Como ha sido propuesto últimamente y de acuerdo a nuestros resultados, tanto la caída de la inmunidad derivada de la vacuna y la variación antigénica podrían tener un rol importante en la persistencia de pertussis en la población. Las epidemias de pertussis en poblaciones vacunadas pueden deberse no sólo a la emergencia de nuevas cepas con cambios inducidos y seleccionados por la vacuna, sino también a la corta inmunidad inducida por ésta. El principal evento de evolución bacteriana y transmisión podría ocurrir en la población adolescente y adulta con inmunidad disminuida. Las bacterias antigénicamente distintas podrían tener características que le

permitan tanto escapar de la inmunidad del hospedador como adaptarse a huéspedes parcialmente inmunizados.

Referido a esto último, en la segunda parte de esta tesis hemos abordado la caracterización fenotípica de las cepas circulantes de pertussis mediante la utilización de metodologías proteómicas. Éstas nos han permitido demostrar la divergencia genómica previamente descrita se acompaña con diferencias a nivel de proteoma sobre todo el correspondiente a la superficie de la bacteria, que van más allá del polimorfismo observado en antígenos protectores y que tienen además implicancias funcionales.

Los hallazgos en los aislamientos clínicos de la expresión funcional del sistema de secreción tipo III, el indicio de la posible expresión de alguna forma de polisacárido capsular, y la expresión de proteínas posiblemente inmunogénicas y determinantes de virulencia; demuestran que la divergencia fenotípica podría tener implicancias tanto en la adaptación de pertussis a la población vacunada como en la modulación de las respuestas del hospedador, la evasión inmunológica y la protección. Por otra parte, estas diferencias proteómicas junto con lo que representan desde el punto funcional, nos permiten comprender los resultados obtenidos en los ensayos con animales en los que evaluamos la eficacia tanto de las vacunas comerciales disponibles actualmente como de las preparadas a partir de aislamientos circulantes en nuestro país.

Finalmente, consideramos que es necesario profundizar este tipo de estudios de modo de avanzar en el conocimiento de la población bacteriana circulante, identificar las cepas representativas de ésta así como nuevos inmunógenos protectores que nos permita un desarrollo racional de vacunas celulares/acelulares más eficientes en nuestro país.

## CAPITULO VI

# REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS



1. AAP. 2006. Recommended childhood and adolescent immunization schedule--United States, 2006. *Pediatrics* 117:239-40.
2. Advani, A., D. Donnelly, L. Gustafsson, and H. O. Hallander. 2007. Changes of the Swedish *Bordetella pertussis* population in incidence peaks during an acellular pertussis vaccine period between 1997 and 2004. *APMIS* 115:299-310.
3. Advani, A., L. Gustafsson, R. M. Carlsson, D. Donnelly, and H. O. Hallander. 2007. Clinical outcome of pertussis in Sweden: association with pulsed-field gel electrophoresis profiles and serotype. *APMIS* 115:736-42.
4. Allen, A. G., R. M. Thomas, J. T. Cadisch, and D. J. Maskell. 1998. Molecular and functional analysis of the lipopolysaccharide biosynthesis locus *wlb* from *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol* 29:27-38.
5. Bailleux, F., L. Coudeville, A. Kolenc-Saban, J. Bevilacqua, L. Barreto, and P. Andre. 2008. Predicted long-term persistence of pertussis antibodies in adolescents after an adolescent and adult formulation combined tetanus, diphtheria, and 5-component acellular pertussis vaccine, based on mathematical modeling and 5-year observed data. *Vaccine* 26:3903-8.
6. 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.
7. Banus, S., R. M. Stenger, E. R. Gremmer, J. A. Dormans, F. R. Mooi, T. G. Kimman, and R. J. Vandebriel. 2008. The role of Toll-like receptor-4 in pertussis vaccine-induced immunity. *BMC Immunol* 9:21.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Bouchez, V., V. Caro, E. Levillain, G. Guigon, and N. Guiso. 2008. Genomic content of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in areas of intensive children vaccination. *PLoS ONE* 3:e2437.
12. Boursaux-Eude, C., and N. Guiso. 2000. Polymorphism of repeated regions of pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* 68:4815-7.
13. Boursaux-Eude, C., S. Thiberge, G. Carletti, and N. Guiso. 1999. Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection: II. Sequence variation and protection induced by a tricomponent acellular vaccine. *Vaccine* 17:2651-60.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Brooks, D. A., and R. Clover. 2006. Pertussis infection in the United States: role for vaccination of adolescents and adults. *J Am Board Fam Med* 19:603-11.
18. Bunk, S., I. Susnea, J. Rupp, J. T. Summersgill, M. Maass, W. Stegmann, A. Schratzenholz, A. Wendel, M. Przybylski, and C. Hermann. 2008. Immunoproteomic identification and serological responses to novel *Chlamydia pneumoniae* antigens that are associated with persistent *C. pneumoniae* infections. *J Immunol* 180:5490-8.
19. Byers, D. M., and H. Gong. 2007. Acyl carrier protein: structure-function relationships in a conserved multifunctional protein family. *Biochem Cell Biol* 85:649-62.

