

RESUMEN

Muchos países han registrado durante los últimos 20 años un aumento alarmante en la incidencia de *Bordetella pertussis*, el principal agente causal de la enfermedad respiratoria aguda conocida con el nombre de tos convulsa, pertussis o coqueluche [1]. En los Estados Unidos (EEUU) por ejemplo, en el año 2012 se registraron 48.277 casos de pertussis; incluyendo 20 muertes relacionadas con la enfermedad. Este registro fue el más alto desde 1955 [1]. El Reino Unido (UK) por su parte detectó un aumento sorprendente en el número de casos, con más casos en el 2013 que los correspondientes a la década de 1970 y 1980; cuando la vacuna era rechazada por la población debido a los reportes sobre las reacciones adversas asociadas con la vacunación [2]. Argentina, por su parte, detectó a partir del año 2003 un aumento de casos sostenido llegando a una tasa de 16/100.000 habitantes en el año 2011. En dicho año también se registró el mayor número de fallecimientos asociados a la enfermedad (76 fallecimientos) [3]. Esta situación que resulta preocupante y se repite en otros países, ha alarmado a los sistemas de salud y ha ocasionado que esta enfermedad hoy sea considerada como una enfermedad resurgente.

Se han esgrimido varias hipótesis sobre la resurgencia de la enfermedad: una de ellas está relacionada con las bajas coberturas de vacunación, lo que llevaría a que parte de la población siga siendo susceptible de contraer la enfermedad y luego transmitirla. Otra hipótesis es que los individuos vacunados pueden infectarse pese a haber sido vacunados [4, 5]. Mientras que la cobertura de vacunación probablemente haya jugado un papel primordial en el aumento de la incidencia hace algunos años, en la actualidad parecería ser menos relevante ya que hay registros de mejoras sustanciales en las mismas [4, 6]. La baja efectividad de las vacunas hoy en uso parece ser hoy la causante principal del resurgimiento de la enfermedad. Al presente se han propuesto varias explicaciones sobre del por qué ha disminuido la efectividad de las vacunas. Una de las causas posibles es que la inmunidad conferida por las vacunas disminuye con el tiempo y determina que los individuos vacunados puedan ser infectados por *B. pertussis* [7]. Otra causa se refiere a que el agente causal de la enfermedad haya evolucionado para escapar de la inmunidad conferida por las vacunas [8]. Por último las vacunas no son capaces de inducir inmunidad contra la infección ni contra la transmisión [9]. Mientras que los dos primeras explicaciones han recibido considerable atención, la tercera fue sólo recientemente propuesto por Warfel, Zimmerman y Merkel

(2014) [9] . En este estudio, Warfel y colaboradores emplearon un modelo de primates no humanos como modelo para la infección por *B. pertussis* y describieron que los individuos vacunados con vacunas acelulares pueden infectarse y transmitir la infección a individuos susceptibles. Estos autores postulan que el hecho de que los individuos vacunados que cursan una infección asintomática puedan infectar a individuos susceptibles podría explicar, al menos parcialmente, el aumento en la incidencia de *B. pertussis*. Sin dudas la situación es compleja y, más allá de cual sea el peso de cada uno de estos factores que afectan la incidencia de la enfermedad, resulta evidente y urgente revisar, implementar y diseñar nuevas estrategias que permitan mejorar el control de esta enfermedad; sobre todo para la población más vulnerable representada por los niños menores de 1 año de edad. Respecto de acciones a corto plazo muchos países han decidido incorporar nuevos refuerzos intentando prolongar la duración de la inmunidad conferida por las vacunas y disminuir así la infección en las poblaciones que han sido descritas como fuente de infección de los menores de 1 año de edad [10-14]. Así, se han recomendado, y en algunos países incluso incorporado, refuerzos en adolescentes, en el personal de salud que trabaja en contacto con los niños, en los padres y contactos cercanos de los recién nacidos y en las madres embarazadas [15, 16]. De hecho, año tras año nuevos refuerzos se están incorporando a los calendarios nacionales de vacunación, sin contar aún con la evidencia epidemiológica que lo sustente. Sin embargo esta estrategia de incorporar nuevos refuerzos se está viendo obstaculizada por varios factores: dificultades en disponibilidad de las vacunas ya que son pocos los productores de vacunas y existe una alta demanda, elevado costo de cada dosis de vacuna acelular que son las únicas recomendadas para la aplicación en los mayores de 7 años y la inversión elevada que debe realizarse para lograr coberturas adecuadas para que los refuerzos incorporados puedan tener el efecto buscado. Esta situación podría mejorarse si se evidencia que alguna y no todas estas medidas resulta realmente beneficiosa en la reducción de la incidencia de pertussis. De esta manera se lograría bajar las demandas y los costos de las vacunas.

Otra estrategia que podría mejorar la situación de pertussis, pero a mediano-largo plazo, sería el desarrollo de una nueva generación de vacunas capaces de superar las deficiencias asociadas con las vacunas actuales [17]. Varias son las alternativas que pueden explorarse [18, 19]. Una de ellas es la desarrollada por nosotros, que consiste en una formulación basada en vesículas de membrana externa (OMVs de la sigla en inglés) derivadas

de *B. pertussis* y también de *B. parapertussis*. Estas formulaciones noveles han resultado ser excelentes en su capacidad protectora en el modelo aceptado de desafío intranasal en ratones frente a diferentes genotipos de *B. pertussis* y *B. parapertussis* [20-24] (Patente de invención -Expediente INPI 2013010123, en trámite; Patente internacional: Submission Number: 060143 Application Number: PCT/IB2014/060143, en trámite, Receiving Office: International Bureau of the World Intellectual Property Organization). Esta formulación acelular es además biosegura y presenta la capacidad de inducir una respuesta inmune protectora con un perfil de Th1/Th2 mixto y también una respuesta de anticuerpos robusta [20]. Los resultados alcanzados hasta el presente muestran a nuestra formulación vacunal como una buena alternativa a las formulaciones actuales ya que contienen un mayor número de inmunógenos que las vacunas acelulares actuales y en conformaciones cercanas a las encontradas en las bacterias, hechos que favorecerían la capacidad de protección otorgada por las vesículas. Además, estas formulaciones proporcionan protección tanto frente a *B. pertussis* como a *B. parapertussis*, ampliando el espectro de protección por sobre las vacunas actuales, lo que contribuiría a un mejor control de la enfermedad.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

**Epidemiología y estrategias de control
para pertussis, una enfermedad
resurgente.**

Maximiliano Ormazábal

Directora: Dra. Hozbor Daniela

Co-directora: Dra. Fernández Julieta

2015

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

Mi reconocimiento

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) y a la Facultad de Ciencias Exactas, por haberme brindado el ámbito propicio para desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral. Al Consejo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICET) por haberme otorgado una Beca con la cual me fue posible desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral

INDICE

RESUMEN	12
OBJETIVOS GENERALES.....	14
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	15
INTRODUCCION	18
LA ENFERMEDAD	18
UN POCO DE HISTORIA SOBRE LA ENFERMEDAD.....	20
DESCUBRIENDO AL AGENTE CAUSAL	21
BORDETELLA PERTUSSIS: AGENTE CAUSAL.....	22
PROCESO DE INFECCIÓN Y PATOFISIOLOGÍA	25
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA.	33
RESPUESTA INMUNE FRENTE A <i>B. PERTUSSIS</i>	37
RESPUESTA INMUNE INNATA	38
RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA	39
INMUNIDAD INDUCIDA POR LA VACUNACIÓN	42
ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA ENFERMEDAD.....	43
EPIDEMIOLOGÍA.....	48
RESPUESTAS A CORTO PLAZO	60
<u>CAPITULO 1: MODELO MATEMÁTICO DE TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD COMO HERRAMIENTA PARA EVALUAR EL IMPACTO DE DIFERENTES ESTRATEGIAS CONTROL.....</u>	68
INTRODUCCIÓN.....	68
ANÁLISIS DEL IMPACTO DE DIFERENTES ESTRATEGIAS DE VACUNACIÓN EN LA INCIDENCIA DE PERTUSSIS	79
DISCUSION.....	83
<u>SECCION 2.1: EVALUACION DE LA CONTRIBUCION DE LOS INMUNOGENOS PTX, PRN Y FHA EN LA PROTECCION CONFERIDA POR LAS OMVS DERIVADAS DE <i>B.PERTUSSIS</i>.</u>	88
INTRODUCCIÓN.....	88
CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPALES INMUNÓGENOS PRESENTES EN LA VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA (OMVs)	89
EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS DISTINTAS FORMULACIONES VACUNALES.	93
EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN CONFERIDA POR LAS VACUNAS ACELULARES BASADAS EN VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA	96
DISCUSIÓN	99
<u>SECCION 2.2: CARACTERIZACIÓN DE LA TOXINA ADENILATO CICLASA EN EL CONTEXTO DE LA VACUNA BASADA EN LAS OMVS.....</u>	102
INTRODUCCIÓN.....	102
CARACTERIZACIÓN DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA (OMVs) OBTENIDAS.	104
EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LA FORMULACION VACUNAL CONTENIENDO A LAS OMVSBPΔAC-HLY.	107
EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN CONFERIDA POR LAS VACUNA ACELULAR BASADA EN OMVSBPΔAC-HLY.....	109
DISCUSIÓN	111

<u>SECCION 2.3: EVALUACION DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE OMVS DERIVAD DE UNA CEPA DE B.PERTUSSIS BLOQUEADA EN FASE AVIRULENTA</u>	<u>114</u>
INTRODUCCIÓN.....	114
CARACTERIZACIÓN DE LAS OMVs OBTENIDAS A PARTIR DE <i>B. PERTUSSIS</i> EN FASE AVIRULENTA	115
EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS DISTINTAS FORMULACIONES VACUNALES.	118
EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN CONFERIDA POR LAS VACUNAS ACELULARES BASADAS EN VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA DERIVADAS DE LA FASE AVIRULENTA DE <i>B. PERTUSSIS</i>	120
DISCUSIÓN	122
<u>CAPITULO 3: IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS COMPONENTES INMUNOGÉNICOS PRESENTES EN LAS OMVS</u>	<u>126</u>
INTRODUCCIÓN.....	126
ENSAYO DEL PODER BACTERICIDA DE LOS ANTICUERPOS INDUCIDOS POR LA VACUNACIÓN CON OMVs	127
ENSAYO DE INMUNOPROTEÓMICA PARA IDENTIFICAR NUEVOS INMUNÓGENOS PROTECTORES PRESENTES EN LAS OMVs	129
DISCUSIÓN	134
<u>DISCUSION GENERAL.....</u>	<u>140</u>
<u>MATERIALES Y METODOS.....</u>	<u>154</u>
1. CEPAS DE <i>B. PERTUSSIS</i>	154
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO PARA <i>B. PERTUSSIS</i>	154
3 OBTENCIÓN DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA (OMVs)	155
4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA – TINCIÓN NEGATIVA.....	155
5. OBTENCIÓN DE MUESTRAS PROTEICAS	155
6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.	156
7. ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONALES EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).	156
8. TINCIÓN DE PROTEÍNAS	157
9. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASA (EM), MALDI-TOF.....	158
10. INMUNODETECCIONES DE PROTEÍNAS (INMUNOBLOT).	160
11. OBTENCIÓN DE ANTISUEROS POLICLONALES EN RATONES.	160
12 ENSAYOS DE PROTECCIÓN UTILIZANDO EL MODELO DESAFÍO INTRANASAL EN RATONES.....	161
13 ENSAYOS DE LISIS BACTERIANA MEDIADA POR COMPLEMENTO.....	162
14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	163
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>166</u>

RESUMEN

Muchos países han registrado durante los últimos 20 años un aumento alarmante en la incidencia de *Bordetella pertussis*, el principal agente causal de la enfermedad respiratoria aguda conocida con el nombre de tos convulsa, pertussis o coqueluche [1]. En los Estados Unidos (EEUU) por ejemplo, en el año 2012 se registraron 48.277 casos de pertussis; incluyendo 20 muertes relacionadas con la enfermedad. Este registro fue el más alto desde 1955 [1]. El Reino Unido (UK) por su parte detectó un aumento sorprendente en el número de casos, con más casos en el 2013 que los correspondientes a la década de 1970 y 1980; cuando la vacuna era rechazada por la población debido a los reportes sobre las reacciones adversas asociadas con la vacunación [2]. Argentina, por su parte, detectó a partir del año 2003 un aumento de casos sostenido llegando a una tasa de 16/100.000 habitantes en el año 2011. En dicho año también se registró el mayor número de fallecimientos asociados a la enfermedad (76 fallecimientos) [3]. Esta situación que resulta preocupante y se repite en otros países, ha alarmado a los sistemas de salud y ha ocasionado que esta enfermedad hoy sea considerada como una enfermedad resurgente.

Se han esgrimido varias hipótesis sobre la resurgencia de la enfermedad: una de ellas está relacionada con las bajas coberturas de vacunación, lo que llevaría a que parte de la población siga siendo susceptible de contraer la enfermedad y luego transmitirla. Otra hipótesis es que los individuos vacunados pueden infectarse pese a haber sido vacunados [4, 5]. Mientras que la cobertura de vacunación probablemente haya jugado un papel primordial en el aumento de la incidencia hace algunos años, en la actualidad parecería ser menos relevante ya que hay registros de mejoras sustanciales en las mismas [4, 6]. La baja efectividad de las vacunas hoy en uso parece ser hoy la causante principal del resurgimiento de la enfermedad. Al presente se han propuesto varias explicaciones sobre del por qué ha disminuido la efectividad de las vacunas. Una de las causas posibles es que la inmunidad conferida por las vacunas disminuye con el tiempo y determina que los individuos vacunados puedan ser infectados por *B. pertussis* [7]. Otra causa se refiere a que el agente causal de la enfermedad haya evolucionado para escapar de la inmunidad conferida por las vacunas [8]. Por último las vacunas no son capaces de inducir inmunidad contra la infección ni contra la transmisión [9]. Mientras que los dos primeras explicaciones han recibido considerable

atención, la tercera fue sólo recientemente propuesto por Warfel, Zimmerman y Merkel (2014) [9] . En este estudio, Warfel y colaboradores emplearon un modelo de primates no humanos como modelo para la infección por *B. pertussis* y describieron que los individuos vacunados con vacunas acelulares pueden infectarse y transmitir la infección a individuos susceptibles. Estos autores postulan que el hecho de que los individuos vacunados que cursan una infección asintomática puedan infectar a individuos susceptibles podría explicar, al menos parcialmente, el aumento en la incidencia de *B. pertussis*. Sin dudas la situación es compleja y, más allá de cual sea el peso de cada uno de estos factores que afectan la incidencia de la enfermedad, resulta evidente y urgente revisar, implementar y diseñar nuevas estrategias que permitan mejorar el control de esta enfermedad; sobre todo para la población más vulnerable representada por los niños menores de 1 año de edad. Respecto de acciones a corto plazo muchos países han decidido incorporar nuevos refuerzos intentando prolongar la duración de la inmunidad conferida por las vacunas y disminuir así la infección en las poblaciones que han sido descritas como fuente de infección de los menores de 1 año de edad [10-14]. Así, se han recomendado, y en algunos países incluso incorporado, refuerzos en adolescentes, en el personal de salud que trabaja en contacto con los niños, en los padres y contactos cercanos de los recién nacidos y en las madres embarazadas [15, 16]. De hecho, año tras año nuevos refuerzos se están incorporando a los calendarios nacionales de vacunación, sin contar aún con la evidencia epidemiológica que lo sustente. Sin embargo esta estrategia de incorporar nuevos refuerzos se está viendo obstaculizada por varios factores: dificultades en disponibilidad de las vacunas ya que son pocos los productores de vacunas y existe una alta demanda, elevado costo de cada dosis de vacuna acelular que son las únicas recomendadas para la aplicación en los mayores de 7 años y la inversión elevada que debe realizarse para lograr coberturas adecuadas para que los refuerzos incorporados puedan tener el efecto buscado. Esta situación podría mejorarse si se evidencia que alguna y no todas estas medidas resulta realmente beneficiosa en la reducción de la incidencia de pertussis. De esta manera se lograría bajar las demandas y los costos de las vacunas.

Otra estrategia que podría mejorar la situación de pertussis, pero a mediano-largo plazo, sería el desarrollo de una nueva generación de vacunas capaces de superar las deficiencias asociadas con las vacunas actuales [17]. Varias son las alternativas que pueden explorarse [18, 19]. Una de ellas es la desarrollada por nosotros, que consiste en una

formulación basada en vesículas de membrana externa (OMVs de la sigla en inglés) derivadas de *B. pertussis* y también de *B. parapertussis*. Estas formulaciones novedales han resultado ser excelentes en su capacidad protectora en el modelo aceptado de desafío intranasal en ratones frente a diferentes genotipos de *B. pertussis* y *B. parapertussis* [20-24] (Patente de invención -Expediente INPI 2013010123, en trámite; Patente internacional: Submission Number: 060143 Application Number: PCT/IB2014/060143, en trámite, Receiving Office: International Bureau of the World Intellectual Property Organization). Esta formulación acelular es además biosegura y presenta la capacidad de inducir una respuesta inmune protectora con un perfil de Th1/Th2 mixto y también una respuesta de anticuerpos robusta [20]. Los resultados alcanzados hasta el presente muestran a nuestra formulación vacunal como una buena alternativa a las formulaciones actuales ya que contienen un mayor número de inmunógenos que las vacunas acelulares actuales y en conformaciones cercanas a las encontradas en las bacterias, hechos que favorecerían la capacidad de protección otorgada por las vesículas. Además, estas formulaciones proporcionan protección tanto frente a *B. pertussis* como a *B. parapertussis*, ampliando el espectro de protección por sobre las vacunas actuales, lo que contribuiría a un mejor control de la enfermedad.

OBJETIVOS GENERALES

En este trabajo de tesis nos hemos propuesto avanzar en dos aspectos globales que entendemos tienen impacto en el mejoramiento de la situación actual de pertussis:

1- Predecir mediante un modelo matemático de transmisión de pertussis el impacto de la implementación de nuevas estrategias de vacunación sobre la incidencia de la enfermedad.

2- Avanzar en la identificación de los componentes de las vesículas de membrana externa que resultan ser esenciales en la protección contra la infección causada por *Bordetella*. De esta forma se espera asegurar la presencia de estos componentes en los procesos productivos y también poder aportar a la identificación de nuevos candidatos que puedan incorporarse en las actuales formulaciones acelulares.

OBJETIVOS ESPECIFICOS**Evaluación del impacto de la incorporación de nuevos refuerzos de vacunas en la incidencia de pertussis en la población más vulnerable.**

- Establecimiento de parámetros característicos de la enfermedad y su epidemiología.
- Validación del modelo a través de comparaciones con datos reales.
- Análisis del efecto de la incorporación del refuerzo de los 11 años en la incidencia de la enfermedad en la población menor de 1 año de edad.

Identificación de componentes de las vesículas de membrana externa que resultan esenciales en la protección por ellas conferida.

- Obtención y caracterización molecular de OMVs derivadas de cepas de *B. pertussis* defectivas en la expresión de inmunógenos incluidos en las actuales vacunas acelulares: toxina pertussis (OMVs Δ PtX), pertactina (OMVs Δ Prn) o hemaglutinina filamentosa (OMVs Δ FHA)
- Caracterización funcional de las OMVs derivadas de los mutantes de *B. pertussis* defectivos antes mencionados.
- Obtención y caracterización molecular y funcional de las OMVs derivadas de una cepa defectiva en la expresión de un inmunógeno vacunal recientemente propuesto, la adenilato ciclasa –hemolisina (OMVs Δ AC-Hly)
- Obtención y caracterización molecular y funcional de las OMVs derivadas de una cepa de *B. pertussis* bloqueada en fase avirulenta (OMVsBpavir)
- Ensayos de inmunoproteómica para identificar componentes comunes en todas las OMVs estudiadas con potencialidad de ejercer un rol protector contra las infecciones causadas por *B. pertussis*.

A continuación haré un repaso de las principales características de la enfermedad, del agente causal y de la epidemiología de pertussis y las vacunas; que entiendo permitirán contextualizar más adecuadamente los resultados alcanzados durante mi trabajo de tesis.

INTRODUCCION

LA ENFERMEDAD

Pertussis, coqueluche o tos convulsa son sinónimos que se emplean para describir una enfermedad respiratoria aguda que generalmente comienza con síntomas parecidos a un resfrío y tal vez con una leve tos o fiebre. Luego de 1 a 2 semanas, comienza una tos violenta que se presenta en forma de ataques que continúa durante semanas. Esa tos violenta y rápida, ocurre una y otra vez, hasta que los pulmones se quedan sin aire y ello obliga al paciente a inhalar haciendo un fuerte sonido conocido como estridor inspiratorio. Esta tos extrema puede hacer que el paciente vomite luego de toser. En los bebés, la tos puede ser mínima o ni siquiera existir. En ellos es más frecuente la aparición de apneas, es decir, una pausa en el ritmo respiratorio del niño, asimismo también la cianosis. Pertussis es más peligrosa para los bebés, de hecho la mitad de los bebés menores de 1 año de edad que contraen la enfermedad son hospitalizados y muchos de ellos tienen un desenlace fatal. En los adolescentes y adultos, especialmente en aquellos que han sido vacunados la sintomatología es más leve.

Así para esta enfermedad se describen 3 fases sintomáticas:

Fase Catarral: esta primera etapa tiene una duración de 1 a 2 semanas. La sintomatología que se presenta en esta fase puede confundirse con otras infecciones respiratorias pues en general aparece como un resfrío con tos seca. En la fase catarral se describe la mayor tasa de diseminación de la enfermedad; de ahí su gran importancia epidemiológica.

Fase Paroxística: esta fase dura de 3 a 6 semanas y se caracteriza por la presentación de accesos o paroxismos de tos que son propios de la enfermedad, vómitos después de toser, cianosis y apnea [25], Los paroxismos de tos están caracterizados por accesos repetidos de tos en forma violenta, sin inhalaciones intermedias, seguidos de un estridor inspiratorio marcado y característico. Al finalizar el paroxismo es frecuente la eliminación de mucosidad clara y blanquecina seguida de vómitos. Los pacientes en general presentan leucocitosis marcada con linfocitosis absoluta, pierden peso, a veces presentan hipoglucemia pero raramente fiebre. No se detecta bacteremia durante esta fase.

Fase Convalecencia: comienza con una disminución gradual de la sintomatología, disminuyendo en frecuencia e intensidad los ataques paroxísticos y la tos, llegando a desaparecer en aproximadamente en 2 a 3 semanas [26, 27].

Todo este cuadro clínico se corresponde con la presentación típica de la enfermedad. Sin embargo, existen distintos factores que lo condicionan como por ejemplo la edad del paciente, el estado de vacunación, el tratamiento con antibióticos y la coinfección con otros microorganismos [26].

Las complicaciones más frecuentes de esta enfermedad, que se presentan en los niños menores de 1 año, son neumonías (22%), convulsiones (3%), encefalitis (1%) y en algunos casos puede ocurrir la muerte (0,3% en niños de 2 años a 6 meses y 1,3% en el primer mes de vida) [25, 27]. Si comparamos esta enfermedad con la meningitis bacteriana, su gravedad y mortalidad, así como las secuelas que puede ocasionar son comparables, sin embargo, no se le da la importancia que si se da a la meningitis bacteriana.

En el caso de los adolescentes y adultos las complicaciones más comunes son dificultad para dormir, incontinencia urinaria, neumonía y quebraduras de costillas

En la Figura 1 presentamos, a modo de ejemplo, los datos publicados para EEUU sobre la distribución de la ocurrencia de complicaciones de la enfermedad de acuerdo a la edad de los pacientes. En la Figura 2 se observa la proporción de muertes según la edad del paciente.



UN POCO DE HISTORIA SOBRE LA ENFERMEDAD

La primera crónica médica de esta enfermedad aparece en 1578 en una descripción de Guillaume de Baillou (1538-1616) sobre una epidemia ocurrida en ese año en Francia. Este médico francés, considerado como el principal epidemiólogo de occidente después de Hipócrates, trabajó por rescatar la tradición hipocrática basada en la observación clínica, el entendimiento humano y la macroscópica de las enfermedades y su tratamiento. A este médico se le acredita la descripción clínica de la tos convulsa, aunque otros señalan que fue un médico iraní el responsable de esta descripción algunos años antes, en 1501. Algunas descripciones de cuadros clínicos compatibles con el de la tos convulsa que datan de años anteriores, hacen dudar respecto si la primera mención de la enfermedad la hizo Baillou. De hecho Kohn [28] sugiere que la descripción de *Perinthus cough* realizada por Hipócrates alrededor del año 400 A.C. se correspondía a una enfermedad cuya sintomatología es compatible con tos convulsa. Más aún en el año 1190, en el *Reginad's Vita Godrici*, se emplea la palabra *kinkehost* para describir una enfermedad que pareciera ser la tos convulsa ya que *kink* es el sinónimo escocés de paroxismo de tos [29]. En el diccionario medieval holandés *Middelnerlandasch woordenboek* se sugirió que la palabra *gisschen* podría ser una denominación para tos convulsa en el este de Holanda en la primera mitad del siglo XIV. En "Historia de la Pediatría en Holanda", van Lieburg [30] se refiere al libro de los Milagros de la Catedral de Hertogenbosch, al sur de Holanda, donde se describe un peregrinaje a la estatua de Santa María en el año 1383 en agradecimiento a la recuperación de un niño que padecía de una enfermedad respiratoria denominada *kychoest*. Si bien resulta imposible confirmar retrospectivamente como tos convulsa o *pertussis* cualquiera de estos antecedentes clínicos, los mismos al menos sitúan la aparición de la enfermedad varios siglos atrás [31-33].

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

magistral en el Hotel-Dieu de París, se refiere a la enfermedad como la “toux qui houpe”, de donde los ingleses hicieron derivar el término “whooping cough”.

DESCUBRIENDO AL AGENTE CAUSAL

Desde los inicios de la enfermedad se especulaba que existía un agente infeccioso causante de pertussis, pero el origen microbiológico del mismo era discutido. En 1766 el profesor sueco Nils Rosen von Rosentein planteaba la idea de que *“la verdadera causa de esta enfermedad es una materia heterogénea o semilla...que se trasmite por infección y parte es atraída por la respiración hasta los pulmones”*[34]. Por otra parte, en 1850 médicos de Filadelfia sugerían que la enfermedad era un desorden del sistema nervioso que generaba efectos en el tracto respiratorio. Para fines del 1800, varios microbiólogos ya planteaban la hipótesis de un microorganismo como agente causal de la enfermedad. En 1870 Letzerich describió un hongo como el agente causal ya que había podido obtener esporos a partir de un niño que presentaba una tos característica para esta enfermedad; además Tschamer lo cultivó y se lo inoculó a conejos. Ambos describieron la presencia de micelios filamentosos. Por otro lado en 1883 Burger publicó el hallazgo de un bacilo pequeño en la expectoración de los coqueluchosos y elipsoidal. En 1887 Afanassjew describió en forma bastante acertada al bacilo, pero no pudo cultivarlo, tarea en la que también fracasaron Czaplewski y Hensel. Diez años después, Koplik cultivó en agar ascitis colonias perladas de *Bacillus pertussis*: pero parecían ser cultivos impuros. Además en 1901 Jochmann y Krause aislaron en agar sangre, del esputo de un pequeño paciente, un pequeño bacilo que llamaron *Bacillus pertussis Eppendorf*, honrando el sector de Hamburgo donde estaba situado su hospital. Sin embargo se los cuestiono con que el cultivo era más *influenzae* que *pertussis* [35].

Así, no fue hasta 1906 que se logró determinar la etiología bacteriana de la pertussis. Fue en ese año que los microbiólogos Jules Bordet (de origen belga) y Octave Gengou (de origen francés), trabajando en el Instituto Pasteur de Bruselas, lograron aislar a la bacteria a partir muestras clínicas tomadas de pacientes con la sintomatología característica de la enfermedad. Al describir su hallazgo decían: *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 enfermedad. Pero el microbio se mostró rebelde a todas las tentativas que se hicieron para cultivarlo* [36]. Esto demuestra además, de la

importancia que tuvo correlacionar la sintomatología de la enfermedad con el bacilo; el desarrollo de un medio de cultivo complejo, que hoy en día lleva sus nombres (Medio Bordet-Gengou). Este medio basado en extracto de papa, glicerol y sangre, les permitió cultivar a la bacteria inhibiendo la flora microbiana que comúnmente acompaña en la boca y fauces.

BORDETELLA PERTUSSIS: AGENTE CAUSAL

En la actualidad el género *Bordetella* pertenece a la familia *Acaligenaceae*, orden *Burkholderiales*, clase *Betaproteobacteria*. Dentro de este género se describen 10 especies (ver Tabla 1) entre las que se encuentra *B. pertussis*, considerado el principal agente causal de la tos convulsa[37]. *B. pertussis* es un cocobacilo Gram negativo de pequeño tamaño (0,2µm por 0,7-1µm), aerobio estricto con un metabolismo respiratorio no fermentativo. Se lo considera un microorganismo de desarrollo fastidioso, no debido a sus requerimientos nutricionales especiales sino a la dificultad de desarrollo por la inhibición ejercida fácilmente por compuestos tales como metales pesados, ácidos grasos insaturados, detergentes, peróxidos y sulfuros.

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

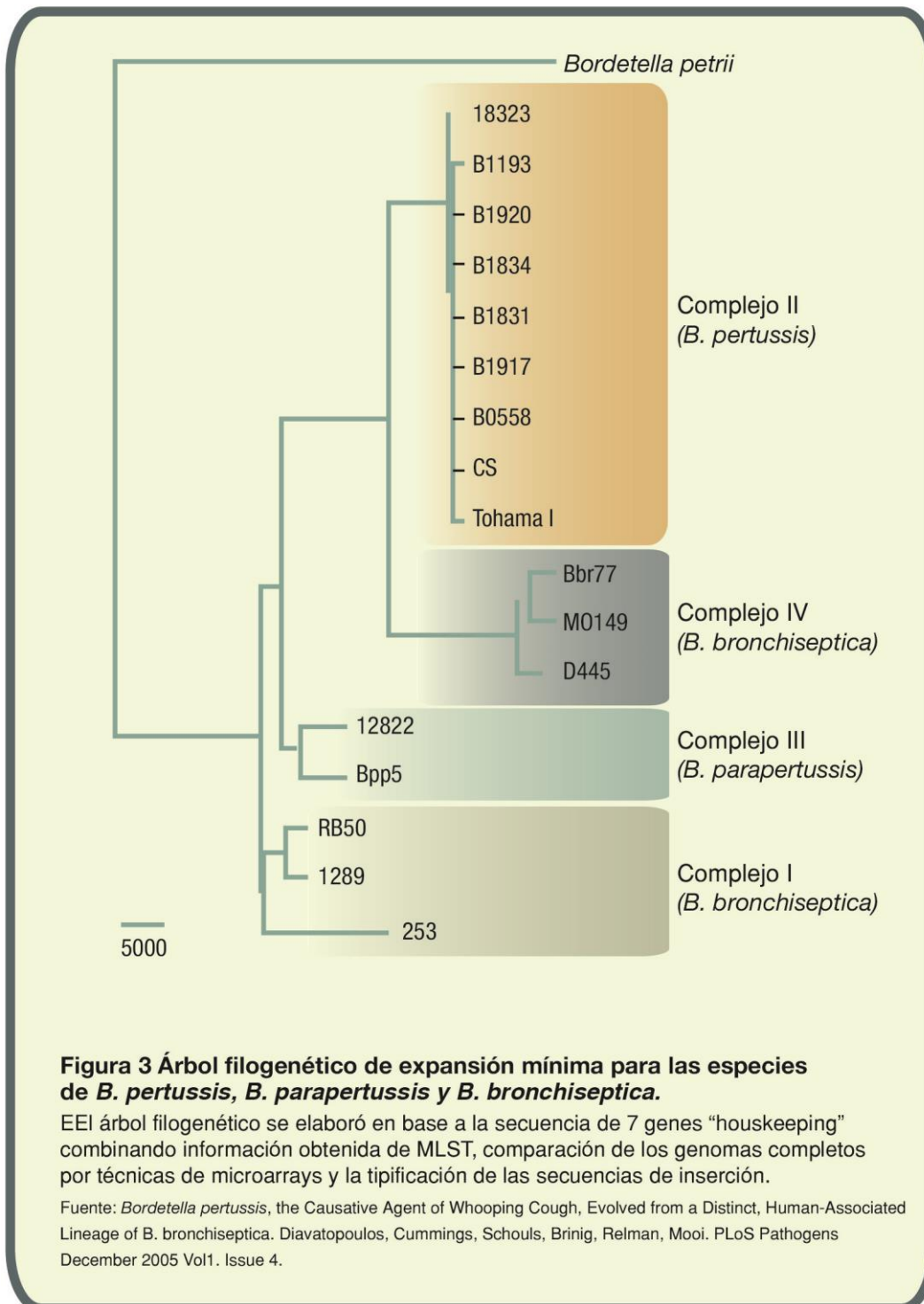
Tabla 1: Especies identificadas pertenecientes al género *Bordetella*

El único huésped hasta ahora descrito para *B. pertussis* es el hombre. Para *B. parapertussis* se han descrito dos especies: *B. parapertussis*_{hu} capaz de infectar a los humanos y producir un cuadro clínico similar a pertussis, y *B. parapertussis*_{ov} que infecta exclusivamente al ganado ovino. *B. bronchiseptica* presenta el mayor rango de huésped ya que ha sido aislada de numerosos animales incluyendo perros, monos, conejos, cerdos y

caballos, aunque también se han documentado infecciones esporádicas en humanos [38]. Las infecciones en humanos por *B. bronchiseptica* en general están referidas a pacientes inmuno deprimidos aunque hay reportes sobre infecciones en individuos sanos [39]. *B. petrii* es la única especie que siempre se había aislado del ambiente, pero recientemente se la ha aislado de pacientes [40]. La característica principal de esta especie es su notable plasticidad génica que le permite su adaptabilidad *in vivo* [41], generando persistencia en los pacientes con enfermedades respiratorias [42, 43]. Por último, la otra especie del género asociada a infecciones en humanos es *B. holmesii*, está asociada primariamente a septicemias pero recientemente se la ha descrito en infecciones del tracto respiratorio con una sintomatología similar a un cuadro de pertussis [44, 45]. Estos hallazgos, donde otras especies del género *Bordetella* son los agentes causales de la enfermedad, resultan de gran preocupación para la salud pública debido a que las vacunas existentes no están desarrolladas contra estos patógenos.

De todas las especies las tres más ampliamente estudiadas son *B. pertussis*, *B. paraptussis* y *B. bronchiseptica*; a las cuales se las denominan **especies clásicas**. Estas tres especies están filogenéticamente muy relacionadas, como fue confirmado con la comparación de los genomas completos de tres cepas representativas [46]. También fue reportado que la adaptación de *B. pertussis* y *B. paraptussis* a los huéspedes humanos se asocia con la reducción en el tamaño de sus genomas, así como también con un aumento en el número de secuencias de inserción (IS) y pseudogenes, respecto de *B. bronchiseptica* [47]. Por lo tanto, y desde el punto de vista evolutivo, se planteó la hipótesis que *B. pertussis* y *B. paraptussis* habían evolucionado de una cepa particular de *B. bronchiseptica*. Recientemente, mediante el análisis de los datos de Multilocus Sequence Typing (MLST) de aislamientos del género *Bordetella* que infectan diferentes especies de mamíferos, se han podido identificar un linaje antecesor específico [48]. En este elegante estudio los autores proponen a *B. bronchiseptica* como el ancestro del que derivan las especies de *Bordetella* patógenas para el humano. Además lograron clasificarlos en cuatro poblaciones bacterianas diferentes que han sido designadas como: complejo I y IV que comprenden cepas de *B. bronchiseptica*, y los complejos II y III que comprenden los patógenos humanos *B. pertussis* y *B. paraptussis_{hu}*, respectivamente (Figura 3) [48]. El complejo I es más cercano al complejo

III y el complejo IV donde la mayoría de las cepas de *B. bronchiseptica* se corresponden a aislamientos humanos, es más cercano al complejo II de *B. pertussis*.



PROCESO DE INFECCIÓN Y PATOFISIOLOGÍA

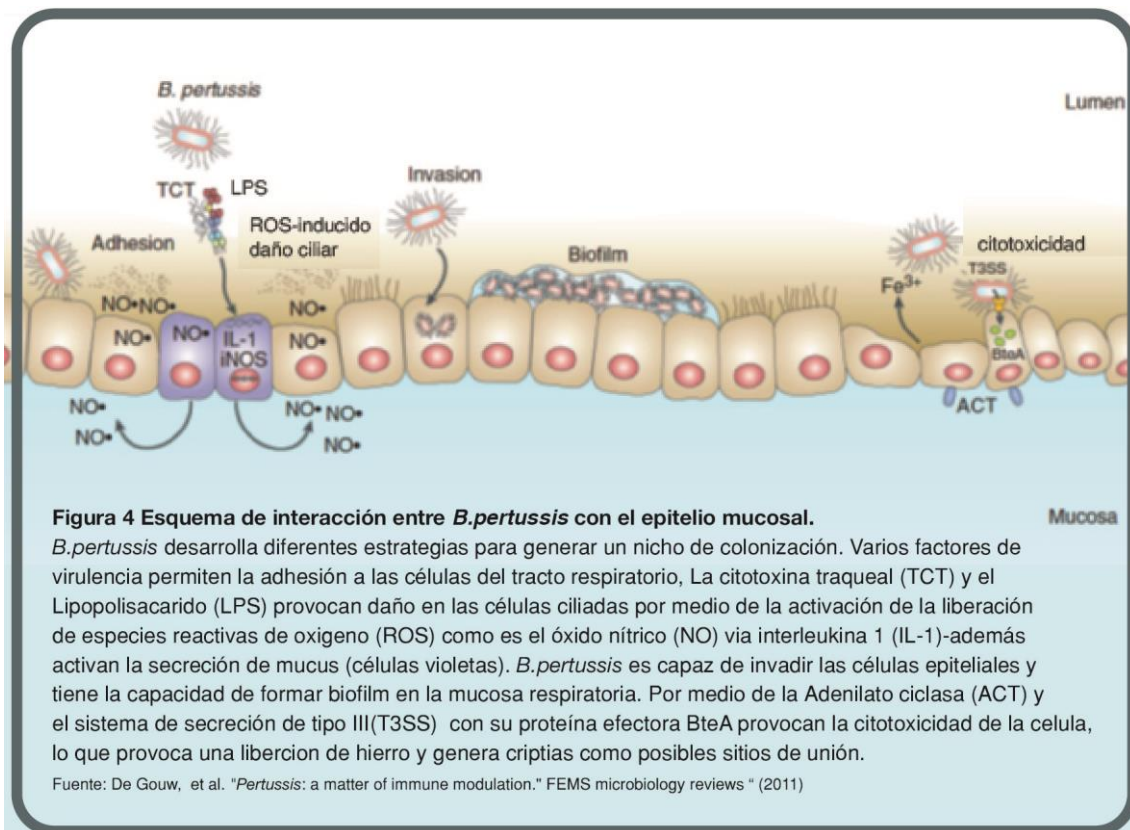
El proceso infeccioso que desencadena *B. pertussis* se inicia en un individuo susceptible cuando el mismo entra en contacto con las secreciones respiratorias de una persona infectada. Una vez dentro del huésped, las bacterias se adhieren a las células epiteliales ciliadas de la nasofaringe e incluso la tráquea, se multiplican y secretan una serie de factores destinados fundamentalmente a evadir la respuesta inmune del huésped [49].

En ese primer contacto con el epitelio ciliado, *B. pertussis* compete con la flora habitual por el lugar y los nutrientes, además se enfrenta a un amplio rango de mecanismos de defensa que buscan limitar y evitar la colonización. La limitación del ion hierro y la inmunidad innata son alguno de los mecanismos que *B. pertussis* debe sortear para que el proceso infeccioso progrese. En los pulmones, la primera lesión causada por pertussis parece ser la hiperplasia linfoide de los nódulos linfáticos peribronquiales y traqueobronquiales. Se ha reportado que pueden ocurrir incluso necrosis y descamación de las capas superficiales epiteliales de los bronquios pequeños [50]. En la mayoría de los casos de muerte por pertussis los pacientes presentan bronconeumonía, generalmente debida a una infección secundaria. Sin embargo hay también casos en que la muerte es causada por la infección primaria por pertussis. La misma parece estar asociada a la obstrucción de las vías aéreas por la migración excesiva de poblaciones celulares del huésped.

Los modelos de infección en animales han permitido conocer un poco más sobre la patofisiología de esta infección. Así, empleando el modelo de infección intranasal de pertussis en ratones se pudo observar que *B. pertussis* causa una bronconeumonía asociada a hemorragia alveolar con edema, sin evidencia de lesiones necróticas [26, 51]. El pulmón infectado presenta una inflamación perivascular y peribronquial generalizada, con un gran número de células infiltrativas, predominando entre ellas los polimorfonucleares. La distribución de estas células es homogénea en todo el pulmón. Se observa en general, inflamación del parénquima pulmonar con aflujo de linfocitos, mientras que el exudado intra alveolar está compuesto principalmente por monocitos. En la infección temprana también se

ha observado una afluencia de células T y δ en pulmones de ratones así como un rápido reclutamiento de células dendríticas.

En animales inmunizados el curso de la infección es menos prolongado y el influjo de células es más transitorio [51].

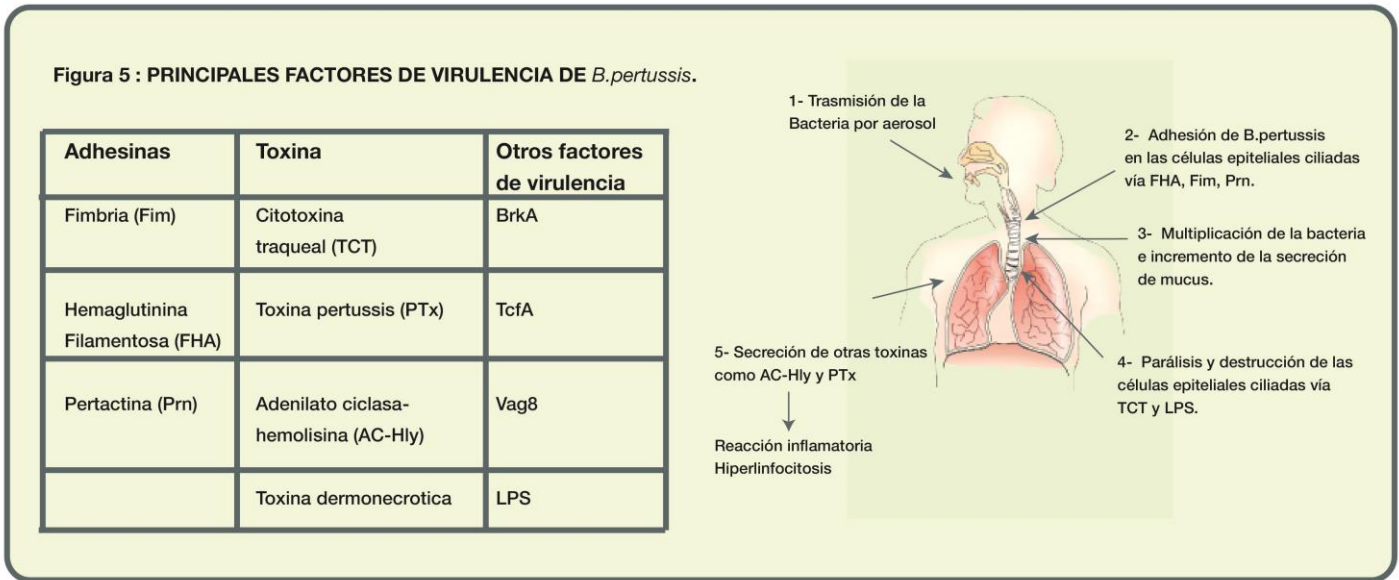


En la Figura 4 se esquematiza las primeras etapas de interacción del patógeno-huésped. Para el desarrollo de las distintas etapas de infección, la bacteria requiere de una serie de factores de virulencia muchos de los cuales ya han sido identificados y caracterizados [26, 52]. Algunos de estos factores denominados factores de virulencia pueden agruparse en dos categorías: adhesinas y toxinas, aunque también existen sistemas más complejos como el sistema de secreción tipo III que también juegan rol clave en la patogénesis de pertussis.

Así, mientras que las adhesinas median la adhesión al epitelio ciliado, a macrófagos y a neutrófilos[53, 54], las toxinas son conocidas por contribuir a la patogénesis y en muchos de los casos estar involucradas en la evasión de la respuesta inmune montada por el huésped [55-57]. Estas bacterias también sintetizan sistemas más complejos que están asociados a la

patogenicidad y también a la evasión de la respuesta inmune del huésped, entre ellos el sistema de secreción tipo III (TTSS) [58, 59].

A continuación presentamos un esquema que resume el rol funcional que cada uno de los principales factores de virulencia presentan durante la patogénesis [52].



De todos estos factores presentados en la tabla de la Figura 5, describiremos con más detalle las características de los inmunógenos presentes en las vacunas acelulares junto con la Adenilato ciclasa- Hemolisina [60] ya que son objeto de estudio de este trabajo de tesis.

Hemaglutinina filamentosa (FHA). Es una proteína en forma de bastón de 232 kDa asociada a la superficie de la bacteria y además es secretada al medio extracelular. El gen estructural de esta adhesina, *fhaB*, codifica para una proteína precursora de 367 kDa, FhaB, que luego sufre una serie de modificaciones en el extremo N terminal y un clivaje en el extremo C terminal, antes de ser secretada como proteína madura. [61-64]. FHA ha sido descrita como necesaria y suficiente para mediar la adhesión de la bacteria a diferentes células eucariotas en ensayos de cultivos *in vitro* [63, 64]. Sin embargo, otras proteínas también se han descrito como adhesinas lo cual marcaría lo crucial que es la etapa de adhesión para este patógeno [65, 66].

Interesantemente se ha observado que mutantes defectivos en la expresión de FHA inducen una respuesta inflamatoria más robustas que las cepas salvajes [67]. Esta respuesta se caracteriza por mayores niveles de citoquinas pro-inflamatorias en los pulmones y un mayor reclutamiento de neutrófilos [67]. Estos datos sugieren que FHA permite modular la respuesta inflamatoria durante el establecimiento de la infección, facilitando de este modo su persistencia de *B. pertussis* en el huésped [67]. FHA también sería capaz de inducir un proceso apoptótico en monocitos y células epiteliales de pulmón [51]. Además, se ha sugerido que la FHA podría actuar sinérgicamente con otros factores de virulencia tales como la ACT [67].

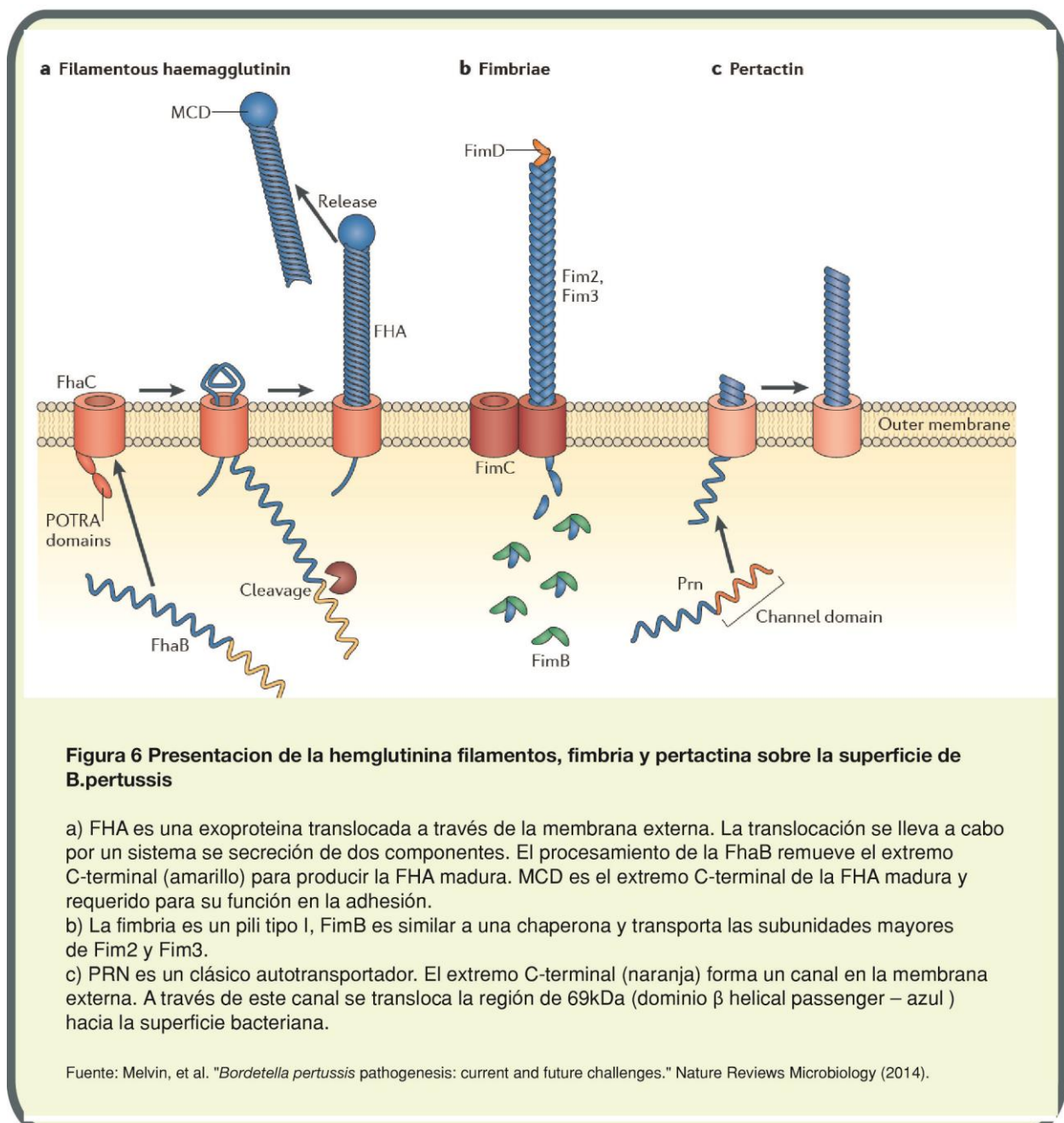
Fimbrias (Fim). Las fimbrias o aglutinógenos son estructuras filamentosas de naturaleza proteica que se extienden de la superficie bacteriana [54]. Formadas por subunidades mayores denominadas Fim2 (22 kDa) y Fim3 (22,5 kDa) que se encuentran codificadas en dos *loci* cromosomales no ligados, *fim2* y *fim3*, respectivamente [26]. Además de la regulación positiva por el sistema BvgAS que describiremos más abajo, los genes *fim* están sujetos a corrimientos del marco de lectura dentro de una regiones promotoras alterando los niveles de expresión de cada gen [68][73].

En las primeras etapas de la infección las fimbrias parecen mediar la unión de la bacteria al epitelio respiratorio del huésped [51]. Estudios *in vivo* realizados con mutantes defectivos en Fim- han permitido determinar 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 huésped [69]. Además, las fimbrias estarían involucradas en la generación de la respuesta inmune del huésped por lo que han sido incluidas en varias formulaciones acelulares [70].

Pertactina (PRN). La pertactina es una proteína autotransportadora presente en la membrana externa de *B. pertussis*. El polipéptido precursor de la PRN denominado P.93, tiene un PM de 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 [57]. Este péptido de 30 kDa cuya presencia ha sido detectada en la membrana externa de la bacteria, participaría en el mecanismo de la secreción de la pertactina [26].

La estructura secundaria de PRN contiene dos regiones inmunodominantes que presentan repeticiones de secuencia: la región 1, cuya secuencia aminoacídica es (GGXXP) se encuentra ubicada a continuación del tripéptido RGD involucrado en la adhesión a las células del huésped; y la región 2 (PQP) que se encuentra en el extremo C-terminal. Esta región es considerada el epítopo inmunoprotector de mayor importancia. Los altos títulos de anticuerpos contra PRN asociados a los de toxina pertussis o a los de fimbria en general han sido correlacionados con la protección contra las formas severas de la enfermedad [71].

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



de V, también se diferencian regiones con conformación estructural de loops que sobresalen uniendo las regiones β . Uno de estos loops o lazos contiene la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) y diversas regiones repetidas ricas en prolina (P) y leucina (L), motivo asociado con la adherencia a los tejidos del huésped [72].

Para el gen que codifica para la pertactina, *prn*, se han descrito diferentes variantes alélicas. El polimorfismo entre las cepas vacunales y los aislamientos de la población bacteriana circulante ha sido propuesto como una de las potenciales causas que contribuyen a la reemergencia de pertussis descrita hace 20 años y que continúa en la actualidad [73].

Toxina pertussis (PTx). Es una proteína multimerica de 106 kDA, compuesta por cinco subunidades diferentes denominadas S1 a S5, de acuerdo a su peso molecular decreciente [26]. *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 [74]. De acuerdo a su estructura PTx es considerada dentro de la familia de las toxinas tipo AB [75][76].

La subunidad S1 también llamada monómero A, está formada por 269 aminoácidos incluyendo al péptido señal y contiene un sitio catalítico que transfiere ADP-ribosa desde el NAD⁺ a las subunidades- α heterotriméricas de las proteínas G. El efecto de esta ADP-ribosilación mediado por la PTx es impedir la activación celular mediada por receptores e interferir en la transducción de señales intracelulares.

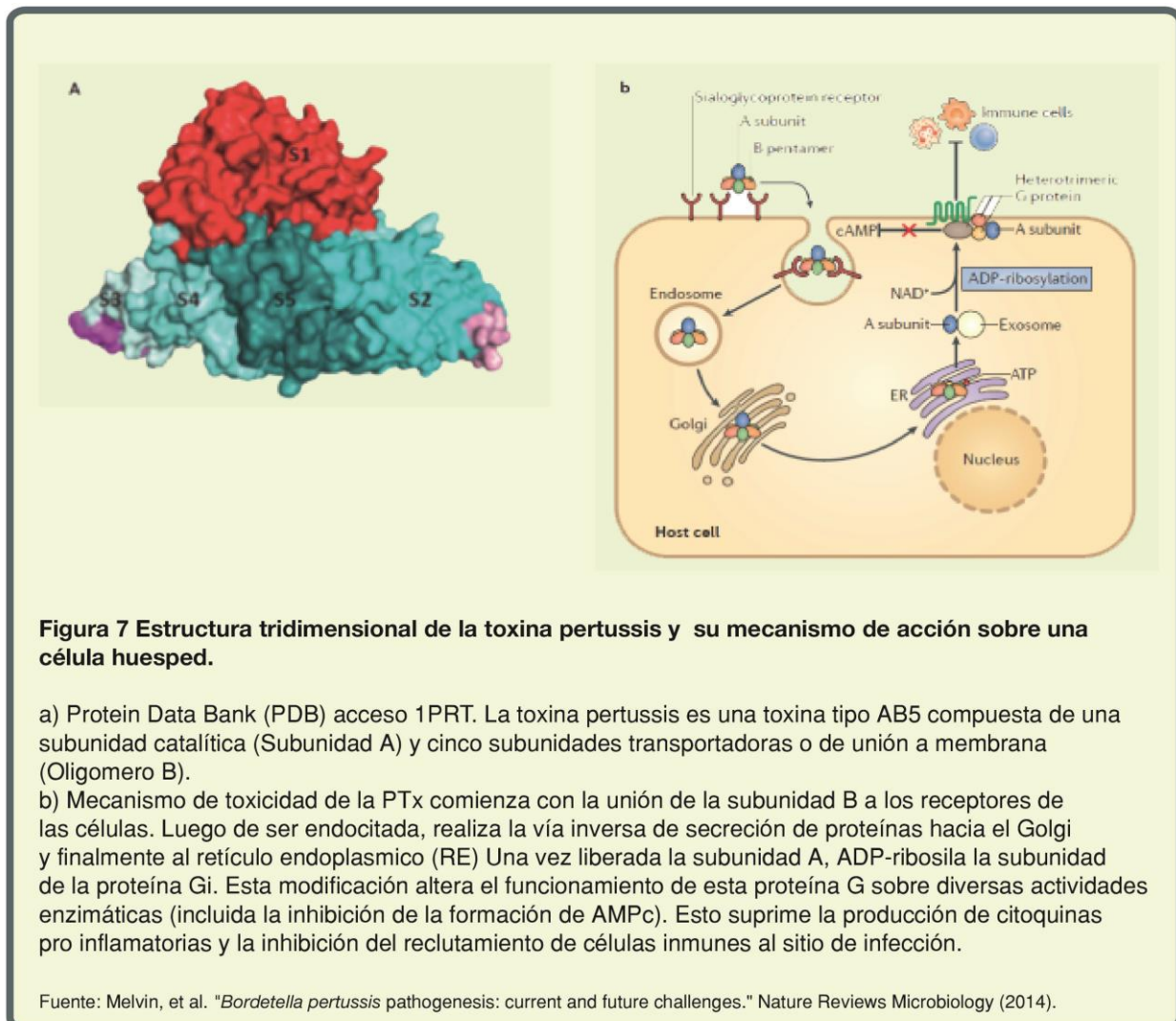
Por otra parte, el oligómero B es un pentámero formado por las subunidades restantes S2 a S5 que adopta una disposición espacial en anillo y toma contacto con los receptores glicoproteicos de la célula huésped.

Luego del proceso de adhesión, el monómero A de la toxina es translocado al citosol de la célula blanco en un proceso independiente de endocitosis. La unión de ATP al oligómero B de la toxina causa la liberación de la subunidad S1 en el citosol y es activada luego de sufrir la reducción de su puente disulfuro. En su forma reducida, S1 cataliza la transferencia de ADP-ribosa desde el NAD⁺ hacia la subunidad α de proteínas Gi [52] que transmiten señales inhibitorias al complejo adenilato ciclasa, resultando en el aumento intracelular de AMPc, lo cual afecta las vías de señalización en muchos tipos de células, incluidas las células del sistema inmune [75, 77]. PTx es capaz de inhibir la quimiotaxis de macrófagos (*in vivo*), de neutrófilos

y linfocitos (*in vitro*) debido a la alteración de los niveles intracelulares de calcio, así como también es responsable de la inhibición de las respuestas oxidativas y de la liberación del contenido lisosomal en macrófagos y neutrófilos [78]; y de la estimulación de la síntesis y secreción de TNF α , IL-1 e IL-6 (Figura 7).

La toxina se secreta al medio extracelular mediante un sistema proteico llamado sistema Ptl (del inglés Pertussis toxin liberation), que se encuentra embebido en la membrana externa bacteriana formando un poro. Las proteínas que constituyen este sistema de secreción están codificadas por 9 genes denominados ptIA-I que mapean justo por debajo de los genes que codifican para la Ptx [57].

En su conjunto, los resultados alcanzados *in vivo* han permitido establecer que la PTx contribuye en el establecimiento de la infección suprimiendo la inflamación temprana e inhibiendo los mecanismos antimicrobianos de las células inflamatorias [79].



Adenilato ciclasa-Hemolisina (AC-Hly). La AC-Hly es una proteína bifuncional secretada por todas las especies de *Bordetella* que infectan mamíferos [80]. Pertenece a la familia de las toxinas RTX (repeticiones en toxinas) y 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 [81].

La AC-Hly es sintetizada como una pro-toxina 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 [60]. El ingreso de la toxina a la célula huésped a través de la membrana plasmática, posiblemente ocurra a través de gangliósidos presentes en la superficie de la célula eucariota [82]. La translocación a través de la membrana plasmática requiere además de la presencia de concentraciones milimolares de calcio [82]. 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 ion es necesario para el ingreso al interior de la célula. Una vez dentro, la AC-Hly es clivada por una proteasa intracelular, liberando de esta forma el dominio ciclasa catalítico [83]. Luego, es activado por la calmodulina y comienza la producción de cantidades suprafisiológicas de AMPc [84].

Tanto la actividad hemolítica como la de ciclasa son esenciales para el inicio de la infección de *B. pertussis* [51]. Estudios recientes demostraron la capacidad de la AC-Hly de bloquear la fagocitosis por macrófagos mediada por complemento [85]. Esta toxina también puede suprimir la activación y la quimiotaxis de células T [86]. Ensayos en modelos animales demostraron que inmunizaciones con esta proteína inducen protección contra la colonización bacteriana [60]. Además, AC-Hly participaría también en etapas posteriores a la colonización, modulando la respuesta del huésped [95].

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA.

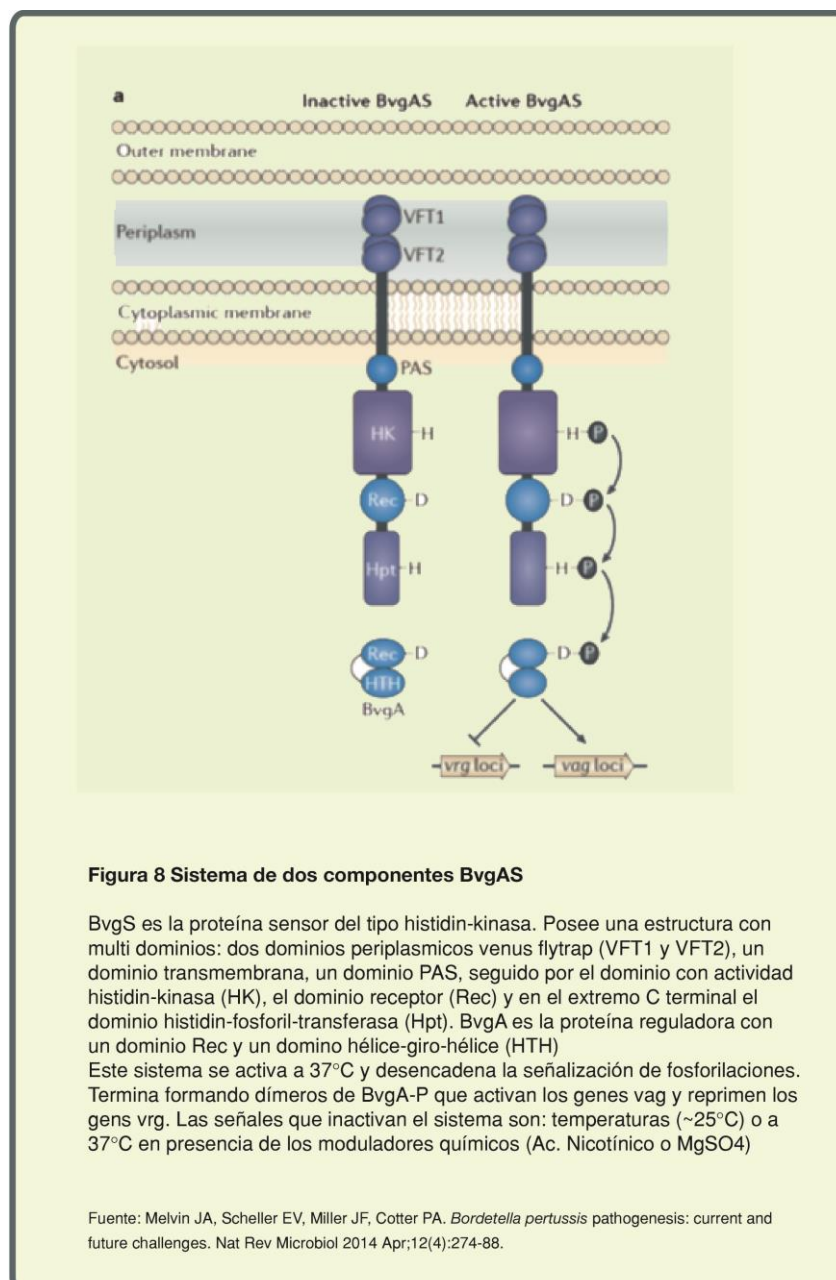
La efectividad de la patogénesis involucra una delicada regulación coordinada de los factores de virulencia en respuesta a las señales del entorno [87]. Una de las primeras observaciones mostraban que *B. pertussis* era capaz de variar la expresión de los antígenos en su superficie en respuesta a señales del ambiente, designándolo en ese momento como “modulación antigénica” [88, 89]. Actualmente se conoce que este fenómeno es debido a la existencia de un sistema regulador que controla la expresión de la mayoría de los factores de virulencia con excepción de la citotoxina traqueal, denominado locus *Bordetella master virulence regulatory system (bvgASR)*. Posteriormente se describió un segundo sistema regulatorio de dos componentes (TCS) denominado RisAS que participaría en la represión de ciertos antígenos [90]. Sin embargo es importante aclarar que existen un mayor número de sistemas de transducción de señal presente en el genoma de *B. pertussis* cuyo rol aún debe ser investigado.

El locus *bvgASR* codifica para un sistema de dos componentes (BvgAS) y fue identificado por Weiss y colaboradores (1989) cuando observaron que la inserción del transposón *Tn5* dentro del mismo eliminaba simultáneamente la síntesis de la PTx, la FHA, la AC-Hly, la toxina TDN y la Fim (cuyos genes se denominan *vag* por virulence activated genes) [91]. Estos ensayos utilizando transposones y otros posteriores que implican un análisis global del genoma demostraron que el sistema BvgAS controla más de cien genes en respuesta a los cambios del entorno [92, 93]. Esto incluye genes que codifican para proteínas estructurales de la superficie, proteínas de secreción que intervienen en la patogénesis, factores requeridos para la supervivencia fuera del huésped, enzimas involucradas en el metabolismo y la fisiología celular, y otros sistemas reguladores adicionales [93].

BvgAS es un típico sistema de dos componentes que está compuesto por una proteína sensor denominada BvgS, y otra proteína reguladora de la respuesta BvgA. BvgA presenta un dominio receptor en el extremo amino terminal y en el extremo carboxilo un dominio de unión al DNA (del tipo hélice-giro-) [87]. Por el otro lado BvgS es un sensor con multidominios y actividad kinasa, que contiene dos dominios N-terminal venus flytrap (VFT), localizados en la región periplásmica [94]. Hacia el extremo C-terminal del VFT contiene una región transmembrana seguida por un dominio PAS localizado en el citoplasmas, que se continua

con un dominio Histidine Kinasa (HK), un dominio Receptor y finalmente el dominio Histidine fosfotranferasa (Hpt) encargado de fosforilar a la proteína BvgA que actúa como regulador transcripcional.

Aunque todavía no se conocen exactamente la/s señal/les que *in vivo* activan a este sistema, se demostró en ensayos de laboratorio que la bacteria cultivada en medios estándares a 37°C activa el sistema BvgAS. Por el contrario en presencia de concentraciones milimolares de sulfato de magnesio o ácido nicotínico o temperaturas por debajo de los 25°C, el sistema BvgAS se inactiva. Estas sustancias son consideradas moduladores o inhibidores del sistema BvgAS [95]. Una vez que BvgS es activado por las señales mencionadas en el dominio

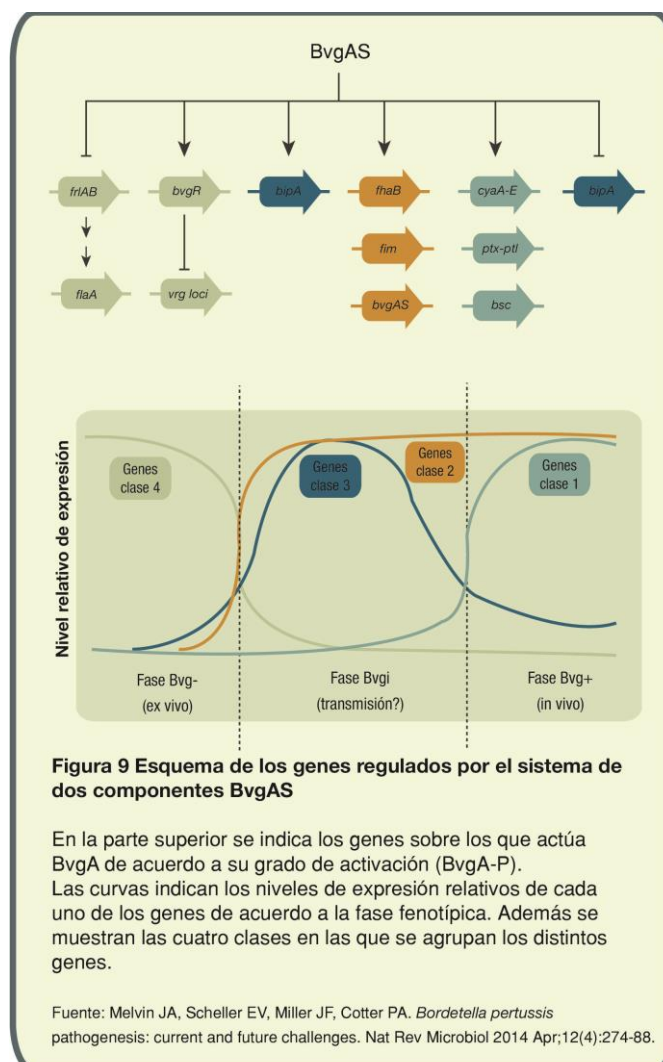


periplásmico, dicha señal es transmitida a través de la membrana al dominio de emisor, el cual mediante ATP se autofosforila en la histidina conservada del dominio HK [96]. Luego este grupo fosfato se tramite a un aspartato de dominio receptor, luego a otra histidina en el dominio Hpt que finalmente se los transfiere al dominio receptor de la proteína reguladora de la respuesta BvgA (ver Figura 8) [96]. Una vez fosforilado, BvgA (BvgA-P) es capaz de dimerizarse y unirse a secuencias específicas del DNA para activar o reprimir la transcripción de determinados promotores [97]. Simultáneamente se activa la transcripción de una tercera proteína del locus *bvgASR* cuya función es reprimir la expresión de los genes denominados en su conjunto *vrgs* (son las siglas de virulence repressed genes). Esta proteína citoplasmática de 32kDa ha sido denominada BvgR [98, 99]

Los genes regulados por este sistema BvgAS se han clasificado en cuatro clases y como resultado de su regulación diferencial, podemos encontrar a la bacteria en al menos tres fases fenotípicas distintas (Figura 9). Entre los genes de la Clase 1 se incluyen el operón *ptx-ptI* (que codifica para la PTx y su sistema de transporte), *cyxA-E* (que codifica para la ACT) y el operón *bsc* (codifica para el sistema de secreción de tipo III(T3SS)). Los niveles máximos de expresión de estos genes se alcanzan cuando BvgAS está completamente activado, y se denominó a esta fase como Bvg+ o fase vir+ ya que expresa todos los factores de virulencia. La Clase 2 de genes se expresan tanto en la fase Bvg+ como en la fase Bvg intermedia (Bvg_i). Esta fase Bvg_i ocurre cuando la bacteria es cultivada en presencia de los moduladores o en las primeras etapas de activación del sistema BvgAS. Dentro de la Clase 2 se encuentran los genes *fhaB* (que codifica para la Hemaglutinina filamentosa (FHA)), los genes *fim* (Fimbria) y el mismo *bvgAS*, el cual es autorregulado. De la Clase 3 de genes sólo se ha descrito un único gen denominado *bipA* (que codifica para una proteína de membrana BipA). La expresión de *bipA* es máxima en la fase Bvg_i y disminuye en las otras dos fases descriptas. Finalmente la Clase 4 de genes contiene al loci *vrg*, el cual se encuentra reprimido con la activación del sistema BvgAS. La máxima expresión de estos genes se observa en la fase denominada Bvg- o avirulenta, donde se expresan por ejemplo los genes requeridos para la síntesis del flagelo y la movilidad en el caso de *B. bronchiseptica* [92, 100].

En cuanto al rol de la regulación mediada por BvgAS *in vivo* cabe destacar que, aunque no es conocido, el hecho que el sistema se haya conservado dentro del género *Bordetella* spp sugieren su importancia en ciclo infeccioso[57]. Debido a que *B. pertussis* y *B. parapertussis*_{Hu}

no son capaces de sobrevivir fuera del huésped por períodos largos de tiempo, se hipotetizó que la regulación mediada por BvgAS debiera ocurrir dentro del tracto respiratorio. En el caso de *B. bronchiseptica* se realizaron experimentos donde empleaban cepas mutantes bloqueadas tanto en fase Bvg+ como en Bvg- [101], o donde expresaban ectópicamente factores Bvg- en un contexto de Bvg+ [102]. Estos ensayos demostraron que la fase Bvg+ era necesaria y suficiente para desarrollar la infección respiratoria en el modelo animal. En cambio, las bacterias bloqueadas en fase Bvg- no sobreviven ni desarrollan la infección, y la expresión ectópica de los factores Bvg- dieron lugar a resultados en algunos casos contradictorios [103, 104]. Más recientemente, usando sistemas reporteros de la expresión de genes, se evidenció que esta variación a la fase Bvg- no ocurriría *in vivo* [105, 106]. Sin embargo, cabe aclarar que sólo se evaluó como factor *vrg* al gen de la flagelina de *B. bronchiseptica*, por lo tanto parece ser una conclusión acotada, por lo debería ser re-evaluada a la hora de realizar generalizaciones.



En *B. bronchiseptica*, se postula que la fase Bvg⁻ es requerida para sobrevivir en condiciones limitantes de nutrientes como la que se encuentra fuera del huésped, quizás en el medio ambiente [107]. Además se ha postulado que la fase Bvgⁱ es importante para la transmisión en el modelo de infección murino [108].

Aunque las fases Bvg⁺, Bvg⁻ y Bvgⁱ son distinguibles ya que cada fase presenta la expresión específica de ciertos genes (Figura 9), es importante señalar que estos resultados aplican para *B. pertussis* en condiciones relativamente estáticas *in vitro*. En contraste, el tracto respiratorio humano es un entorno altamente variable, y bajo estas condiciones, es muy poco probable que el sistema BvgAS funcione en un sentido de prendido y apagado ('on-off'), sino que debería presentar un amplio espectro en los niveles de expresión que permitan la transición entre las distintas fases en respuesta a cambios en las condiciones ambientales locales. Debido a esta flexibilidad, se considera hoy en día a este sistema como un 'reóstato' [109].

Aunque los sistemas reguladores adicionales son sin duda importantes durante el ciclo infeccioso de *Bordetella* spp., sus funciones precisas aún no se han determinado.

RESPUESTA INMUNE FRENTE A *B. PERTUSSIS*

Para realizar una breve revisión sobre el conocimiento existente de respuesta inmune frente a este patógeno, describiremos aspectos relevantes tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. Primeramente expondremos datos sobre la inmunidad frente a infección, y luego describiremos la respuesta observada frente a la vacunación. Los datos aquí resumidos provienen tanto de estudios clínicos como de ensayos utilizando modelos animales [51, 110].

Los estudios inmunológicos señalan la complejidad de la infección por *B. pertussis*, en la cual parece no haber un único perfil de respuesta relevante sino que diversos mecanismos inmunológicos son capaces de brindar protección contra la enfermedad [51]. Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre frente a otros patógenos, en *B. pertussis* no existe un antígeno dominante sino que la respuesta a distintos antígenos y factores de virulencia de la bacteria parecen tener una contribución significativa, existiendo cierto grado de redundancia entre los mismos. La información disponible señala que tanto la inmunidad humoral como la celular

son relevantes en la resolución de la infección participando ambos tipos de respuestas en la inmunidad conferida por las vacunas [110].

RESPUESTA INMUNE INNATA

Dentro de las células que juegan un rol en la respuesta innata frente a *B. pertussis* se encuentran:

Macrófagos. Estudios *in vitro* e *in vivo* empleando el modelo de infección en animales han revelado que *B. pertussis* es capaz de persistir en los macrófagos [111, 112]. Estos hallazgos indicarían que estas células pueden proporcionar un nicho intracelular para extender la infección y diseminarse a otros huéspedes susceptibles. La mayor parte de las bacterias que son fagocitadas son destruidas dentro de los compartimentos ácidos. Sin embargo, un grupo de bacterias elude la destrucción pudiendo multiplicarse y residir en los compartimientos no ácidos [113].

Se ha observado en ratones que los macrófagos contribuyen también a la inmunidad protectora ya que su depleción en las vías aéreas conduce a un incremento de la infección causada por *B. pertussis* [114]. La capacidad de destrucción bacteriana de los macrófagos se ve aumentada por IFN- γ e IL-17 a través de un mecanismo que puede ser tanto dependiente como independiente de óxido nítrico (ON) [115]. Esto proporciona parte de la evidencia sobre la importancia de las células Th1 y Th17 en la eliminación de *B. pertussis* del huésped [116].

Células dendríticas (CD). Las CD inmaduras residentes y las infiltradas del tracto respiratorio son las responsables de sensar los patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs (del inglés, *pathogen-associated molecular patterns*) y los factores de virulencia de *B. pertussis*. Este reconocimiento promueve señales pro-inflamatorias que resultan ser cruciales para gatillar la producción temprana de citoquinas y quimioquinas [51]. Esta etapa se acompaña de la infiltración de leucocitos, seguida por la activación de células T. La unión del LPS a los TLR4 de las CD promueve la maduración de las mismas y la secreción de IL-12 e IFN- γ [117], que lleva a la inducción de células Th1 las cuales ayudan a mediar la eliminación de la bacteria. Las CD que son activadas por la AC-Hly también promueven la inducción de

células Th17 específicas, las cuales actúan junto con las células Th1 para eliminar a las bacterias.

Neutrófilos. *B. pertussis* puede sobrevivir dentro de estructuras subcelulares en los neutrófilos[118], aunque a diferencia de los macrófagos, no actuarían como reservorios intracelulares de la bacteria debido a su corta vida media. Sin embargo, los neutrófilos sí juegan un rol en la destrucción de bacterias fagocitadas. Los neutrófilos infiltran los pulmones desde los 5 días post-infección y parecen ser importantes en el control de la infección en ratones inmunes, posiblemente a través de la captación mediada por anticuerpos y la muerte intracelular [119].

Células NK. Las células NK luego de la infección por *B. pertussis* proporcionan la fuente inicial de IFN- γ , el cual es esencial para contener las bacterias dentro del tracto respiratorio y para promover una respuesta Th1 responsable de la eliminación bacteriana [120]. La depleción de las células NK lleva a la diseminación de la bacteria a otros órganos como hígado [120] y a la reducción de las células Th1 y al aumento de la respuesta Th2. Estos resultados marcan el rol de las células NK en la protección y regulación de las respuestas de células T [121]

Además de estas células existen otros mecanismos de defensa de la respuesta inmune innata entre los que se encuentran la secreción de **péptidos antimicrobianos** y **proteínas del complemento**. Todos estos elementos participan en las defensas del huésped contra la infección pero no son suficientes para eliminar al patógeno y controlar efectivamente la infección por *B. pertussis*, necesitando de una respuesta inmune adaptativa.

RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

Inmunidad humoral

La infección natural con *B. pertussis* induce la formación de IgG e IgA en ratones y humanos. La IgA secretoria (IgA-S) ha sido detectada en las secreciones de la mucosa antes que la IgG en suero, sugiriendo que puede tener un rol importante en el control de la infección de *B. pertussis* [122].

En humanos, los anticuerpos IgA e IgG que están presentes en el pulmón tendrían un rol más relevante que los que se encuentran en circulación [110]. Sin embargo, algunos

estudios mostraron que la severidad de pertussis es menor en individuos con altos niveles de anticuerpos séricos contra PTx y PRN [71]. Los anticuerpos anti-FHA parecerían tener poca relevancia y sería necesaria una combinación de anticuerpos. Estos datos estarían de acuerdo con los ensayos clínicos de las vacunas acelulares de 3 y 5 componentes.

Los hallazgos **en ratones** defectivos en inmunoglobulinas mostraron que cuando estos animales son inmunizados con una vacuna acelular o celular no son capaces de eliminar a las bacterias del huésped, sugiriendo el rol de las mismas en la protección [123]. Todos estos datos muestran que los anticuerpos juegan un rol importante en la defensa contra el patógeno aunque no hay un correlato directo entre protección y título de anticuerpos. De hecho, recientemente se ha establecido que la respuesta humoral por sí sola no alcanza para brindar una protección completa frente a la infección por *B. pertussis* [110].

Inmunidad celular

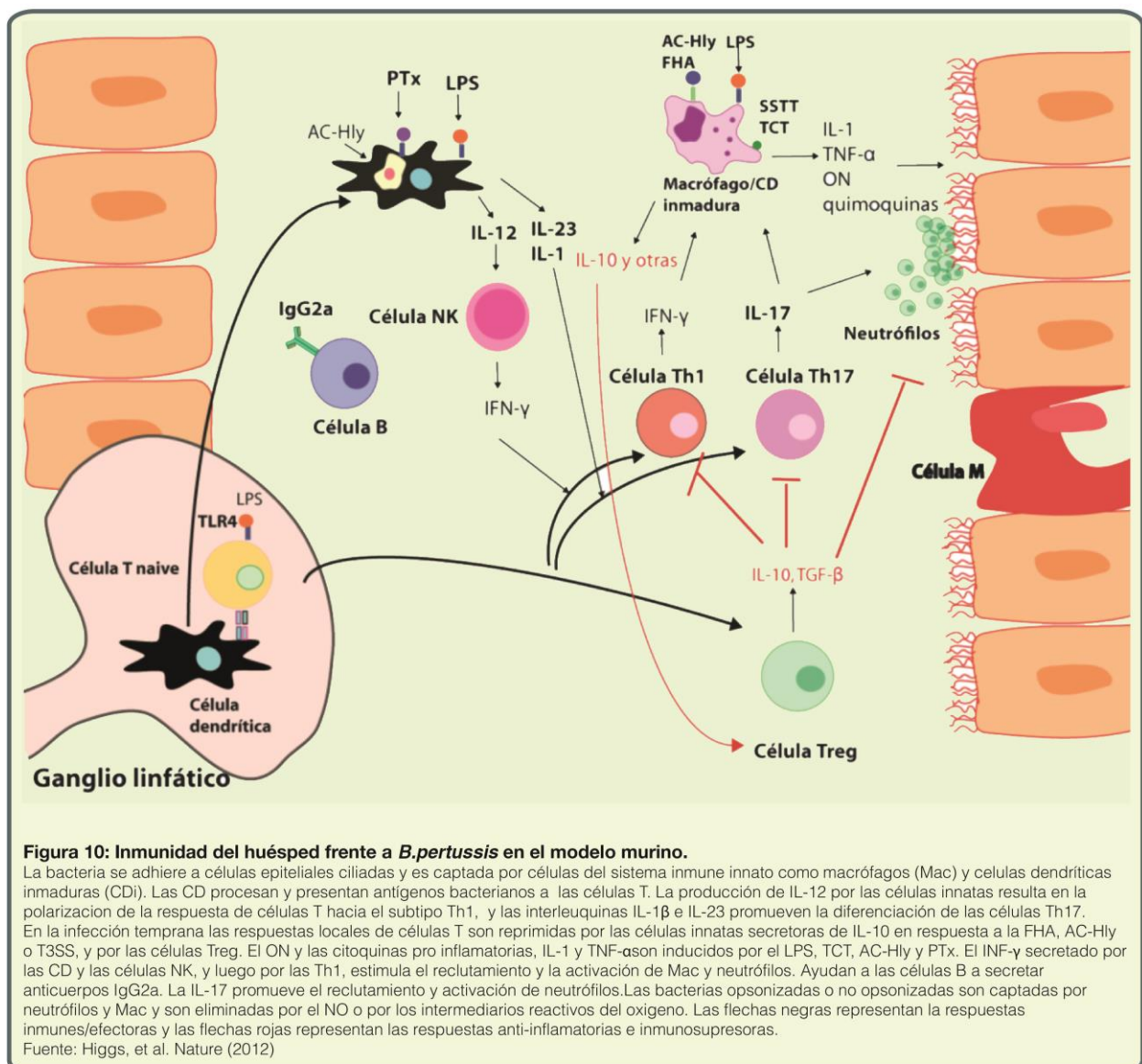
Si bien al comienzo los estudios sobre la inmunidad protectora contra pertussis se centraron en el análisis de la respuesta de anticuerpos en suero, existe evidencia creciente de que la inmunidad celular es necesaria para el control efectivo de la infección inducida por *B. pertussis* [26].

En humanos, la infección por *B. pertussis* da como resultado la producción de células T CD4+ específicas para los antígenos PTx, FHA y PRN [124, 125]. Más aún, se encontró que en sangre de bebés que padecían tos convulsa, las células T presentes secretaban IFN- γ e IL-2, pero poco o nada de IL-4 o IL-5 [125]. Estos resultados, que han sido confirmados por otros estudios [126, 127], sugieren que durante la infección por *B. pertussis* se desencadena una respuesta de tipo Th1. Por otra parte, estudios recientes han sugerido que las células Th17 también son inducidas en respuesta a la infección con *B. pertussis* [115].

En ratones, las células T $\gamma\delta$ son reclutadas tempranamente a los pulmones luego de la infección con *B. pertussis* [128]. Por otra parte, células CD4+ específicas de antígeno de ratones infectados o convalecientes secretan IFN- γ y/o IL-17, lo que sugiere que las células Th1 y Th17 son inducidas por la infección con *B. pertussis*, al igual que en humanos [121, 129]. El IFN- γ producido por las células Th1 activa la producción de óxido nítrico por los macrófagos, el cual ayuda a eliminar la bacteria [130, 131]. Curiosamente, ratones IFN- γ -/- pueden eliminar a la bacteria si sobreviven a la infección inicial aunque carezcan de una respuesta

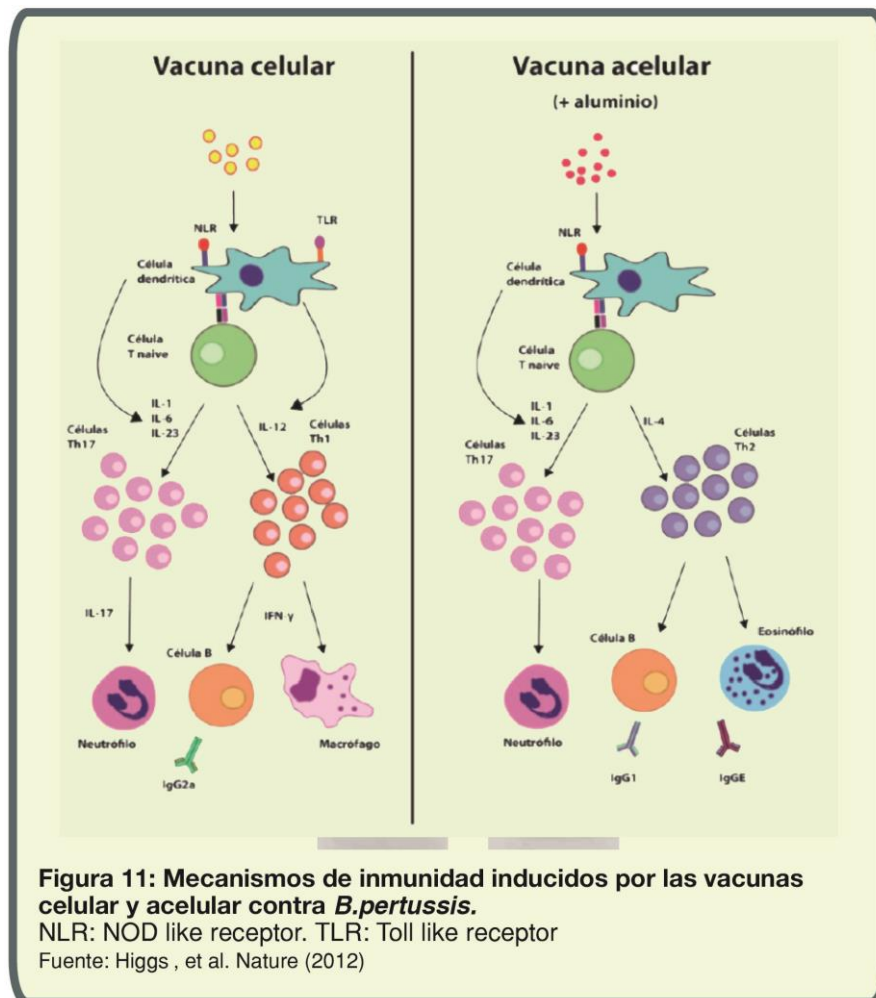
Th1 y no desarrollen una respuesta Th2 [132]. Esta eliminación de la bacteria probablemente ocurra a través de la función de las células Th17. Las células CD4+ que producen IL-17 son inducidas durante la infección [119, 129, 133] y su inducción es impulsada por las citoquinas de la respuesta innata, IL-1 e IL-23. Estas células CD4+ productoras de IL-17 son críticas para la eliminación de *B. pertussis* mediada tanto por macrófagos como por neutrófilos [115, 134]. Por otra parte, luego de la infección primaria con *B. pertussis* en ratones se producen muy pocas células Th2. Más aún, ratones IL-4-/- eliminan a la bacteria de la misma manera que los ratones salvajes [135]. Por lo tanto, la inducción de una inmunidad adaptativa eficaz contra *B. pertussis* requiere tanto de células Th1 como Th17.