20. Cainelli Gebara, V. C., L. Risoleo, A. P. Lopes, V. R. Ferreira, W. Quintilio, F. Lepine, W. D. Silva, and I. Raw. 2007. Adjuvant and immunogenic activities of the 73kDa N-terminal alpha-domain of BrkA autotransporter and Cpn60/60kDa chaperonin of *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 25:621-9.
21. Canthaboo C., L. W., Dorothy K.L. Xing \*, Michael J. Corbel. 2000. Investigation of cellular and humoral immune responses to whole cell and acellular pertussis vaccines. *Vaccine* 19:637-643.
22. Carbonetti, N. H. 2007. Immunomodulation in the pathogenesis of *Bordetella pertussis* infection and disease. *Curr Opin Pharmacol* 7:272-8.
23. Carbonetti, N. H., G. V. Artamonova, C. Andreasen, E. Dudley, R. M. Mays, and Z. E. Worthington. 2004. Suppression of serum antibody responses by pertussis toxin after respiratory tract colonization by *Bordetella pertussis* and identification of an immunodominant lipoprotein. *Infect Immun* 72:3350-8.
24. 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.
25. 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.
26. Caro, V., V. Bouchez, N. Guiso, B. Gatti, M. R. Agosti, and S. E. Ayala. 2007. Pertussis in Argentina and France. *Vaccine* 25:4335-9.
27. Caro, V., D. Hot, G. Guigon, C. Hubans, M. Arrive, G. Soubigou, G. Renaud-Mongenie, R. Antoine, C. Locht, Y. Lemoine, and N. Guiso. 2006. Temporal analysis of French *Bordetella pertussis* isolates by comparative whole-genome hybridization. *Microbes Infect* 8:2228-35.
28. Caro, V., E. Njamkepo, S. C. Van Amersfoorth, F. R. Mooi, A. Advani, H. O. Hallander, Q. He, J. Mertsola, M. Riffelmann, C. Vahrenholz, C. H. Von Konig, and N. Guiso. 2005. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Bordetella pertussis* populations in various European countries with different vaccine policies. *Microbes Infect* 7:976-82.
29. Cassidy, 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.
30. Cassidy, P. K., M. Tobin-D'Angelo, J. R. Watson, K. H. Wu, M. M. Park, and G. N. Sanden. 2008. Co-infection with two different strains of *Bordetella pertussis* in an infant. *J Med Microbiol* 57:388-91.
31. CDC. 2008. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases.*, 10th ed. 2nd printing, ed. Atkinson W, Hamborsky J, McIntyre L, Wolfe S, eds., Washington DC: Public Health Foundation, 2008.
32. Celentano, L. P., M. Massari, D. Paramatti, S. Salmaso, and A. E. Tozzi. 2005. Resurgence of pertussis in Europe. *Pediatr Infect Dis J* 24:761-5.
33. Chakravarti, D. N., M. J. Fiske, L. D. Fletcher, and R. J. Zagursky. 2000. Application of genomics and proteomics for identification of bacterial gene products as potential vaccine candidates. *Vaccine* 19:601-12.
34. 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.
35. Cherry, J. D. 2007. Immunity to pertussis. *Clin Infect Dis* 44:1278-9.
36. 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.
37. Chitlaru, T., O. Gat, H. Grosfeld, I. Inbar, Y. Gozlan, and A. Shafferman. 2007. Identification of in vivo-expressed immunogenic proteins by serological proteome analysis of the *Bacillus anthracis* secretome. *Infect Immun* 75:2841-52.
38. Coburn, B., I. Sekirov, and B. B. Finlay. 2007. Type III secretion systems and disease. *Clin Microbiol Rev* 20:535-49.
39. Corbel, M. J., R. G. Das, D. Lei, D. K. Xing, Y. Horiuchi, and R. Dobbelaer. 2008. WHO Working Group on revision of the Manual of Laboratory Methods for Testing DTP Vaccines-Report of two meetings held on 20-21 July 2006 and 28-30 March 2007, Geneva, Switzerland. *Vaccine* 26:1913-21.
40. Cotter, P. A., and A. M. Jones. 2003. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol* 11:367-73.