En la Figura 10 se muestra la respuesta inmune del huésped frente a *B. pertussis* en el modelo murino.



INMUNIDAD INDUCIDA POR LA VACUNACIÓN

En relación a la inmunidad inducida por vacunación, resulta importante tener en cuenta que en la actualidad existen dos tipos de formulaciones vacunales, una denominada celular o wP (del inglés, *whole cell pertussis vaccine*) constituida por una suspensión de bacterias enteras muertas por calor y detoxificadas, y otra acelular denominada aP (del inglés, *acellular pertussis vaccine*) o de componentes constituida por antígenos purificados (ver más adelante). La respuesta inmune que generan ambos tipos de vacunas está representada en la Figura 11. En las vacunas wP se incluyen PAMPs tales como LPS, que inducen la activación de las interleuquinas IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23 por las CD y los macrófagos. Estas citoquinas proinflamatorias promueven la inducción de células Th1 y Th17 a partir de células T *naive*. El IFN- γ y la IL-17 estimulan la producción de anticuerpos opsonizantes y la activación de macrófagos y neutrófilos que ayudan a lisar las bacterias que persisten dentro de las células [110]. Por el contrario, las vacunas aP, que se administran junto con hidróxido de aluminio como adyuvante, carecen de PAMPs pero estimulan la producción de IL-1, y en consecuencia de células Th17. Las células Th17 ayudan al reclutamiento y activación de neutrófilos, los cuales captan y aniquilan a *B. pertussis*. Las células Th2 son también inducidas por la influencia de la IL-4 y proporcionan ayuda a las células B para la secreción de inmunoglobulina E (IgE), IgG1 e IgG3, las cuales evitan fundamentalmente la adherencia de la bacteria al epitelio respiratorio.



ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA ENFERMEDAD

Antimicrobianos

Para el tratamiento de esta patología y en el control de foco, se emplean antimicrobianos de forma de favorecer la eliminación bacteriana de las vías respiratorias y limitar la transmisión a los contactos susceptibles. Existen varios antimicrobianos con actividad *in vitro* efectiva contra *B. pertussis*. Los antimicrobianos recomendados en la terapéutica son los macrólidos como eritromicina y también los más nuevos como azitromicina o claritromicina. En caso de intolerancia a los mismos puede emplearse trimetoprima sulfametoxazol (TMS). La duración del tratamiento será de 7 o de 14 días según el antimicrobiano que se emplee. Si el tratamiento se instaura en la primera semana de iniciados los síntomas, durante la fase catarral de la enfermedad, su efecto es el de reducir la

duración y severidad de los síntomas y de esta manera se logra eliminar al organismo del tracto respiratorio superior dentro de los cinco días de iniciada la terapia. Sin embargo, a veces esto no es posible ya que existen demoras en la consulta al médico, en la sospecha de caso y en su confirmación en el laboratorio. Esta serie de factores lleva a la indicación de tratamiento con antibióticos con el objetivo fundamental de limitar la diseminación de la enfermedad, ya que no produce efectos apreciables sobre la duración ni la severidad de los síntomas. Es así que la recomendación es la administración de antibióticos en las primeras cuatro semanas de iniciados los síntomas y en las seis a ocho semanas para individuos que están en contacto con personas de alto riesgo como niños, mujeres en el tercer trimestre de embarazo y profesionales de la salud [136]

El uso de antibióticos también está indicado como quimioprofilaxis (QP) para los contactos de casos detectados [25, 137]. Está demostrado que la QP disminuye la tasa de casos secundarios pero no previene la infección. Se obtiene la mayor eficacia cuando se administra antes de los 21 días de la aparición de síntomas en el caso índice. Para evitar el uso indiscriminado de macrólidos, que conduce a un aumento en la resistencia de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*, actualmente se recomienda brindar QP post-exposición sólo a los contactos íntimos de pacientes de alto riesgo, incluyendo dentro de estos a: menores de 1 año de edad, mujeres embarazadas en el tercer trimestre, pacientes inmunocomprometidos, pacientes con enfermedades crónicas, etc. En los últimos años se ha sugerido también la QP para trabajadores de la salud y personal de escuelas .

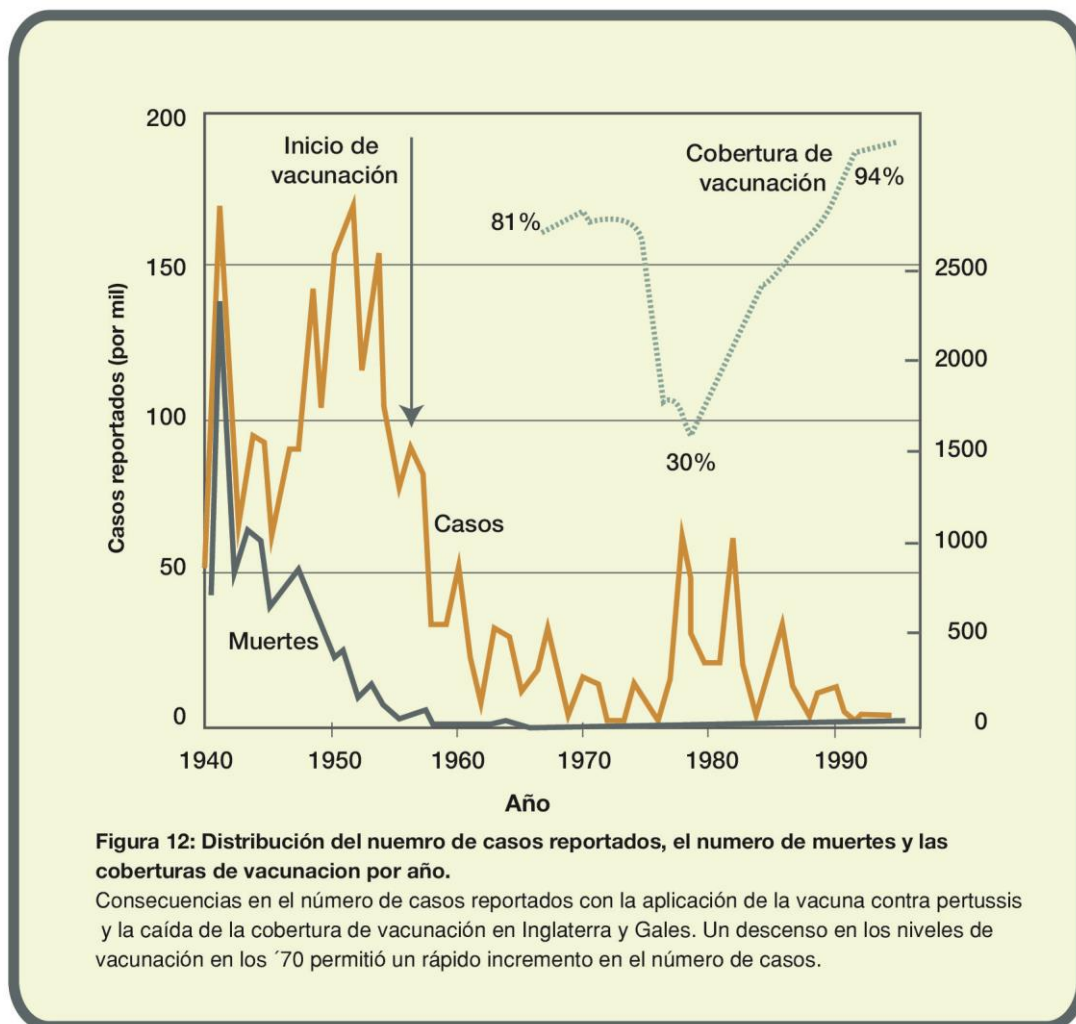
Vacunas

El desarrollo de vacunas contra pertussis comienza temporalmente en 1906 cuando se logra identificar al agente causal de la enfermedad. La metodología utilizada consistía en preparar una suspensión del agente causal inactivado por calor y detoxificada con agentes químicos. Aunque en la década de 1920 ya existían varias vacunas contra otras enfermedades, el caso de la vacuna contra pertussis fue bastante cuestionado. Recién en 1923 el investigador danés Madsen logro no sólo desarrollar una vacuna celular sino que evidenció su efectividad durante un brote en la Islas Faroe. Durante su aplicación también se evidenció por primera vez la aparición de reacción adversas asociadas a la vacunación [138, 139]. Luego de usarse algunas formulaciones desarrolladas por las empresas farmacéuticas, en 1931 la Asociación

Médica Americana estadounidense declaró que las vacunas contra pertussis licenciadas desde 1914 parecían no tener absolutamente ninguna influencia en el desarrollo de la enfermedad [117]. Posteriormente Pearl Kendrick y Grace Elderling comenzaron sus estudios sobre pertussis en 1932 en Michigan, Estados Unidos. Durante estos años llevaron adelante varios ensayos clínicos rigurosamente diseñados, en los que establecieron los niveles de protección de las vacunas por ellas mismas desarrolladas. Fue esta la primera vez que se hicieron ensayos clínicos en la población general, y no en niños institucionalizados o población carcelaria [140]. Las vacunas por ellas utilizadas estaban formuladas en base a una mezcla de cepas locales recientemente aisladas. En 1940 estas investigadoras incluyeron sales de aluminio como adyuvante y toxoide diftérico para proteger a la población de esta patología prevalente [141]. Además este grupo de investigación desarrolló en 1946 un test en ratones que incluía un desafío intracraneal que permitió evaluar la potencia de la vacuna [142]. Este test correlaciona con la protección en humanos y por ello continúa utilizándose. Los resultados alcanzados con esta formulación fueron satisfactorios, y así en los años cincuenta la vacuna de Kendrick y Elderling comenzó a usarse masivamente en Estados Unidos. En el año 1949 se adicionó el toxoide tetánico a la formulación de las investigadoras. La vacuna así formulada, denominada **vacuna triple bacteriana DTP** (por Difteria Tétanos Pertussis) mostró una buena respuesta para cada uno de los antígenos que la constituían [143]. Es desde entonces que esta vacuna celular DTP se comenzó a usar masivamente. La vacuna mostró muy buenos resultados, disminuyendo 20 veces la incidencia de la enfermedad para 1960. Se la ha incluido así en todos los calendarios de vacunación nacionales de muchos países y desde 1974 en los programas de inmunización de la Organización Mundial para la Salud (EPI de la OMS Expanded Program of Immunization).

Las vacunas celulares han demostrado alcanzar entre un 80 a un 95% de efectividad dependiendo de la definición de caso empleado en los ensayos clínicos [144]. Sin embargo, se ha reportado la aparición de **reacciones secundarias adversas** asociadas a la vacunación. Entre otros se han descripto llanto prolongado e inconsolable y convulsiones febriles. Para eventos como el síndrome de muerte súbita de los niños, que también fue atribuido al empleo de vacunas celulares contra pertussis, no existen resultados que puedan indicar una relación causal y para otros desordenes la evidencia es insuficiente como para extraer conclusiones contundentes que lleven a la no recomendación del uso de estas formulaciones.

Sin embargo la publicidad de los efectos adversos determinaron que en la década del '70 diversos países desarrollados como Japón, Suecia, Alemania, Italia e Inglaterra suspendieran el uso de la vacuna celular de pertussis o implementaran una vacunación voluntaria. Esta determinación trajo aparejado un aumento muy marcado en la incidencia de casos reportados (Figura 12).



Esta situación llevó al desarrollo de una nueva generación de vacunas, las vacunas acelulares o de componentes. Las primeras formulaciones acelulares contenían sólo toxina pertussis, luego se fueron adicionando diferentes componentes. En la actualidad existen formulaciones de tres a cinco componentes formuladas con PTx, FHA, y Prn en el primer caso y en el segundo se agregan además los dos serotipos de antígenos fimbriales (Fim2 y Fim3).

Todas las vacunas acelulares han mostrado ser seguras y presentar menor reactogenicidad que la vacuna celular. En cuanto a la efectividad de estas vacunas, la misma

fue probada en varios ensayos clínicos en distintos países. Aunque no es sencillo comparar los resultados obtenidos en cada uno de estos ensayos - fundamentalmente a raíz de las distintas definiciones de caso adoptadas en cada estudio- el consenso general es que las vacunas acelulares de mayor número de componentes mostraron una eficacia al menos similar a la de las vacunas a células completas [145].

En la actualidad no existe un consenso internacional respecto a qué vacuna emplear, ni qué esquema de vacunación seguir, así hay países que sólo emplean en sus Calendarios Nacionales de Vacunación vacunas celulares, otros que emplean en las primeras dosis vacunas celulares y luego realizan refuerzos con vacunas acelulares y otros usan vacunas acelulares en todo el esquema de vacunación.

Una diferencia significativa que se describe para ambas formulaciones vacunales, es la distinta respuesta inmune que se obtiene luego de la inmunización con cada una de ellas. Por un lado las vacunas celulares se caracterizan por dar una respuesta más de tipo celular (una respuesta más polarizada a la tipo Th1) mientras que la respuesta a las vacunas acelulares estaría mediada principalmente por una respuesta humoral (respuesta del tipo Th2) [51]. En ningún caso la inmunidad conferida es de por vida. La duración de la protección luego de la vacunación varía según el tipo de vacuna, el plan de vacunación, el nivel de exposición y la edad de aplicación de la primera dosis [146]. La inmunidad protectora en el caso de las vacunas parece no superar los 12 años. Tampoco la infección natural confiere inmunidad de por vida, se ha estimado que la duración de la inmunidad hasta que el individuo puede infectarse nuevamente varía de 7 a 20 años [147].

Dado que en un momento los perfiles de eficacia para los dos tipos de vacunas pareció ser similar, la elección de qué clase de vacunas emplear dependió de cada país. Las estrategias elegidas por cada uno se basaron en la historia nacional de la enfermedad, de la calidad y disponibilidad de las vacunas [148]. La mayoría de los países en desarrollo hoy emplea vacunas celulares debido al menor costo de las mismas. En general, los países desarrollados han modificado sus calendarios nacionales de vacunación y han incorporado el uso de vacunas acelulares en todo el esquema [149]. Más allá de que vacuna se utilice, la mayoría de las naciones recomiendan una serie primaria de 3 dosis entre las 6 semanas y los 6 meses de

vida, (WHO Expanded Program of Immunization). Muchos calendarios incluyen además refuerzos y una cuarta o quinta dosis a los 4-6 años de edad.

Debido al creciente número de casos entre individuos adolescentes y adultos, en los últimos años se ha recomendado el empleo de dosis de vacunas como refuerzos sobre estos grupos etarios. Las formulaciones vacunales acelulares son las utilizadas con este fin, ya que éstas tienen menor probabilidad de inducir efectos adversos en paciente no infantiles. Se han formulado incluso vacunas acelulares dirigidas específicamente a adolescentes y adultos constituidas por los mismos componentes que las formulaciones pediátricas, pero con distinta cantidad de cada uno de ellos, sobre todo se suele disminuir la cantidad de la toxina pertussis [150]. Los grupos de adultos en los que se ha recomendado el uso de vacuna contra pertussis son el de mujeres embarazadas o puérperas y sus grupos familiares cercanos (estrategia capullo o cocoon), personal de salud y los individuos que tengan al cuidado grupos de niños [11, 14].

En nuestro país la vacunación contra la tos convulsa se vale de la vacuna pentavalente DTP-Hib-HB (Difteria, Tétanos, pertussis, *H. influenzae* tipo b y Hepatitis B) recomendada en el Calendario Nacional de Vacunación en 3 dosis a los 2, 4, 6 meses y a los 18 meses se recomienda la cuarta dosis con vacuna cuádruple bacteriana DTP-Hib. Finalmente se indica un refuerzo a los 6 años con vacuna triple bacteriana DTP. Recientemente se ha incluido en el calendario un nuevo refuerzo a los 11 años con vacuna triple bacteriana acelular DTaP [151].

Todo este escenario diverso respecto de las vacunas en uso parece ser consecuencia, entre otros, de la falta de un conocimiento acabado de la patología, su dinámica y epidemiología.

EPIDEMIOLOGÍA

En esta sección abordaremos un aspecto esencial de la enfermedad que enmarca nuestro trabajo. El mismo está referido a la detección desde hace más de 20 años de manera sostenida de un incremento significativo de casos de pertussis, pese a utilizar en forma masiva vacunas contra la enfermedad desde hace más de 60 años [152-155]. Esta situación

epidemiológica ha llevado a considerar a pertussis como una enfermedad resurgente y un problema para la salud pública tanto en países industrializados como en vías de desarrollo [156-160].

A continuación presentaremos una selección de datos epidemiológicos que entendemos reflejan claramente la situación antes descrita. En particular proporcionaremos datos de Estados Unidos no sólo por su experiencia de años en la vigilancia epidemiológica de la enfermedad sino por el fácil acceso a los datos [161, 162]. Incluiremos también datos de Argentina no sólo por nuestro interés particular sino por nuestra accesibilidad a la información epidemiológica por ser Laboratorio Nacional de Referencia de la enfermedad en nuestro país.

Empezaremos analizando dos épocas epidemiológicas diferenciadas por el uso de vacuna contra esta enfermedad: la era prevacunal y la vacunal (figura 3). La era prevacunal es anterior a la década del cincuenta y la vacunal posterior [163]. En la era prevacunal la enfermedad era la primera causa de muerte por infecciones en niños afectando principalmente a los niños menores de 5 años [164].

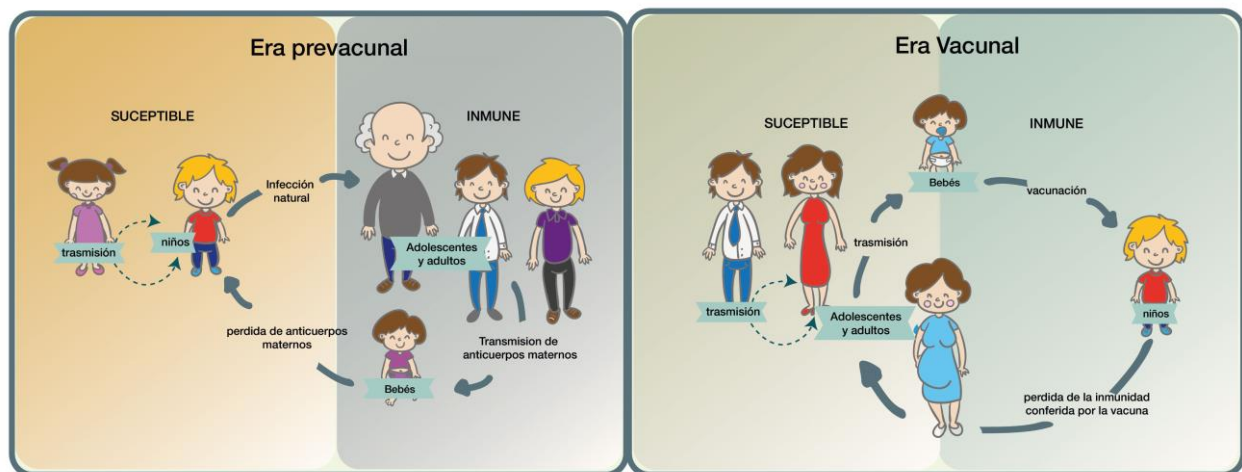
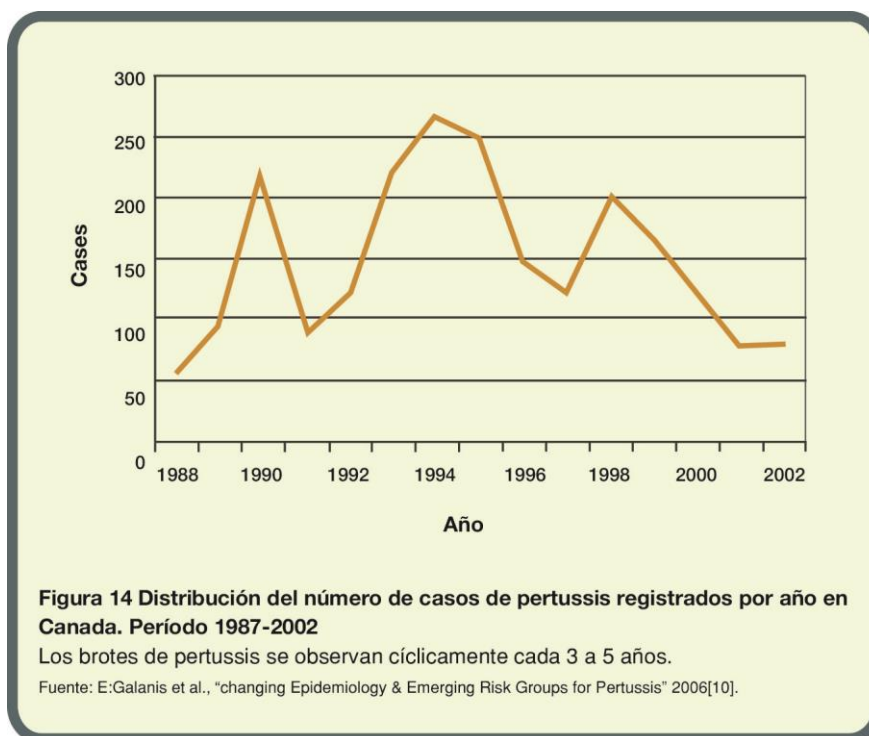


Figura 13: Transmisibilidad de pertussis en la era pre y post vacunal.

Fuente: Pertussis— Not Just for Kids. Erik L. Hewlett, M.D., and Kathryn M. Edwards, M.D. n engl j med 352;12 www.nejm.org march 24, 2005.

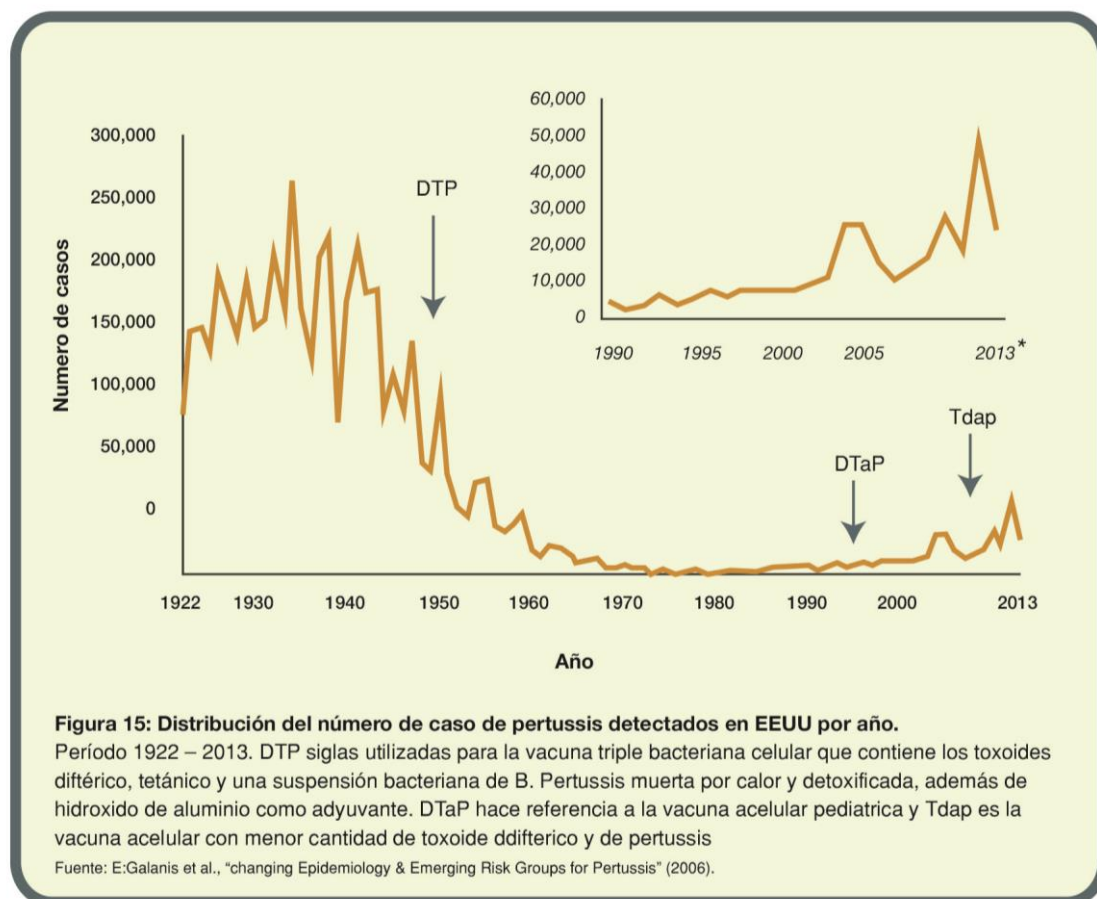
En el caso de Estados Unidos por ejemplo, esta enfermedad a partir de 1922 fue considerada de notificación obligatoria registrándose así un total de 100.000-300.000 casos por año. En el 1934 el número de casos notificados fue 265.000 [165]. La incidencia anual promedio era de 157/100 000 habitantes con tasa de muerte de 1 cada 10 casos. Pertussis así provocaba la muerte de más niños que los causados por enfermedades como la Polio y la Viruela juntas [166]. En Inglaterra y Gales, la incidencia de pertussis durante la era prevacunal fue de 230/100 000 habitantes. Esta incidencia podría ser aún mayor, ya que existen estimaciones que indican que la situación era aún peor y que estos valores de incidencia en realidad se corresponden con el 20% del total de los casos reales debido al subreporte y subregistro de la enfermedad [26]. Otra característica epidemiológica de la enfermedad, tanto la era prevacunal sino en la vacunal, es que la enfermedad se presenta con brotes epidémicos cada 3 a 5 años [164].



El patrón cíclico de epidemias como el representado en la Figura 14 parece deberse a la acumulación de un número significativo de personas susceptibles a la infección que pueden propagar la enfermedad rápidamente dada la alta contagiosidad de la misma [167]. El hecho que el patrón cíclico se presente también en la era vacunal parece deberse a que la inmunización controla la enfermedad pero no la infección ni la circulación de pertussis. Esta

falla en las vacunas fue propuesto por varios autores como Fine y Clarkson hace más de 30 años , y aún sigue sosteniéndose de manera más generalizada [168].

El desarrollo de la primeras vacunas celulares (wP) y su aplicación masiva a partir de la década de 1940 dio comienzo a una nueva era epidemiológica para pertussis, la era vacunal. En 1943 la Academia Americana de Pediatría recomendó la aplicación sistemática de 3 dosis de vacuna acelular y un refuerzo lo que redujo drásticamente la morbilidad y la mortalidad asociada a esta enfermedad. Así, para EEUU ya para el año 1948 se notificaban menos de 100.000 casos por año, llegando a un mínimo histórico de casos en 1976 con 1010 casos reportados en todo el país [166]. Esta disminución de casos resultó del 92,2% si se analizan los casos de la era prevacunal y vacunal; como puede observarse en la siguiente Figura 15

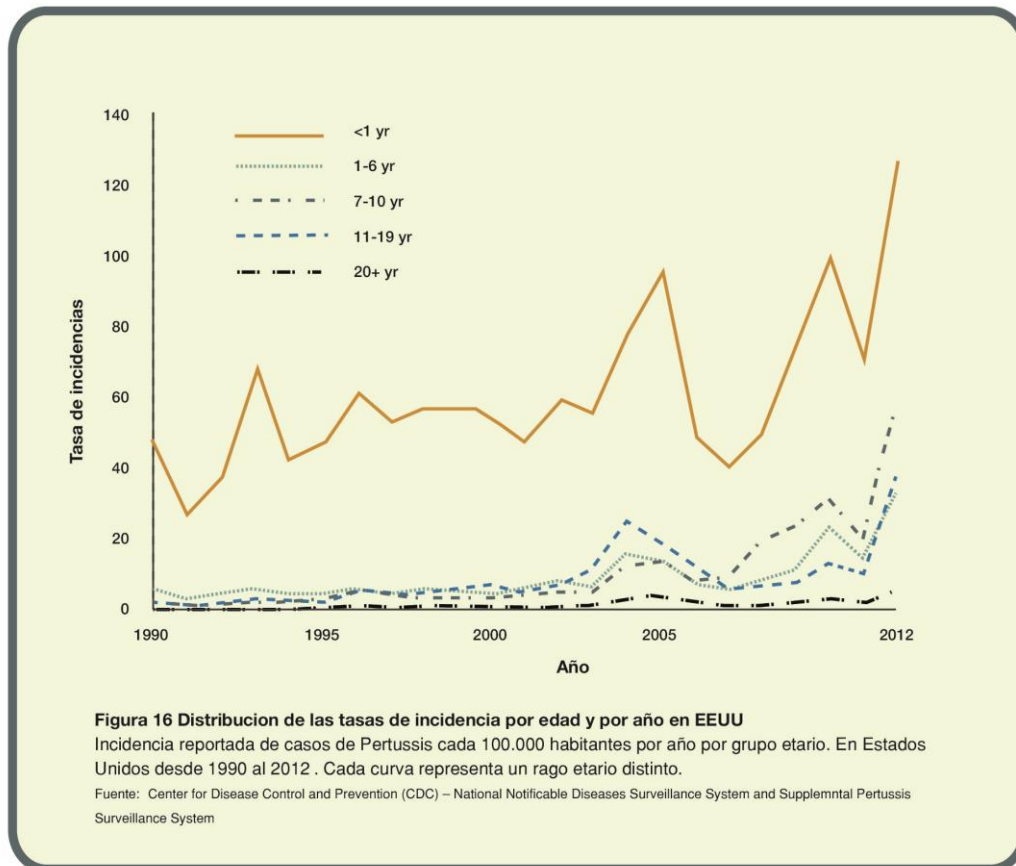


De hecho entre los años 1976 y 1982 la incidencia de pertussis en EEUU fue de 0.5 a 1.0 casos cada 100.000 habitantes. Como hemos señalado el número de muertes también se redujo significativamente: 99,3% respecto de la era prevacunal [169].

Sin embargo, el éxito de estas vacunas celulares comenzó a ensombrecerse con la aparición de reportes que hablaban sobre reacciones adversas asociadas a la vacunación. Estas reacciones podían ir desde un enrojecimiento en el lugar de la inyección hasta convulsiones e incluso la muerte. La Organización mundial de la Salud estimó que se producían 1 muerte cada 310.000 vacunaciones. Estos datos resultaron preocupantes y en algunos casos llevó a la no aceptación de la vacuna con el consiguiente aumento en el número de casos y de muertes. Así, las investigaciones sobre pertussis se focalizaron al desarrollo de nuevas vacunas menos reactogénicas [170, 171]. En 1981 se licencia la primera vacuna contra pertussis constituida por inmunógenos proteicos purificados. Comienza entonces el desarrollo de las vacunas de componente o acelulares (aP) las cuales fueron primeramente utilizadas en los países industrializados [57, 172]. La asociación de reacciones graves con las vacunas celulares nunca fue demostrado por lo que la OMS recomendó su uso para la población menor de 7 años [171].

Las vacunas acelulares por su parte podrían ser utilizadas en la población pediátrica pero también en los mayores de 7 años. Así, EEUU en el año 1992 decide recomendar un esquema de vacunación consistente en 3 dosis con vacuna celular y 2 refuerzos con vacuna acelular. En el año 1997 recomienda usar en todo el calendario vacuna acelular [166]. Sin embargo desde ese momento y en adelante, EEUU como otros países ha registrado un constante incremento en el número de casos acompañado con un corrimiento en la edad de los pacientes con mayor incidencia hacia el grupo de adolescentes y adultos [173] además de los infantes menores de 1 año de edad (Figura 16)

Los adolescentes y adultos son considerados la fuente de infección de los niños más pequeños que son los más vulnerables a la enfermedad y los que presentan mayor sintomatología y proporción de muertes causadas por la enfermedad [163]. Este incremento en la población adolescente vacunada, muy probablemente sea un reflejo de la pérdida de inmunidad conferida por la vacuna [166]. En este punto es interesante resaltar que la inmunidad conferida por la infección tampoco dura toda la vida. De hecho se estima que la duración de la inmunidad conferida por infección es de 15 a 20 años, mientras que la duración de la inmunidad adquirida por la vacunación es de 10 – 12 años en el caso de las vacunas celulares y de 3 para las acelulares [147, 174].



Así en EEUU para el año 2000 se registraron tasas altas de incidencia para los infantes pero también para los grupos de 11 a 19 años [166]. Esta situación epidemiológica que se repitió en los años posteriores llevó a licenciar y luego recomendar la aplicación a la población de 11 años de edad de una dosis de refuerzo con una vacuna aP. Esta vacuna presenta menor contenido de toxoide diftérico y el inmunógeno toxina pertussis (Tdap) para disminuir la aparición de posibles reacciones adversas [175]. La situación en países como EEUU no pudo controlarse con aquel refuerzo y nuevos refuerzos fueron recomendados: vacunación al personal de salud en contacto con niños, vacunación en embarazadas, vacunación en adultos.

Pese a la incorporación de estos refuerzos, la situación epidemiológica en EEUU de pertussis se describe como preocupante ya que entre el 2001 y 2010 se reportaron 189 muertes de casi 28 mil casos de Pertussis en infantes (6,8/100000 casos fatales en casos de infantes) [10]. La situación parecería ser aún peor porque se estima que hay un subregistro de las muertes por pertussis en las hospitalizaciones del orden de 2 a 3 veces menor a la real [176]. Durante el año 2010 y 2012 ocurrieron brotes epidémicos de gran envergadura en distintos estados de EEUU. En el brote detectado en California en 2010 y en Washington en

el 2012, la mayor incidencia se encontró en niños menores de 1 año [154, 164, 166] pero también en los niños de 7 a 10 años, que en su mayoría habían recibido hasta 5 dosis de vacunas acelular (vacuna acelular pediátrica, TDaP) y en adolescentes de 13 -15 años de edad que habían recibido el refuerzo de los 11 años. Todos estos datos sin dudas evidencian las falencias en las actuales vacunas contra pertussis. En el 2012 en todo el país, se reportaron 48.277 casos de pertussis, incluidas 20 muertes relacionadas con esta afección, la mayoría en bebés menores de 3 meses. Este número de casos es el más alto desde el año 1955. En el año 2013 el número de casos de pertussis total país disminuyó a 28. 639 casos aunque 13 estados y Washington, D.C. registraron aumento de casos. Para ese año, la mayores tasas se observaron nuevamente en los infantes, adolescentes de 13 y 14 años, así como en los de 15. Hasta mediados del 2014, 50 estados y Washington, D.C. reportaron 17. 325 casos de pertussis lo que representa un aumento del 30 % en comparación con el mismo periodo en el 2013[166].

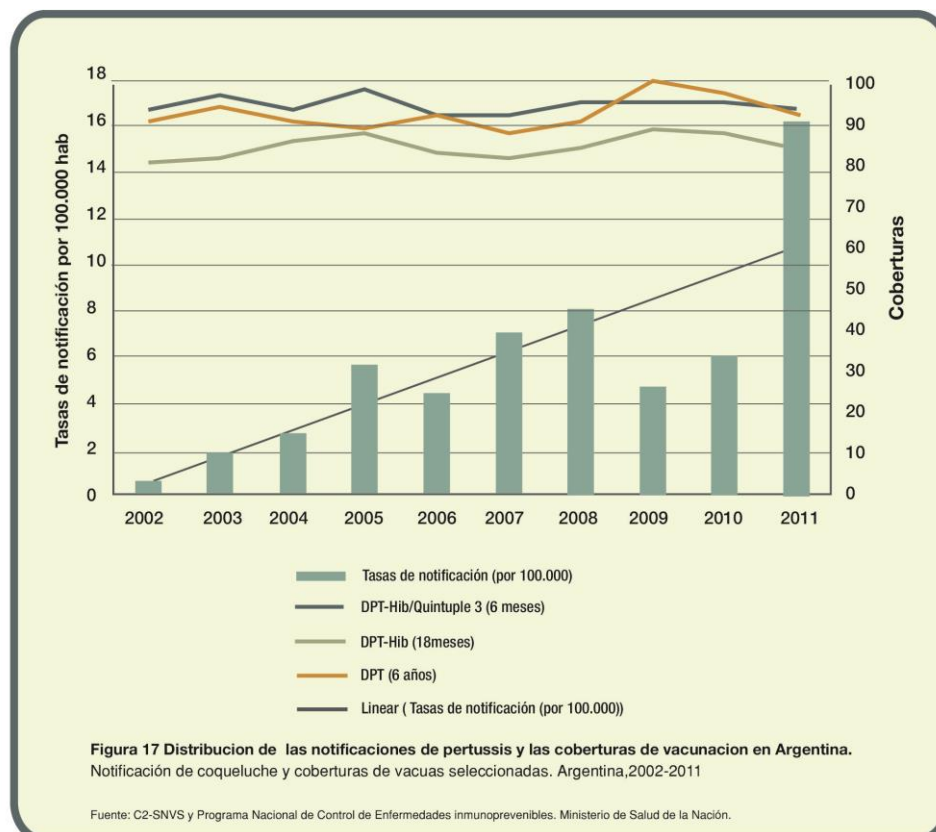
Una situación similar se ha descripto para diferentes países de Europa, Asia, Latinoamérica y Oceanía [153]. Por ejemplo, en Europa entre los años 2003-2007 se notificaron 43.500 casos con una tasa de incidencia de 4,1/100.000 y de 35,3/100.000 para niños menores de 1 año de edad. Durante dicho período se detectaron 30 muertes, el 87% de las mismas registradas en los niños ≤ 1 año. La tasa de hospitalizaciones fue de 82/1.000 casos de pertussis [177]. Para el año 2010 de manera alarmante se reportaron 15.750 casos y en el 2012 56.000 casos de pertussis [178, 179]. En Suiza los valores de incidencia se mantuvieron por debajo de 100 casos cada 100 000 habitantes hasta el año 1993, pero a partir de ese año se comenzó a detectar un aumento de casos llegando a tasas de 185 /100 000 [180]. En Holanda, hasta el año 1996 las tasas fueron inferiores a 2.3 casos por 100 000 habitantes pero a partir de ese año se detecta un aumento que llega a un pico de incidencia de 27.2/100 000 con coberturas a vacunales de más del 97%. En el brote epidémico de 1996 se detectó un aumento en la incidencia en los niños de 4 a 9 años de edad y vacunados, lo que se considera otro ejemplo de la disminución en la efectividad de la vacuna aplicada quizás como consecuencia de una población bacteriana divergente a la contenida en las vacunas[160].

La situación en Holanda abrió un nuevo campo de investigación en pertussis el cual está referido a la caracterización de la población bacteriana circulante. Fue a partir del brote de 1996 que se comienzan a detectar variantes alélicas en la población bacteriana circulante

que son diferentes a las contenidas en las cepas que se utilizan en la producción de vacunas [181]. Así, la genotipificación de aislamientos clínicos de *B. pertussis* circulantes mostró la existencia de 17 variantes alélicas de la región promotora de la toxina pertussis *ptxP*, 5 variantes de la proteína de la subunidad PtxA de la toxina pertussis, 13 variantes de la proteína PRN y 2 variantes alelicas de *fim2* y de *fim3* [182]. Se pudo evidenciar que las cepas que se usan en la producción de vacunas y los aislamientos más antiguos contienen el geno/fenotipo *ptxP1-ptxA2/4-PRN1-Fim2*. Los aislamientos más reciente contiene en cambio el geno/fenotipo *ptxP3 ptxA1fim3 PRN2 -Fim3* [183, 184]. Esta divergencia entre las cepas vacunales y la población bacteriana circulante actual podría en parte explicar el resurgimiento de la enfermedad [185].

En nuestro país la enfermedad también se describe como endémica con brotes epidémicos cada 3-5 años [186]. En la Argentina la vacunación masiva contra la enfermedad pertussis se comenzó más tardíamente ya que fue incorporada en la década de 1970 [187]. Como ya hemos mencionado el esquema de vacunación que se emplea en la actualidad en nuestro país consiste en 7 dosis totales. Las tres primeras dosis a los 2, 4 y 6 meses de edad con la quintuple bacteriana celular (Difteria, Tétanos, Pertussis, Haemophilus tipo b, Hepatitis B, DTP-Hib Hb), luego un refuerzo a los 18 meses con la Cuadruple bacteriana (Difteria, Tétanos, Pertussis y Haemophilus tipo b, DTP-Hib) o quintuple, otro al ingreso escolar (5-6 años) con la triple bacteriana celular (Difteria, Tétanos, Pertussis, DTP) y el último a los 11 años de edad con la vacuna triple acelular (dTap). También se ha incluido un refuerzo a las embarazadas y una dosis al personal de salud ambas con la dTap [151]. Hasta el año 1985 se aplicaban las 3 dosis primarias y el refuerzo de los 18 meses, luego se incluyó el refuerzo al ingreso escolar y a partir del año 2011 se incorporó el refuerzo de los 11 años, y más recientemente a las embarazadas y personal de salud [151].

Argentina luego de la incorporación de la vacunación registra un descenso sostenido de casos hasta el año 2002. A partir del año 2003 se detecta un aumento en el número de casos que en el año 2011 llega a su valor más alto con 16 casos de pertussis por cada 100.000 habitantes. En dicho año también se registró el mayor número de fallecimientos asociados a la enfermedad (76 fallecimientos). Todas las muertes ocurrieron en el grupo de menores de 1 año, excepto cinco casos que ocurrieron en el grupo de 1-4 años (3), 25 a 34 años (1) y mayor de 75 años (1). Entre 2002-2011, las coberturas de vacunación anti-pertussis a nivel nacional para la 3ra dosis de la serie primaria y para la correspondiente al ingreso escolar estuvieron por encima del 90%, mientras que el refuerzo de los 18 meses presentó coberturas entre 80 y 90% (Figura 17). El refuerzo de los 11 años, incluido en el Calendario desde 2009, tuvo una cobertura del 54,6% y 72,8% en los años 2010 y 2011 respectivamente.



Respecto de la distribución de casos respecto de la edad de los pacientes, la mayoría de los casos se registra en los niños más pequeños. Es importante aclarar aquí que quizás esta mayor proporción se deba en parte a que la vigilancia de pertussis en la población adolescente adulta es débil.

La situación epidemiológica de la enfermedad en nuestro y otros países ha mostrado que la enfermedad representa en la actualidad un problema grave para la salud pública. Las

causas de esta situación se están debatiendo fuertemente, de forma que en base al conocimiento de las mismas se puedan dar respuestas efectivas que lleven a un mejor control de la enfermedad. En este contexto se ha incrementado el desarrollo y uso de modelos matemáticos de forma de poder evaluar más oportunamente las estrategias de control que se están proponiendo.

Las posibles causas hasta ahora esgrimidas para la resurgencia de la enfermedad hacen referencia a mejoras en el diagnóstico laboratorial y a la vigilancia en general, pero también a las debilidades en las vacunas disponibles tanto de las clásicas vacunas celulares como de las vacunas acelulares más modernas: relativa baja efectividad, necesidad de muchas dosis con coberturas del 95% para lograr protección, pérdida de la inmunidad y adaptación del patógeno a la inmunidad conferida por las vacunas.

Respecto al diagnóstico, la incorporación del diagnóstico molecular basado en ensayos de PCR ha impactado positivamente no solo en la aplicación de un tratamiento más oportuno sino en la sensibilidad de la detección del caso tanto clínica como laboratorialmente [188]. Estos casos probablemente con las metodologías basadas en microbiología y serología no podían ser detectados ni tratados llevando así a un subregistro del número de casos y una diseminación de la enfermedad por falta de acciones para controlar los focos. La incorporación de sistemas de notificación online también ha permitido una mejora del registro y una disminución en el subreporte. Estas mejoras sin dudas han permitido una mejor visualización de los casos circulantes que en los primeros años de aplicación motivaron la detección de un aumento de casos que no necesariamente son reflejo de un incremento real de casos sino en la mayor sensibilidad del sistema de salud en detectarlos [26, 189, 190].

Respecto de las vacunas utilizadas actualmente, es vasta la información que refiere a la moderada efectividad de las mismas [145, 191-199]. La efectividad de vacunas celulares y de las acelulares con 5 componentes no supera el 80% -85% dependiendo la definición de caso utilizada en los ensayos clínicos llevados a cabo para su determinación [194, 198]. Esta moderada efectividad de las vacunas obliga a los sistemas de salud a incluir en los calendarios de vacunación varias dosis (inclusive en adolescentes y adultos) para lograr protección y a lograr coberturas de vacunación altas. La alta contagiosidad de pertussis sumada a la efectividad moderada de las vacuna imposibilita la erradicación de esta enfermedad [200].

No obstante es importante destacar que el uso de las mismas ha logrado reducir la incidencia de la enfermedad un 90 % respecto de la era pre-vacunal en aquellas poblaciones donde se aplicaron con altas tasas de cobertura.

Un aspecto también preocupante de las vacunas es que la inmunidad inducida por ellas no dura toda la vida. Más aún, se ha propuesto que el uso masivo de las vacunas está ejerciendo una presión de selección sobre la población bacteriana circulante haciendo prevalecer bacterias con características geno y fenotípicas que le permiten evadir la respuesta inmune inducida por las vacunas [185, 201, 202]. En el caso de las vacunas acelulares el fenómeno de pérdida de la inmunidad y la presión de selección ejercida por ellas sobre la población bacteriana circulante parecen ser más acuciantes; ya que en los últimos años se ha demostrado que la pérdida de la inmunidad ocurre más temprano (2 -3 años) que en poblaciones en las que se emplean esquemas con vacunas celulares [147, 174, 182, 185, 203]. Además, en los países con más tradición en el uso de las vacunas acelulares se han recuperado aislamientos de *B. pertussis* que no expresan el antígeno vacunal pertactina [202, 204-207]. Pareciera que el cambio de la vacuna celular wP por las vacunas acelulares aP ha complicado la situación de la enfermedad, debido probablemente a que la respuesta inmune inducida por las vacunas aP es menos robusta que la inducida por las vacunas wP [17, 190, 208]. Esto pudo evidenciarse en el modelo no-humano de primates recientemente desarrollado, en donde se observó que las vacunas aP protegen contra la enfermedad, pero no son capaces de prevenir ni la infección ni la transmisión [9]. Más aún, un estudio clínico de caso y control, diseñado para evaluar el riesgo de contraer pertussis entre los jóvenes de 10 – 17 años durante el brote de California 2010 reveló que los adolescentes que habían recibido cuatro dosis de wP presentaron una probabilidad de contraer la enfermedad 6 veces menor que los que habían recibido todas las dosis con aP; y casi cuatro veces menos probabilidad de contraerla que los jóvenes que habían recibido una combinación de vacunas (algunas dosis con wP y otras con aP) [209-211]. En otro estudio también se evidenció que el riesgo de contraer la enfermedad se ve incrementado en escolares y adolescentes cuyas dosis vacunales sólo habían sido con aP en comparación con los sujetos que recibieron igual número de dosis pero con vacuna wP [212-214]. Estos hallazgos son consistentes con el conocimiento de que las vacunas aP inducen una respuesta Th2 y también Th17 que es menos eficaz que la fuerte respuesta Th1 inducida por la infección natural o por wP [116, 125, 215-218]. Esta observación ha sido

confirmada en el modelo de los monos babuinos [9, 219]. Como ya dijimos, este modelo es muy valioso porque en él se presenta la tos y el contagio típico de la enfermedad que se observa en humanos [220-222]. Estas características permiten realizar una serie de experimentos referidos a la biología de la infección y a la protección hasta ahora impensables y a pesar de los costos la comunidad científica lo ha aceptado rápidamente. En particular, una de las observaciones más contundentes realizadas en este modelo consistió en evaluar la capacidad protectora de las aP comparadas con las wP. Si bien ambas previnieron el desarrollo de la enfermedad, los monos vacunados con aP mantenían un curso típico de infección, con alta carga bacteriana de *B. pertussis* en vías respiratorias, mientras que los vacunados con wP eliminaban casi completamente a las bacterias en unos días. Más aún, se constató que los animales vacunados con aP, a pesar de no mostrar síntomas de enfermedad, eran capaces de transmitirla a animales sanos no inmunizados [9]. Estos resultados tienen una profunda implicancia en la comprensión de la dinámica de los brotes epidémicos de *B. pertussis* y constituyen una señal terriblemente preocupante para países que mantienen un esquema completo de vacunación con aP.

Además de la disminución de la inmunidad inducida por la vacunación, se están describiendo como posible causa de la resurgencia a los cambios en las características antigénicas y genotípicas de las cepas de *B. pertussis* circulantes: los alelos de los antígenos que se incluyen en las vacunas y los expresados por bacterias circulantes difieren entre sí [185, 201, 223]. La aparición de aislamientos bacterianos divergentes a los contenidos en las vacunas parece reflejar el efecto de la presión selectiva ejercida por la vacunación [17, 207]. En algunos, pero no todos los países, la aparición de variantes alélicas coincide temporalmente con el resurgimiento de la enfermedad. Más recientemente, han aparecido aislamientos bacterianos que no expresan en particular Pertactina [202, 204-207]. La aparición de aislamientos deficientes en pertactina exclusivamente en las regiones donde las vacunas aP son las únicas utilizadas, sugiere que la vacunación con vacuna aP resultó en la expansión de cepas que tienen una ventaja selectiva en las poblaciones humanas vacunadas [204, 224-226].

Otro factor que también contribuye al resurgimiento de pertussis es el aumento del número de casos causados por *B. parapertussis* para la que no hay vacunas disponibles. Esta especie de *Bordetella* no era considerada de importancia hasta que el desarrollo de

metodologías diagnósticas permitieron identificarla más adecuadamente [26]. El uso de metodologías diagnósticas mejoradas ha permitido detectar en algunos países que entre un 14-16 % de las muestras clínicas tomadas de pacientes con sospecha de pertussis se correspondían con pacientes infectados con *B. parapertussis* [198, 227]. Estos casos representan un número importante de casos contra los que las vacunas utilizadas en la actualidad no estarían protegiendo.

Estas falencias que hemos descrito para las actuales vacunas que se emplean en los distintos países llevó a plantear, de manera uniforme entre los especialistas de la temática, la necesidad de realizar acciones a corto plazo como puede ser la incorporación de una nueva generación de vacunas [17, 18, 208].

RESPUESTAS A CORTO PLAZO

Más allá de las causas y el peso relativo de las mismas, resulta evidente la necesidad de implementar medidas a corto y largo plazo que intenten mejorar el control de la enfermedad. A corto plazo podría evaluarse mejorar el uso de las actuales vacunas implementando un esquema de vacunación que responda a las características epidemiológicas actuales de la enfermedad con el objetivo de lograr inmunidad en los grupos vulnerables y en aquellos que puedan ser fuente de infección para la población más desprotegida [57]. La opción a más largo plazo es el desarrollo de una nueva generación de vacunas que sean más efectivas y bioseguras que las anteriores.

Respecto de las medidas a corto plazo recientemente diversos organismos internacionales y nacionales han recomendado entre otras las siguientes estrategias de vacunación:

Vacunación universal de los adultos: Con la inmunización universal de los adultos de 19 años de edad y mayores se espera reducir la incidencia de pertussis en este grupo etario, pero también en los niños pequeños a través de la inmunidad de rebaño. Sin embargo, hasta ahora no hay datos disponibles que muestren si esta estrategia logra cumplir con estos objetivos.

En la actualidad, esta estrategia no se aplicó en nuestro país ni en ninguno de Latinoamérica.

Inmunización de las madres, familiares y contactos cercanos de recién nacidos (estrategia “Cocoon”): Para esta estrategia, se consideraron dos esquemas principales de vacunación: la vacunación materna durante el embarazo (durante el tercer trimestre de gestación) o la vacunación luego del nacimiento de las madres, padres, miembros de la familia y otros contactos cercanos. La vacunación materna durante el embarazo podría reducir la transmisión de pertussis de la madre al recién nacido. Tendría también la ventaja de la transferencia de anticuerpos al bebé a través de la placenta. En 2011, esta estrategia fue recomendada por el Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) para todas las mujeres embarazadas después de 20 semanas de gestación [10, 11]. En América Latina, algunos países como Argentina, Colombia y México han implementado esta estrategia en 2012. A finales de 2012, la ACIP modificó la recomendación indicando un refuerzo en cada embarazo independientemente del intervalo entre embarazos [11]. Esta estrategia no está implementada en la región latinoamericana.

El segundo esquema consiste en la vacunación posparto de los padres y todos los contactos cercanos de los recién nacidos. A través del desarrollo y uso de modelos matemáticos de transmisión de la enfermedad se ha podido estimar que con esta estrategia podría lograrse la reducción de la incidencia de la enfermedad en lactantes [228, 229]. De hecho, algunos informes confirman que esta estrategia reduce significativamente la transmisión de la enfermedad a los bebés [230, 231]. El único país de América Latina que ha incluido la vacunación de los padres fue Costa Rica durante los brotes 2006/2007.

Inmunización selectiva de trabajadores de la salud y cuidadores de los niños: La vacunación de trabajadores de la salud se recomienda sobre todo para prevenir la transmisión nosocomial a los infantes e inmuno-comprometidos. Argentina y Panamá ya han implementado desde el 2010 la inmunización de trabajadores de la salud.

Vacunación de refuerzo pre escolar: Con la administración de una dosis de refuerzo a los 4-6 años de edad se espera extender la inmunidad en la adolescencia y también en los niños, ya que se espera que reduzca la transmisión de los hermanos a los niños pequeños. Sin embargo, Hviid et al. ha reportado que la eficacia del refuerzo preescolar para prevenir la hospitalización por pertussis en los niños menores de 1 año de edad es modesta [232]. Aunque esta estrategia parece tener un impacto modesto en lactantes, si resulta eficaz en reducir la incidencia en los individuos con 4-6 años de edad. De hecho, se ha observado que después de la introducción de una dosis de refuerzo de 4 a 6 años de edad niños, la morbilidad en preescolares y escolares ha disminuido [158, 233, 234]. Todos los países de América Latina en la actualidad la han implementado

Inmunización universal de los adolescentes: Con el refuerzo de vacuna anti pertussis en los adolescentes, se espera extender la duración de la inmunidad contra la enfermedad y de forma indirecta reducir la transmisión hacia los más vulnerables [165, 175]. La efectividad de esta medida es cuestionada pero todavía no se cuentan con datos contundentes como para revocar o ratificar esta recomendación [24][223]. En América Latina, entre los países que han incorporado esta estrategia se encuentra Argentina (2010), Panamá (2010) y Uruguay (2012). Cabe destacar que estos países solo la aplican a una cohorte de edad (11-12 años).

Todavía se necesitan más datos para poder universalizar cualquiera de las medidas antes mencionadas. Los modelos matemáticos sin embargo pueden ayudar a la toma de decisiones. De hecho en los últimos años el diseño de diferentes modelos se ha incrementado marcando sin duda el rol de los mismos como herramientas que pueden contribuir a la toma de decisiones.

Más allá de estas estrategias aplicables a corto plazo, es claro que en el mediano plazo se necesita una nueva generación de vacunas capaces de superar las deficiencias asociadas con las actuales vacunas [17, 19, 223, 235]. Una posibilidad es promover el uso de las vacunas de células enteras, pero mejoradas sobre todo en lo que se refiere a su seguridad [236]. Sin embargo, aunque se logre este tipo de desarrollo el retorno a la utilización de la vacuna wP sería difícil de ser aceptado en algunos países luego de las campañas realizadas en pos del uso de las vacunas acelulares.

Otra posibilidad es mejorar las actuales vacunas aP a través de la inclusión de factores de virulencia de *B. pertussis* adicionales tales como la Adenilato ciclasa [129, 237] y/o las proteínas reguladas por hierro (IRP1-3) [238, 239] y/o incorporando un nuevo adyuvante, que como los agonistas de los receptores de tipo Toll, sean capaces de inducir una alta respuesta Th1 [240, 241].

Dentro de los desarrollos de nuevas vacunas más avanzados que podrían contribuir a la solución del problema de la reemergencia de la enfermedad se encuentra la que incluye una cepa atenuada de *B. pertussis* que se propone se administre por vía intranasal [242, 243]. Aunque este es un desarrollo prometedor que ha demostrado algunas ventajas, el mismo presenta potenciales problemas de seguridad relacionadas con el uso de patógenos atenuados [244, 245].

Una alternativa interesante que combina algunas de las estrategias mencionadas anteriormente es el uso de vesículas de membrana externa, también llamadas nanopartículas, que contienen antígenos de superficie bacterianas. Existen dos vacunas contra la meningitis que contienen componentes derivados de la membrana externa y periplasma de *Neisseria meningitidis del serogrupo B* [246, 247]. Los datos sobre seguridad y eficacia de estas vacunas y el conocimiento de que la mayoría de las bacterias Gram-negativas secretan vesículas hacen que la estrategia de vacunación con vesículas o nanopartículas sea factible para enfermedades como pertussis [246, 248-250]. En este contexto, nuestro grupo de investigación ha diseñado una vacuna aP nanopartícula derivada de *B. pertussis* y *B. parapertussis*. Esta nueva formulación es capaz de ejercer un excelente poder protector en el modelo aceptado de desafío intranasal en ratones contra diferentes cepas de *B. pertussis* y *B. parapertussis* [20, 22-24, 221]. Esta formulación tiene un perfil de seguridad en ratones que es comparable a la de la aP comercial y mucho mejor que la wP [23, 24]. Además, nuestra vacuna a OMVs induce una respuesta de anticuerpos robusta y una respuesta inmune protectora con un perfil mixto Th1 / Th2 [20]. Hemos caracterizado la composición de las nanopartículas y hemos identificado a más 40 componentes proteicos que en su mayoría están referidas a proteínas unidas a membrana [22, 24]. La presencia de un alto número de inmunógenos en la formulación vacunal es por demás importante, ya que esto puede evitar la excesiva presión selectiva conferida por uno solo o muy pocos inmunógenos como los contenidos en las actuales vacunas aP. Esta formulación también es atractiva

económicamente, hecho que resulta crítico para su uso en países en desarrollo. Se estima que el costo final por dosis de nuestra formulación será menor que el de las formulaciones aP existentes ya que para este último caso se requiere de tantos procesos de purificación como componentes tenga, lo que sin dudas repercute en el costo final de la vacuna. En nuestro caso el procedimiento de obtención de las vesículas de membrana externa sólo requiere de centrifugaciones.

En resumen, la formulación a base de nanopartículas de *Bordetella* parece ser una buena alternativa a las formulaciones actuales ya que contienen un mayor número de inmunógenos que las vacunas acelulares actuales y en conformaciones cercanas a las encontradas en las bacterias, hechos que favorecerían la capacidad de protección otorgada por las vesículas. Estas formulaciones también proporcionan protección contra *B. pertussis* y *B. parapertussis*, ampliando el espectro de protección por sobre las vacunas actuales, lo que contribuiría a un mejor control de la enfermedad.

CAPITULO 1: MODELO MATEMÁTICO DE TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD COMO HERRAMIENTA PARA EVALUAR EL IMPACTO DE DIFERENTES ESTRATEGIAS CONTROL**INTRODUCCIÓN**

La vacunación es la mejor estrategia para el control de pertussis incluso para la complicada situación epidemiológica actual. Pertussis es una enfermedad respiratoria altamente contagiosa y aunque existen antibióticos, los mismos no afectan el curso de la infección sino la sintomatología, sólo si son tomados precozmente. Las vacunas contra pertussis comenzaron a desarrollarse poco después que Jules Bordet y Octave Gengou lograran en 1906 identificar a *B. pertussis* como agente causal de la enfermedad [36]. Las primeras evidencias de éxito con esta vacuna fueron obtenidas por el investigador danés Madsen durante un brote en la Islas Faroe, pertenecientes en ese momento al reino de Dinamarca (1923-1924). Estos ensayos permitieron comprobar la efectividad de la vacuna aunque también detectaron por primera vez efectos adversos asociados con la vacunación. Al avanzar el conocimiento microbiológico sobre *B. pertussis*, se describieron fases antigénicamente distintas [89], y se atribuyó la potencialidad de infectar humanos a las bacterias en la Fase virulenta o también conocida como fase 1. Haciendo uso de este conocimiento Louis Sauer entre 1928 y 1933 formuló y probó una vacuna más potente en la que incluyó cepas en fase I recientemente aisladas y de cultivos fuertemente hemolíticos (marcador de virulencia). Esta vacuna fue probada en 1.300 niños en Estados Unidos, vacunando a la mitad de ellos y desafiando luego al conjunto con la bacteria viva por vía intranasal. Luego del desafío, solamente los niños no vacunados desarrollaron la infección [251]. Pero fue gracias al trabajo de Pearl Kendrick y Grace Elderling que se evidenció en varios ensayos clínicos rigurosamente diseñados los niveles de protección de las vacunas por ellas mismas desarrolladas. Estas vacunas estaban formuladas en base a una mezcla de cepas locales recientemente aisladas [140]. Los resultados alcanzados con esta formulación fueron satisfactorios, y así para los años 1950 muchos países centrales adoptaron estas vacunas en la forma de vacunas que combinaban antígenos de difteria, tétanos y pertussis (DTP). En los lugares en que se aplicaron la incidencia de la enfermedad bajó en forma contundente y por ello su uso se extendió a nivel mundial.

La preocupación sobre la seguridad de estas formulaciones vacunales consistentes en suspensiones bacterianas del agente causal muerto por calor y detoxificado (vacunas celulares) persistió e incluso se hizo más notoria cuando el número de casos había disminuido. En varios países, aunque sin mucho sustento, asociaron la muerte de varios niños con la vacunación contra pertussis. Uno de estos países fue Japón, que tras la muerte de dos bebés poco tiempo después de ser vacunados suspendieron el uso de estas vacunas. Aunque la vacunación luego se desestimó como causa de las muertes, las vacunas celulares quedaron fuertemente cuestionadas. La suspensión de la vacunación en Japón tuvo como consecuencia que ese país pase de tener 393 casos –ninguno fatal- en 1974, a más de 13.000 casos con 41 muertes en 1979. En 1975 Suecia suspendió también la vacunación, con resultados epidemiológicos muy similares [252].

Si bien los efectos más graves parecen no haber estado asociados con la vacunación contra pertussis, el perfil de reactividad de esta vacuna es controvertido y desde el momento de la publicidad de los reportes sobre la reactividad la búsqueda de mejores vacunas más seguras resulta intensa.

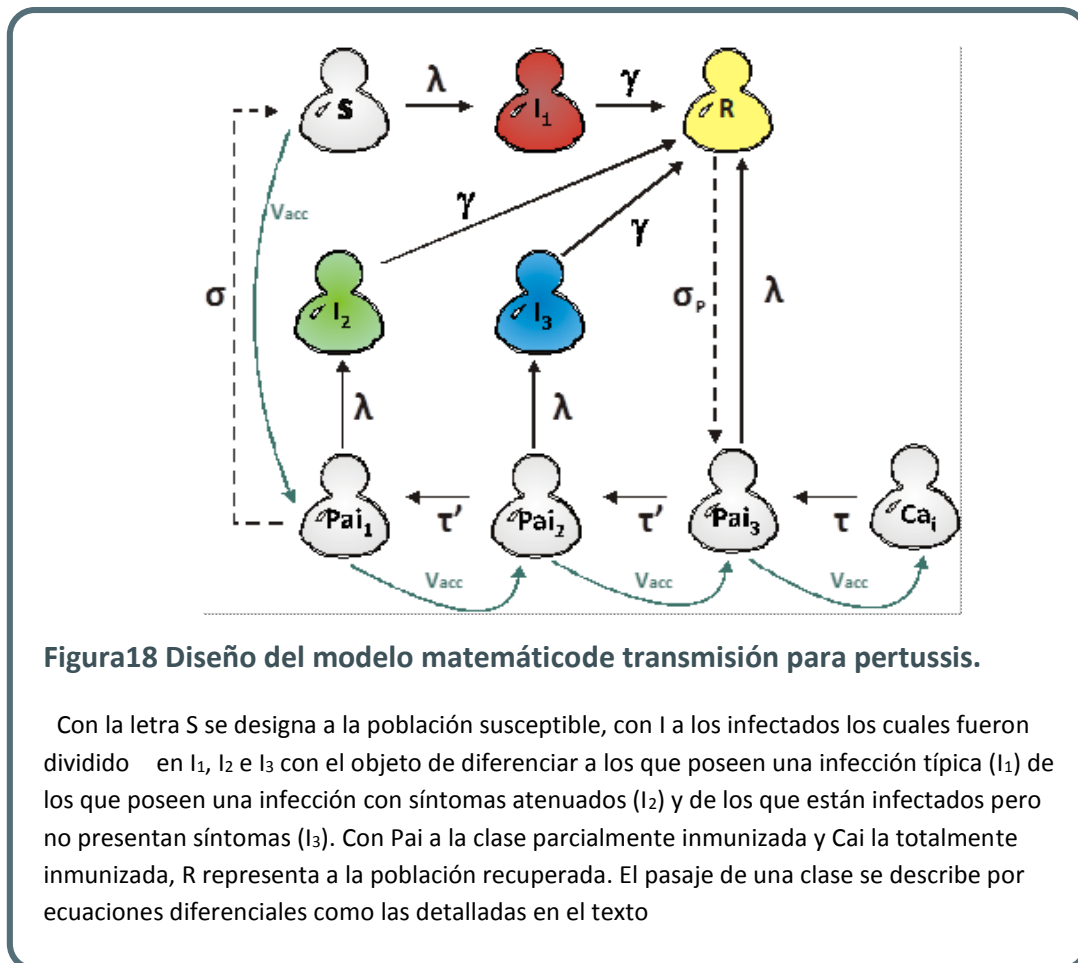
Hacia fines de los años 1970, se logró identificar y caracterizar algunos de los principales factores de virulencia de *B. pertussis*. Así siguiendo con la conceptualización de incluir inmunógenos propios de la fase virulenta y al poco tiempo de haber suspendido la vacunación en varios países, comenzaron en Japón los desarrollos que llevaron a una nueva generación de vacunas que a diferencia de las anteriores solo están constituidas por componentes proteicos purificados derivados de *B. pertussis*. Este tipo de vacunas, llamadas vacunas acelulares, son las que se usan actualmente en la mayoría de los países centrales para cubrir las dosis primarias y refuerzo, y en algunos países para los refuerzos en la población mayor de 7 años.

La primera vacuna acelular fue licenciada en Japón en 1981, luego otras formulaciones constituidas por más factores de virulencia fueron licenciadas en los siguientes años. En el año 2005 se licenciaron 2 nuevas formulaciones acelulares que contenían los mismos constituyentes que las anteriores pero en menor dosis para poder ser empleada en la población mayor de 7 años.

Todos estos desarrollos empleados en 3 dosis primarias y 1 o 2 refuerzos antes del ingreso escolar han permitido controlar adecuadamente la enfermedad hasta los años noventa pero a partir de allí brotes de envergadura comenzaron a detectarse en varias regiones del planeta evidenciando debilidades de las vacunas en uso. Esto motivó consensuar la necesidad de contar con nuevos desarrollos que supliran las debilidades de las actuales vacunas contra pertussis. Si bien es clara la necesidad una tercera generación de vacunas, hasta tanto se obtenga es necesario usar lo más adecuadamente posible las formulaciones actuales de forma de lograr algún efecto positivo en el corto plazo. Bajo esta conceptualización diferentes organismos internacionales y nacionales han recomendado la incorporación de nuevos refuerzos sobre todo para intentar disminuir la morbilidad y mortalidad en los niños más pequeños ya que esta resulta la población más gravemente afectada por esta enfermedad. Diferentes estrategias se han recomendado y aplicado pero aún no se han podido universalizar ninguna de ellas ya que sus efectos sobre la transmisión e incidencia de la enfermedad no son conocidos debido principalmente al hecho que las mismas han sido recientemente implementadas y por lo tanto no se han recopilado los suficientes datos como para recomendar o no su uso [154, 223].

Dado el costo de las vacunas que se están usando para los refuerzos (vacunas acelulares) y los asociados a su implementación resulta urgente contar con evidencias que permitan sostener o no el uso de las mismas. Una herramienta que está tomando importancia dada capacidad de hacer predicciones son los modelos matemáticos de transmisión de enfermedades. En la actualidad existen varios modelos que representan la epidemiología de pertussis [253-260]. Nuestro grupo desde hace varios años ha abordado un trabajo interdisciplinario que combina saberes de diferentes áreas del conocimiento e intercambia experiencias sobre todo con el grupo liderado por el Dr Fabricius y el Dr Rumbo. Así, logramos diseñar de manera conjunta un modelo de transmisión de la enfermedad que permite realizar predicciones. El modelo matemático diseñado por nosotros está basado en los modelos SIR cuyo nombre proviene de las iniciales S (población susceptible), I (población infectada) y R (población recuperada). Nuestro modelo considera estos tres grupos aunque más particionados y un grupo más que se corresponde con los individuos que poseen algún grado de inmunidad ante la infección al que designamos con la letra G_i . Los grupos I y G_i están subdivididos de acuerdo al grado de inmunidad de los individuos, adquirido naturalmente

(por haber estado infectados) o adquirido artificialmente (por haber recibido distintas dosis de vacuna). Así la clase G_i fue dividida en: $P_{AI}^1, P_{AI}^2, P_{AI}^3, Ca_i$ y R . Estas clases agrupan individuos con un grado creciente de inmunidad, de manera que los individuos de las clases Ca_i y R poseen inmunidad total (no adquieren la infección en contacto con individuos infectados). Por su parte, el grupo de individuos infectados se dividió en I_1, I_2 e I_3 con el objeto de diferenciar a los que poseen una infección típica (I_1) de los que poseen una infección con



síntomas atenuados (I_2) y de los que están infectados pero no presentan síntomas (I_3). El modelo relaciona las variaciones las tres poblaciones (Susceptible, Infectada y Recuperada) a través de la tasa de infección y el período infeccioso promedio). A continuación se presenta un esquema del modelo

El modelo además se ha estructurado en edades, es decir cada uno de los grupos de individuos incluidos fue particionado en clases etarias. Esta división obedece a dos razones. Por un lado, es sabido que la fuerza de infección no es homogénea en la población, por

ejemplo, es mayor para los niños en edad escolar que para cualquier otra franja etaria [200, 253]. Esta heterogeneidad tiene consecuencias que es preciso tener en cuenta si se quiere dar una descripción realista de la dinámica de la enfermedad. Por otro lado, al estar particionada la población podemos estudiar específicamente el impacto de las medidas de control en un determinado grupo etario, en general hemos elegido el grupo de riesgo (0-1 año) por ser el más vulnerable a la enfermedad.

Este modelo, como otros, incluye parámetros que contienen información de las características de la enfermedad, su transmisión, y de la vacunación. Algunos de estos parámetros son conocidos pero otros como la duración de la inmunidad resultan de difícil determinación [147, 212, 261]. Otros parámetros incluso no son homogéneos en la población, como las coberturas vacunales y los patrones de contacto específicos por edades. Para contemplar las incertezas y la variabilidad de alguno de los parámetros hemos trabajado en diferentes escenarios que se definen por una combinación de los los valores de parámetros de modo de cubrir un amplio rango de situaciones posibles. Este proceder nos permite explorar la sensibilidad de los resultados que alcancemos ante cambios en los parámetros y así distinguir cuan robustos son los resultados.

Durante mi trabajo de tesis he participado de esta línea de investigación que en la actualidad se ha consolidado y continúa aportando resultados de impacto sobre la epidemiología de pertussis. A continuación presentaré los resultados que hemos alcanzado en la parametrización y en la evaluación del impacto que tiene sobre la incidencia de la enfermedad en la población más vulnerable (0-1 año) la aplicación de distintas estrategias como la incorporación de la dosis de vacuna a los 11 años de edad.

Respecto de los parámetros, en primer lugar, consideramos que la población no cambia con el tiempo y que los nacimientos y las muertes se producen siguiendo una mortalidad tipo I, que consiste en suponer que todos los individuos viven exactamente hasta la misma edad (en este caso 75 años). Para la duración de la infección hemos considerado 21 días ya que es el reportado en bibliografía [26]. Para la eficacia de cada dosis de vacuna hemos considerado $VE=0.9$ [253] lo cual implica que entre 1 y 2 años de aplicada la tercera dosis de vacuna, nuestro modelo predice que entre el 95% y el 86 % estarían protegidos de contraer una forma

severa de pertussis y entre un 81% y el 63% estarían protegidos de contraer una enfermedad moderada.

La dinámica del modelo más arriba presentado responde a la evolución temporal de la cantidad de individuos en los distintos compartimentos o clases epidemiológicas esquematizadas. Esta transferencia de individuos de una clase a otra, representada en el esquema por las flechas unidireccionales que unen los diferentes grupos de individuos, fue descrita por un conjunto de ecuaciones diferenciales no lineales. Las letras, junto a cada flecha, indican la tasa de transferencia de individuos por unidad de tiempo.

$\sigma = 1/(100 \text{ años})$: pérdida total de la inmunidad

$\sigma_p = 1/(5 \text{ años})$: pérdida parcial de la inmunidad

$\tau' = 1/ (3.5 \text{ años})$: pérdida parcial de la inmunidad

$\tau = 1/ (2 \text{ años})$: pérdida parcial de la inmunidad

$\gamma = 1/ (21 \text{ días})$: tasa de recuperación

La fuerza de infección (λ) como hemos mencionado es dependiente de la edad y viene dada por la expresión:

$$\lambda^i = \sum_{j=1}^n \beta_{ij} (I_1^j + \rho_1 I_2^j + \rho_2 I_3^j)$$

Aquí β_{ij} corresponde al número de contactos infectivos promedio por unidad de tiempo que tiene un individuo del grupo etario i con otro del grupo etario j . Contacto infectivo se define cuando un individuo susceptible se encuentra con otro individuo infectado (I_1) y se produce la infección de este último. Por su parte $\rho_2 < \rho_1 < 1$ tienen en cuenta que los infectados I_2 e I_3 contribuyen menos a la fuerza de infección que los I_1 . Los valores tomados fueron $\rho_1 = 1/2$, $\rho_2 = 1/4$ los cuales están de acuerdo con los datos hallados en bibliografía [254].

Para la estimación de los valores de β_{ij} se requiere del conocimiento de una gran cantidad de datos epidemiológicos que, en general, no están disponibles. Por esta razón, un procedimiento usual que se sigue para estimarlos, consiste en establecer una matriz de

contactos con una estructura que permite reducir el número de β_{ij} incógnita de N^2 a N , donde N es el número de clases etarias. La forma de la matriz β_{ij} que resulta de este procedimiento es conocida en la literatura como matriz WAIFW (por la abreviatura en inglés de: Who Acquires Infection From Whom) [200, 262]. En nuestro trabajo hemos empleado estas matrices para definir los valores de β_{ij} , y con estos valores calculados pudimos luego simular la dinámica de propagación de pertussis en la población y evaluar los efectos que tendrían en esta dinámica diversos cambios en la política de vacunación. Debido a que no hay suficientes datos locales empíricos sobre los cuales podamos diseñar matrices locales, decidimos emplear estructuras de contactos sociales de otros países ya que muestran comportamientos regulares entre ellos que podrían en principio extenderse a cualquier población[263][264]

Así para las estimaciones de β_{ij} entonces diseñamos una estructura de matriz WAIFW como la que se esquematiza en la Tabla 2 **Error! No se encuentra el origen de la**

WAIFW									
	0-6m	6m-1a	1-3a	3-5a	5-10a	10-15a	15-35a	35-50a	50-70a
0-6m	1	1	2	2	2	2	3	3	3
6m-1a		2	2	2	3	2	3	3	3
1-3a			3	3	3	2	3	3	3
3-5a				4	4	3	3	3	3
5-10a					5	6	3	3	3
10-15a						6	7	8	9
15-35a							7	8	9
35-50a								8	9
50-70a									9

Tabla 2: Matriz WAIFW donde se definen los rangos etarios y el esquema de contactos entre los distintos grupos.

referencia..

Los grupos etarios incluidos en la matriz aunque fueron seleccionados arbitrariamente se incluyeron para poder diferenciarlos y analizarlos en forma particular. Con esta estructura de contactos y a partir de los valores de $\lambda^{(i)}$ tomados de la era prevacunal calculamos los valores de β_{ij} . Los valores tomados para la λ de los distintos grupos etarios considerados fueron de 0,1; 0,1; 0,14; 0,23; 0,47; 0,25; 0,07; 0,04 y 0,03. Algunos de estos valores surgen de la interpolación de valores reportados para la era pre-vacunal de Inglaterra y Gales [200]. Para las clases 35-50 años y 50-70 años tomamos los valores sugeridos por Van Rie y colaboradores [255].

Con el objetivo de plantear otras alternativas que den cuenta de los posibles contactos de los niños <1 año con sus madres y con el personal encargado del cuidado en este rango etario (maestras del jardín maternal, niñeras, etc.) diseñamos dos matrices de contactos en las se modificaron los valores para los contactos de los grupos etarios marcados en rojo (WAIFW-2), o se modificaron además la división del rango etario <1 año (WAIFW-3). A continuación se presentan las matrices diseñadas.

WAIFW-2

	0-3m	3m-1a	1-3a	3-5a	5-10a	10-15a	15-35a	35-50a	50-70a
0-3m	1	1	2	2	2	2	3	8	8
3m-1a		2	2	2	3	2	3	8	8
1-3a			3	3	3	2	3	8	8
3-5a				4	4	3	3	8	8
5-10a					5	6	3	3	8
10-15a						6	7	7	9
15-35a							7	7	9
35-50a								7	9
50-70a									9

WAIFW-3

	0-3m	3m-1a	1-3a	3-5a	5-10a	10-15a	15-35a	35-50a	50-70a
0-3m	1	1	2	2	2	2	7	9	9
3m-1a		2	2	2	3	2	3	8	8
1-3a			3	3	3	2	3	8	8
3-5a				4	4	3	3	8	8
5-10a					5	6	3	3	8
10-15a						6	7	7	9
15-35a							7	7	9
35-50a								7	9
50-70a									9

Tabla 3: Esquema de las dos matrices de contactos que se proponen como variantes.

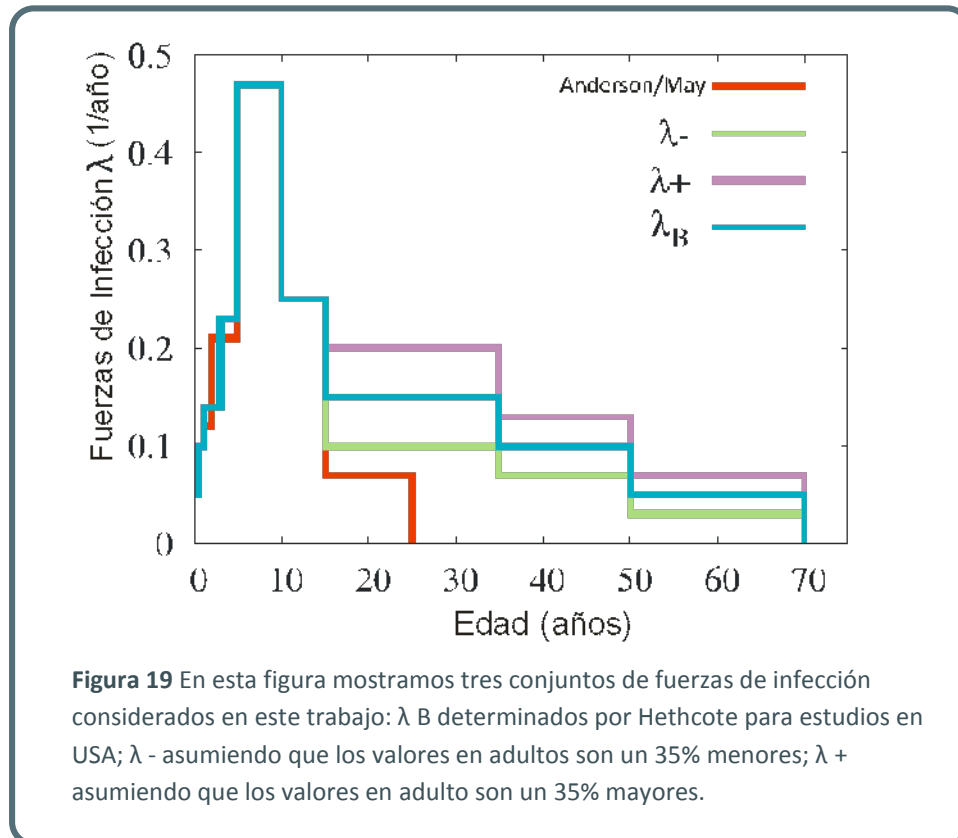
Estas matrices se emplearon en los diferentes escenarios epidemiológicos que utilizamos. Estos escenarios surgen de combinar distintos rangos de valores para la duración de la inmunidad, de los parámetros que describen los contactos entre individuos (matrices y fuerza de infección) y de coberturas vacunales.

Respecto de las coberturas vacunales consideramos las correspondientes al esquema de vacunación oficial de Argentina. En particular consideramos en un caso la cobertura reportada por el Ministerio de Salud de La Nación y en otro consideramos valores más bajos ya que es una situación factible. En la Tabla 4 se incluyen los valores de coberturas utilizadas en las 2 situaciones planteadas para cada una de las dosis del esquema básico de vacunación.

Dosis	a_i	Cobertura: p_i	
		C_{TOT}	$C_{70\%}$
1	2 m	0.958	0.70
2	4 m	0.958	0.70
3	6 m	0.958	0.70
4	18 m	0.844	0.70
5	6 a	0.93	0.93

Tabla 4: Esquema de las diferentes dosis de vacunas. a_i : edad de la aplicación de la dosis "i". p_i : cobertura de la dosis "i" (es la fracción de la población de la edad a_i vacunada). Eficiencia de la vacuna = 0.9 para todas las dosis

Con respecto a la fuerza de infección en este trabajo se consideraron tres sets de valores posibles. Uno se corresponde al detallado por Hethcote [253], el cual se basa en estimaciones realizadas a partir de datos epidemiológicos obtenidos de Inglaterra y Gales para la era pre-vacunal [200]. Estos valores de fuerzas de infección en nuestro trabajo fueron tomadas como valores basales (λ_B) ya que luego consideramos una situación en que los valores estuvieran por encima de estos valores (designada como λ_+) y otra situación en que los valores estuvieran por debajo de los valores λ_B (designada como λ_-). En la Figura 19 se muestran los valores utilizados.



Respecto de la duración de la inmunidad conferida por cada dosis de vacuna consideramos un valor de 3,5 años para la pérdida de la inmunidad luego de haber recibido al menos 3 dosis sea compatible con el rango reportado en trabajo de Wendelboe et al 2005 [147].

Con todos estos posibles valores considerados para las coberturas de vacunación, las WAIFW, coberturas y fuerzas de infección y la duración de la inmunidad definimos los escenarios antes mencionados. En estos diferentes escenarios calculamos, con las ecuaciones diferenciales mostradas más abajo e incluidas en un programa desarrollado por los físicos de nuestro equipo, la incidencia de la enfermedad en niños menores de 1 año. Los valores calculados fueron luego comparados con los datos epidemiológicos reales.

$$\begin{aligned}
\frac{dS_i}{dt} &= {}_iS_i + {}_0P_{Al_i}^1 - {}_iS_i + c_{i-1}(1 - vacc_i)S_{i-1} - c_iS_i + {}_{i0}B \\
\frac{dP_{Al_i}^1}{dt} &= {}_iP_{Al_i}^1 - {}_0P_{Al_i}^1 + {}_i'P_{Al_i}^2 - {}_iP_{Al_i}^1 + c_{i-1}(1 - vacc_i)P_{Al_{i-1}}^1 - c_iP_{Al_i}^1 + c_{i-1}vacc_iS_{i-1} \\
\frac{dP_{Al_i}^2}{dt} &= {}_iP_{Al_i}^2 - {}_i'P_{Al_i}^2 + {}_i'P_{Al_i}^3 - {}_iP_{Al_i}^2 + c_{i-1}(1 - vacc_i)P_{Al_{i-1}}^2 - c_iP_{Al_i}^2 + c_{i-1}vacc_iP_{Al_{i-1}}^1 \\
\frac{dP_{Al_i}^3}{dt} &= {}_iP_{Al_i}^3 - {}_i'P_{Al_i}^3 + C_{Al_i} - {}_iP_{Al_i}^3 + R + c_{i-1}(1 - vacc_i)P_{Al_{i-1}}^3 - c_iP_{Al_i}^3 + c_{i-1}vacc_iP_{Al_{i-1}}^2 \\
\frac{dC_{Al_i}}{dt} &= C_{Al_i} - {}_iC_{Al_i} + c_{i-1}C_{Al_{i-1}} - c_iC_{Al_i} + c_{i-1}vacc_iP_{Al_{i-1}}^3 \\
\frac{dI_{1_i}}{dt} &= {}_iS_i - I_{1_i} - {}_iI_{1_i} + c_{i-1}I_{1_{i-1}} - c_iI_{1_i} \\
\frac{dI_{2_i}}{dt} &= {}_iP_{Al_i}^1 - I_{2_i} - {}_iI_{2_i} + c_{i-1}I_{2_{i-1}} - c_iI_{2_i} \\
\frac{dI_{3_i}}{dt} &= {}_iP_{Al_i}^2 - I_{3_i} - {}_iI_{3_i} + c_{i-1}I_{3_{i-1}} - c_iI_{3_i} \\
\frac{dR_i}{dt} &= {}_iP_{Al_i}^3 + (I_{1_i} + I_{2_i} + I_{3_i}) - R - {}_iR + c_{i-1}R_{i-1} - c_iR_i
\end{aligned}$$

$$i=1, \dots, 30$$

Estas comparaciones nos permitieron analizar cuales parámetros de los ensayados reflejaron mejor la situación epidemiológica del ámbito local. Así a partir de los datos obtenidos del Laboratorio Nacional de Referencia –VACSAL – IBBM en el año 2008, y considerando la población de la ciudad de La Plata de 650.000 pudimos estimar la incidencia en un valor de 12.5 casos nuevos por año cada 100.000 habitantes para los niños menores de 1 año de edad. Este valor registrado se correspondería a una subvaloración ya que se sabe que el sistema de salud no registra todos los casos debido a diversas situaciones socio sanitario de la población. Se estima que el subreporte es de 30 al 50% .

En la tabla 5 se presentan los datos arrojados por el modelo al considerar los distintos valores de fuerza de infección ensayados y distintas coberturas de vacunación.

Inc.	λ_B		λ_-		λ_+	
	I_1	I_2	I_1	I_2	I_1	I_2
0-1a						
C_{TOT}	12	15	7	9	15	19
C_{70}	19	25	14	19	23	29

Tabla 5 : Incidencia para el rango etario de 0 a 1 año obtenida del modelo utilizando diferentes combinaciones de fuerzas de infección (λ) y cobertura de la vacunación.(C)

Como puede observarse en la tabla, los valores de incidencia obtenidos de todos los casos analizados resultaron ser compatibles con las estimaciones que realizamos a partir de los datos epidemiológicos locales. Por lo tanto, podríamos emplear cualquiera de las combinaciones de fuerza de infección y coberturas ensayadas. Sin embargo, respecto de la fuerza de infección decidimos emplear de manera conservadora el valor de λ_B .