41. Cotter, P. A., and J. F. Miller. 2000. Genetic analysis of the *Bordetella* infectious cycle. *Immunopharmacology* 48:253-5.
42. Crowcroft, N. S., Stein, C., Duclos, P., and Birmingham, M. 2003. How best to estimate the global burden of pertussis? . *Lancet Infect Dis* 3:413-418.
43. Cummings, C. A., H. J. Bootsma, D. A. Relman, and J. F. Miller. 2006. Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by *Bordetella* BvgAS. *J Bacteriol* 188:1775-85.
44. Cummings, C. A., M. M. Brinig, P. W. Lepp, S. van de Pas, and D. A. Relman. 2004. *Bordetella* species are distinguished by patterns of substantial gene loss and host adaptation. *J Bacteriol* 186:1484-92.
45. de Greeff, S. C., F. R. Mooi, J. F. Schellekens, and H. E. de Melker. 2008. Impact of acellular pertussis preschool booster vaccination on disease burden of pertussis in The Netherlands. *Pediatr Infect Dis J* 27:218-23.
46. 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.
47. de Melker, H. E., J. F. Schellekens, S. E. Neppelenbroek, F. R. Mooi, H. C. Rumke, and M. A. Conyn-van Spaendonck. 2000. Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of the Netherlands: observations on surveillance data. *Emerg Infect Dis* 6:348-57.
48. 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.
49. Denoel, P., F. Godfroid, N. Guiso, H. Hallander, and J. Poolman. 2005. Comparison of acellular pertussis vaccines-induced immunity against infection due to *Bordetella pertussis* variant isolates in a mouse model. *Vaccine* 23:5333-41.
50. 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.
51. Edelman, K., Q. He, J. Makinen, A. Sahlberg, M. Haanpera, L. Schuerman, J. Wolter, and J. Mertsola. 2007. Immunity to pertussis 5 years after booster immunization during adolescence. *Clin Infect Dis* 44:1271-7.
52. Elahi, S., J. Holmstrom, and V. Gerdts. 2007. The benefits of using diverse animal models for studying pertussis. *Trends Microbiol* 15:462-8.
53. 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.
54. 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.
55. Elomaa, A., A. Advani, D. Donnelly, M. Antila, J. Mertsola, Q. He, and H. Hallander. 2007. Population dynamics of *Bordetella pertussis* in Finland and Sweden, neighbouring countries with different vaccination histories. *Vaccine* 25:918-26.
56. 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.
57. 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.
58. Eyles, J. E., B. Unal, M. G. Hartley, S. L. Newstead, H. Flick-Smith, J. L. Prior, P. C. Oyston, A. Randall, Y. Mu, S. Hirst, D. M. Molina, D. H. Davies, T. Milne, K. F. Griffin, P. Baldi, R. W. Titball, and P. L. Felgner. 2007. Immunodominant *Francisella tularensis* antigens identified using proteome microarray. *Crown Copyright 2007 Dstl. Proteomics* 7:2172-83.
59. Fedele, G., P. Stefanelli, F. Spensieri, C. Fazio, P. Mastrantonio, and C. M. Ausiello. 2005. *Bordetella pertussis*-infected human monocyte-derived dendritic cells undergo maturation and induce Th1 polarization and interleukin-23 expression. *Infect Immun* 73:1590-7.
60. 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.
61. Fernandez, R. C., and A. A. Weiss. 1996. Susceptibilities of *Bordetella pertussis* strains to antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 40:1041-3.