Respecto de las distintas WAIFW así como las distintas coberturas de vacunación y duración de la inmunidad, los resultados alcanzados tampoco permitieron excluir ninguno de los valores ensayados y dado que en la literatura no existe información que nos permita hacer una selección de los sets de valores decidimos seguir nuestros análisis haciendo evaluaciones en los distintos escenarios.

ANÁLISIS DEL IMPACTO DE DIFERENTES ESTRATEGIAS DE VACUNACIÓN EN LA INCIDENCIA DE PERTUSSIS

Una vez definidos los parámetros y los escenarios decidimos analizar el efecto de la implementación del refuerzo de los 11 años en la incidencia de la enfermedad en la población más vulnerables..

Este análisis nos pareció importante de realizarl ya que Argentina ha incluido recientemente en el Calendario Nacional Vacunación este refuerzo. La inclusión de este refuerzo buscaba disminuir la incidencia de la enfermedad en el grupo de los 11 años pero también en los niños menores de 1 año de edad. Este efecto en los niños no resulta tan obvio

puesto que la introducción de una dosis afecta la dinámica de la enfermedad en forma general.

Decidimos entonces emplear nuestro modelo para realizar estimaciones sobre el posible impacto de este refuerzo sobre la incidencia de pertussis en los niños menores de un año de edad. Para ello consideramos específicamente las siguientes situaciones definidas por los parámetros que se detallan a continuación:

- Situación I: definida por considerar fuerza de infección λ_B (base) y coberturas de vacunación C_{TOT} (corresponde al valor de 90%) y $C_{70\%}$ (cobertura disminuida al 70%)
- Situación II: definida por valores de λ que se calcularon a partir de los valores B_{ij} determinados con los λ de la era pre vacunal pero incluidos en las WAIFW- 2 y 3, y coberturas de vacunación C_{TOT} (corresponde al valor de 90%) y $C_{70\%}$ (cobertura disminuida al 70%)
- Situación III: definida por considerar la fuerza de infección λ_B (base), valores de la duración de la inmunidad τ a 1/5años y los dos valores de coberturas de vacunación (C_{TOT} y $C_{70\%}$).

Los valores de incidencia para poblaciones I_1 e I_2 de 0 -1 año calculadas para las distintas situaciones se presentan en la Tabla 6:

Incid. 0-1 año	Sin dosis 11a		Con dosis 11a		% dismin. Inc.	
	I_1	I_2	I_1	I_2	I_1	$I_1 + I_2$
λ_B, C_{TOT}	12.4	15.5	11.7	14.7	-5.6	-5.4
$\lambda_B, C_{70\%}$	19.6	25.5	18.8	24.5	-4.1	-4.0
λ_{W-2}, C_{TOT}	12.1	15.4	11.3	14.4	-6.6	-6.5
$\lambda_{W-2}, C_{70\%}$	20.1	23.6	19.2	22.5	-4.5	-4.6
λ_{W-3}, C_{TOT}	6.7	17.8	6.2	16.8	-7.5	-6.1
$\lambda_{W-3}, C_{70\%}$	14.8	29.7	14.1	28.4	-4.7	-4.5
$\lambda_B, \tau'=5, C_{TOT}$	10.5	12.5	9.3	11.1	-11.4	-11.3
$\lambda_B, \tau'=5, C_{70\%}$	17.8	20.6	16.4	19.0	-7.8	-7.8

Tabla 6 : Efecto de aplicar el refuerzo contra pertussis a los 11 años en la incidencia del grupo de 0 a 1 año

En dicha Tabla se incluyen los valores hallados tanto en ausencia del refuerzo de los 11 años como en presencia del mismo. Para una mejor interpretación de los resultados incluimos una columna donde se presentan los porcentajes de reducción de la incidencia logrados por la incorporación del refuerzo. Como puede observarse en casi todos los casos evaluados la incorporación del refuerzo de los 11 años redujo la incidencia en valores cercanos al 5%. Sólo para el caso en que la duración de la inmunidad fue mayor el porcentaje hallado fue cercano al 10%. Los datos muestran claramente que el efecto de la incorporación del refuerzo de los 11 años es independiente de la cobertura de vacunación para las dosis primarias y de la matriz de contacto empleada.

Si bien el efecto del refuerzo tiene muy bajo impacto en la población de 0-1 año, la misma si provoca una reducción apreciable (35%) en la población de 11 años.

Un aspecto interesante a analizar es la consecuencia que tendría el incorporar este refuerzo en tiempos cortos ya que los modelos compartimentalizados y deterministas como el aquí utilizado predice que el sistema alcanza un estado de equilibrio estacionario. Este valor del equilibrio representa la fase endémica de la enfermedad y como sabemos que cualquier

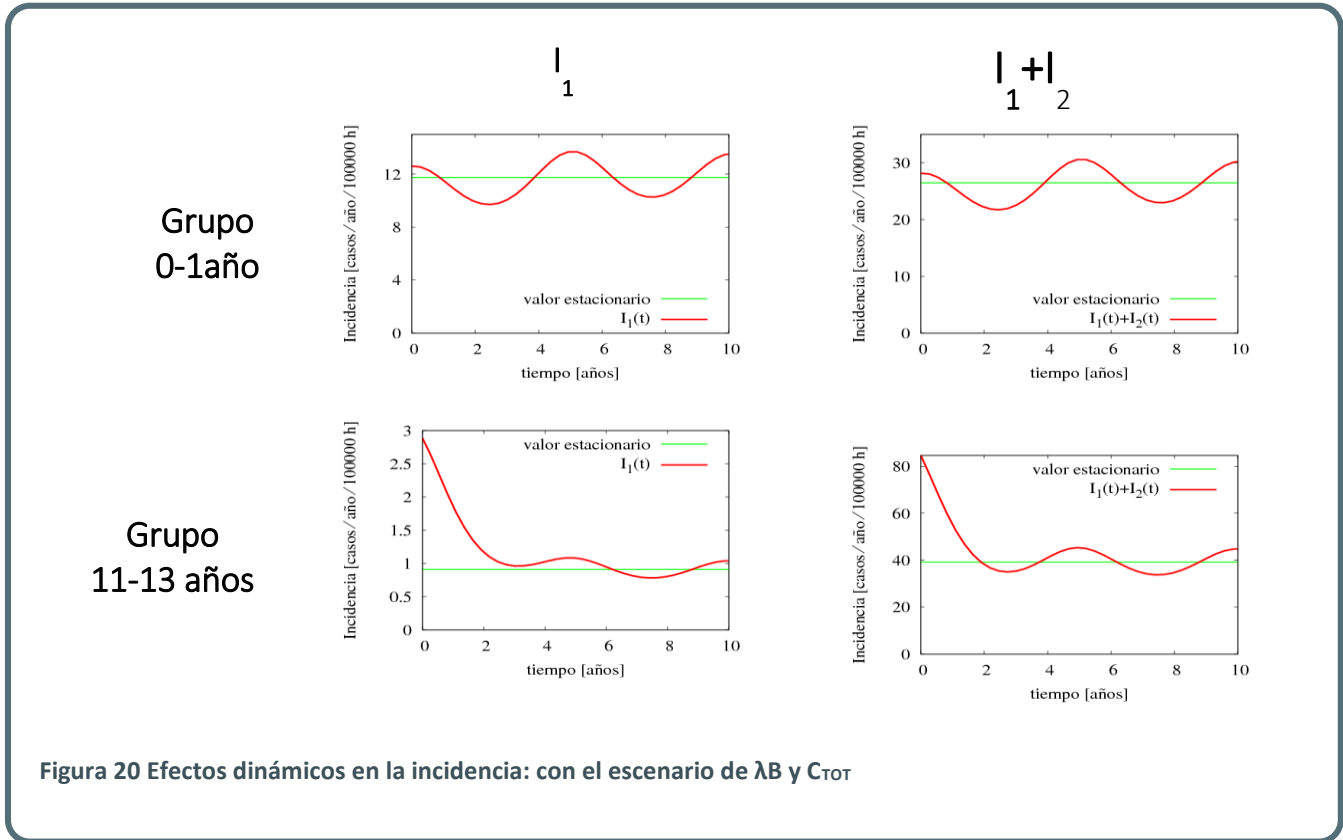


Figura 20 Efectos dinámicos en la incidencia: con el escenario de λB y C_{TOT}

perturbación de este equilibrio genera oscilaciones pronunciadas en las variables dinámicas del modelo que suavemente se van amortiguado con el tiempo, es necesario evaluar el efecto de la perturbación (refuerzo de los 11 años) en la incidencia a tiempos cortos. Así analizamos el efecto dinámico en la poblaciones I_1 e I_1+I_2 de las clases etarias 0-1 año y 11-13 años luego de la aplicación de la dosis vacunal de los 11 años. Los valores calculados para las incidencias respecto del tiempo transcurrido luego de la incorporación del refuerzo $t=0$ se muestran en la Figura 20.

Para la población de 0-1 año observamos que a los 2 años de incorporado el refuerzo, la incidencia se reduce en un 13 %. Sin embargo a los 2 años siguientes, este valor de incidencia se incrementa superando el valor hallado en el estado estacionario. Así los valores de incidencia para la población de 0-1 año van oscilando alrededor del 5% a medida que transcurre el tiempo respecto de la incorporación del refuerzo. Para la población de 11 a 13 años, a los dos años de incorporado el refuerzo su incidencia decae a 47% respecto del valor inicial. Sin embargo, esta abrupta disminución luego comienza a oscilar alrededor del valor estacionario (35% menor que el valor inicial). Por lo tanto, el éxito de la estrategia debería evaluarse en los distintos años luego de incorporar el cambio en las estrategias de vacunación

Finalmente evaluamos el efecto que tendría aplicar una estrategia de vacunación cada 10 años sobre la incidencia en los niños < 1 año. Consideramos para ello que el 1er refuerzo se da a los 11 años, y los restantes cada 10 años a partir de ahí. Para estos análisis incluimos los dos escenarios de coberturas de vacunación (Tabla 4). En la Tabla 7 se muestran las reducciones en las incidencias de las poblaciones $I_1 + I_2$ en el grupo etario de 0 -1 año luego de aplicar 1, 2, 3 y 6 dosis de refuerzos.

Incid. 0-1 año	Sin refuerzos I_1+I_2	+1 ^{er} ref (11 a)	+ 1 ^{er} + 2 ^{do} ref	+ 1 ^{er} + 2 ^{do} + 3 ^{er} ref	+ 6 refuerzos	
					I_1+I_2	% dism.
λ_B, C_{TOT}	29.9	-5 %	-14%	-21%	20.1	-28%
$\lambda_B, C_{70\%}$	45.1	-4 %	-11%	-17%	34.2	-24%

Tabla 7 : Efecto de aplicar 1 dosis adicional contra pertussis cada 10 años, en la incidencia del grupo de 0 a 1 año.

Estos datos muestran que se requieren de varias aplicaciones vacunales para lograr una reducción sustancial en la incidencia en los niños de 0-1año. Esta estrategia de varias dosis en principio parecería dificultosa de ser llevada a cabo porque se requiere de tener éxito en la aplicación de cada una de las dosis de refuerzo aplicada.

DISCUSION

La construcción de modelos matemáticos es una de las herramientas utilizadas hoy en día para el estudio de problemas en medicina, epidemiología, farmacocinética, entre otras áreas del conocimiento. Sus objetivos primordiales son describir, explicar y predecir fenómenos y procesos en dichas áreas. La relevancia de la construcción de los modelos matemáticos para enfermedades infecciosas es algo evidente ya que: a) provee un medio que posibilita entender la transmisión de una enfermedad infecciosa a través de una población bajo diferentes escenarios, b) revela algunas veces relaciones que no son obvias a primera vista; c) es posible extraer propiedades y características de las relaciones entre los elementos que de otra forma permanecerían ocultas; d) en la mayor parte de los problemas de enfermedades infecciosas del mundo real no es factible experimentar con la realidad debido a que puede ser muy costoso, poco oportuno o incluso imposible. Por lo tanto, resulta atractivo intentar superar estas dificultades con un modelo que describa de manera adecuada las características básicas de la enfermedad y su transmisión de forma de poder predecir las consecuencias de introducir cambios específicos.

Cabe señalar que los modelos matemáticos para enfermedades infecciosas cada vez están resultando más demandados como herramienta para tomar decisiones. Los resultados que se pueden alcanzar con los modelos deben valorarse en su justa medida, ya que difícilmente es comprensible un problema complejo sin una mínima modelación, aunque también hay que reconocer que no es posible modelar la totalidad de las situaciones reales. En esencia, la función central de crear y analizar modelos matemáticos es mejorar la comprensión de un sistema para prevenir futuras situaciones de enfermedades, determinar

la prevalencia e incidencia y complementar como una herramienta adicional, a la hora de tomar decisiones objetivas para controlar o erradicar las enfermedades

En este contexto y dada la situación de pertussis nuestro grupo de trabajo hace unos años ha comenzado un trabajo transdisciplinario para desarrollar un modelo matemático de transmisión de la enfermedad. Así hemos logrado diseñar un modelo basado en el modelo más sencillo denominado SIR. En estos modelos se parte del supuesto de que los individuos se encuentran en uno de varios estados posibles. En función de dichos estados, la población puede incluirse en algunas categorías: individuos susceptibles (S), infectados (I) o recuperados (R), etc. Hemos logrado así diseñar un modelo determinista compartimentalizado en edades. Alguno de los parámetros incluidos en este modelo son conocidos pero otros son inciertos y ello nos ha llevado a definir escenarios epidemiológicos posibles que cubren rangos de parámetros que resultarían factibles. Hemos trabajado así con varios escenarios posibles que surgen de la combinación de considerar distintas duraciones de la inmunidad, distintos valores para los parámetros que describen los contactos entre individuos (matrices y fuerza de infección) y distintas coberturas vacunales.

Una vez logrado la parametrización y habiendo confirmado que con los distintos escenarios analizados llegamos a reproducir valores de incidencia que se correspondía con los reales procedimos a analizar el efecto sobre la incidencia de pertussis en los menores de 1 año de la incorporación de un refuerzo vacunal en los adolescentes para todos los escenarios planteados. Los resultados obtenidos se incluyen en la Tabla 6. Allí se observa que la reducción en la incidencia como consecuencia de la adición de refuerzo de los 11 años ya sea en Inc1, Inc2 o la suma Inc1 + Inc2, está alrededor del 5% en todos los casos.

Evaluamos también si el potencial efecto de incluir la vacuna de refuerzo de los 11 años dependía de la cobertura alcanzada para las dosis primarias. Los resultados hallados muestran claramente que, más allá de la duración de la inmunidad o el escenario de contacto considerado, mejorar la cobertura de la vacunación produce una disminución significativa en la incidencia 0-1 año en comparación con la incorporación de la dosis de refuerzo a los 11 años. Estos datos muestran que aumentar la cobertura de la primera dosis (a los 2, 4 y 6 meses) daría lugar a una mejora sustancial en el control de esta enfermedad (Tabla 6, donde la Incidencia dada por I_1+I_2 para la C_{70} es de 45,1 y para C_{TOT} 27,9). La incidencia disminuye

para este grupo etario en un 38% cuando se lograr alcanzar coberturas del 90% en las dosis iniciales.

El modelo compartimental determinista aquí desarrollado y utilizado predice que el sistema alcanzará un estado de equilibrio estacionario que representa la fase endémica de la enfermedad y cualquier perturbación de este equilibrio genera oscilaciones que luego serán amortiguadas. En particular, la introducción de la vacuna de refuerzo de 11 años produce un comportamiento oscilatorio de las incidencias que se muestra en la Figura 20. La figura muestra la evolución dinámica de $Inc1(t) + Inc2(t)$ en un período de 10 años para el grupo de 11-13 años y grupos 0-1 años. En dicha figura se observa que dos años después de la introducción de la dosis de refuerzo, cuando incidencias alcanzaron su mínimo (47% respecto del valor inicial), la incidencia para el grupo 11-13 años vuelve a aumentar superando el valor estacionario, mientras que para el grupo 0-1 año luego de disminuir 13% aumenta luego oscila alrededor del 5% respecto del valor inicial. La incidencia para el grupo 11-13 años oscila alrededor de un nuevo valor de equilibrio que es 43,5% menor que antes de la introducción de la dosis de refuerzo.

El comportamiento oscilatorio que se muestra en la Figura 20 se ha predicho tanto en los modelos epidémicos deterministas como estocásticos [253, 254, 257, 260, 265]. En el caso de pertussis, estas oscilaciones se han reportado en varios países y se muestra que las mismas ocurren en un periodo de entre 3 y 5 años, aunque el valor exacto puede fluctuar entre los países e incluso en el mismo país en diferentes épocas.

En suma los resultados alcanzados en este trabajo valorizan a los modelos matemáticos como herramienta útiles que pueden ayudar a las tomas de decisiones en salud. En particular, los resultados obtenidos muestran que la inclusión de una sola dosis a los 11 años reduce significativamente la incidencia de la enfermedad en este grupo de edad, pero tiene un impacto muy bajo (<5%) en el grupo de riesgo (0 -1 año). Más importante aún es que mejorar la cobertura de la primera dosis tendría un impacto mucho mayor en los lactantes. Estos resultados se mantienen en los distintos escenarios considerados, mostrando así la solidez de estas conclusiones.

SECCION 2.1: EVALUACION DE LA CONTRIBUCION DE LOS INMUNOGENOS PTx, Prn Y FHA EN LA PROTECCION CONFERIDA POR LAS OMVS DERIVADAS DE *B.pertussis*.**INTRODUCCIÓN**

Como parte de nuestro trabajo de tesis buscamos identificar aquellos componentes que contribuyan a la capacidad protectora inducida por las OMVs, de forma de luego poder utilizarlos como marcadores indispensables de la calidad de nuestra formulación. Dado el conocimiento del poder protector de algunos factores bacterianos, que por su propiedades fueron incluidos en la mayoría de las vacunas acelulares, decidimos como primera estrategia evaluar la contribución de la toxina pertussis, la pertactina y la hemaglutinina filamentosa [145, 199, 266]. La presencia de estos tres factores ya fueron identificados en las OMVs con las que se formula la vacuna [24].

Como hemos mencionado en la introducción, la PTx es una proteína multimérica del tipo AB, donde la subunidad A (monomérica) es la responsable del efecto toxico a través de su función de ADP-ribosil transferasa sobre proteína G_i en la membrana de varias células del sistema [26]. La resultante de la inhibición de las vías de señalización acopladas a G_i inhibe a su vez varias vías de señalización de quimioquinas y conduce a discapacidad de quimiotaxis de macrófagos, neutrófilos y linfocitos [110]. La producción de esta toxina también se ha asociado con un retraso en la infiltración de neutrófilos a los pulmones con la consecuente letalidad [59, 114, 204, 267]. Por otra parte se ha descrito que esta toxina tiene la capacidad de actuar como adyuvante activando la respuesta humoral tanto local como sistémica, estimulando la producción de IgE, IgA e IgG [268, 269]. Se ha demostrado también que PTX es capaz de inducir un perfil de respuesta Th1 y Th2 cuando es co-administrada con otros antígenos [270, 271]. Recientemente Nasso y colaboradores demostraron que la PTX detoxificada genéticamente, es capaz de estimular una respuesta Th1/Th17 por la vía de la interleuquina IL10 [272].

La pertactina por su parte es una proteína de las superficie bacteriana, que contiene un dominio RGD (Arg-Gly-Asp) que interviene en la interacción con las células eucariotas [26]. Los anticuerpos anti-Prn mostraron ser esenciales en la opsonofagocitosis descrita para *B.*

pertussis [273]. Más aún, estudios clínicos lograron evidenciar la existencia de cierta correlación entre los título anti-Prn y los niveles de protección [274].

La otra proteína incluida tanto en las vacunas acelulares de 3 como en la de 5 componentes es la hemaglutinina filamentosa (FHA), cuyo principal rol descrito es el de adhesina [26, 275]. Esta proteína de 232KDa se encuentra presente en la superficie bacteriana pero también en el medio extracelular. De esta proteína se han descrito propiedades inmumoduladoras por lo que su inclusión en las vacunas aún hoy es controvertida [190]. No obstante, las vacunas siguen conteniendo esta proteína.

Para desarrollar el objetivo propuesto trabajamos con bacterias deficientes en cada uno de los inmunógenos descritos. Fue a través del empleo de estos mutantes defectivos que obtuvimos OMVs para ser caracterizadas tanto *in vitro* como *in vivo*. A continuación presentaré los resultados alcanzados.

CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPALES INMUNÓGENOS PRESENTES EN LA VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA (OMVS)

Para poder evaluar el rol de los antígenos vacunales en cuanto a su contribución en la protección inducida por las OMVs trabajamos con 3 mutantes de *B. pertussis* defectivos en la expresión de cada uno de estos inmunógeno. Al mutante defectivo en la expresión de PTx lo hemos designado Bp Δ PTx, el que no expresa Prn, Bp Δ Prn y por último el que no expresa FHA (Bp Δ FHA). Estos mutantes defectivos que fueron cedidos gentilmente por los investigadores que los obtuvieron, derivan toda de la cepa parental *B.pertussis* Tohama I (Bpwt) [276-278].

Para obtener las OMVs derivadas de cada de uno de los mutantes de *B. pertussis* defectivos en la expresión de los inmunogenos mencionados seguimos la metodología descrita por Hozbor y colaboradores (1999). Para ello realizamos cultivos líquidos empleando el medio de Stainer Scholte suplementado con casaminoácidos. A partir de bacterias cosechadas en fase exponencial tardía hicimos los tratamientos con buffers, el proceso de sonicación y las distintas etapas de centrifugación según lo descrito [250]. Tanto el proceso de obtención de las OMVs como las metodologías empleadas para su caracterización han sido puestas a punto en nuestro laboratorio varios años atrás [20-24, 250].

El proceso de obtención de las distintas OMVs se realizó al menos 4 veces. Las OMVs derivadas de cada cepa mutante fue analizada en su identidad y morfología mediante observaciones utilizando microscopia electronica de transferencia (MET) [250]. A modo de ejemplo en la Figura 21 se muestran las imágenes obtenidas por tinción negativa con ácido fosfotugnstico al 2%.

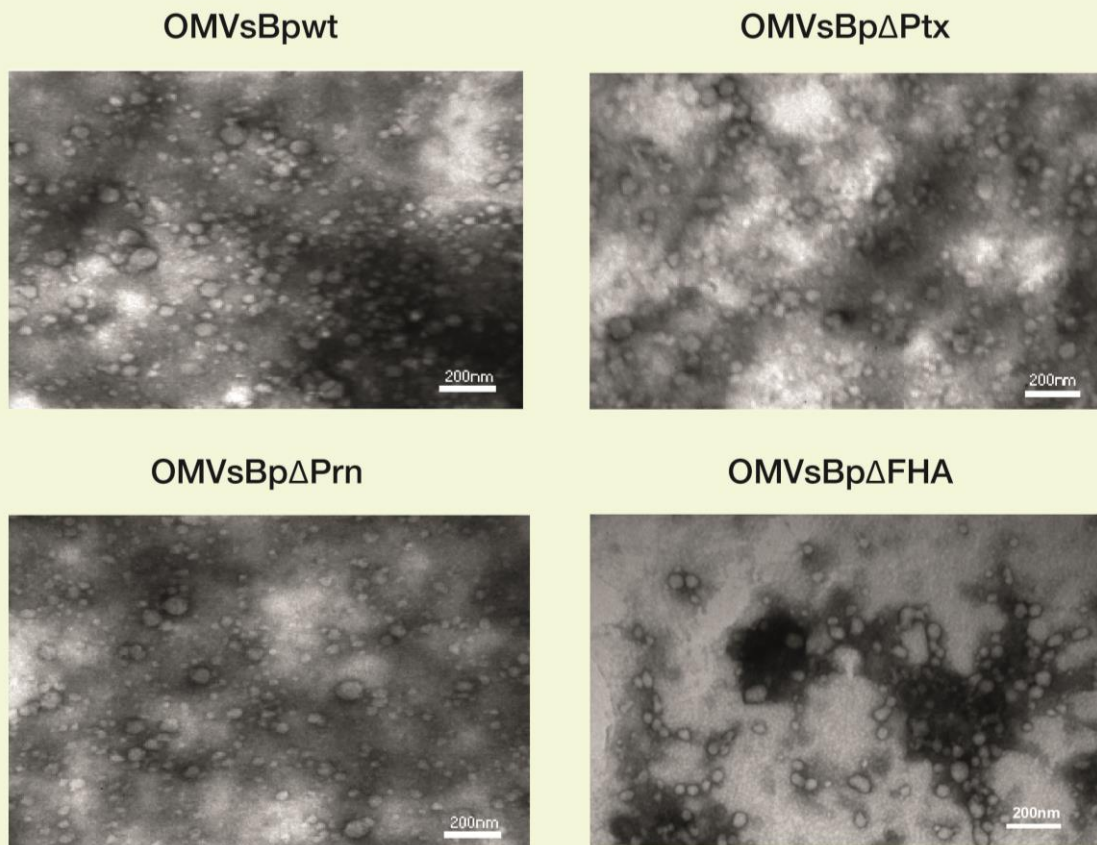
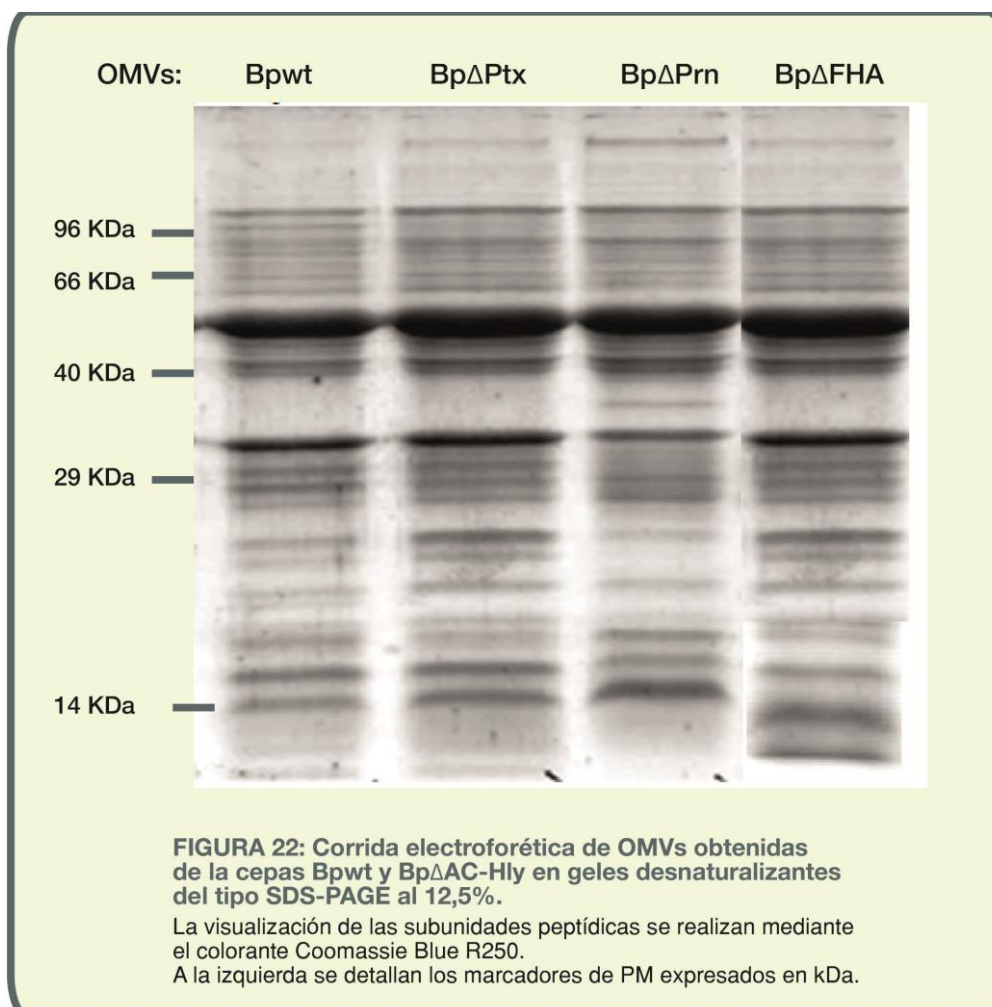


FIGURA 21

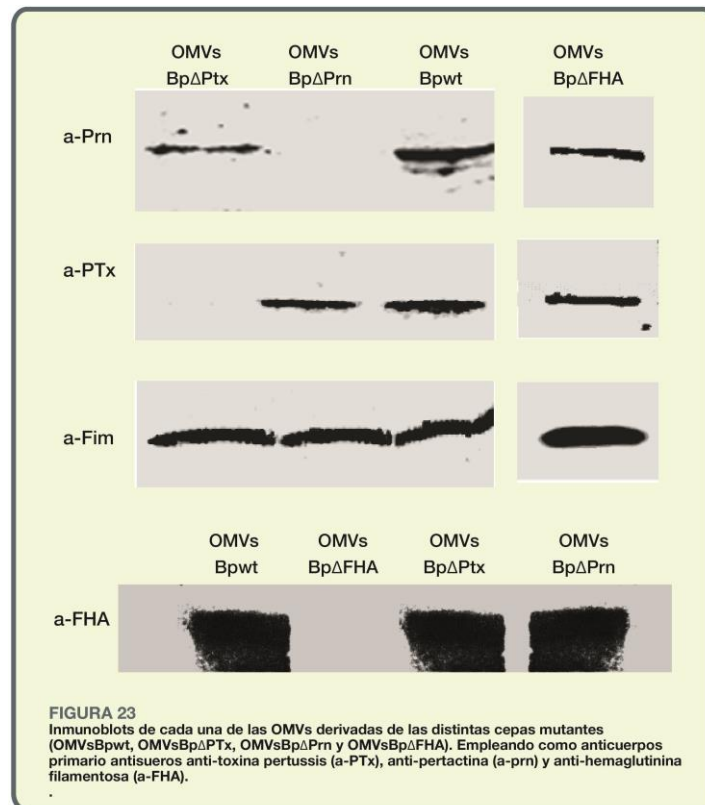
Microscopias electrónicas de OMVs derivadas de la cepa parental Bp Tohama fase I (OMVsBpwt) y de los mutantes defectivos en la expresión de PTx (OMVsBpΔPtx), PRN (OMVsBpΔPrn) o FHA (OMVsBpΔFHA). Para la visualización se realizó una tinción negativa, La observación se realizó en un microscopio electrónico de transmisión (Jeol JEM 1200EX). La barra refiere a la escala: 200nm

Como puede observarse en todos los casos se detecta la presencia de vesículas con tamaños entre 50-200nm de diámetro y de una distribución homogénea tanto para las OMVs obtenidas de la cepa parental como para las OMVs derivadas de las cepas mutantes. No se observaron diferencias entre lotes ni entre las OMVs derivadas de las distintas cepas mutantes.

El perfil proteico de cada una de las preparaciones de OMVs fue analizado mediante corridas electroforéticas en geles desnaturizantes del tipo SDS-PAGE (12,5% p/v). Los resultados alcanzados se muestran en la Figura 22. Como puede observarse, los perfiles proteicos en todos los casos está constituido por al menos 20 bandas con PM que varían entre 12 y 120 kDa. Los perfiles son similares para las distintas OMVs obtenidas. Sólo se han detectado algunas bandas diferenciales. Los resultados obtenidos se han repetido para los distintos lotes obtenidos para cada una de las OMVs.

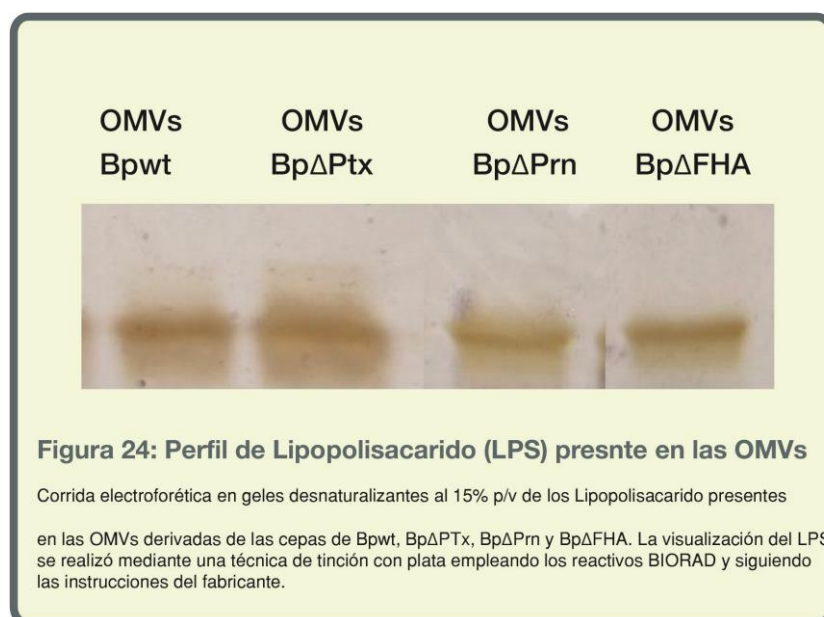


Para confirmar que las OMVs derivadas de la cepa parental contenían los inmunógenos Ptx, PRN y FHA como había sido descrito oportunamente realizamos ensayos de inmunoblot empleando anticuerpos policlonales específicos para cada una de las proteínas mencionadas. Esta metodología fue extendida a las demás OMVs obtenidas de las cepas mutantes. Los resultados alcanzados se presentan a modo de ejemplo en la Figura 23.



Como puede observarse en la Figura 23, en las OMVs derivadas de la cepa parental cada uno de los antiseros reconoció bandas de PM correspondiente a cada uno de los inmunógenos ensayados por lo que nos permite confirmar la presencia de los mismos en estas OMVs. Por otra parte y como esperábamos, en cada una de las OMVs obtenidas de las distintas cepas defectivas de *B. pertussis* pudimos detectar la ausencia del inmunógeno cuya secuencia está deletada, y la presencia de los demás inmunógenos analizados. Como control del blotting y de carga proteica incluimos el revelado con anticuerpos anti-fimbria (FIM). Como puede observarse en la figura el reconocimiento de este anticuerpo frente a las distintas OMVs fue similar (Figura 23).

Para completar la caracterización de las OMVs derivadas de las distintas cepas evaluadas realizamos corridas electroforéticas para detectar la presencia del lipopolisacárido (LPS). Los resultados presentados en la Figura 24 muestran un perfil similar del LPS para las distintas OMVs evaluadas. Aunque esta metodología no es cuantitativa nos permite evidenciar que no existen diferencias abruptas entre las distintas OMVs del contenido del LPS. Este componente es ubicuo de la membrana externa de todas las bacterias Gram negativas por lo que su presencia contribuye a identificar la naturaleza de nuestras preparaciones. La presencia de esta molécula es controvertida ya que por un lado a se le ha adjudicado un importante poder adyuvante pero también se le ha asociado con la inducción de reacciones adversas de forma dependiente de la cantidad [279, 280]. En el laboratorio hemos podido determinar que esta cantidad de LPS se corresponde a la contenida en una suspensión bacteriana que contiene 1×10^7 bacterias. Este valor es mucho menor (1000 veces menor) al contenido en una dosis de vacuna celular humana (10^{10} bacteria por dosis).



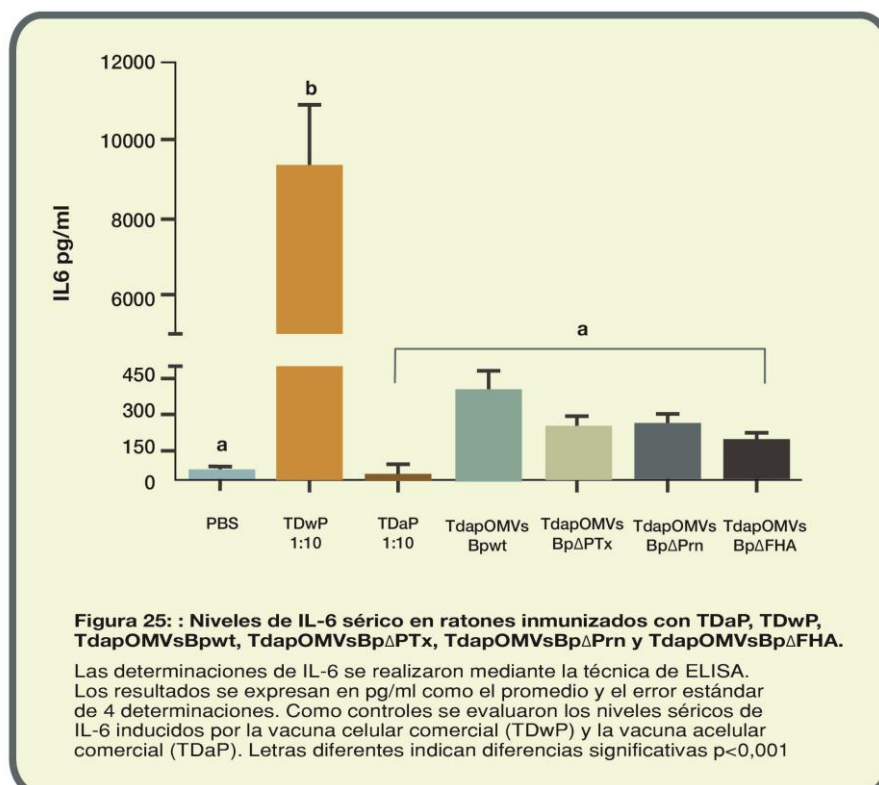
EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS DISTINTAS FORMULACIONES VACUNALES.

En experimentos previos sobre distintos lotes de OMVs de la cepa parental obtenidos en el laboratorio hemos evaluado la toxicidad de las vacunas formuladas en base a las mismas y hemos observado que estas formulaciones resultan seguras ya que cumplen con las

recomendaciones de bioseguridad establecidas por la OMS [23, 24]. Con los lotes hasta aquí caracterizados decidimos evaluar la toxicidad no sólo de las OMVs derivadas de la cepa parental sino de aquellas derivadas de las cepas defectivas en la expresión de los distintos inmunógenos (OMVsBp Δ PTx, OMVsBp Δ Prn y OMVsBp Δ FHA). Para ello empleando el modelo de inmunización intraperitoneal en ratones realizamos medidas de una interleucina que da cuenta de la inflamación como lo es la IL-6 y ensayos de ganancia de peso en ratones. Con fines comparativos incluimos también un grupo de ratones inmunizados con vacuna comercial celular (wP) y la vacuna acelular (TdaP).

Todos los ensayos funcionales de la OMVs se realizaron a partir de formulaciones que contenían a cada una de las OMVs detoxificadas con formaldehído, aluminio como adyuvante y los toxoides tetánico y diftérico, de modo de obtener una formulación similar a las vacunas comerciales [24]. De aquí en más estas formulaciones fueron designadas como TdapOMVsBpwt, TdapOMVsBp Δ PTx, TdapOMVsBp Δ Prn y TdapOMVsBp Δ FHA respectivamente.

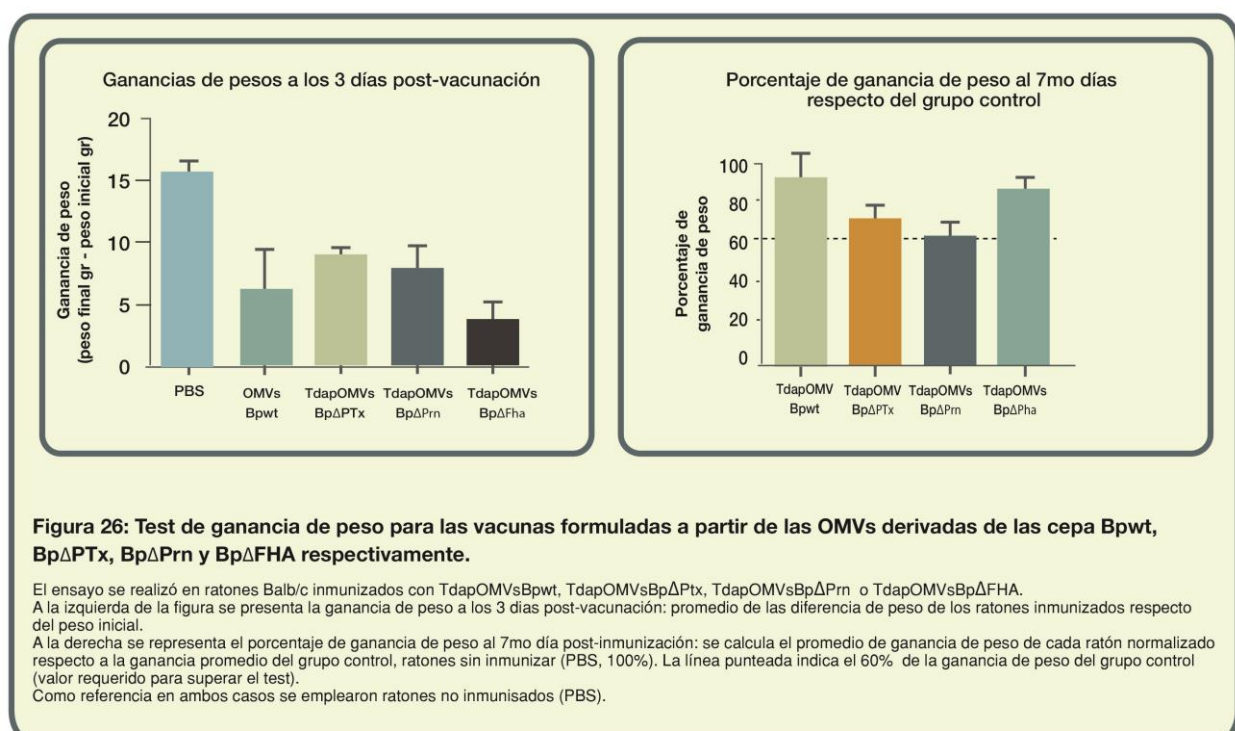
Los niveles hallados de IL-6 a las 4 h post primera inmunización se presentan en la Figura 25



Como podemos observar en dicha figura, la cantidad de la interleuquina IL-6 serica expresada en pg/ml detectada en los ratones inmunizados ya sea con la vacuna comercial aP o con cualquiera de las formulaciones que contienen a las OMVs resulta menor que 400 pg/ml siendo los valores similares a los detectados en los ratones no inmunizados ($p < 0,001$). Por el contrario y como era esperable para el tratamiento con vacuna comercial wP los niveles de IL-6 resultaron ser superiores con valores de 9.262 ± 1.600 pg/ml. Estos valores de IL-6 para wP son significativamente más alto que los detectados para cualquiera de las vacunas ensayadas.

Siguiendo las recomendaciones de la OMS también realizamos el test de ganancia de peso [281] que involucra el seguimiento del peso de los ratones inmunizados a 16 horas, 3 días hasta 7 días post primera inmunización. Para que una vacuna sea considerada como no toxica, deben cumplirse los siguientes requisitos:

- El peso total del ratón vacunado al 3er día debe ser el mismo o mayor que el peso inicial.
- Al 7mo día el promedio de la ganancia de peso en el grupo vacunado no puede ser menor al 60% de la ganancia de peso promedio del grupo control.
- No se deben morir más del 5% de los animales durante el ensayo



En la Figura 26 se muestra a modo de ejemplo los registros de pesos correspondientes a los 3 y a los 7 días post primera inmunización

Los datos recolectados nos han permitido confirmar que todas las formulaciones empleadas en los ensayos cumplen con las recomendaciones de la OMS. Así detectamos que a los tres días post primera inmunización todos los grupos no solo recuperan el peso de los animales al iniciar la inmunización sino que logran aumentar de peso. A los siete días también pudimos detectar que los pesos de los ratones superan el 60% del aumento que alcanzan los ratones no inmunizados (PBS).

Todos estos resultados nos permiten asegurar que los niveles de toxicidad para todas las vacunas formuladas a partir de las distintas OMVs son los adecuados. Más aún, nos permiten afirmar que las modificaciones en la expresión de los componentes de la membrana externa no producen cambios significativos que pudieran alterar la toxicidad de las mismas.

Una vez caracterizadas las OMVs y las formulaciones basadas en ellas procedimos a evaluar la capacidad protectora de las mismas a través del empleo del modelo de desafío intranasal en ratones.

EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN CONFERIDA POR LAS VACUNAS ACELULARES BASADAS EN VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA

Para evaluar el poder protector de una vacuna se emplean modelos animales y en algunos casos, en los que exista un correlato de protección medible *in vitro*, se evitan los ensayos *in vivo*.

Para el caso de pertussis, no se ha podido establecer un correlato de protección que sea factible de ser medido *in vitro* por lo que se deben emplear modelos animales. De hecho para este patógeno, en principio estricto del hombre, se han desarrollado y empleado distintos modelos en conejos, cobayos, cerdos, ratas, ratones y pequeños primates [282]. Estos modelos se han empleado con distintos fines de investigación. El modelo de rata tiene la particularidad de que utilizando una determinada dosis el animal no sólo desarrolla la infección sino que también presenta la sintomatología característica de la enfermedad, es decir la tos paroxística [283]. Este modelo puede así utilizarse para evaluar el proceso de

transmisión de la enfermedad. Recientemente se ha desarrollado un modelo en primates que supera al anterior ya que permite además evaluar la inmunidad desencadenada por la vacunación. Los resultados que se extraen en el modelo de primates son más próximos a los datos hallados en el hombre [222]. Lamentablemente el uso de este modelo es bastante restringido por la inaccesibilidad y el costo de los animales. Otro modelo que se ha empleado es el de lechones recién nacidos los cuales interesantemente presentan síntomas clínicos similares a los humanos y en particular presentan una bronconeumonía severa que correlaciona con la patofisiología encontrada en pulmones de niños [284, 285].

El modelo animal murino ha sido y lo sigue siendo, el más ampliamente utilizado por la facilidad en la manipulación de los animales, accesibilidad y porque refleja características de la infección humana tales como la alta susceptibilidad a *B.pertussis* de ratones recién nacidos respecto a los adultos, períodos similares de infección pulmonar y manifestaciones causadas por acción de la toxina pertussis (hipoglucemia, leucocitosis y sensibilización a la histamina) [286]. La afección en ratones también es dependiente, al igual que en humanos, de la dosis de bacteria utilizada en la infección. Aunque no desarrollan tos, se ha podido evidenciar que existe una correlación muy buena entre la efectividad de la vacuna en humanos y la capacidad de eliminar bacterias de los pulmones en ratones inmunizados y luego desafiados con una suspensión bacteriana [282, 287]. El primer modelo murino utilizado para evaluar la efectividad de las vacunas fue el desarrollado por Perla Kendrick y Grace Elderling en 1946. Este modelo incluía un desafío intracraneal letal luego de la inmunización [142]. La efectividad e incluso la potencia de las vacunas se evaluaban analizando la supervivencia de los ratones inmunizados. Este método es el que se ha utilizado y todavía se sigue utilizando como método de referencia para evaluar la eficacia de vacunas celulares [288]. Para las vacunas acelulares sin embargo se determinó que el desafío intranasal es el más adecuado para evaluar capacidad protectora de las mismas [289]. En este modelo en lugar de analizar la cinética de muerte, se evalúa el número de bacterias (unidades formadoras de colonias, UFC) que se encuentran colonizando el tracto respiratorio del animal luego del desafío [289, 290]. Se ha podido evidenciar que la protección en términos de reducción de UFC determinada en este modelo correlaciona de forma adecuada con la eficacia de las vacunas acelulares pero también las celulares. En el caso de vacunas protectoras los ratones inmunizados resuelven la infección en un plazo de entre 3 y 10 días, mientras que los ratones no inmunizados lo

hacen en un plazo de entre 30 y 40 días. Las dosis que se emplea para el desafío son subletales aproximadamente 10^7 bacterias y estos valores deben descender de manera significativa en caso de estar en presencia de una formulación protectora.

En este contexto, para evaluar la capacidad protectora de formulaciones basadas en OMVs utilizamos el modelo murino de desafío intranasal [24]. En trabajos previos hemos establecido la dosis protectora de las formulaciones a OMVs en términos de cantidad de proteína [23, 24]. La vía de inmunización empleada es la intraperitoneal, y el número de dosis es dos (separadas 14 días) según lo aceptado en *B. pertussis* [289]. Para el desafío empleamos una suspensión bacteriana de *B. pertussis* Tohama I que contenía aproximadamente 5×10^7 UFC/40 μ l. La protección la evaluamos realizando recuento de colonias recuperadas de los pulmones al día 7 post desafío [289]. Como control negativo de protección empleamos a un grupo de ratones que fueron tratados con PBS. Como control positivo empleamos un grupo de ratones inmunizados con una vacuna acelular comercial en alta dosis (1/10 de la dosis humanas). Estos experimentos los hemos realizados al menos 3 veces en ensayos independientes.

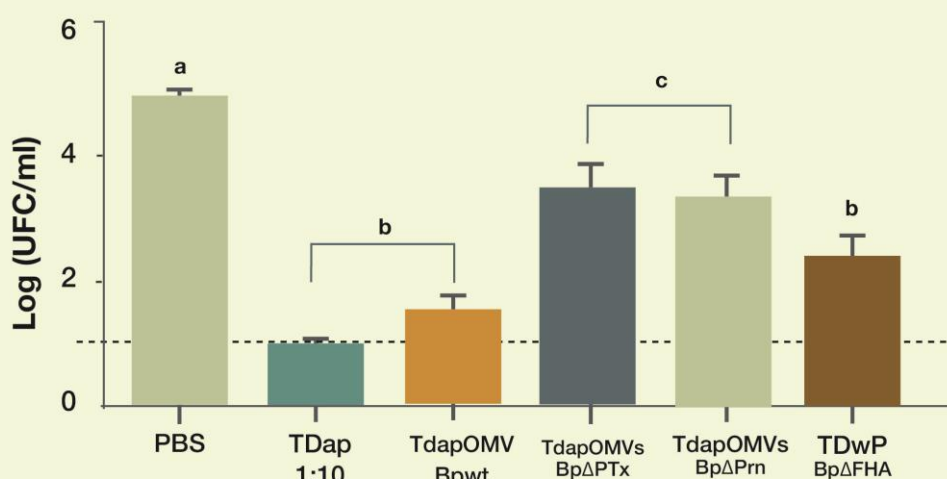


Figura 27 . Efecto de la inmunización sistémica con TdapOMVsBpwt, TdapOMVBpΔPTx, TdapOMVBpΔPrn o TdapOMVBpΔFha en el modelo de desafío intranasal ratón.

Como control positivo de protección se empleó a la vacuna Tdap Comercial (1/10 de la dosis humana). Para el desafío se empleó una suspensión subletal de *B. pertussis* Tohama I (5×10^7 CFU 40 μ l⁻¹). Se realizaron tres experimentos independientes.

Los resultados presentados son representativos de un experimento. Los resultados mostrados se corresponden a los hallados a los 7 días post desafío y refieren a la media de cuatro ratones por grupo. La línea discontinua indica el límite inferior de detección.

El número de bacterias recuperadas de los pulmones del ratón se expresan como el Log de la media \pm error estándar (barras de error) de las unidades formadoras de colonias por ml. El análisis estadístico se realizó mediante el test de Bonferroni. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,001$.

En la Figura 27 se muestra el efecto en la colonización de *B. pertussis* por la administración de 2 dosis de cada una de las vacunas ensayadas.

Como puede observarse en la Figura 27 los recuentos bacterianos detectados en los pulmones obtenidos de los ratones tratados con TdapOMVsBpwt resultaron ser significativamente menores que los del grupo control negativo ($p < 0,001$). Estos resultados confirman nuestros resultados anteriores sobre las OMVs derivadas de la cepa parental. En esta figura también se puede observar que el número de colonias recuperadas de los pulmones de ratones inmunizados con la vacuna TdapOMVsBp Δ Ptx al día 7-post desafío fue menor que el observado en animales tratados con PBS, pero más alto que el tratamiento TdapOMVsBpwt (Fig 27). Se obtuvieron resultados similares con la TdapOMVsBp Δ Prn. La vacuna conteniendo la OMVs derivada del mutante defectivo en Prn disminuye su capacidad de protección en aproximadamente dos órdenes de magnitud, mostrando así su rol determinante en la capacidad de protección que confieren las OMVs (Fig. 27).

El análisis de los resultados obtenidos para la vacuna TdapOMVsBp Δ FHA muestra que el nivel de protección por ella ejercido no resulta diferencial respecto del observado para la formulación con las OMVs derivadas de la cepa parental ($p < 0,05$). Estos resultados indicarían que la ausencia de FHA en las OMVs no impactaría en la capacidad protectora por ellas ejercidas.

Todos los resultados presentados datos aquí confirman la importancia de PTx y Prn en la obtención de una respuesta protectora contra pertussis. El rol protector de la FHA en el marco de las OMVs parecería no ser importante.

DISCUSIÓN

Previamente hemos demostrado en nuestro laboratorio que las vesículas de membrana externa obtenidas de *B. pertussis* son buenos candidatos vacunales con características que parecen superar a las limitaciones que presentan las actuales vacunas [18, 182, 198, 223, 235]. En trabajos previos hemos caracterizado la respuesta inmune protectora inducidas por las OMVs [23, 24], pero restaba avanzar en la identificación de factores que fueran claves en la protección por ellas inducidas [20]. En el trabajo aquí presentado hemos podido confirmar

a través del empleo de OMVs derivadas de bacterias deficientes en la expresión de PTx, la importancia de este inmunógeno en la capacidad protectora que inducen las vacunas que contienen OMVs [21].

Los ensayos realizados con formulaciones que contienen OMVs que carecen de Prn o FHA nos permitieron evidenciar que la presencia de Prn en las OMVs pero no la de FHA resulta esencial en el desarrollo de la capacidad protectora inducidas por las OMVs (resultados recientemente publicados Ormazabal et al. 2014 ref:[21]). Estos resultados señalan una vez más la importante contribución de Prn a la respuesta anti-pertussis por encima de la FHA. Estos datos concuerdan con la relativa pronta inclusión de este componente en las vacunas acelulares de 3 y 5 componentes [198]. Más aún, en varios estudios realizados en animales y humanos se ha demostrado que la Prn de *B. pertussis* es capaz de inducir anticuerpos que estarían involucrados en los mecanismos de protección contra *B. pertussis* [273, 274]. De hecho se ha reportado que los anticuerpos anti-pertactina son cruciales para la fagocitosis de *B. pertussis*, mecanismo que resulta esencial en la protección contra la enfermedad [113, 273, 291, 292].

La prevalencia actual de aislamientos clínicos de *B. pertussis* en los que no se detecta la presencia de Prn en regiones geográficas con alta cobertura de vacuna, marcaría también la importancia de este componente en la protección ya que la ausencia del mismo significaría una ventaja adaptativa en una población inmunizada [202, 204-207]. Las actuales vacunas acelulares constituidas por unos pocos componentes en dosis alta parecerían ser las responsables de la emergencia y propagación de aislamientos antígeno-deficientes [198].

En suma nuestros resultados no sólo han permitido confirmar la capacidad protectora de OMVs derivadas de la cepa parental sino que también han demostrado la relevancia de inmunógenos como Prn y PTx en la protección. Estos datos resultan valiosos ya que la evaluación de estos inmunógenos podría ser utilizada como marcadores de calidad de las OMVs durante el proceso productivo.

SECCION 2.2: CARACTERIZACIÓN DE LA TOXINA ADENILATO CICLASA EN EL CONTEXTO DE LA VACUNA BASADA EN LAS OMVs**INTRODUCCIÓN**

En la sección anterior hemos presentado los resultados obtenidos al evaluar el rol de la presencia de conocidos inmunógenos constituyentes de las actuales vacunas AP comerciales en el marco de las OMVs. En este capítulo evaluaremos el rol funcional de otra proteína de *B. pertussis*: la Adenilato Ciclasa-Hemolisina (AC-Hly) ya que ha sido detectada en las OMVs [250] y para la que se han descrito características que podrían hacerla atractiva como antígeno vacunal [60, 293]. Esta toxina que se expresa en *B. pertussis* y en otras especies que constituyen el género *Bordetella*, se localiza en la superficie de la bacteria y en el medio extracelular. Se sintetiza como precursor de 1.706 residuos aminoacídicos y presenta dos tipos de actividades, la actividad adenilato ciclasa (AC) y como hemolisina (Hly) [84, 294, 295]. Esta última es dependiente de una modificación post traduccional que consiste en el agregado de un grupo palmitoilo a dos residuos de Lisina ubicados en las posiciones 860 y 983. La actividad adenilato ciclasa (AC) está asociada al extremo N-terminal de este polipéptido (aproximadamente 400 aminoácidos) mientras que la capacidad hemolítica (Hly) está confinada al extremo C-terminal. Ambos dominios, AC y Hly presentan características estructurales similares a las toxinas de la familia de toxinas RTX (Repeat in Toxin) ya que contienen un arreglo de repeticiones en tándem de 9 aminoácidos L-X-G-G-X-G (N/D)-D-X-(U)-X (código de aminoácido de una letra, X representa cualquier aminoácido y U representa cualquier residuo grande hidrofóbico como I, L, V, F, Y) que están involucrados en la unión a calcio [60, 296].

La mayor parte de la toxina permanece asociada a la superficie celular y su secreción al medio extracelular parecería estar regulada por la proteína FHA. Se ha demostrado que mutantes de *B. pertussis* que no expresaban FHA, liberaban más AC-Hly al medio extracelular y que la asociación de la toxina a la superficie bacteriana podía ser restablecida mediante la expresión de FHA a partir de la secuencia codificante contenida en un plásmido [297].

La actividad ciclasa de la proteína AC-Hly altera las funciones fisiológicas de la célula eucariota mediante la síntesis descontrolada de cAMP intracelular a partir de ATP [298, 299].

Esta proteína bi funcional es capaz de formar canales selectivos de cationes en las membranas eucariotas mediante el dominio con actividad hemolisina [300, 301]. Esta toxina inhibe además la fagocitosis de los macrófagos e induce la apoptosis en estas células [82, 85, 302, 303].

En cuanto a las propiedades inmungénicas de esta toxina se cuenta con datos que muestran la presencia de anticuerpos anti-AC-Hly en la mayoría de los pacientes diagnosticados con pertussis [304]. Más aún, en un estudio publicado en el 2004 se presentaron resultados que demuestran la presencia de anti-AC-Hly no sólo en pacientes infectados no vacunados, sino también en pacientes infectados que habían recibido dosis de vacunas. Sin embargo, el nivel en los pacientes vacunados fue mucho menor [305]. Este trabajo logró demostrar de manera concluyente que existe una importante respuesta de anticuerpos contra la AC-Hly en los chicos infectados.

Otro aspecto importante que se ha descrito para esta proteína es su capacidad que tiene de actuar como adyuvante al co-administrarse con otros antígenos [306-310]. Se ha demostrado que el empleo de la proteína sin actividad enzimática en combinación con los distintos antígenos de la vacuna aP conduce a un aumento en el título de anticuerpos, y en la respuesta celular orientándola a un perfil mixto Th1/Th2 a diferencia del típico Th2 de la vacuna aP [311, 312].

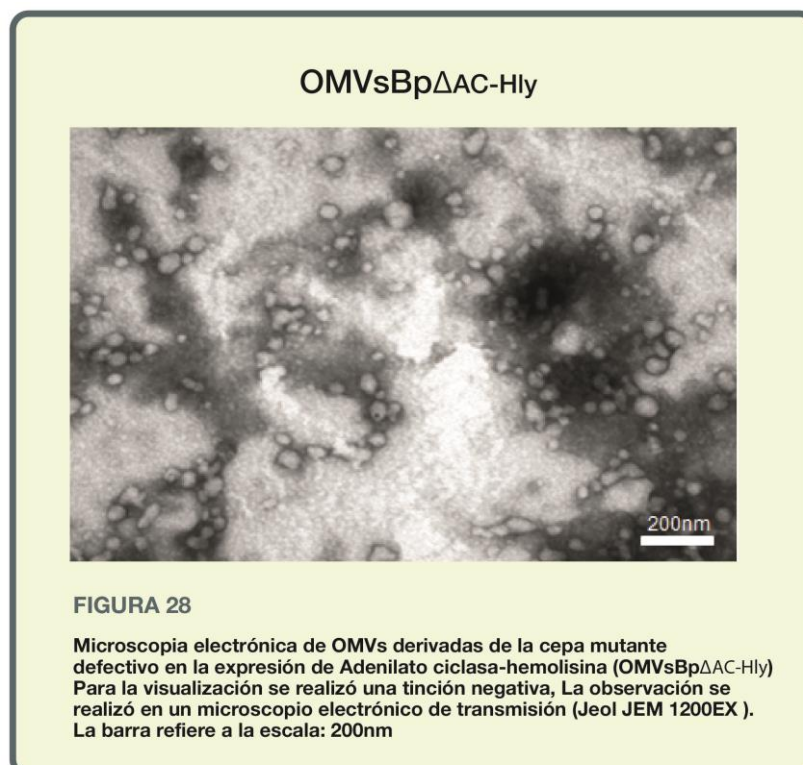
En base a estas propiedades y al hecho de la detección de la presencia de la AC-Hly en las OMVs decidimos evaluar el rol de esta proteína en la protección conferida por las OMVs. Para desarrollar este objetivo contamos con una cepa defectiva en AC-Hly (Bp Δ AC-Hly) gentilmente cedida por el Dr. Peter Sebo. Este mutante es derivado de la cepa parental *B. pertussis Tohama I*.

A partir de esta cepa obtuvimos OMVs, las cuales fueron caracterizadas empleando las mismas metodologías anteriormente descritas. A continuación presentamos los resultados alcanzados.

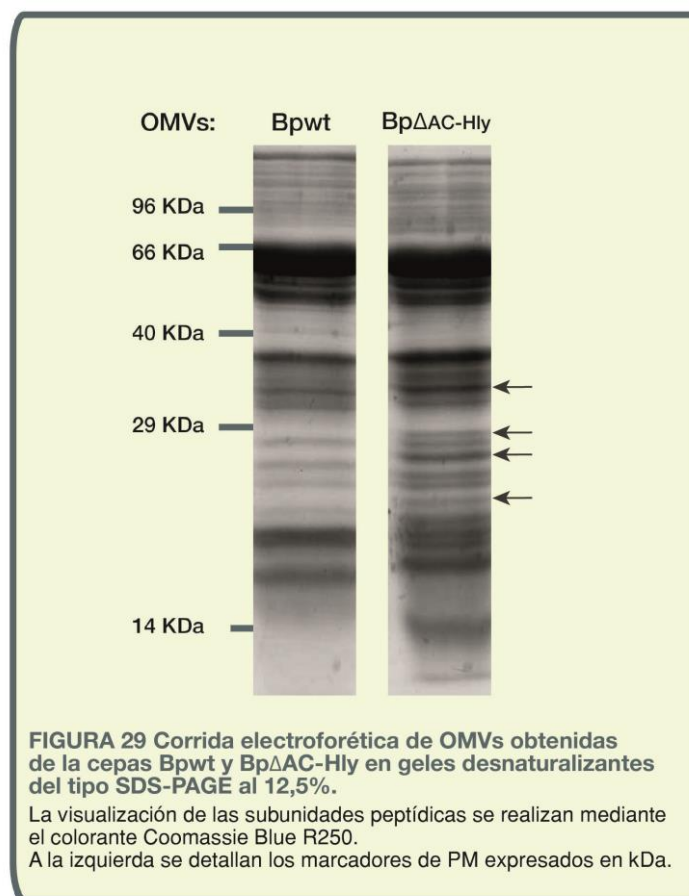
CARACTERIZACIÓN DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA (OMVs) OBTENIDAS.

Para la caracterización funcional de la AC-Hly en el marco de las OMVs, primeramente procedimos a la obtención y caracterización de las vesículas derivadas de la cepa mutante defectiva en la expresión de la AC-Hly (de aquí en más designada como Bp Δ AC-Hly) como así también de la cepa parental Bpwt.

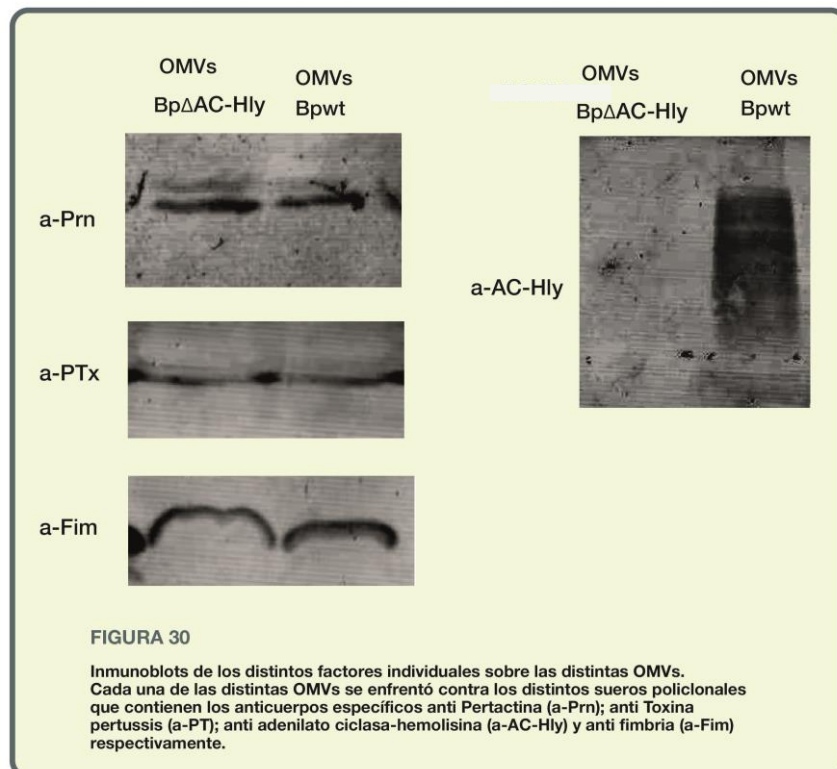
La metodología de obtención para estas vesículas fue la misma que la anteriormente descrita para las otras OMVs evaluadas durante este trabajo de tesis [20-24, 250]. Luego de realizar el proceso de obtención para al menos 3 lotes, analizamos la identidad y la morfología de las OMVs mediante microscopía electrónica de transferencia (MET), corridas electroforéticas en geles 1D e inmunoblottings [250]. En la Figura 28 se muestra una de las micrografías realizada con tinción negativa correspondiente a uno de los lotes obtenidos. Resultados similares se obtuvieron para cada uno de los lotes mostrando una vez más la robustez de la metodología seguida. En las imágenes presentadas se pueden apreciar a las OMVs con tamaños distribuidos homogéneamente entre 50-200nm de. Estos resultados son similares a los obtenidos para las otras OMVs ensayadas.



En cuanto al perfil proteico de estas OMVs el mismo fue analizado comparativamente con el de las OMVs proveniente de la cepa parental mediante corridas electroforéticas en geles desnaturizantes del tipo SDS-PAGE (12,5% p/v). Los resultados alcanzados se muestran en la Figura 29. Como puede observarse en esta figura los perfiles obtenidos para ambas OMVs son similares, ya que presentan prácticamente las mismas bandas de PM distribuidos entre 12 y 120 kDa. Existen muy pocas bandas diferenciales detectadas señaladas en la figura mediante flechas. Estos resultados que se repitieron para los distintos lotes obtenido son consistentes con los alcanzados para las OMVs descriptas anteriormente.



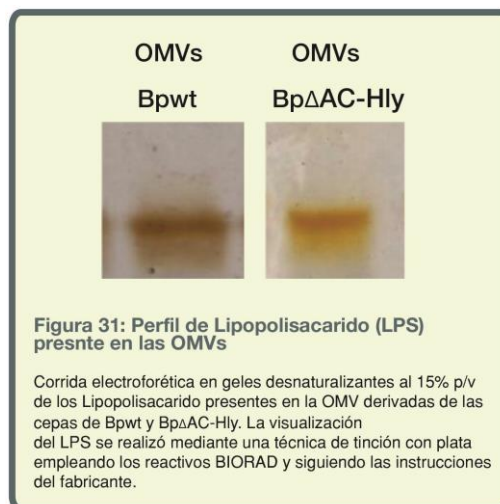
Con el fin de evaluar la presencia de los antígenos PTx, Prn y FIM así como la expresión de la AC-Hly en las OMVs obtenidas realizamos ensayos de inmunoblotting empleando anticuerpos policlonales específicos para cada uno de los inmunógenos. Los resultados se presentan a modo de ejemplo en la Figura 30.



Como puede observarse en la Figura 30, los antisueros anti-PTx, anti-Prn y anti-FIM reconocieron en la OMVsBpwt y en la OMVsBpΔAC-Hly bandas de PM correspondiente a cada uno de los inmunógenos ensayados (PTx, Prn y FIM). En cuanto a la presencia o ausencia de la AC-Hly, como era esperado sólo se pudo detectar reconocimiento en las OMVsBpwt. El perfil de reconocimiento incluye más de una banda que según lo descrito por otros autores y por nosotros mismos se corresponde a productos de degradación de la AC-Hly, ya que se trata de una proteína muy sensible a la proteólisis. Como control de carga proteica en los geles para ambas OMVs y también como control del immunoblotting se realizó la detección del antígeno Fim.

Para completar la caracterización de las OMVs sujetas a estudio realizamos otras corridas electroforéticas para detectar la presencia del lipopolisacrido (LPS). Los resultados presentados en la Figura 31 muestran un perfil similar del LPS para las ambas OMVs evaluadas.

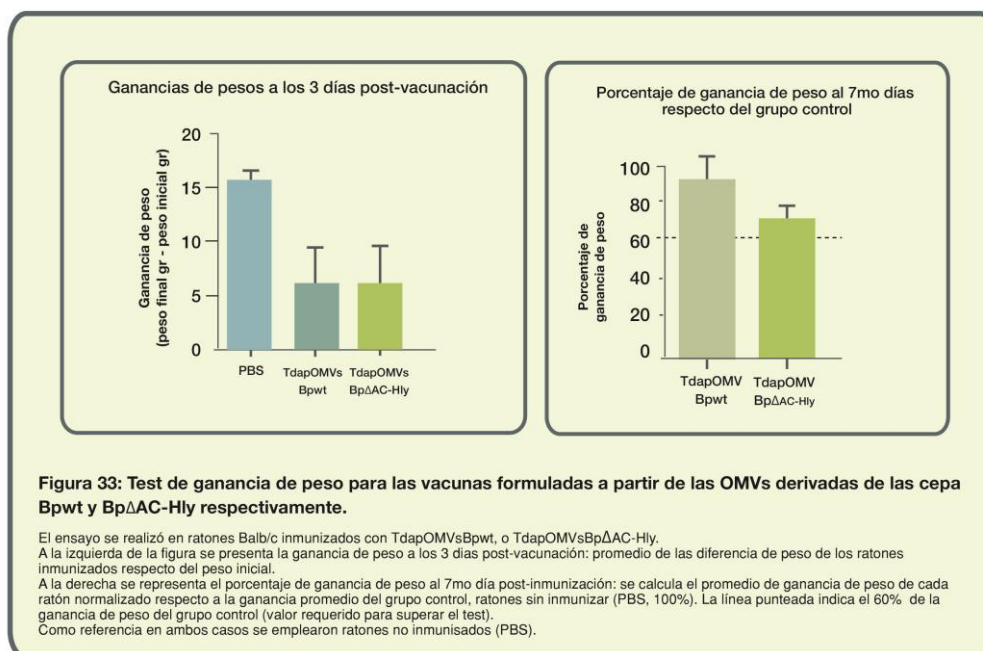
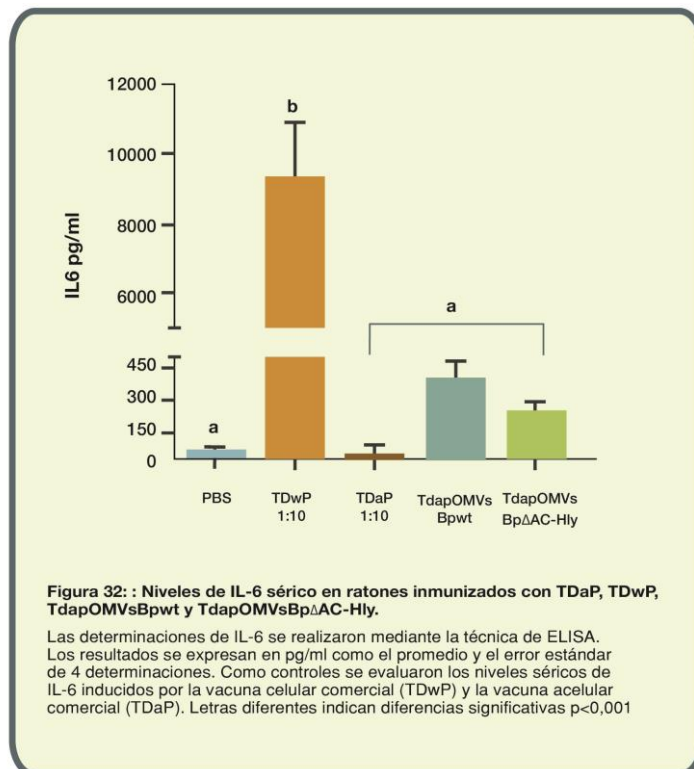
Al igual que para las OMVs obtenidas de las otras cepas defectiva pudimos determinar que la cantidad de LPS en las OMVs se corresponde a la contenida en una suspensión bacteriana que contiene 1×10^7 bacterias. Este valor nuevamente resulta ser mucho menor (1000 veces) al contenido en las vacunas wP.



EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LA FORMULACION VACUNAL CONTENIENDO A LAS OMVSBPΔAC-HLY.

A partir de los distintos lotes de OMVsBpwt y OMVsBpΔAC-Hly caracterizados formulamos las vacunas con adyuvante y los toxoides tetánico y diftérico (TdapOMVsBpwt y TdapBpΔAC-Hly respectivamente) para poder evaluar en primer lugar su toxicidad y luego su capacidad protectora en el modelo murino de desafío intranasal. Para ello realizamos tanto medidas de IL-6 en el suero de los ratones post inmunizados como también el test de ganancia de peso en ratones siguiendo las metodologías antes descriptas [23, 24]. Con fines comparativos incluimos un grupo de ratones inmunizados con vacuna comercial celular (wP) y vacuna acelular (TdaP). Como control negativo de toxicidad se empleó un grupo de ratones no inmunizados (ratones PBS).

Los niveles hallados de IL-6 a las 4 h post primera inmunización y los resultados de los pesajes para evaluar la ganancia de peso se presentan en las Figuras 32 y 33 respectivamente.



Como podemos observar en la Figuras 32 y 33, tanto los niveles que se detectan de IL-6 en el suero de los ratones como el test de ganancia de peso demuestran que esta nueva formulación mantiene las características respecto a la seguridad y toxicidad como todas las vacunas formuladas con las distintas OMVs en este trabajo de tesis ensayada. Los niveles de IL-6 alcanzados en los ratones inmunizados con la formulación de OMVBpΔCya fueron de 260

± 29 pg/ml unas 35 veces menor que el valor hallado en los ratones inmunizados con la vacuna wP. Este valor para la TdapOMVsBp Δ AC-Hly no difiere significativamente del hallado para la vacuna aP y para la OMVBpwt ($p < 0,001$). En cuanto al test de ganancia de peso pudimos observar que al 3er día post inmunización (pi) todos los ratones inmunizados con ambas OMVs recuperan el peso inicial. Más aun al 7mo día post inmunización, observamos un aumento promedio de peso en el grupo inmunizado con las vacunas Tdap OMVs que supera el 60% del aumento de peso que logran los ratones control. Todos estos datos concuerdan con los requisitos para considerar a estas formulaciones conteniendo OMVs como formulaciones seguras.

Una vez caracterizadas tanto la TdapOMVs Bpwt y la TdapOMVsBp Δ Cya en cuanto a su composición y toxicidad, procedimos a evaluar la capacidad protectora de las mismas a través del empleo del modelo de desafío intranasal en ratones.

EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN CONFERIDA POR LAS VACUNA ACELULAR BASADA EN OMVSBP Δ AC-HLY

Con estas dos formulaciones vacunales de TdapOMVs procedimos a comparar el poder protector de las mismas a fin de evaluar el efecto sobre el mismo de la presencia o ausencia de la AC-Hly. Para ello empleamos el modelo murino de desafío intranasal en el que seguimos el esquema de 2 dosis espaciadas 14 días con desafío a los 7 días post segunda inmunización con una suspensión de *B. pertussis Tohama I* en dosis subletal. En la Figura 34 se presentan los resultados correspondientes al número de bacterias recuperadas en los pulmones de los ratones siete días después de haber sido desafiados con *B. pertussis*. Como control positivo de protección incluimos un tratamiento con vacuna acelular en alta dosis (dilución 1:10 de la dosis humana)[23]. Estos ensayos se realizaron por triplicado.

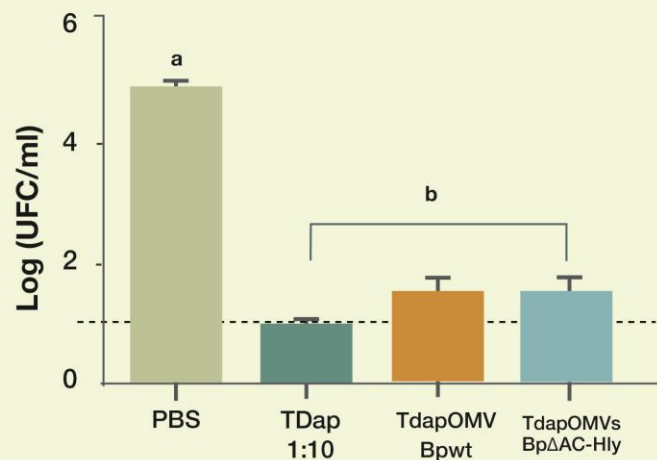


Figura 34 . Efecto de la inmunización sistémica con TdapOMVsBpwt, o TdapOMVsBpΔAC-Hly en el modelo de desafío intranasal ratón.

Como control positivo de protección se empleó a la vacuna Tdap Comercial (1/10 de la dosis humana). Para el desafío se empleó una suspensión subletal de *B. pertussis* Tohama I (5×10^7 CFU $40\mu\text{l}^{-1}$). Se realizaron tres experimentos independientes.

Los resultados presentados son representativos de un experimento. Los resultados mostrados se corresponden a los hallados a los 7 días post desafío y refieren a la media de cuatro ratones por grupo. La línea discontinua indica el límite inferior de detección.

El número de bacterias recuperadas de los pulmones del ratón se expresan como el Log de la media \pm error estándar (barras de error) de las unidades formadoras de colonias por ml. El análisis estadístico se realizó mediante el test de Bonferroni. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,001$.

Como esperábamos el mayor recuento de UFC se detectó en los pulmones de los ratones no inmunizados (PBS). El control de protección utilizado mostró que el ensayo fue exitoso ya que los niveles alcanzados de UFC para este tratamiento resultaron ser al menos 4 órdenes inferiores respecto de los valores hallados en los animales no inmunizados (control negativo de protección). En el caso de los animales inmunizados con las formulaciones conteniendo a las distintas OMVs los recuentos detectados resultaron ser significativamente menores que los del grupo sin inmunizar y similares a los del control positivo de protección ($p < 0,001$). Todos estos resultados muestran que ambas formulaciones conteniendo a las OMVs presentan niveles adecuados de protección y que la ausencia de AC-Hly en el contexto de las OMVs no impactaría en la capacidad protectora contra la infección de *B. pertussis* en el modelo murino.

DISCUSIÓN

La toxina adenilato ciclasa-hemolisina (ACT, AC-Hly o CyaA) es un factor de virulencia clave de *B. pertussis*, [57, 60, 80, 110]. A esta toxina se le ha adjudicado la capacidad de afectar funciones bactericida de células fagocíticas tales como el estallido oxidativo [85, 313, 314]. A través de la síntesis de cAMP, la toxina CyaA también afecta la maduración de las células dendríticas activadas por agonistas, lleva a la inhibición de la secreción de IL-12 y TNF- α e incluso incrementa de la producción de IL-10 y la expansión de células Treg. Se ha propuesto así que una de las funciones de la AC-Hly sea la de dificultar la inducción de la respuesta inmune adaptativa durante la infección de *B. pertussis* [52]. Sin embargo, como toxoide sin actividad enzimática, es capaz de inducir una respuesta inmune protectora y funcionar como adyuvante potenciando la inmunogenicidad de antígenos de *B. pertussis* [306-310, 315]. Esto ha motivado a que CyaA sea propuesta como un candidato a ser incluido en una nueva generación de vacunas aP. Más aún, su potencial uso se ha extendido a su empleo como vacuna inmunoterapéutica ya que ha presentado la capacidad de inducir respuestas de linfocitos T con polarización Th1-CD8 + citotóxicos de actividad fundamental contra los tumores de cuello uterino.

En base a estos antecedentes decidimos evaluar si la AC-Hly presente en las OMVs efectivamente tiene un rol clave en la capacidad protectora por ellas ejercidas. Para ello realizamos estudios funcionales comparativos entre formulaciones a OMVs que contienen a la AC-Hly en su composición con otras en las que la AC-Hly no es detectada en la formulación. Los resultados alcanzados muestran, sin lugar a dudas, que la ausencia de esta proteína en el marco de las OMVs no afecta en absoluto el poder protector por ellas ejercidas. Estos resultados que en principio parecerían ser contradictorios con los datos previos reportados sobre la capacidad protectora de la AC-Hly, podrían no serlo ya que su rol aquí está evaluado en un contexto más complejo en los que la pequeña deficiencia que pueda provocar su ausencia puede ser contrarrestada por otro componente de la OMV. De todas formas podemos concluir que la presencia de AC-Hly en las OMVs no tendría un rol en la protección tan crucial como el que hemos detectado para inmunógenos como la PTx y Prn

Dado los resultados obtenidos sobre los factores de virulencia, evaluados independientemente, nos propusimos avanzar en la evaluación del rol en la protección del

conjunto de los mismos. Para ello decidimos trabajar con una bacteria en fase avirulenta que no expresa ninguno de los factores de virulencia. Los resultados alcanzados se presentan en la siguiente sección de este trabajo de tesis.

SECCION 2.3: EVALUACION DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE OMVS DERIVAD DE UNA CEPA DE B.PERTUSSIS BLOQUEADA EN FASE AVIRULENTE**INTRODUCCIÓN**

En el género *Bordetella* y en *B. pertussis* en particular la expresión de las proteínas PTx, PRN, FHA, FIM y AC-Hly se asocia con la virulencia de la bacteria en el huésped. Estas proteínas en conjunto se encuentran bajo el control de un locus denominado en inglés *Bordetella virulence gene* (*bvg*, antes designado *vir* por estar asociado con la regulación de la expresión de los factores de virulencia). Este locus *bvg*, que codifica para un sistema de dos componentes denominado BvgAS, y como mencionamos anteriormente fue identificado por Weiss y colaboradores en 1989 cuando observaron que la inserción del transposón *Tn5* dentro del mismo, abolía simultáneamente la síntesis de las proteínas antes mencionadas las cuales se denominaron a partir de allí factores Bvg+ o factores de virulencia [91, 316, 317]. Los genes que codifican para los factores de virulencia se denominan **vag** por virulence activated genes. A través de este sistema y en respuesta a determinadas señales del medio ambiente como temperaturas menores a 25°C, presencia de Mg₂SO₄ o ácido nicotínico, las bacterias dejan de sintetizar los factores denominados de virulencia o Bvg+ y sintetizan otro set de proteínas que en conjunto se les ha asignado el nombre de factores de avirulencia o factores Bvg- [317]. Los genes que codifican para estas proteínas se los designa en conjunto *vrg* por virulence repressed genes.

Mutaciones espontáneas en el locus *bvg* también pueden conducir al cambio de fase de virulencia a la fase de avirulencia [318]. El funcionamiento de BvgAS en un principio fue considerado como un sistema on/off o de encendido/apagado de los genes de virulencia. Sin embargo, la descripción de proteínas de expresión intermedia que no corresponden ni a productos de los genes *vag* ni de los *vrg*, ha conducido a una reformulación de la hipótesis referente al mecanismo de regulación mediado por BvgAS [319, 320]. Este es actualmente considerado un sistema similar a un reóstato, capaz de regular la expresión de un amplio abanico de fenotipos ubicados entre los extremos correspondientes a las clásicas fases de virulencia y de avirulencia [26, 109].

La fase avirulenta nos resultó una fase interesante de ser evaluada en el marco de las OMVs ya que nos permitiría analizar el rol de la ausencia de todos los factores de virulencia

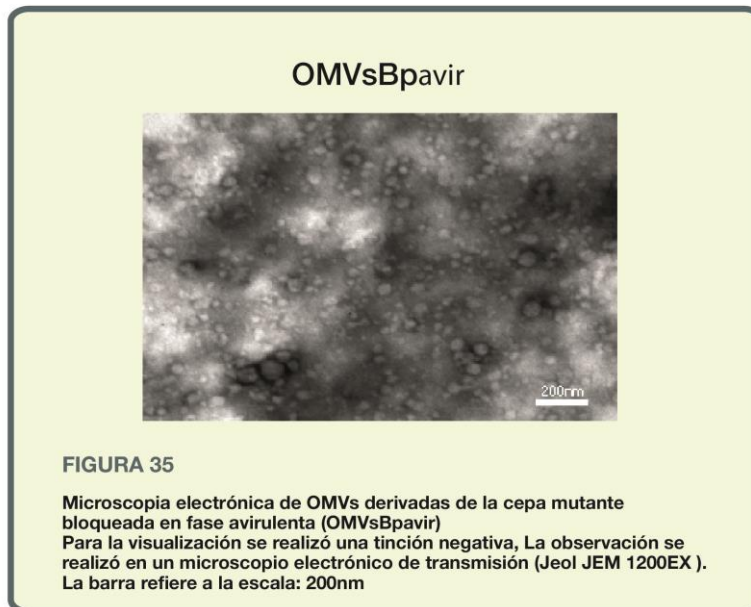
en su conjunto. Los factores de avirulencia en principio no deberían afectar la capacidad protectora porque se han descrito como poco inmunogénicos [321, 322]. En las primeras descripciones de la fase avirulenta o también llamada modo C, Lacey demostró la falta inducción de síntesis de anticuerpos contra antígenos expresados en esta fase [89]. Más aún en trabajos en los que se emplearon algunos de los factores *vrg* purificados también detectaron débil inmunogenicidad de los mismos [321, 322]. Estos resultados sugieren que la fase de avirulencia podría ocurrir *in vivo* como mecanismo de evasión de la respuesta inmune [13].

Para alcanzar nuestro objetivo tendiente a evaluar en su conjunto el rol de la expresión de todos los factores de virulencia en la protección conferida por las OMVs, empleamos un mutante derivado de *B. pertussis* Tohama I que se encuentra bloqueada en el fenotipo avirulento a partir del cual obtuvimos OMVs.

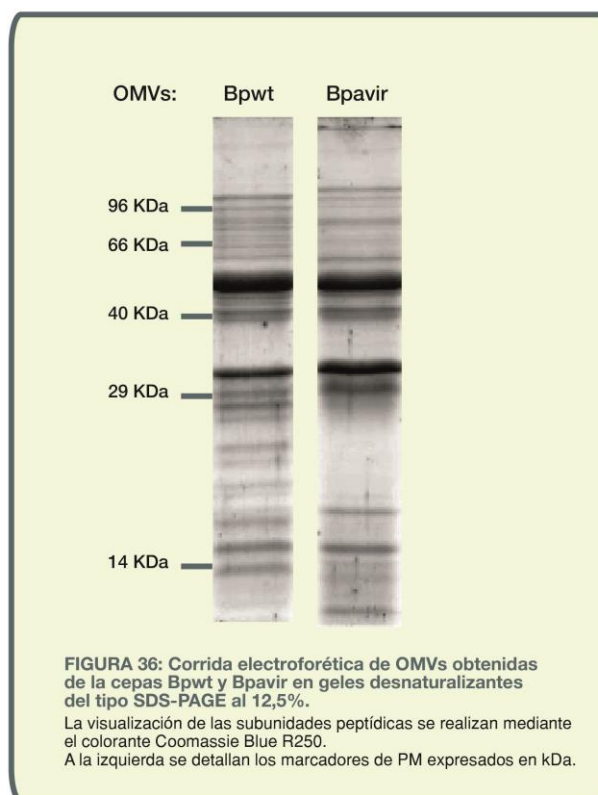
A continuación presentaremos los resultados obtenidos en los ensayos de caracterización *in vitro* e *in vivo* realizados con las OMVs obtenidas de la cepa *B. pertussis* en fase avirulenta (OMVsBpavir). Los resultados alcanzados fueron analizados comparativamente con los obtenidos con las OMVs derivadas de *B. pertussis* en fase virulenta (OMVsBpwt).