62. 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.
63. Fine, P. E., and J. A. Clarkson. 1987. Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. *Rev Infect Dis* 9:866-83.
64. Fingerhann, M., J. Fernandez, F. Sisti, M. E. Rodriguez, B. Gatti, D. Bottero, A. Graieb, M. E. Gaillard, S. G. Ayala, F. R. Mooj, 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.
65. Finn, T. M., and D. F. Amsbaugh. 1998. Vag8, a *Bordetella pertussis* bvg-regulated protein. *Infect Immun* 66:3985-9.
66. 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.
67. Galanis, E., A. S. King, P. Varughese, and S. A. Halperin. 2006. Changing epidemiology and emerging risk groups for pertussis. *CMAJ* 174:451-2.
68. Gandon, S., and T. Day. 2007. The evolutionary epidemiology of vaccination. *J R Soc Interface* 4:803-17.
69. Gandon, S., M. Mackinnon, S. Nee, and A. Read. 2003. Imperfect vaccination: some epidemiological and evolutionary consequences. *Proc Biol Sci* 270:1129-36.
70. Gardy, J. L., C. Spencer, K. Wang, M. Ester, G. E. Tusnady, I. Simon, S. Hua, K. deFays, C. Lambert, K. Nakai, and F. S. Brinkman. 2003. PSORT-B: Improving protein subcellular localization prediction for Gram-negative bacteria. *Nucleic Acids Res* 31:3613-7.
71. Giuliano, M., P. Mastrantonio, A. Giammanco, A. Piscitelli, S. Salmaso, and S. G. Wassilak. 1998. Antibody responses and persistence in the two years after immunization with two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. *J Pediatr* 132:983-8.
72. Gogol, E. B., C. A. Cummings, R. C. Burns, and D. A. Relman. 2007. Phase variation and microevolution at homopolymeric tracts in *Bordetella pertussis*. *BMC Genomics* 8:122.
73. 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.
74. Grandi, G. 2003. Rational antibacterial vaccine design through genomic technologies. *Int J Parasitol* 33:615-20.
75. Granstrom, M., A. M. Olinder-Nielsen, P. Holmblad, A. Mark, and K. Hanngren. 1991. Specific immunoglobulin for treatment of whooping cough. *Lancet* 338:1230-3.
76. Grgic-Vitek, M., I. Klavs, and A. Kraigher. 2008. Re-emergence of pertussis in Slovenia: time to change immunization policy. *Vaccine* 26:1874-8.
77. Grimprel, E., P. Begue, I. Anjak, F. Betsou, and N. Guiso. 1993. Comparison of polymerase chain reaction, culture, and western immunoblot serology for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J Clin Microbiol* 31:2745-50.
78. 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.
79. Guiso, N., C. Capiou, 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.
80. Gupta, M., V. Subramanian, and J. Yadav. 2009. Immunoproteomic Identification of Secretory and Subcellular Protein Antigens and Functional Evaluation of the Secretome Fraction of *Mycobacterium immunogenum*, a Newly Recognized Species of the *M. chelonae*-*M. abscessus* Group. *J Proteome Res*.
81. Gustafsson, L., H. O. Hallander, P. Olin, E. Reizenstein, and J. Storsaeter. 1996. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N Engl J Med* 334:349-55.
82. Gzyl, A., E. Augustynowicz, G. Gniadek, D. Rabczenko, G. Dulny, and J. Slusarczyk. 2004. Sequence variation in pertussis S1 subunit toxin and pertussis genes in *Bordetella pertussis* strains

- used for the whole-cell pertussis vaccine produced in Poland since 1960: efficiency of the DTwP vaccine-induced immunity against currently circulating *B. pertussis* isolates. *Vaccine* 22:2122-8.
83. 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.
  84. Hallander, H., A. Advani, M. Riffelmann, C. H. von Konig, V. Caro, N. Guiso, F. R. Mooi, A. Gzyl, M. S. Kaltoft, N. K. Fry, J. Mertsola, and Q. He. 2007. *Bordetella pertussis* strains circulating in Europe in 1999 to 2004 as determined by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 45:3257-62.
  85. 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.
  86. Halperin, S. A. 2007. The control of pertussis--2007 and beyond. *N Engl J Med* 356:110-3.
  87. Halperin, S. A. 2005. Pertussis--a disease and vaccine for all ages. *N Engl J Med* 353:1615-7.
  88. Halperin, S. A., S. A. Heifetz, and A. Kasina. 1988. Experimental respiratory infection with *Bordetella pertussis* in mice: comparison of two methods. *Clin Invest Med* 11:297-303.
  89. Hampl, S. D., and L. C. Olson. 1995. Pertussis in the young infant. *Semin Respir Infect* 10:58-62.
  90. Han, H. J., K. Kamachi, K. Okada, H. Toyozumi-Ajisaka, Y. Sasaki, and Y. Arakawa. 2008. Antigenic variation in *Bordetella pertussis* isolates recovered from adults and children in Japan. *Vaccine* 26:1530-4.
  91. 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.
  92. 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.
  93. 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.
  94. 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.
  95. Henderson, I. R., and J. P. Nataro. 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* 69:1231-43.
  96. 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.
  97. Hewlett, E. L., and K. M. Edwards. 2005. Clinical practice. Pertussis--not just for kids. *N Engl J Med* 352:1215-22.
  98. Higgins, S. C., A. G. Jarnicki, E. C. Lavelle, and K. H. Mills. 2006. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol* 177:7980-9.
  99. 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.
  100. Hijnen, M., R. de Voer, F. R. Mooi, R. Schepp, E. E. Moret, P. van Gageldonk, G. Smits, and G. A. Berbers. 2007. The role of peptide loops of the *Bordetella pertussis* protein P.69 pertactin in antibody recognition. *Vaccine* 25:5902-14.
  101. Hijnen, M., F. R. Mooi, P. G. van Gageldonk, P. Hoogerhout, A. J. King, and G. A. Berbers. 2004. Epitope structure of the *Bordetella pertussis* protein P.69 pertactin, a major vaccine component and protective antigen. *Infect Immun* 72:3716-23.
  102. Hijnen, M., D. J. van Zoelen, C. Chamorro, P. van Gageldonk, F. R. Mooi, G. Berbers, and R. M. Liskamp. 2007. A novel strategy to mimic discontinuous protective epitopes using a synthetic scaffold. *Vaccine* 25:6807-17.
  103. Hot, D., R. Antoine, G. Renaud-Mongenie, V. Caro, B. Hennuy, E. Levillain, L. Huot, G. Wittmann, D. Poncet, F. Jacob-Dubuisson, C. Guyard, F. Rimlinger, L. Aujame, E. Godfroid, N.