CARACTERIZACIÓN DE LAS OMVs OBTENIDAS A PARTIR DE *B. PERTUSSIS* EN FASE AVIRULENTE

Como en los capítulos anteriores, primeramente obtuvimos las OMVs derivadas de una cepa de *B. pertussis* bloqueada en fase avirulenta. Obtuvimos al menos 3 lotes empleando procedimientos independientes. Las preparaciones obtenidas fueron analizadas mediante microscopía electrónica (MET) la cual nos permitió confirmar la presencia de OMVs que resultaron similares a las derivadas de la cepa *B. pertussis* en fase virulenta (Figura 35)



El perfil proteico de las OMVsBpavir analizado en electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes fue comparado con el de las OMVsBpwt. Los resultados se muestran en la siguiente Figura 36:

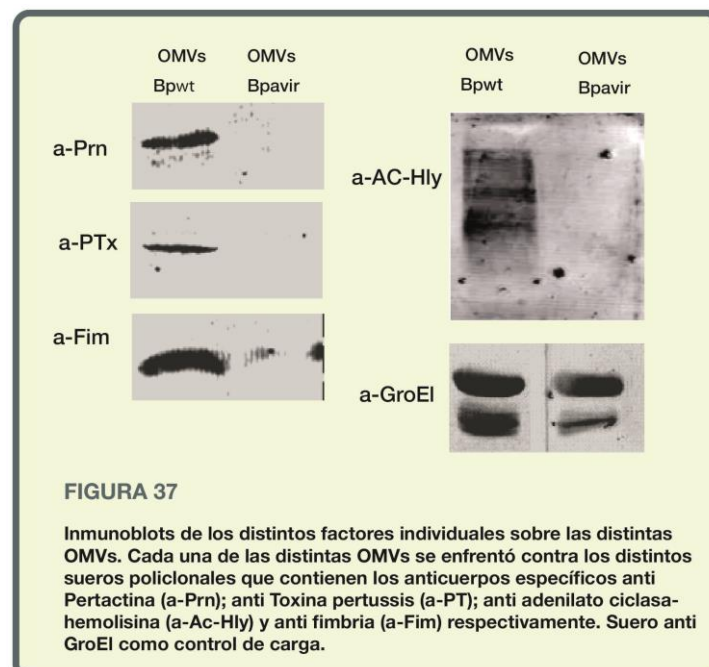


Como puede observarse las OMVsBpavir presenta un perfil más sencillo con varias bandas de PM que difieren de las visualizadas para las OMVsBpwt. Este resultado es esperable

ya que para la fase avirulenta se han descrito proteínas de membrana que son propias de esta fase [92, 93].

Para confirmar que las OMVsBpavir no contenían en su composición ninguno de los factores de virulencia conocidos realizamos ensayos de inmunoblotting empleando anti sueros policlonales específicos contra los factores de virulencia: PTx, PRN, FIM y AC-Hly. Con fines comparativos realizamos blottings empleando los mismos antisueros pero enfrentados a las proteínas correspondientes a las OMVsBpwt. Como control de y como control de funcionamiento de la técnica de inmunoblotting utilizamos un suero policlonal específico de la chaperona de 60Kda (GroEl) localizada en la membrana externa de *B. pertussis*. La elección de esta proteína se fundamenta en el hecho que esta proteína no es regulada por el sistema de dos componentes BvgAS y su expresión es constitutiva.

En la Figura 37 puede observarse que mientras para las OMVs derivadas de *B. pertussis* wt todos los sueros reconocen bandas del PM correspondiente para cada factor de virulencia analizado y para la GroEl, en las OMVs derivadas de la fase avirulenta solo se detecta una banda de reconocimiento específico de la proteína GroEl. .



Al igual que para las otras OMVs, para estas preparaciones también evaluamos el contenido de LPS como se describió anteriormente.

En la Figura 38 se puede observar que el perfil de LPS para OMVBpavir fue similar al de las OMVsBpwt evidenciando que al menos con esta técnica no pudimos detectar diferencias apreciables en esta molécula.

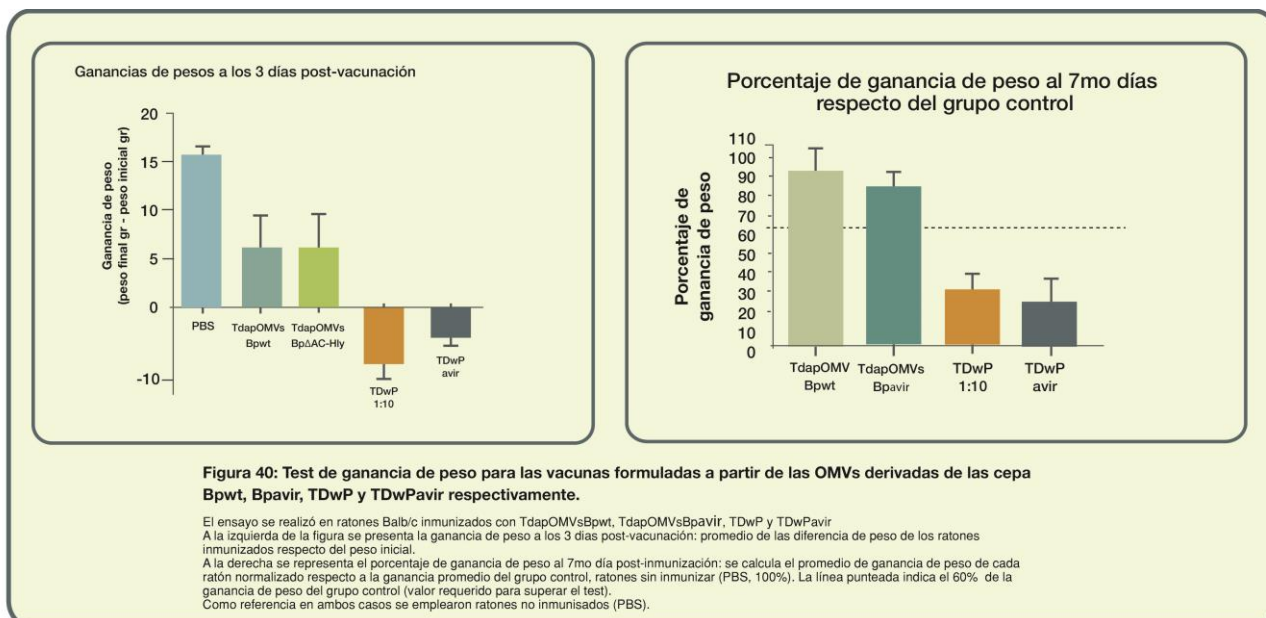
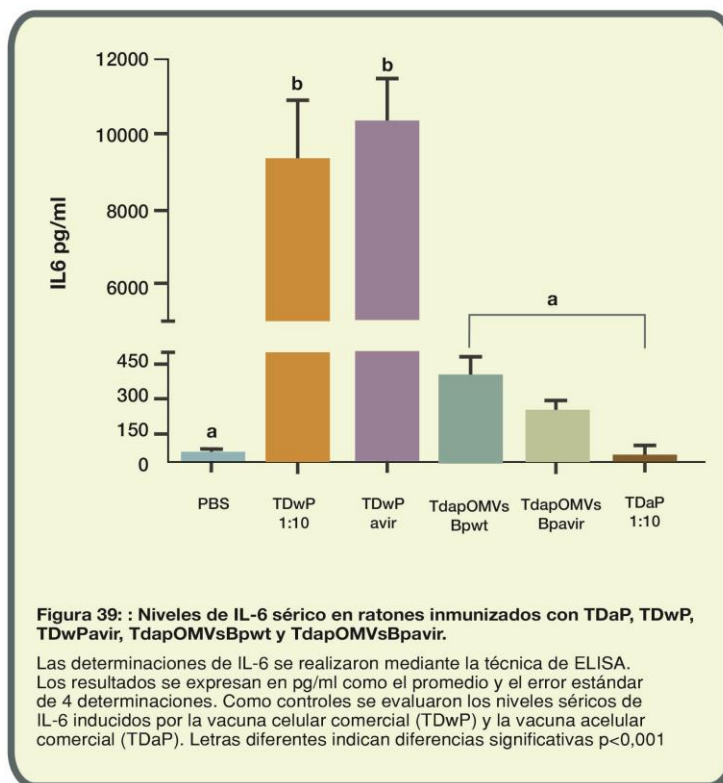


EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS DISTINTAS FORMULACIONES VACUNALES.

A partir de las OMVs caracterizadas realizamos las formulaciones para obtener las distintas Tdap OMVs. Teniendo en cuenta que esta es la primera vez que se evalúa una vacuna formulada a partir de *B. pertussis* en fase avirulenta de decidimos incluir en los ensayos de caracterización *in vivo* vacunas celulares derivadas de la fase virulenta y también de la fase avirulenta.

Con estas formulaciones vacunales evaluamos primeramente la toxicidad de las mismas con el fin corroborar que no exista algún efecto adverso que nos inhabilite su uso en el modelo animal. Como lo hemos hecho para las otras vacunas ensayadas, para estas vacunas también evaluamos los niveles de IL-6 en el suero de los ratones 4 horas después de ser inmunizados y realizamos el test de ganancia de peso recomendado. En las Figuras 39 y 40 se muestran los

resultados obtenidos para las 4 formulaciones ensayadas. Como control se empleó un grupo de ratones no inmunizados.



Como podemos observar, los niveles de IL-6 más elevados se corresponden a las determinaciones realizadas a partir de muestras de animales inmunizados con vacunas celulares en fase virulenta y vacunas celulares en fase avirulenta: 9.200 ± 1600 pg/ml en los

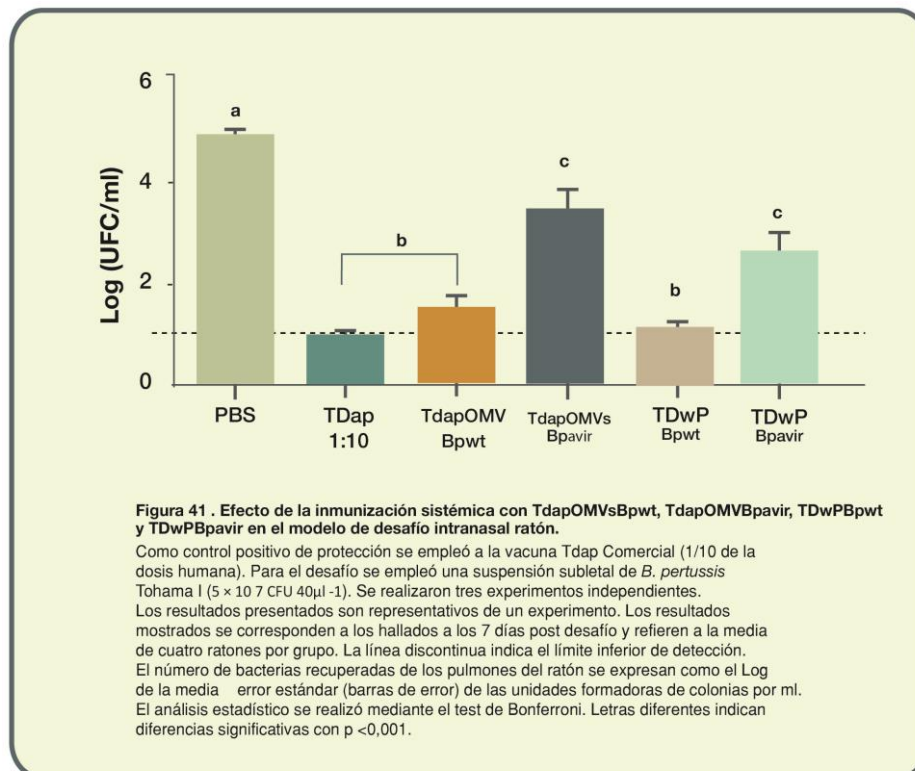
animales inmunizados con la wP en fase virulenta y de 10.300 ± 2000 pg/ml para la vacuna wP en fase avirulenta. Estos valores resultaron ser significativamente ($p < 0,001$) mayores a los valores detectados en los ratones control no inmunizados (tratamiento PBS) y en las demás formulaciones vacunales basadas en OMVs. Como control también incluimos un grupo de ratones inmunizados con vacuna Tdap comercial. En este caso los valores hallados fueron similares a los de las vacunas Tdap formuladas a base de OMVs. Todos estos resultados muestran que las modificaciones en la composición proteica detectadas para las OMVs obtenidas de la cepa bloqueada en fase avirulenta no provocan un cambio significativo en la toxicidad de esta formulación.

En relación a los ensayos de test de ganancia, los resultados alcanzados sobre los pesos de los animales muestran que las formulaciones vacunales basadas en OMVs cumplen con los requisitos para ser consideradas vacunas seguras. En cambio las vacunas wP presentan una disminución en el peso de los ratones a los 3 días posteriores a la vacunación, y aunque logran recuperar su peso, al séptimo día esta ganancia de peso es menor al 60% del aumento que logran los ratones del grupo control (PBS). Estos resultados muestran una vez más a las vacunas celulares como más tóxicas que las acelulares.

EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN CONFERIDA POR LAS VACUNAS ACELULARES BASADAS EN VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA DERIVADAS DE LA FASE AVIRULENTE DE *B. pertussis*.

En esta sección presentaremos los resultados alcanzados al evaluar la capacidad protectora de formulaciones que contiene OMVsBpavir. Los datos se obtuvieron del empleo del modelo murino de desafío intranasal, que incluye un esquema de vacunación consistente en 2 dosis espaciadas 14 días y el desafío a los 7 días post segunda inmunización con una suspensión bacteriana de *B. pertussis* Tohama I en dosis subletal.

Los resultados alcanzados se presentan en la Figura 41 donde se muestran los niveles de bacterias recuperadas en los pulmones de los ratones siete días después de haber sido desafiados con *B. pertussis*. Estos ensayos se realizaron por triplicado.



Como puede observarse los niveles de UFC en los pulmones de todos los grupos de ratones vacunados se diferencian significativamente de grupo control no inmunizado ($p < 0,001$). En concordancia con los resultados obtenidos con anterioridad, los niveles de UFC recuperadas tanto de los animales inmunizados con vacuna celular en fase virulenta como con acelular comercial y acelular basada en OMVs derivadas de *B. pertussis* wt estuvieron cerca del límite de detección de la técnica (recuento menor a 10UFC/ml). Contrariamente, los recuentos de UFC obtenidos en los ratones inmunizados con la vacuna celular en fase avirulenta o con la vacuna TdapOMVsBpavir fueron significativamente mayores a los hallados en los ratones inmunizados con cualquiera de las otras vacunas incluidas en estos ensayos ($p < 0,001$). Sin embargo los valores de UFC para ambas formulaciones resultaron ser significativamente inferiores a los hallados en los ratones no inmunizados. Estos hallazgos no eran los esperados teniendo en cuenta los antecedentes sobre la baja inmunogenicidad de los factores de avirulencia. Mientras que una vacuna formulada con los factores de avirulencia nunca fue desarrollada ni siquiera ensayada, esperábamos que los resultados de la misma

fueran nulos en cuanto a los niveles de protección. Estos resultados estarían indicando que las OMVs en fase avirulenta contienen inmunógenos que otorgan a las OMVs cierto nivel protector.

DISCUSIÓN

En base a los resultados presentados en los capítulos anteriores que muestran el rol que tienen algunos factores de virulencia en la protección inducida por las OMVs, decidimos evaluar si la falta de todos los factores de virulencia puede eliminar completamente la capacidad protectora inducida por las OMVs. Para este fin, decidimos obtener y caracterizar a OMVs derivadas de una cepa *B. pertussis* bloqueada en la fase avirulenta. Este enfoque nos pareció apropiado ya que por un lado *B. pertussis* en fase avirulenta no expresa ninguno de los factores asociados con virulencia de esta bacteria, y por otro lado, los factores propios de la fase avirulenta parecen comportarse como inmunógenos pobres [321, 322]. Sorprendentemente, al evaluar la capacidad protectora de las OMVs obtenidas a partir de *B. pertussis* bloqueada en la fase avirulenta en el modelo murino evidenciamos que las mismas eran capaces de ejercer cierto poder protector contra la infección. La inmunización con vacunas basadas en OMVsBpavir logra reducir en 2 log ($p < 0,001$) los recuentos bacterianos respecto del grupo control no inmunizado. A pesar de que este nivel de protección es inferior al obtenido con cualquiera de las formulaciones vacunales derivadas de *B. pertussis* en fase virulenta aquí ensayadas, la capacidad protectora de formulaciones derivadas de la fase avirulenta no había sido reportada hasta el momento.

En relación a seguridad de las formulaciones basadas en componentes derivados de *B. pertussis* en fase avirulenta, de acuerdo con los niveles de la IL-6 pro-inflamatoria hallados después de la inmunización y al test de ganancia de peso, juntos evidencian que las formulaciones Tdap OMVsBpavir resultan ser seguras.

Un aspecto interesante que surge del análisis de todos los resultados obtenidos hasta aquí es el hecho que los niveles de protección inducidos por las OMVs derivadas de una cepa que carece de un único inmunógeno, ya sea PTx o de PRN, resulta ser similar a los obtenidos

a partir de OMVs que carecen de estos dos y más inmunógenos protectores al mismo tiempo. Este hallazgo nos hizo pensar en la posibilidad que exista un núcleo común de componentes que son los esenciales para inducir un nivel mínimo de protección en lo que se refiere a la capacidad protectora de las OMVs. En el próximo capítulo presentaremos los resultados alcanzados en la identificación de componentes comunes entre las distintas OMVs con potencial rol en la protección por ellas inducida.

CAPITULO 3: IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS COMPONENTES INMUNOGÉNICOS PRESENTES EN LAS OMVs**INTRODUCCIÓN.**

El empleo de cepas de *B. pertussis* defectivas en la expresión de antígenos de virulencia específicos nos ha permitido evaluar la contribución de cada uno de ellos en la protección conferida por las vacunas basadas en las OMVs. La extensión de esta estrategia al empleo de una cepa de *B. pertussis* bloqueada en la fase avirulenta que no expresa ninguno de los factores de virulencia nos ha permitido alcanzar un resultado sorprendente: las vacunas basadas en inmunógenos provenientes de fase avirulenta siguen protegiendo aunque en niveles menores que las correspondientes a las formuladas con inmunógenos provenientes de la fase virulenta. Este resultado nos resulta sorprendente porque como hemos discutido en el capítulo anterior, los factores propios de la fase avirulenta han sido descritos como poco inmunogénicos [322]. Esperábamos por ello un valor casi nulo de protección para estas OMVs, sin embargo, el nivel de protección alcanzado con la formulación TdapOMVsBpavir resultó ser similar al obtenido con formulaciones conteniendo OMVs provenientes de una cepa en fase virulenta carente de 1 único factor de virulencia. La similitud entre los niveles de protección entre las diferentes OMVs nos hizo pensar que las distintas formulaciones provenientes de cepas defectivas compartían componentes comunes los cuales podrían ser responsables de la protección observada.

Teniendo en cuenta que estos factores bacterianos comunes entre las distintas OMVs podrían constituirse en nuevos candidatos vacunales que podrían sumarse a los actualmente en uso, decidimos avanzar en la identificación de los mismos. Para ello planteamos como estrategia trabajar con técnicas que den cuenta de aspectos estructurales y funcionales de la respuesta humoral inducida por las formulaciones que contienen a las OMVs. Si bien no existe una clara correlación entre el título de anticuerpos específicos y la protección, el rol de la respuesta humoral en la protección es bien conocida [110, 323, 324].

Específicamente, empleamos técnicas de inmunoproteómica y otras que permiten evaluar las funciones de los anticuerpos asociadas a la actividad bactericida mediada por

complemento. Esta actividad fue evaluada ya que existen resultados que correlacionan la eliminación de la bacteria con los niveles de protección conferidos por la vacunación [325].

A continuación presentaremos los resultados alcanzados al emplear las técnicas antes mencionadas.

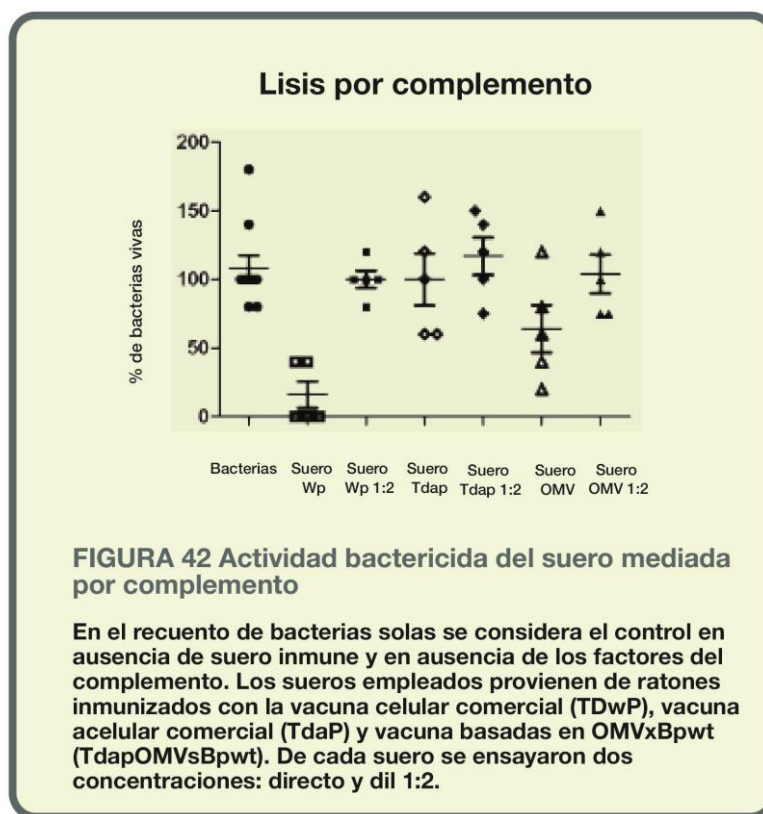
ENSAYO DEL PODER BACTERICIDA DE LOS ANTICUERPOS INDUCIDOS POR LA VACUNACIÓN CON OMVS

Para evaluar si la vacunación con las OMVs es capaz de inducir una respuesta humoral que active la lisis mediada por el complemento realizamos ensayos *in vitro* que involucran incubaciones de una suspensión bacteriana con el suero inmune inactivado y un suero que aporte el complemento activo. En un primer experimento empleamos a los sueros inducidos por los sueros inducidos por la vacuna celular y acelular para evaluar la funcionalidad del ensayo. Se incluyó también los sueros obtenidos de los ratones inmunizados con las vacunas conteniendo a las OMVs. Incluimos dos diluciones de los sueros para definir la concentración adecuada para visualizar la lisis.

La cepa bacteriana empleada fue *B. pertussis Tohama I* (Bpwt) (500 bacterias por ensayo) la cual fue incubada por 2 h a 37°C con agitación junto a los sueros a ensayar. Como fuente de complemento empleamos suero obtenido de ratones no inmunizados. La lisis por complemento fue evaluada a través de recuentos bacterianos por plaqueo luego de las incubaciones. En la Figura 42 mostramos los resultados obtenidos.

Los resultados presentados muestran que el suero wP (obtenido a los 14 días post inmunización, título 1:125) presenta la mayor capacidad bactericida cuando el mismo es empleado sin dilución. Dicha capacidad es dosis dependiente según se puede observar en los recuentos bacterianos al diluir el suero a ensayar. Resultados similares pero en niveles menores (menor poder bactericida) pudo detectarse para la vacuna acelular.

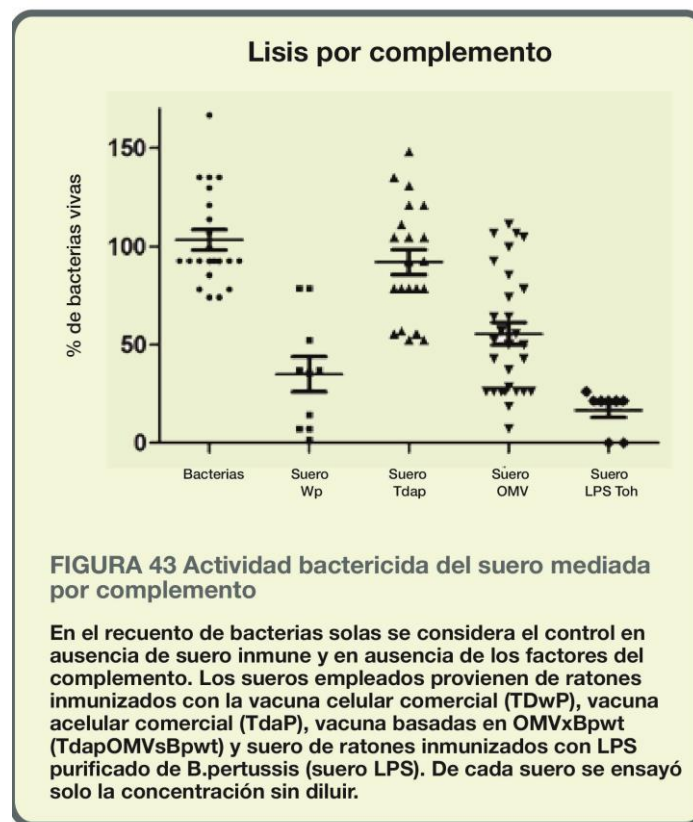
Los resultados alcanzados en este primer ensayo también permitieron detectar que el suero sin diluir inducido por las TdapOMVsBpwt tiene poder bactericida.



En base a estos resultados decidimos evaluar un mayor número de sueros de cada tratamiento pero trabajando sólo con los sueros sin diluir.

Teniendo en cuenta reportes previos que indican que el LPS es una molécula esencial en la actividad de lisis por complemento [326-328] decidimos incorporar como otro control más a los sueros de ratones inmunizados únicamente con el LPS (título 1:75). En la siguiente Figura 43 se presentan los resultados alcanzados. Como era esperado el suero anti-LPS presenta una alta capacidad de lisis. Este resultado muestra también la validez de nuestro ensayo y nuestros hallazgos. En cuanto a las OMVs se emplearon los sueros obtenidos de ratones inmunizados con las distintas OMVs, pero en la figura sólo mostramos, a modo de ejemplo, el resultado obtenido con los sueros correspondientes a la vacunación con

TdapOMVBpwt. Los demás sueros de las otras OMVs mostraron valores similares al descrito en la Figura 43 (datos no mostrados).



Todos estos resultados muestran que las vacunas conteniendo las OMVs son capaces de inducir una respuesta humoral, cuyos anticuerpos presentan la capacidad de inducir la lisis bacteriana mediada por complemento. Esta actividad podría contribuir al menos en parte en la capacidad protectora inducida por las OMVs

Estos sueros que resultaron activos en la lisis bacteriana fueron luego empleados para identificar componentes inmunogénicos comunes en las distintas OMVs ensayadas en este trabajo de tesis

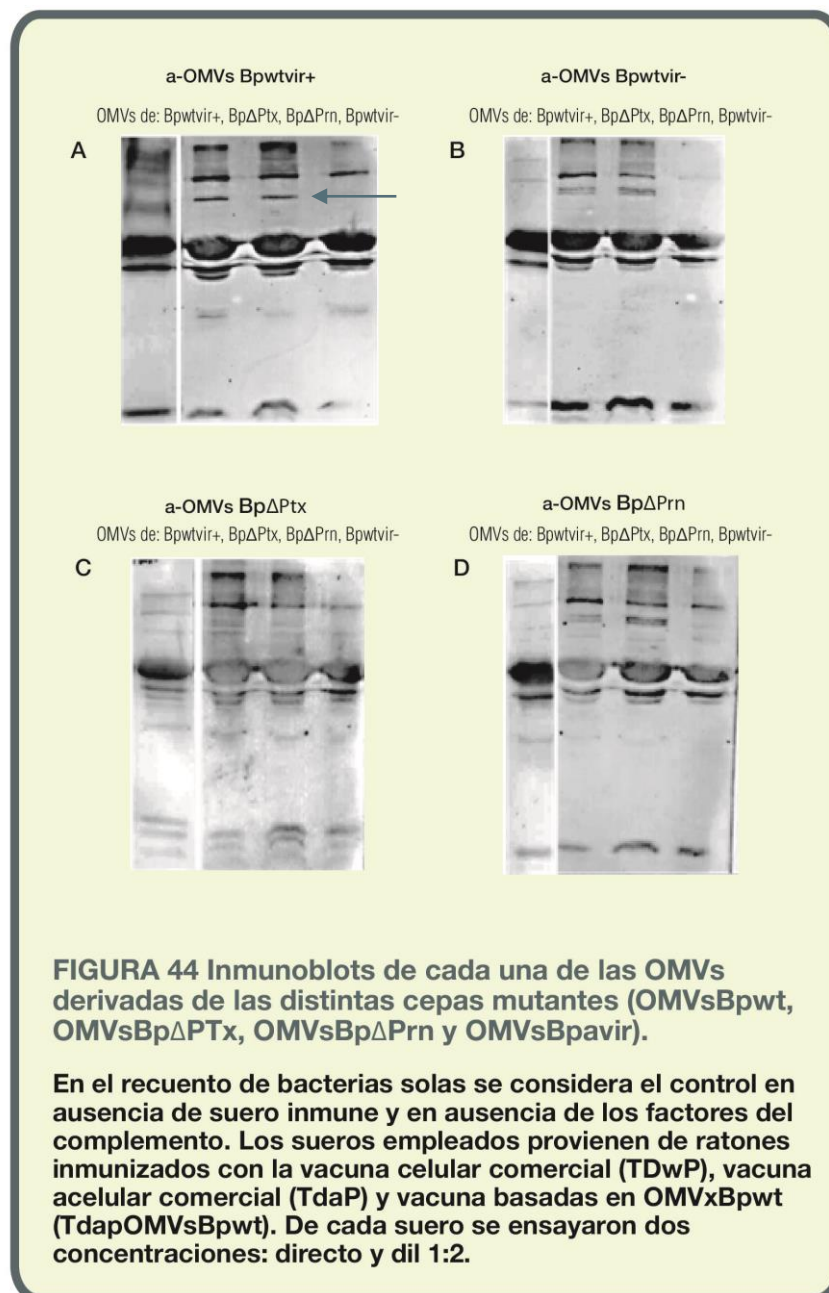
ENSAYO DE INMUNOPROTEÓMICA PARA IDENTIFICAR NUEVOS INMUNÓGENOS PROTECTORES PRESENTES EN LAS OMVs

Con el objetivo de identificar aquellos componentes comunes a todas las OMVs que hemos utilizado en este trabajo de tesis realizamos ensayos de inmunoproteómica. Para ello realizamos corridas electroforéticas en geles SDS-PAGE de muestras proteicas provenientes de preparaciones de OMVsBpwt, OMVsBpavir, OMVsBpΔPtx y OMVsBpΔPrn. Estos geles

fueron transferidos a membranas de PVDF para ser enfrentados con los sueros inducidos por las distintas vacunas conteniendo las diferentes OMVs. Como control negativo empleamos un suero proveniente de animales no inmunizados. Así obtuvimos paneles de reconocimiento antígeno anticuerpo.

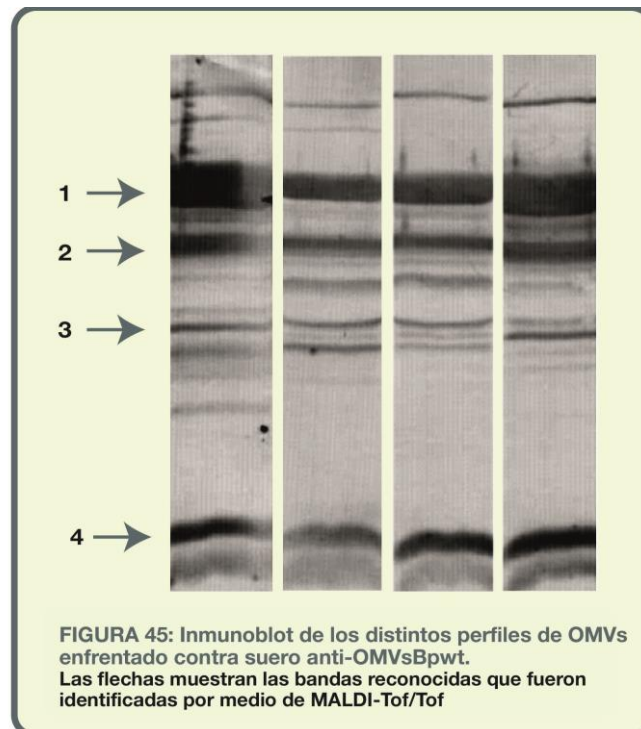
En la Figura 44 se muestran los resultados obtenidos al enfrentar las distintas preparaciones de OMVs, OMVsBpwt, OMVsBp Δ Ptx, OMVsBp Δ Prn y OMVsBpavir con sueros provenientes de animales inmunizados con: TdapOMVsBpwt, TdapOMVsBp Δ Ptx, TdapOMVsBp Δ Prn y Tdap OMVsBpavir, cada vacuna empleada por separado. El primer resultado relevante que obtuvimos fue que el suero naive no reconoció a ningún polipéptido de ninguna de las OMVs ensayadas. Luego, pudimos detectar que los perfiles de reconocimiento para las distintas OMVs frente a un suero particular y frente a los distintos sueros inmunes ensayados resultaron ser homogéneos y simples. En todos los casos el número de bandas reconocidas no superó a 10 reconocimientos. Si bien el perfil de reconocimiento con el suero inmune anti OMVsBpavir resulta ser el más sencillo, lo que es más interesante es el hecho que este suero comparte bandas de reconocimiento con sueros inmunes provenientes de OMVs obtenidas de cepas de *B. pertussis* en fase virulenta. Para las OMVsBpavir en todos los casos se detecta la ausencia una banda de PM aprox 72kDa la cual señalamos con una flecha en la Figura 44.

En todos los casos el reconocimiento por parte de los sueros inmunes se localizó en la región por encima de los 50 kDa y en la región de 15-20 kDa



Para identificar las bandas comunes reactivas a los sueros extrajimos de los geles 1D las bandas que coinciden en PM a las reconocidas en los inmunoblots. A partir del material extraído de los geles 1D procedimos a la digestión tróptica para poder identificarlas mediante al uso de un espectrómetro de masa (EM) del tipo MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight) y así obtener de cada banda un registro de la huella peptídica. Esta huella peptídica obtenida con el MALDI TOF fue luego comparada con la que

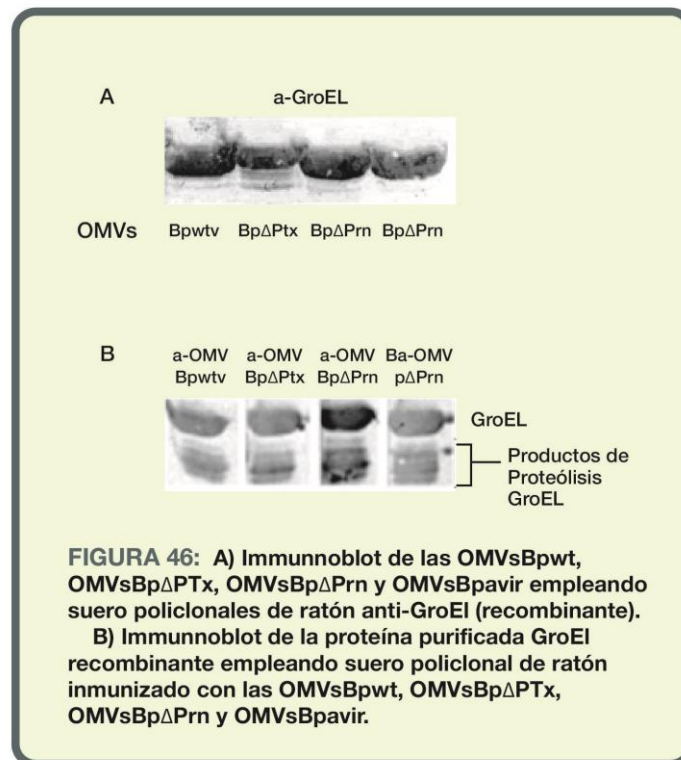
se obtiene *in silico*, a partir de la digestión virtual de todas las proteínas potenciales de ser expresadas por el genoma anotado de *B. pertussis* de forma de poder así identificar las distintas proteínas. Se emplea para ello el software MASCOT (www.matrixscience.com)



Así, mediante la EM se pudo determinar la identidad de 4 bandas (Figura 45): el polipéptido correspondiente a la banda 1 fue identificado como BP3495 una chaperona de 60kDa GroEl con un score MASCOT de 158 (score >70 significativa identificación), una cobertura de secuencia de 32% y un alineamiento de péptidos de 7. Los polipéptidos correspondientes a las bandas indicadas como 2 y 3 se identificaron como BP0840 una porina de membrana externa OmpC con un score MASCOT de 125 (score > 52 significativo), una cobertura de secuencia de 13% y un alineamiento de péptidos de 2. El polipéptido correspondiente a la banda 4 fue identificada como BP0943 proteína OmpA, con un score MASCOT de 188 (score >52 significativo), una cobertura de secuencia de 17% y un alineamiento de péptidos de 2. La diferencia entre la identificación de la proteína GroEl y las proteínas OmpC y OmpA, fue que la primera se logró identificar con el espectro de masas correspondientes a los péptidos tripsinizados, en cambio las otras dos proteínas fueron identificadas gracias al empleo de un Lift con el espectrómetro. Este lift permite seleccionar para su fragmentación un pico determinado y a partir del mismo, genera una ruptura y un nuevo espectro para el péptido. Las tres proteínas identificadas resultaron ser proteínas

constitutivas cuya expresión no está regulada por el sistema de dos componentes BvgAS [93]. Estos hallazgos confirman que las bandas que resultaron comunes a las distintas OMVs cuando fueron reveladas con los diferentes anti sueros se corresponden a la misma proteína. Más aún estos resultados muestran claramente que estas proteínas identificadas son inmunogénicas. Para confirmar los resultados alcanzados nos pareció importante clonar y expresar las proteínas identificadas para luego obtener sueros específicos contra la proteína y hacer ensayos de inmunoblotting. Estos inmunoblots los realizamos por un lado empleando como antígeno a las distintas OMVs y como suero el obtenido contra la proteína y por otro, utilizando la proteína purificada como antígeno y los sueros inducidos por las OMVs como anti sueros. Decidimos aplicar esta estrategia para la proteína GroEL ya que fue la más abundante y la de mayor reactividad frente a los sueros. Para el clonado de la proteína empleamos el sistema de expresión Gateway (Invitrogen) que nos permite purificar con técnicas sencillas la proteína cuya secuencia de ADN fue clonada. El vector de expresión empleado fue el plásmido comercial pET200/D-TOPO (Invitrogen). Para la expresión de la proteína recombinante empleamos la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). La identidad de la proteína purificada fue confirmada mediante corridas electroforéticas asociadas a espectrometría de masa. Una vez confirmada su identidad obtuvimos sueros policlonales específicos siguiendo un protocolo de inmunización clásico. Una vez confirmada la especificidad del antisuero obtenido y habiendo evaluado el título del mismo procedimos a la realización de los ensayos de inmunoblotting antes descriptos.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 46.



En el panel A de la Figura 46 se puede observar que el suero específico anti GroEI reconoce una banda del PM esperado en todas las OMVs ensayadas. Más aún, hemos podido evidenciar que los sueros inducidos por cualquiera de las vacunas formuladas a partir de las distintas OMVs son capaces de reconocer a la proteína GroEI purificada

Todos estos resultados confirman la presencia de GroEI en las distintas OMVs y además valida la estrategia seguida para la identificación de las proteínas inmunogénicas comunes a las distintas OMVs ensayadas.

DISCUSIÓN

La vía por complemento es una defensa importante contra los patógenos respiratorios en los pulmones y también en las superficies mucosales. *B. pertussis* expresa la proteína BrkA la cual es capaz de resistir la destrucción por complemento [326, 329]. Sin embargo, se ha detectado que algunos individuos pueden llegar a montar una respuesta inmune que puede superar la defensa bacteriana mediada por BrkA [326]. En otro estudio se ha evidenciado que

los sueros provenientes de adultos con diferente exposición a *B. pertussis* se caracterizaron por presentar actividad bactericida contra una cepa de tipo salvaje. Todos los sueros ensayados mostraron actividad bactericida, lo que sugiere que los adultos a menudo tienen capacidad bactericida gracias a la infección o a la vacunación con vacunas celulares. La vacuna acelular por su parte presenta una capacidad baja de inducir anticuerpos que lleven a la lisis por complemento. Esta diferencia de las vacunas acelulares respecto de las celulares parecería estar relacionado con el contenido del LPS [9].

Teniendo en cuenta esta capacidad de los sueros inmunes y que nuestras OMVs contienen LPS decidimos evaluar en los sueros inducidos por ellos la capacidad bactericida como posible mecanismo que pueda contribuir en la protección por ellas inducidas. [273, 326, 330-333].

En los ensayos *in vitro* realizados pudimos detectar que los sueros inducidos por las distintas vacunas que contienen a las OMVs presentan la capacidad de inducir la lisis por complemento. En presencia de los sueros anti OMVs se logró detectar una reducción del número de bacterias viables del $55,5 \pm 5,7$ % de bacterias vivas respecto del control del ensayo sin lisis ($p < 0,001$). Esta reducción se observó no solo respecto del control negativo sino también respecto de los resultados obtenidos para los sueros inducidos por las vacunas aP.

Teniendo en cuenta el rol de los anticuerpos en la protección decidimos avanzar en la identificación de componentes inmunogénicos dentro de las OMVs que sean capaces de inducir respuesta humoral. Para ello realizamos ensayos de inmunoproteómica que incluyen electroforesis en geles 1D asociadas a espectrometría de masa. Esta técnica nos permitió identificar cuatro polipéptidos los cuales se corresponden a tres proteínas, cuyo reconocimiento fue detectado en todas las OMVs. Una de las proteínas identificadas fue una chaperona de 60kDa (clasificada dentro de las HSK 60 en procariontes) denominada GroEl (BP3495), la segunda proteína identificada fue una Porina de membrana externa OmpC (BP0840), y la tercera una Proteína de membrana externa OmpA.

Cuando analizamos los genes que codifican para estas proteínas corroboramos que los mismos no están regulados por el sistema de dos componentes BvgAS [92, 93], por lo tanto es esperable que la presencia de la misma se detecte en las OMVs derivadas tanto de la cepa Bp wt como Bp avir.

También logramos confirmar por medio de sueros específicos dirigidos contra GroEL su presencia en todas las OMVs, confirmando los resultados alcanzados con los ensayos de espectrometría de masas. La presencia de la proteína GroEL en las distintas OMVs resulta por demás atractivo ya que anticuerpos contra GroEL fueron detectados en personas infectadas [304]. Más aún, se ha descrito que GroEL es capaz de inducir protección en ratones neonatos [334]. Respecto de OmpC, previamente designada como OmpP, se ha demostrado que su secuencia contiene regiones conservadas con otras porinas de diferentes microorganismos [335]. Actualmente, además, se ha demostrado para otros patógenos que estas porinas podrían ser blancos factibles de vacunas [336]. Finalmente la proteína OmpA recientemente ha sido propuesta como posible candidato vacunal por ser una de las dos proteínas más abundantes no reguladas por el sistema BvgAS [337].