- Guiso, M. J. Quentin-Millet, Y. Lemoine, and C. Locht. 2003. Differential modulation of *Bordetella pertussis* virulence genes as evidenced by DNA microarray analysis. *Mol Genet Genomics* 269:475-86.
104. Hozbor, D., F. Fouque, and N. Guiso. 1999. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res Microbiol* 150:333-41.
105. 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.
106. Judelsohn, R. G., and M. B. Koslap-Petraco. 2007. Public health perspectives on the rising incidence of pertussis. *Public Health Nurs* 24:421-8.
107. Karp, P. D., I. M. Keseler, A. Shearer, M. Latendresse, M. Krummenacker, S. M. Paley, I. Paulsen, J. Collado-Vides, S. Gama-Castro, M. Peralta-Gil, A. Santos-Zavaleta, M. I. Penaloza-Spinola, C. Bonavides-Martinez, and J. Ingraham. 2007. Multidimensional annotation of the *Escherichia coli* K-12 genome. *Nucleic Acids Res* 35:7577-90.
108. 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.
109. Kerr, J. R., G. P. Rigg, R. C. Matthews, and J. P. Burnie. 1999. The *Bpel* locus encodes type III secretion machinery in *Bordetella pertussis*. *Microb Pathog* 27:349-67.
110. 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.
111. King, A. J., T. van Gorkom, J. L. Pennings, H. G. van der Heide, Q. He, D. Diavatopoulos, K. Heuvelman, M. van Gent, K. van Leeuwen, and F. R. Mooi. 2008. Comparative genomic profiling of Dutch clinical *Bordetella pertussis* isolates using DNA microarrays: identification of genes absent from epidemic strains. *BMC Genomics* 9:311.
112. Kirimanjeswara, G. S., L. M. Agosto, M. J. Kennett, O. N. Bjornstad, and E. T. Harvill. 2005. Pertussis toxin inhibits neutrophil recruitment to delay antibody-mediated clearance of *Bordetella pertussis*. *J Clin Invest* 115:3594-601.
113. Kirimanjeswara, G. S., P. B. Mann, and E. T. Harvill. 2003. Role of antibodies in immunity to *Bordetella* infections. *Infect Immun* 71:1719-24.
114. Klement, E., L. Uliel, I. Engel, T. Hasin, M. Yavzori, N. Orr, N. Davidovitz, N. Lahat, I. Srugo, E. Zangvil, and D. Cohen. 2003. An outbreak of pertussis among young Israeli soldiers. *Epidemiol Infect* 131:1049-54.
115. Kodama, A., K. Kamachi, Y. Horiuchi, T. Konda, and Y. Arakawa. 2004. Antigenic divergence suggested by correlation between antigenic variation and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Bordetella pertussis* isolates in Japan. *J Clin Microbiol* 42:5453-7.
116. Kuwae, A., T. Matsuzawa, N. Ishikawa, H. Abe, T. Nonaka, H. Fukuda, S. Imajoh-Ohmi, and A. Abe. 2006. BopC is a novel type III effector secreted by *Bordetella bronchiseptica* and has a critical role in type III-dependent necrotic cell death. *J Biol Chem* 281:6589-600.
117. 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.
118. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
119. Le, T., J. D. Cherry, S. J. Chang, M. D. Knoll, M. L. Lee, S. Barenkamp, D. Bernstein, R. Edelman, K. M. Edwards, D. Greenberg, W. Keitel, J. Treanor, and J. I. Ward. 2004. Immune responses and antibody decay after immunization of adolescents and adults with an acellular pertussis vaccine: the APERT Study. *J Infect Dis* 190:535-44.
120. Ledermann D, W. 2004. Breve historia de la *Bordetella pertussis*, una elusiva damisela. *Revista chilena de infectología* 21:241-246.
121. Leininger, E., C. A. Ewanowich, A. Bhargava, M. S. Pepler, J. G. Kenimer, and M. J. Brennan. 1992. Comparative roles of the Arg-Gly-Asp sequence present in the *Bordetella pertussis* adhesins pertactin and filamentous hemagglutinin. *Infect Immun* 60:2380-5.

122. 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.
123. Lin, Y. F., M. S. Wu, C. C. Chang, S. W. Lin, J. T. Lin, Y. J. Sun, D. S. Chen, and L. P. Chow. 2006. Comparative immunoproteomics of identification and characterization of virulence factors from *Helicobacter pylori* related to gastric cancer. *Mol Cell Proteomics* 5:1484-96.
124. Locht, C. 2007. *Bordetella: Molecular Microbiology*. Horizon Bioscience, Institut Pasteur de Lille, France
125. Luker, K. E., A. N. Tyler, G. R. Marshall, and W. E. Goldman. 1995. Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in pertussis. *Mol Microbiol* 16:733-43.
126. Magalhaes, J. G., D. J. Philpott, M. A. Nahori, M. Jehanno, J. Fritz, L. Le Bourhis, J. Viala, J. P. Hugot, M. Giovannini, J. Bertin, M. Lepoivre, D. Mengin-Lecreulx, P. J. Sansonetti, and S. E. Girardin. 2005. Murine Nod1 but not its human orthologue mediates innate immune detection of tracheal cytotoxin. *EMBO Rep* 6:1201-7.
127. 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.
128. 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.
129. 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.
130. 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.
131. Mattoo, S., A. K. Foreman-Wykert, P. A. Cotter, and J. F. Miller. 2001. Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis. *Front Biosci* 6:E168-86.
132. 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.
133. McKenzie, B. S., R. A. Kastelein, and D. J. Cua. 2006. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 27:17-23.
134. Medhekar, B., R. Shrivastava, S. Mattoo, M. Gingery, and J. F. Miller. 2008. *Bordetella* Bsp22 forms a filamentous type III secretion system tip complex and is immunoprotective in vitro and in vivo. *Mol Microbiol*.
135. Merkel, T. J., P. E. Boucher, S. Stibitz, and V. K. Gripppe. 2003. Analysis of *bvgR* expression in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 185:6902-12.
136. Mickle, F. L., R. F. Feemster, L. B. Jensen, E. K. Kline, P. L. Kendrick, S. E. Miller, R. S. Muckenfuss, W. D. Tiedeman, R. M. Atwater, and F. B. Elder. 1949. Coordinating Committee on Laboratory Methods. *Am J Public Health Nations Health* 39:75-9.
137. Miller, E., L. A. Ashworth, K. Redhead, C. Thornton, P. A. Waight, and T. Coleman. 1997. Effect of schedule on reactogenicity and antibody persistence of acellular and whole-cell pertussis vaccines: value of laboratory tests as predictors of clinical performance. *Vaccine* 15:51-60.
138. Mills, K. H. 2001. Immunity to *Bordetella pertussis*. *Microbes Infect* 3:655-77.
139. 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.
140. 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.
141. 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.
142. 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.

143. 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.
144. 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.
145. Nowalk, A. J., R. D. Gilmore, Jr., and J. A. Carroll. 2006. Serologic proteome analysis of *Borrelia burgdorferi* membrane-associated proteins. *Infect Immun* 74:3864-73.
146. Nteyayabo, 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.
147. Olin, P., F. Rasmussen, L. Gustafsson, H. O. Hallander, and H. Heijbel. 1997. Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines. *Lancet* 350:1569-77.
148. Oliver, D. C., G. Huang, E. Nodel, S. Pleasance, and R. C. Fernandez. 2003. A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Mol Microbiol* 47:1367-83.
149. Packard, E. R., R. Parton, J. G. Coote, and N. K. Fry. 2004. Sequence variation and conservation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from the UK. *J Med Microbiol* 53:355-65.
150. Pallen, M. J., and B. W. Wren. 2007. Bacterial pathogenomics. *Nature* 449:835-42.
151. 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.
152. 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. Rabinowitsch, S. Rutter, M. Sanders, D. Saunders, K. Seeger, S. Sharp, M. Simmonds, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, L. Unwin, S. Whitehead, B. G. Barrell, and D. J. Maskell. 2003. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet* 35:32-40.
153. Pilione, M. R., and E. T. Harvill. 2006. The *Bordetella bronchiseptica* type III secretion system inhibits gamma interferon production that is required for efficient antibody-mediated bacterial clearance. *Infect Immun* 74:1043-9.
154. 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.
155. Preston, A. 2005. *Bordetella pertussis*: the intersection of genomics and pathobiology. *CMAJ* 173:55-62.
156. Quinn, H. E., and P. B. McIntyre. 2007. Pertussis epidemiology in Australia over the decade 1995-2005--trends by region and age group. *Commun Dis Intell* 31:205-15.
157. Ramsay, M. E., C. P. Farrington, and E. Miller. 1993. Age-specific efficacy of pertussis vaccine during epidemic and non-epidemic periods. *Epidemiol Infect* 111:41-8.
158. Redhead, K. 1984. Serum antibody responses to the outer membrane proteins of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 44:724-9.
159. Rendi-Wagner, P., M. Paulke-Korinek, G. Stanek, G. Khanakah, and H. Kollaritsch. 2007. Impact of a pertussis booster vaccination program in adolescents and adults on the epidemiology of pertussis in Austria. *Pediatr Infect Dis J* 26:806-10.
160. Restif, O., and B. T. Grenfell. 2007. Vaccination and the dynamics of immune evasion. *J R Soc Interface* 4:143-53.
161. Restif, O., D. N. Wolfe, E. M. Goebel, O. N. Bjornstad, and E. T. Harvill. 2008. Of mice and men: asymmetric interactions between *Bordetella* pathogen species. *Parasitology*:1-13.
162. Robinson, A., and D. C. Hawkins. 1983. Structure and biological properties of solubilized envelope proteins of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 39:590-8.
163. Rodriguez-Ortega, M. J., N. Norais, G. Bensi, S. Liberatori, S. Capo, M. Mora, M. Scarselli, F. Doro, G. Ferrari, I. Garaguso, T. Maggi, A. Neumann, A. Covre, J. L. Telford, and G. Grandi.



2006. Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A *Streptococcus* surface proteome. *Nat Biotechnol* 24:191-7.
164. 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.
165. Rosqvist, R., K. E. Magnusson, and H. Wolf-Watz. 1994. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J* 13:964-72.
166. 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.
167. 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.
168. Scarselli, M., M. M. Giuliani, J. Adu-Bobie, M. Pizza, and R. Rappuoli. 2005. The impact of genomics on vaccine design. *Trends Biotechnol* 23:84-91.
169. Schouls, L. M., H. G. van der Heide, L. Vauterin, P. Vauterin, and F. R. Mooi. 2004. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Dutch *Bordetella pertussis* strains reveals rapid genetic changes with clonal expansion during the late 1990s. *J Bacteriol* 186:5496-505.
170. Serruto, D., and R. Rappuoli. 2006. Post-genomic vaccine development. *FEBS Lett* 580:2985-92.
171. 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.
172. 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.
173. 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.
174. Stibitz, S., W. Aaronson, D. Monack, and S. Falkow. 1989. Phase variation in *Bordetella pertussis* by frameshift mutation in a gene for a novel two-component system. *Nature* 338:266-9.
175. Storsaeter, J., H. O. Hallander, L. Gustafsson, and P. Olin. 1998. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 16:1907-16.
176. Tozzi, A. E., L. Rava, M. L. Ciofi degli Atti, and S. Salmaso. 2003. Clinical presentation of pertussis in unvaccinated and vaccinated children in the first six years of life. *Pediatrics* 112:1069-75.
177. Trollfors, B. 1984. *Bordetella pertussis* whole cell vaccines--efficacy and toxicity. *Acta Paediatr Scand* 73:417-25.
178. van Boven, M., H. E. de Melker, J. F. Schellekens, and M. Kretzschmar. 2001. A model based evaluation of the 1996-7 pertussis epidemic in The Netherlands. *Epidemiol Infect* 127:73-85.
179. van Boven, M., F. R. Mooi, J. F. Schellekens, H. E. de Melker, and M. Kretzschmar. 2005. Pathogen adaptation under imperfect vaccination: implications for pertussis. *Proc Biol Sci* 272:1617-24.
180. 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.
181. 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.
182. 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.
183. Vandebriel, R. J., E. R. Gremmer, J. P. Vermeulen, S. M. Hellwig, J. A. Dormans, P. J. Roholl, and F. R. Mooi. 2007. Lung pathology and immediate hypersensitivity in a mouse model after vaccination with pertussis vaccines and challenge with *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 25:2346-60.
184. von Konig, C. H., S. Halperin, M. Riffelmann, and N. Guiso. 2002. Pertussis of adults and infants. *Lancet Infect Dis* 2:744-50.
185. 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.



186. Weiss, A. A., and M. S. Goodwin. 1989. Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model. *Infect Immun* 57:3757-64.
187. 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.
188. WHO. 2008. Immunization surveillance, assessment and monitoring [http://www.who.int/immunization\\_monitoring/diseases/pertussis/en/](http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/pertussis/en/).
189. Willems, R., A. Paul, H. G. van der Heide, A. R. ter Avest, and F. R. Mooi. 1990. Fimbrial phase variation in *Bordetella pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation. *EMBO J* 9:2803-9.
190. Xing, D. K., R. G. Das, L. Williams, C. Canthaboo, J. Tremmil, and M. J. Corbel. 1999. An aerosol challenge model of *Bordetella pertussis* infection as a potential bioassay for acellular pertussis vaccines. *Vaccine* 17:565-76.
191. Yaari, E., Y. Yafe-Zimerman, S. B. Schwartz, P. E. Slater, P. Shvartzman, N. Andoren, D. Branski, and E. Kerem. 1999. Clinical manifestations of *Bordetella pertussis* infection in immunized children and young adults. *Chest* 115:1254-8.
192. Yao, S. M., Y. C. Lin, C. Y. Chou, Y. Y. Chen, M. J. Hsiao, H. Y. Chen, J. J. Yan, H. P. Su, and S. Y. Li. 2005. Antigenic divergence of *Bordetella pertussis* isolates in Taiwan. *J Clin Microbiol* 43:5457-61.
193. Yuk, M. H., E. T. Harvill, P. A. Cotter, and J. F. Miller. 2000. Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation by the *Bordetella* type III secretion system. *Mol Microbiol* 35:991-1004.
194. 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.
195. Zhang, Y. M., S. W. White, and C. O. Rock. 2006. Inhibiting bacterial fatty acid synthesis. *J Biol Chem* 281:17541-4.

DOMICION.....

A.....

Fecha 23-04-2010

Inv. E..... Inv..... 5890