Todos los ensayos realizados nos han permitido así detectar que la capacidad de protección de OMVs es aportada por varios componentes, incluyendo Prn y PTx. Más aún se han detectado varios factores comunes entre las OMVs derivadas de *B. pertussis* en fase virulenta y de fase avirulenta con potencial rol en la protección. La estructura compleja de las OMVs resulta una característica atractiva de las mismas por contener una amplia diversidad de componentes que contribuyen a la protección conferida. Podemos anticipar que esta característica de las OMVs puede constituir una ventaja muy positiva de las mismas, ya que la presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas que circulan no se centrará en un solo o unos pocos componentes.

La investigación detallada de las propiedades biológicas de estos antígenos en el contexto de las OMVs puede proporcionar la identidad de nuevos inmunógenos que podrían constituir una segunda generación de vacunas acelulares.

DISCUSION GENERAL

Hace pocos años la Organización Mundial de la Salud estimó que si todas las vacunas que se disponen hoy en día contra las enfermedades de la infancia se adoptaran universalmente, y si los países incrementaran las coberturas vacunales en el mundo hasta un promedio del 90%, podrían prevenirse en el segundo decenio del 2000, dos millones de muertes más al año entre niños menores de cinco años. Esto tendría una repercusión importantísima en el progreso hacia el objetivo mundial de reducir la mortalidad infantil en dos tercios en los años venideros. Se lograría también con ello reducir en gran medida la carga de morbilidad y discapacidad debidas a enfermedades prevenibles mediante vacunas, y contribuiría a mejorar la salud y el bienestar de los niños, además de reducir los costos de hospitalización. El éxito de estos objetivos incluye no sólo alcanzarlos sino sostenerlos y para ello se necesita de un sistema ágil que pueda hacer frente incluso a situaciones no esperadas. Se necesita además de más inversiones ininterrumpidas que permitan impulsar la investigación y el desarrollo de vacunas que requieren ser mejoradas o incluso de nuevas vacunas contra enfermedades con alta morbi mortalidad como el paludismo, la tuberculosis y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Se estima que en conjunto estas enfermedades provocan más de 4 millones de muertes al año principalmente en los países en desarrollo.

Pertussis o coqueluche es una de la enfermedades inmunoprevenibles que ha hecho difícil alcanzar aquellos objetivos para mejorar la salud de los niños ya que por un lado para adquirir inmunidad protectora vía la aplicación de vacunas se requiere como mínimo de 3 dosis primarias y 1 refuerzo aplicados en la infancia. Por otro lado, los cálculos teóricos indican que esta enfermedad no puede controlarse adecuadamente, y menos aún erradicarse, dada la elevada tasa de contagio que tiene y porque sería necesario lograr una cobertura efectiva del 96% de la población; algo materialmente imposible con vacunas cuya eficacia es de alrededor del 80% [200]. Aunque no han logrado la erradicación de la enfermedad, las vacunas celulares y luego las acelulares contra pertussis lograron en las primeras décadas de su aplicación, una drástica reducción del número de casos en todos los países donde se aplicaron [37].

Sin embargo en la actualidad y luego de más de 60 años de vacunación masiva, la situación epidemiológica mundial de pertussis está lejos de ser totalmente controlada y de hecho hoy representa un problema grave para la salud [166, 190, 208, 223]. Respecto de las complicaciones que plantea el control de esta patología resulta elocuente la comparación de pertussis con otras enfermedades infecciosas. En este sentido podemos citar los resultados de un trabajo publicado en 2007 donde los autores comparan, a partir de las series históricas de incidencia para las enfermedades inmunoprevenible, el impacto de los programas de vacunación en Estados Unidos [169]. De entre 9 patologías para las cuales existen vacunas licenciadas desde antes de 1980 (difteria, tétanos, pertussis, sarampión, paperas, poliomielitis, rubéola, rubéola congénita y viruela) los casos de pertussis fueron los que menos descendieron en comparación con la era prevacunal, si bien este descenso fue del 92,2% (Tabla 8).

	Era prevacunal		Era Vacunal		Reducción %	
	Casos	Muertes	Casos	Muertes	Casos	Muertes
Difteria	21053	1822	0	0	100%	100%
Tétanos	580	472	41	4	93%	99%
Pertussis	200727	4034	15632	27	92%	99%
Sarampión	530217	440	55	0	100%	100%
Paperas	162344	39	6584	0	96%	100%
Poliomielitis	36110	3272	0	0	100%	100%
Rubeola	47745	17	11	0	100%	100%
Viruela	29005	337	0	0	100%	100%

Tabla 8 Comparación histórica de la morbilidad y mortalidad para las enfermedades inmunoprevenibles cuyas vacunas fueron implementadas antes de 1980. El número de casos de la era vacunal refieren al año 2006, y el número de muertes al año 2004.
Fuente: *Historical comparisons of morbidity and mortality for vaccine-preventable diseases in the United States*. Roush, S.W y Murphy, T.V JAMA, 2007. 298 (18): p. 2155-63.

En algunos países sobre todo los más periféricos la situación preocupante radica en que la cobertura de la vacunación es insuficiente. La OMS estimó que de las 200.000 muertes producidas por esta enfermedad, la mayoría ocurría en países africanos o del sur de Asia con muy bajas tasas de vacunación [338]. Pero también existen datos preocupantes sobre la epidemiología de pertussis en los países donde la vacunación y las condiciones socioeconómicas son más adecuadas. En estos países el número de casos de pertussis ha

aumentado de manera sostenida registrando brotes epidémicos de envergadura. Argentina, China, España, Estados Unidos, Holanda, Australia son ejemplos de estos países entre otros. Respecto de la incidencia total, en estos trabajos se reportan aumentos muy significativos: en Argentina la incidencia de pertussis en el período 2004-2006 duplicó la incidencia del período 1995-1999 y en el 2011 se registra un brote de envergadura con 76 muertes [3, 339]. En China, los casos reportados de pertussis en el período 2001-2004 fueron unas diez veces mayores a los previos a 1992 [340]. En Holanda ocurrieron en 1987 y 1996 picos de hasta diez veces la incidencia de los años inmediatamente anteriores [160]. Estados Unidos ha experimentado el brote epidémico de coqueluche más grande de los últimos 50 años. Según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), el número de casos reportados durante el año 2012 superó los 48.277, más del doble de los registros del 2011 (18.719) y muy por encima del récord anterior de 27.550 en 2010. En 2012, la tasa de incidencia nacional era 13,4 por 100.000 con valores muy superiores en varios estados de Estados Unidos. En el año 2013, se registraron un total de 28.639 casos y en el 2014, 28.660. Para ambos años varios brotes fueron registrados en distintos estados [166]. En Australia, entre 1995 y 2005 los reportes de casos anuales se mantuvieron aproximadamente estables, pero se observó también un aumento relativo en la incidencia correspondiente al grupo de 20 a 59 años [341]. Entre 2000 y 2010, varias epidemias fueron reportadas llegando a un total de 139.000 casos con una incidencia anual de 156 casos por cada 100 000 para el año 2010.

Todos estos datos que se repiten en otros países [342, 343] [344] han llevado a considerar a pertussis una enfermedad resurgente que presenta las mayores complicaciones en los niños menores de un año pero también está presente en la población adolescente adulta [164, 166, 212].

Para esta situación epidemiológica se han esgrimido varias causas, la mayoría de ellas asociadas a las vacunas hoy en uso: baja efectividad, corta duración de la inmunidad conferida por las vacunas, adaptación de patógeno a la inmunidad conferida por las vacunas, etc. El peso de cada una de ellas varía de país a país y ello ha evitado que se llegue a un consenso sobre la principal causa que ocasionaría la situación antes descrita. Pero más allá de identificar la/s causa/s, es claro que se requiere de manera urgente de nuevas formulaciones vacunales que suplan las debilidades de las actuales. Los sistemas de salud deben mientras tanto revisar sus acciones de control para fortalecer y / o implementar estrategias para que a

corto plazo mejoren la situación, al menos para la población más vulnerable representado por los lactantes. Respecto de este último punto resulta oportuno recordar que antes de la reaparición de la enfermedad, los calendarios de vacunación consistían en una serie primaria de 3 dosis durante el primer año de vida y una dosis de refuerzo entre uno y seis años de edad, preferentemente durante el segundo año de edad. Con el resurgimiento de la enfermedad, se agregaron más refuerzos siguiendo recomendaciones de las organizaciones internacionales [11, 12, 345]. En particular, se han recomendado refuerzos para los grupos de población con las tasas más altas de incidencia (adolescentes y adultos) y / o en los grupos de población que se describen como las principales fuentes de infección para los lactantes (trabajadores de la salud en contacto con los niños, miembros de la familia en contacto con el niño, y / o madres embarazadas) [11, 345].

En la siguiente Tabla 9 se presentan las recomendaciones propuestas y los objetivos que se persiguen con la aplicación de las mismas.

Estrategia de inmunización	Potencial Esquema	Objetivo principal	Objetivo secundario
Inmunización universal de adultos	Todo adulto ≥ 18 años con intervalos regulares (posiblemente coincidente con refuerzos de difteria, tétanos y polio)	Reducir la morbilidad en adultos Desarrollo de "herd immunity"	Reducir la transmisión de B.pertussis a los mas chiquitos
Inmunización selectiva de madres, familiares y contactos cercanos de los recién nacidos	Durante el tercer trimestre de embarazo o también postparto antes de las 4 semanas de edad del neonato	Reducir la transmisión de la enfermedad a los bebes	Reducir la morbilidad en adultos Especialmente adultos juvenes
Inmunización selectiva del personal de salud.	Al comienzo de ejercer la profesión (independientemente del estado de vacunación para difteria, tétanos y polio) seguido de refuerzos apropiadamente	Reducir la transmisión de la enfermedad a los pacientes susceptibles (incluido bebés)	Reducir la morbilidad en personal de la salud.
Inmunización selectiva del personal encargado del cuidado de niños.	Al comienzo de ejercer la profesión (independientemente del estado de vacunación para difteria, tétanos y polio) seguido de refuerzos apropiadamente	Reducir la transmisión de la enfermedad a los niños mas pequeños	Reducir la morbilidad en personal encargado del cuidado de niños.
Inmunización universal de adolescentes	A los 11-12 años de edad (dependiendo de la recomendación para los booster de difteria, tétanos y polio) sin pasar los 18 años de edad.	Reducir la morbilidad en adolescentes y jóvenes adultos. Desarrollo de "herd immunity"	Reducir la transmisión de la enfermedad a los niños mas pequeños
Refuerzo universal antes del ingreso escolar a los 4-6 años de edad	A todos los chicos antes del ingreso escolar o en los primeros años (4-6 años de edad)	Reducir la morbilidad en chicos de edad escolar. Desarrollo de "herd immunity"	Reducir la transmisión de la enfermedad a los niños mas pequeños
Reforzar y/o mejorar las actuales estrategias de vacunación para bebés y niños	Según la recomendación actual, que varía para cada país.	Reducir la morbilidad y mortalidad en bebes y niños.	Reducir la circulación de B.pertussis

Tabla 9: Estrategias de inmunización recomendadas por la Global Pertussis Initiative (GPI)

Todas las recomendaciones hasta ahora realizadas no cuentan con el sustento epidemiológico suficiente como para universalizarlas, sin embargo dada la situación epidemiológica de la enfermedad los países año tras año van incorporando más y más refuerzos. Así la demanda de vacunas acelulares aplicables a la población adolescente y adulta se ha incrementado de manera estrepitosa a punto tal que las compañías productoras no están pudiendo satisfacer las demandas en su totalidad. Estos refuerzos además implican un costo importante dentro de las carteras de salud de cada país tanto para la compra y para la administración de los refuerzos que recomiende. Es por todo ello que resulta importante identificar qué refuerzos tendrían un impacto más favorable en la epidemiología de la enfermedad y sobre todo en la epidemiología de los más vulnerables, es decir la población de los lactantes menores de 1 año de edad.

En este contexto una herramienta que está tomando relevancia por sus contribuciones en la toma de decisiones en el área de la salud humana son los modelos matemáticos de transmisión de enfermedades. Pertussis no es ajena a los avances en el diseño de modelos y de hecho existen varios modelos que representan la dinámica de pertussis [200, 253, 255, 257, 265]. Estos modelos difieren entre sí en varios aspectos pero sobre todo los asociados a los parámetros incluidos. Dichos modelos intentan reflejar la enfermedad y su situación en determinadas regiones geográficas por lo que no resultan fácilmente extrapolables a otras regiones con diferentes características. Nuestro grupo a través de un trabajo transdisciplinario ha logrado diseñar un modelo determinista compartimental estructurado por edad basado en dos supuestos generalizables relativos a la inmunidad de la enfermedad, uno refiere a que la inmunidad tiene un efecto importante sobre los casos graves de la enfermedad y otro que la inmunidad inducida por las vacunas disminuye con el tiempo. Así en nuestro modelo la población la hemos estratificado en nueve clases epidemiológicas (Figura 18). Con este modelo hemos explorado diferentes escenarios epidemiológicos ya que existen incertidumbres en algunos parámetros que se incluyen en el modelo como lo es la tasa de contacto infectivos entre personas de diferente las edades, las coberturas vacunales y también la duración exacta de la inmunidad. La comparación de los datos epidemiológicos reales extraídos de nuestra base de datos con los calculados con el modelo en los diferentes escenarios considerados nos permitió reproducir la caída en la incidencia de los niños causado por el uso masivo de la vacunas contra pertussis comparables.

También nos permitió detectar que es importante evaluar diferentes estrategias en los escenarios propuestos porque dados escenarios representan situaciones epidemiológicas posibles. Los resultados que de allí se desprendan que resulten independientes del escenario evaluado tendrán un impacto predictivo más global.

Habiendo logrado establecer los diferentes escenarios entre los cuales estaría representada la realidad de la epidemiología de pertussis en nuestro ámbito, decidimos evaluar el impacto de la incorporación del refuerzo de los 11 años en la incidencia de la población más vulnerables. Este refuerzo fue incluido en nuestro país en el 2009 en respuesta a la situación epidemiológica y a la posibilidad de congregar a la población objeto con relativa facilidad ya que se aplican otras vacunas. Para la evaluación del impacto del refuerzo hemos realizado cálculos para todos los escenarios considerados. Los resultados obtenidos mostraron que el refuerzo de los 11-años disminuye la incidencia de la enfermedad en este grupo de edad. Este resultado está de acuerdo con el reportado recientemente por otros autores [173, 346]. Sin embargo cuando evaluamos el efecto de la introducción de este refuerzo en los adolescentes en los lactantes, nuestros resultados mostraron que el mismo reduce la incidencia en los niños, pero a un grado muy bajo. La disminución calculada es cercana al 5% en cualquiera de los escenarios considerados. Estos datos al igual que otros recientemente divulgados sugieren que las vacunas anti - pertussis en los adolescentes no tendrían un impacto significativo en los niños menores de 1 año. Esto podría explicarse al menos en parte, por el escaso rol que tienen los adolescentes como fuente de infección en lactantes [147, 347]. Es importante destacar también que utilizando nuestro modelo hemos sido capaces de demostrar que, en países como Argentina donde algunas regiones tienen relativamente baja cobertura de vacunación, la estrategia de mejorar las coberturas de las primeras dosis tiene un impacto más beneficioso en la reducción de la incidencia en los bebés que el refuerzo de los adolescentes. Así, encontramos que la disminución de la incidencia en los bebés de 0-1 año era de casi el 40% si se mejoraba la cobertura vacunal de las primeras dosis desde 70% a un 90%.

Los resultados aquí alcanzados, que concuerdan con los recientemente reportados [150, 173, 346], no sólo valorizan a los modelos como una herramienta importante en la toma de decisiones sino también el trabajo transdisciplinario que está permitiendo abordar

adecuadamente problemáticas tan complejas como la aquí presentada [348] en la que no resulto obvio el impacto que puede tener la aplicación de una estrategia en particular.

Si bien hemos podido evaluar si la implementación de un refuerzo puede traer aparejado una mejora en la incidencia de la enfermedad en la población más vulnerable, no es claro que el camino para mejorar el control de la enfermedad sea realmente adicionar y adicionar refuerzos. Por el contrario el hecho que año a año se tengan que incorporar más y más refuerzos sin que la situación epidemiológica de pertussis se logre mejorar sustancialmente probablemente se deba en realidad a los fallos en las vacunas utilizadas, en particular, en las vacunas acelulares [174, 349]. En relación a las fallas de las vacunas acelulares, estudios recientemente reportados sobre la situación epidemiológica de Australia y los EE.UU., así como los datos de un modelo de babuinos que se asemeja mucho a la enfermedad humana, apoyan la hipótesis que la transición de las vacunas de células enteras (wP) a las vacunas acelular (aP) puede estar asociada con el resurgimiento de la enfermedad [9, 211, 350]. En particular, el modelo de babuino ha permitido evidenciar que las vacunas acelulares son capaces de inducir protección adecuada contra la enfermedad, pero no contra la infección ni contra la transmisión [9]. En este contexto en donde la estrategia de adicionar refuerzos no se presenta muy alentadora, el desarrollo de una tercera generación de vacunas más efectiva, más segura y que induzca una inmunidad más duradera se presenta como la estrategia a seguir por lo que deben obtenerse resultados de manera urgente.

Una respuesta posible a las consecuencias del uso de las vacunas acelulares, sobre todo para aquellos países en los que reemplazaron las vacunas celulares por acelulares en las dosis primarias, sería promover el regreso al uso de las vacunas de células enteras, pero con nuevas formulaciones que resulten menos reactogénicas y más efectivas. Sin embargo, resultaría difícil por parte de los países que presentan un esquema con vacunas acelulares volver a utilizar vacunas celulares, porque este cambio fue motivado en el hecho de que la comunidad recibió información sobre las reacciones adversas de las vacunas celulares como fundamento del mismo.

Otra posibilidad dentro de los nuevos desarrollos sería el mejorar las actuales vacunas acelulares a través de la inclusión de más factores de virulencia derivados de *B. pertussis* tales como fuera propuesta la incorporación de la toxina adenilato ciclasa o las proteínas reguladas

por hierro proteins [60, 238] y / o también cambiar el adyuvante de forma de incluir uno capaz de conducir una alta respuesta Th1, es decir, agonistas de los receptores de tipo Toll, como se ha discutido recientemente [351].

Hay incluso en la actualidad varias propuestas avanzadas de nuevas vacunas que podrían contribuir a la solución del problema de la reemergencia de pertussis. Una de ellas consiste en una formulación que contienen una cepa atenuada de *B. pertussis* que se administra por vía intranasal [242-244]. Esta vacuna de hecho ha sido probado con éxito en modelos animales y también ha sido evaluada en cuando a su seguridad en los ensayos clínicos de fase I [245]. Aunque parece prometedora, su uso se enfrenta a los potenciales problemas de seguridad relacionadas con el uso de cepas atenuadas.

Una alternativa interesante que combina algunas de las estrategias mencionadas anteriormente es el uso de vesículas de membrana externa (del inglés OMVs), también llamadas nanopartículas, que contienen numerosos antígenos de superficie bacteriana. Existen dos vacunas contra la meningitis que contienen componentes derivados de la membrana externa y periplasma de *Neisseria meningitidis* del serogrupo B [249, 352-354]. Los datos sobre seguridad y eficacia de estas vacunas y el conocimiento de que la mayoría de las bacterias Gram-negativas secretan vesículas pueden hacer que la estrategia de vacunación con vesículas o nanopartículas resulte factible para otra enfermedades [246]. En este contexto, nuestro grupo ha diseñado una vacuna acelular basada en OMVs derivadas de *B. pertussis* y también de *B. parapertussis*. Los resultados alcanzados con estas formulaciones muestran que las mismas ejercen un excelente efecto protector en el modelo aceptado de desafío intranasal en ratones frente a diferentes cepas de *B. pertussis* y *B. parapertussis* [20-24]. Este tipo de formulaciones tiene un perfil de seguridad en ratones que es comparable a la de las vacunas acelulares comerciales y mucho mejor que las vacunas celulares (Patente de invencion -expediente inpi 2013010123, en trámite; Patente internacional: submission number: 060143 application number: pct/ib2014/060143, en trámite, receiving office: international bureau of the world intellectual property organization). Además, nuestra formulación es capaz de inducir una respuesta robusta de anticuerpos y una respuesta celular protectora con un perfil mixto Th1/Th2. Ya hemos caracterizado la composición de las OMVs verificando la presencia de un alto número de inmunógenos incluidos los principales factores de virulencia lo cual es importante ya que esto podría evitar la excesiva presión selectiva

conferida por las vacunas que contienen pocos antígenos [20] Esta formulación también resulta atractiva económicamente que solo se requieren de pocos pasos para producirlas.

En este este trabajo de tesis no sólo hemos confirmado resultados que destacan el poder protector de nuestra formulación basada en OMVs derivadas de *B. pertussis* sino que además hemos podido identificar los componentes esenciales para la protección inducida por nuestra formulación. Empleando vacunas que contienen a las OMVs derivadas de mutantes de *B. pertussis* defectivos en la expresión de alguno de los principales inmunógenos incluidos en las actuales vacunas acelulares hemos podido detectar que tanto la toxina pertussis (PTx) como la Pertactina (Prn) son esenciales para la inducción del poder protector de las OMVs. Estos resultados señalarían una vez más la importante contribución de PTx y PRN en protección anti-pertussis. La observación actual sobre los efectos protectores PTx es coherente con el uso actual de vacunas constituidas solamente por esta toxina. El rol de la PRN en la protección es coherente con su pronta inclusión en la vacuna acelulares de 3 componentes [145, 199]. Varios estudios en animales y humanos han indicado que PRN puede inducir anticuerpos protectores [273, 355, 356] que resultan cruciales para *B. pertussis* fagocitosis, que también se correlaciona con la protección contra la enfermedad [71, 273].

Usando la misma estrategia de preparar formulaciones vacunales basadas en OMVs derivadas de cepas de *B. pertussis* deficientes en la expresión de algunos factores y luego de caracterizarlas y evaluarlas en el modelo de desafío intranasal en ratones, pudimos determinar que ni la hemaglutinina filamentosa ni la adenilato ciclasa- hemolisina resultan esenciales en la protección mediada por estas formulaciones. Estos resultados no descartan el uso de los mismos en formulaciones más sencillas. Nuestros hallazgos podrían deberse en parte a que el rol de estos dos inmunógenos estaría enmascarado por otros componentes presentes en este tipo de formulaciones complejas que contienen numerosos inmunógenos.

En base a los resultados que muestran el rol de algunos factores de virulencia en la protección inducida por las OMVs, decidimos evaluar si la falta de todos los factores de virulencia puede abrogar la capacidad protectora de las vacunas pertussis basadas en OMVs. Para este fin, trabajamos con las OMV derivadas de una cepa de *B. pertussis* bloqueada en la fase avirulenta. Este enfoque parecía apropiado a nuestro objetivo, ya que por un lado la cepa de *B. pertussis* bloqueada en la fase avirulenta no expresa ninguno de los factores de

virulencia [316, 317] y, por otro lado, los factores característicos de la fase avirulenta han sido reportados como inmunógenos pobres [98, 99, 104, 357]. Sorprendentemente, los resultados que obtuvimos con estas las OMVs muestran que las mismas aunque con valores menores resultan ser protectora contra la infección, como puede inferirse al detectar una disminución de 2 log ($p < 0,001$) en los recuentos bacterianos de pulmón respecto al grupo control no inmunizado. A pesar de que este nivel de protección es inferior al registrado para las vacunas conteniendo a las OMVs en fase virulenta, los resultados fueron inesperados y nóveles ya que esta fase fenotípica no ha sido hasta ahora reportada como capaz de conferir protección contra *B. pertussis*. Además, la toxicidad de estas OMVs parece ser tan bajo como el resto de las OMVs ensayadas.

En conjunto, los resultados presentados en este trabajo de tesis dan cuenta que las OMVs derivadas de *B. pertussis* presentan un nivel basal de protección contra la infección causada por *B. pertussis*, independientemente de la expresión de uno o más factores de virulencia. Por lo tanto, la eficacia protectora observado con todas las OMVs puede atribuirse en parte a factores comunes que se expresan en todas las cepas bacterianas utilizadas. Con el fin de identificar dichos componentes comunes que podrían tener un papel en la protección se realizó un análisis inmuno-proteómico utilizando como antígeno las distintas OMVs obtenidas de las diferentes cepas estudiadas y los diferentes sueros de ratón inducido por los OMVs. Estos ensayos nos permitieron identificar proteínas comunes a todas las OMVs. Estos incluyen antígenos a OmpC y GroEL. Recientemente, se demostró que OmpC es un objeto de una vacuna prometedora para otro patógeno [336, 358]. Respecto de GroEL, se ha reportado de que esta proteína proporciona protección contra un desafío de aerosol con *B. pertussis* [334, 359]

Según los resultados que aquí se muestran, la capacidad protectora de las vacunas formuladas a partir de las OMVs derivadas de *B. pertussis* es aportado por varios componentes, incluyendo PRN y PTx pero también por varios factores que son comunes tanto a la virulenta como a la fase bacteriana no virulenta. Es de gran importancia seguir avanzando en la identificación de los componentes esenciales en la protección para determinar su papel individual en la construcción de la capacidad protectora de las OMVs. Podemos anticipar que esta característica de contener una multiplicidad de los inmunógenos que aportan a la capacidad protectora de las OMVs resulta en un aspecto muy positivo de nuestra formulación

a OMVs, ya que la presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas que circulan no se centrará en un solo o unos pocos componentes, lo que haría más difícil la aparición de variantes de escape, tal como se observó para acelular vacunas hechas con antígenos de proteína purificada.

Entendemos que nuestros hallazgos son importantes no sólo en lo que refiere a las OMVs como candidatos vacunales sino en la vacunología de pertussis en general, ya que hemos encontrado componentes que podrían jugar un rol esencial en la protección y son independientes de la fase de virulencia en que se encuentra la bacteria los cuales. Así, la búsqueda de nuevos inmunógenos no debería restringirse a la fase virulenta de la bacteria sino al fenotipo que resulta independiente de la regulación mediada por el sistema de dos componentes.

MATERIALES Y METODOS

1. CEPAS DE *B. PERTUSSIS*.

Como cepas de referencia de *B. pertussis* se empleó la cepa *BpTohama I* (Colección del Instituto Pasteur de París CIP 8132). La cepa *Bp Tohama I* ha sido aislada en Japón de un paciente infectado y su genoma ha sido completamente secuenciado . Esta cepa se utiliza para la producción de vacunas acelulares. Además se emplearon las cepas mutantes derivadas de *BpTohama I*, *Bp RA* es la cepa defectiva en la expresión de la toxina pertussis (Δ PTx) [2] ; *Bp Bbc42* defectiva en el gen de la pertactina (Δ PRN) ; *Bp GR4* defectiva en la expresión de la Hemaglutinina filamentosa (Δ FHA) ; *Bp 3183* defectiva en la expresión de la Adenilato ciclasa hemolisina (Δ Cya) y la *Bp 347* la cual es una cepa mutante bloqueada en la fase Bvg-(avir)[5].

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO PARA *B. PERTUSSIS*

Los stock bacterianos de las cepas de *B. pertussis* utilizadas se conservan como una suspensión en el medio sintético de Stainer-Scholte (SS) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, en presencia de glicerol 50 % v/v. Para obtener células de *B. pertussis*, a partir de estos stock iniciamos cultivos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 72 hs. en placas de Petri conteniendo el medio Bordet Gengou suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 10% v/v (BGAS). Transcurridas 72 horas del primer cultivo efectuamos un subcultivo en el mismo medio durante 24 horas más.

Para cultivar las cepas mutantes se adicionaron a las placas de BGAS los antibióticos correspondientes en las siguientes concentraciones finales: Gentamicina $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ y Kanamicina $25\text{ }\mu\text{g/ml}$.

A continuación se detalla la composición de los medios de cultivo:

Agar Bordet – Gengou Sangre (BGAS)		Stainer- Scholte (SS)		Complemento (20ml 10X)	
Agar Bordet-Gengou comercial (Difco®)	30 g/l cultivo	Glutamato de sodio monohidrato	10.7 g/l	L- Cisteína	800 mg
Peptona (Difco®)	10 % p/v	L- Prolina	0.24 g/l	FeSO4 7H2O	200 mg
Glicerina	1 % v/v	NaCl	2.50 g/l	Ac. Ascórbico	400 mg
Una vez esterilizado se suplementa con 10 % v/v de sangre de carnero		KH2PO4	0.50 g/l	Ac. Nicotínico	80 mg
		KCl	0.20 g/l	HCl(c)	2 ml
		MgCl2 6H2O	0.10 g/l		
		CaCl2 6 H2O	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.			

3 OBTENCIÓN DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA (OMVS)

Para obtener las OMVs de las bacterias, cada cepa se cultivó en medio líquido SS con casaminoácidos 10% p/v a 37°C por 16 hs. Se recolectó el pellet bacteriano centrifugando a 6000g por 20 min a 4°C y se resuspendió en una solución 20mM Tris-HCl, 2mM EDTA pH 8.5 (buffer TE). Se emplearon 5 ml de buffer TE por cada 1 g (de masa húmeda) de bacteria. A esta suspensión se agregaron 2.5gr de bolitas de vidrio por cada 10ml de buffer TE y se sonicaron en baño de agua fría por 20 min. Posteriormente se centrifugó dos veces a 10.000g por 20min a 4°C con el objetivo de eliminar los restos bacterianos. El sobrenadante se sometió a una ultracentrifugación a 100.000g por 2hs. Este pellet se resuspendió en una solución de PBS esteril.

4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA – TINCIÓN NEGATIVA

La microscopia se llevó a cabo con una suspensión de OMVs en 0.1mM de Acetato de Amonio (pH 7.0). Una gota de esta suspensión se colocó en una grilla cubierta de un film de carbono reforzado. Después de 30 segundos se removió el exceso de líquido con un papel de filtro y la grilla fue teñida con una solución del 2% (p/v) de Acido Fosfotungstico pH 5.2 (con KOH). La observación se realizó con un Microscopio Jeol JEM 1200EX

5. OBTENCIÓN DE MUESTRAS PROTEICAS

5.1. Obtención de proteínas totales

Las bacterias cultivadas en medio sólido se resuspendieron de forma de obtener una suspensión de DO=10 (DO650nm para *B. pertussis* y DO600nm para *E. coli*). Estas suspensiones bacterianas fueron luego tratadas con Buffer de Laemmli con 5%v/v de β -mercaptoetanol. Antes de someterlas a corridas electroforética las muestras fueron calentadas a ebullición durante 15 minutos, centrifugadas y sonicadas en baño para una mejor resolución de las mismas en los geles.

5.2. Obtención de fracciones proteicas de *B. pertussis* enriquecidas en proteínas de membrana

Estas muestras fueron obtenidas a partir de un cultivo bacteriano en medio SS en fase logarítmica (DO650nm final aproximada 1-1.5). Las células cultivadas en estas condiciones fueron cosechadas por centrifugación a 10.000 g durante 30 minutos a 4°C y resuspendidas en buffer HEPES 10mM, pH 7.4 con PMSF 0.25 mM final, de forma de alcanzar una DO650nm=10. La ruptura celular se realizó mediante ultrasonido realizando 6 repeticiones de pulsos con potencia máxima (Branson) durante 3 min. Los restos celulares y las células remanentes fueron eliminadas por centrifugación, 10.000 g x 4°C durante 20 min. El lisado libre de células fue ultracentrifugado (Beckman Coulter Optima LE-80K) durante 1 hora a 100.000 g (Rotor 70Ti) a 4 °C. El sedimento obtenido resulta en una preparación enriquecida en proteínas de membrana que de aquí en más denominaremos “Cubierta” de *B. pertussis*. Estas cubiertas fueron solubilizadas en buffer 7 M Urea, 2 M Tiourea, 10 % Isopropanol, 2% Tritón 100 (Buffer UTIT).

6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

La cuantificación de proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford (18) con el reactivo comercial (BioRad) según indicaciones del fabricante. Se utilizó Seroalbúmina bovina (BSA por sus siglas en inglés) como proteína estándar (en concentraciones de 0,062 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

7. ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONALES EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).

Las corridas electroforéticas se realizaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli [6]

Buffer de Laemmli

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

Glicerol 20% v/v

EDTA 0,004 M

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

Azul de Bromofenol 0,01 %

β -mercaptoetanol 5 % v/v

El gel de apilamiento o stacking se preparó en una concentración de 4 % de poli(acrilamida) (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 poli(acrilamida) (acrilamida : bisacrilamida 30:0.8), con Tris-HCl 1M a pH 8.8 y SDS 10 %p/v. Las electroforesis se realizaron en equipos Miniprotean II (BioRad) durante 40 a 60 minutos a 110 volts utilizando como buffer de corrida Glicina 0.37 M, SDS 10 % p/v, Tris-HCl 0.05 M pH 8.3. Alternativamente se utilizó un equipo Hoefer (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 tiñeron con Coomassie Blue R-250, Coomassie Coloidal o con nitrato de plata.

8. TINCIÓN DE PROTEÍNAS

8.1. Tinción Coomassie Blue R-250

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

8.2. 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) Tres incubaciones con solución de Fijación 1 conteniendo 30% etanol, 2% ácido fosfórico, en agua desionizada, cada una de 30 minutos con agitación moderada.

2) Tres lavados con Solución de lavado conteniendo 2% de ácido fosfórico en agua desionizada, cada una de 20 minutos, con agitación moderada.

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

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

5) Para remover el fondo que pudiera quedar se sumerge en agua desionizada.

8.3. Tinción con Nitrato de Plata.

Luego de la corrida electroforética el gel se fija por al menos 2 horas en solución conteniendo: 50% metanol, 10% ac. acético y 40% agua. Posteriormente se procede al lavado del gel con etanol 50 % y una vez con etanol 30%. Se realiza luego un tratamiento con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0.02 % p/v durante 1 minuto con tres lavados posteriores de 20 segundos cada uno con agua desionizada. Luego se incuba durante 20 minutos con solución de AgNO_3 0.2 % p/v con 75 l de HCOH 37 %. Seguidamente se realizan dos lavados de 20 segundos cada uno con agua desionizada. Finalmente se revela con una solución de Na_2CO_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 l de HCOH 37 %. Una vez que se observa la aparición de las bandas correspondientes se lava con agua desionizada 2 veces de 2 minutos cada una. Luego se detiene la reacción con metanol 50 %, ácido acético 12 %.

9. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASA (EM), MALDI-TOF.

9.1. Digestión tróptica in-gel.

Las bandas (geles unidimensionales) teñidos fueron cortados del gel y transferidos a distintos pocillos de placas multi-well. Los spots fueron lavados alternadamente con 100 μl de agua desionizada 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 las bandas/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 μ l 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 y seguidamente los spots fueron deshidratados con 3 lavados con acetonitrilo. Cuando los spots estuvieron completamente blancos, deshidratados y libres de acetonitrilo; éstos fueron rehidratados con pequeños volúmenes, 5 μ l, de bicarbonato de amonio 25 mM conteniendo tripsina (20 μ g/ml, Promega). Las bandas/spots fueron incubados durante 45 minutos a 4 °C y una vez transcurrido este tiempo se verificó que los spots estuvieran perfectamente hidratados, se cubrió las bandas/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.

9.2. Obtención de la huella peptídica mediante espectrometría de masa (EM).

Para realizar el análisis por espectrometría de masa se utilizó la matriz α -ciano-4 hidroxí - ácido cinámico, en una concentración 0.2 g/l preparada en una solución 50 % acetonitrilo / 0.25 % TFA. La muestra junto con la matriz en una relación 1:1 se colocó en el soporte MTP Anchor Chip™ 600/384 TF y se dejó secar durante 10 minutos a temperatura ambiente previo al análisis por EM. El espectro de la muestra se obtuvo luego empleando un equipo Ultraflex II Tof-Tof (Bruker Daltonics). Los parámetros utilizados fueron los siguientes: potencia del láser 31-50 %, frecuencia del láser 100Hz, 100 shots por disparo, voltaje de aceleración 20 kV, detección de masa 800-3500 Da, señal deflectada por debajo de 850 Da, ganancia del detector 1650 V, ganancia electrónica 100mV. Los espectros fueron analizados utilizando el software Flex Analysis (Bruker Daltonics) y calibrados internamente utilizando los picos conocidos de autólisis de la tripsina.

9.3. Identificación de proteínas y herramientas bioinformáticas.

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 ($p < 0.05$).

10. INMUNODETECCIONES DE PROTEÍNAS (INMUNOBLOT).

Las muestras de proteínas sometidas previamente a corridas electroforéticas fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinildieno (PVDF) (Immobilon, Millipore) utilizando el equipo Mini Trans-Blot transfer Cell (BioRad) según las indicaciones del fabricante.

Las membranas transferidas fueron bloqueadas en sus sitios inespecíficos con las proteínas de leche descremada (San Regim) 5 % p/v en buffer TBS (Tris-HCl 12 mM, NaCl 4 mM). Seguidamente la membrana se trató con el primer anticuerpo 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 con agitación suave. Se retiró la solución del segundo anticuerpo y se realizaron tres lavados con TBS y un lavado en buffer para fosfatasa alcalina (PA: 50 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 9.5). Finalmente en el momento del revelado se preparó una solución con el sustrato de la fosfatasa alcalina que contiene NBT (Nitroblue Tetrazolium Chloride) y BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-indolylphosphate p-toluidine) en buffer PA. Una vez que se desarrolló color se detuvo la reacción con agua desionizada.

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

11. OBTENCIÓN DE ANTISUEROS POLICLONALES EN RATONES.

11.1 Sueros anti-OMVs

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, tanto en formulaciones celulares como acelulares a partir de las distintas OMVs

Para obtener el anti-suero reactivo frente a las distintas vacunas se inmunizaron, mediante inyección i.p. 4 ratones con 3 μg de OMVs (proteínas totales) por dosis utilizando como adyuvante $\text{Al}(\text{OH})_3$. Se realizaron dos inmunizaciones con intervalos de 14 días, después de las cuales los ratones fueron sangrados a blanco.

11.2 Sueros anti proteínas recombinantes

A partir de las proteínas purificadas se realizó una diálisis contra PBS para eliminar los restos de los buffers empleados en la purificación de la proteína. Una vez dializada la proteína se preparó con el adyuvante de Freund completo diluido 1:2 con 3 μg de la proteína purificada. Se realizaron inyecciones por vía intra peritoneal, dos inmunizaciones cada 7 días, y luego de 5 a 7 días de la segunda inmunización se extrajo sangre de los ratones. Se separó el suero luego de dejar coagular 30 minutos a 37°C y 1 hora a 4°C. Se centrifugó a 5000rpm por 15 minutos para separar el paquete globular y se extrajo el suero.

12 ENSAYOS DE PROTECCIÓN UTILIZANDO EL MODELO DESAFÍO INTRANASAL EN RATONES.

Grupos de ratones Balb/C hembras de 3 a 4 semanas de edad (4 para cada tratamiento, 3 repeticiones de los ensayos) fueron inmunizados 2 veces con intervalos de 15 días. Las inmunizaciones se realizaron mediante inyección intraperitoneal (i.p.) con 1/10 de la dosis humana de las vacunas bacterianas triple DTP (Serum Institute of India LTD), con 1/10 de la dosis humana de la vacuna acelular TDaP (Boostrix), o con las distintas formulaciones preparada por nosotros a partir de las distintas OMVs, empleando 3 μg de proteínas totales (para cada OMV) por dosis. A los 15 días de la segunda inmunización se desafiaron los ratones mediante inoculación intranasal (40 μl conteniendo 5×10^7 - 1×10^8 bacterias) con la cepa vacunal Bp Tohama I.

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 Tohama I (control positivo de protección), y un grupo de ratones sin inmunizar (inyectados con PBS) y desafiados con la cepa Tohama I (controles negativos de protección).

Los ratones desafiados fueron sacrificados mediante dislocación cervical a los 7 días post-desafío (4 ratones por condición). Se extrajeron los pulmones en esterilidad y se homogeneizaron en PBS con un homogeneizador Pro Scientific INC 200. Luego se realizaron

diluciones seriadas 1/10 de los homogenatos de pulmón, se plaquearon en medio BGAS por duplicado y se realizaron los recuentos de UFC después de 3-4 días de incubación a 37 °C.

El límite de detección de esta metodología está dado por la capacidad de discriminar entre un pulmón con bacterias viables de uno que no contenga ninguna. Dado el procedimiento empleado, la placa que denominamos directa tendrá unas 10 veces menos UFC que el pulmón completo, la primera dilución 100 veces menos, y así sucesivamente. El límite inferior de detección está dado por la placa directa, pero a causa de tomar una alícuota de la décima parte, no es posible asegurar que el número de UFC en el pulmón sea nulo, aún cuando en la placa directa no aparezcan colonias. Este problema admite un planteo en términos de la distribución de Poisson para muestreo aleatorio. Si admitimos esta distribución, la probabilidad de encontrar al menos una colonia en nuestra alícuota de un décimo del volumen total será de prácticamente 1 cuando el número de colonias esperado sea de 10 UFC en el pulmón. Este es el límite inferior de detección que establecimos en nuestros experimentos (el valor correspondiente es $\log_{10} 10=1$).

El límite de detección superior no es problemático, porque pueden hacerse tantas diluciones como sean necesarias para lograr un número deseado de entre 30 y 300 colonias por placa.

13 ENSAYOS DE LISIS BACTERIANA MEDIADA POR COMPLEMENTO.

Este ensayo se utiliza para evaluar la lisis mediada por el complemento activado vía anticuerpos específicos contra *B. pertussis*. Primero se inactivó el complemento del suero que contiene los anticuerpos específicos mediante tratamiento a 56°C por 30 min. Luego se puso en contacto una suspensión bacteriana con estos sueros inactivados, durante 1 hora y 30 minutos a 37°C en agitación moderada (50µl de suero con 50µl de bacterias). La suspensión bacteriana se realizó en el Buffer de Lisis x Complemento (Considerando $DO_{650} 1 = 3 \times 10^9$ UFC para tener 1 UFC/µl la $DO_{650}=3,33 \times 10^{-7}$). Luego se agregaron 10µl de Suero ACTIVO (con complemento) y se incubó por 2hs a 37°C. En este caso se utilizó suero de raton naive o suero fetal bovino. Finalmente se plaquearon las diluciones adecuadas en BGAS para realizar el recuento de UFC.

Buffer de LISIS x Complemento: PBS + MgCl 0,5mM + CaCl 0,15mM (esterilizado por filtración)

14. 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 Log_{10} de 50 UFC. Las diferencias entre $\text{Log}_{10}(\text{UFC})$ 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.

BIBLIOGRAFIA

1. CDC. *Pertussis Outbreak Trends*. 2015; Available from: <http://www.cdc.gov/pertussis/outbreaks/trends.html>.
2. statistics, O.f.N. *Datasets and reference tables*. 2015; Available from: <http://www.ons.gov.uk/ons/datasets-and-tables/index.html>.
3. Romanin, V., et al., *Epidemiological situation of pertussis and strategies to control it: Argentina, 2002-2011*. Arch Argent Pediatr, 2014. **112**(5): p. 413-20.
4. Jackson, D.W. and P. Rohani, *Perplexities of pertussis: recent global epidemiological trends and their potential causes*. Epidemiol Infect, 2014. **142**(4): p. 672-84.
5. Aguas, R., G. Goncalves, and M.G. Gomes, *Pertussis: increasing disease as a consequence of reducing transmission*. Lancet Infect Dis, 2006. **6**(2): p. 112-7.
6. Organization, W.H. *Progress Towards Global Immunization Goals 2012*; Available from: http://www.unicef.org/immunization/_les/SlidesGlobalImmunization.pdf.
7. Wearing, H.J. and P. Rohani, *Estimating the duration of pertussis immunity using epidemiological signatures*. PLoS Pathog, 2009. **5**(10): p. e1000647.
8. Mooi, F.R., I.H. van Loo, and A.J. King, *Adaptation of Bordetella pertussis to vaccination: a cause for its reemergence?* Emerg Infect Dis, 2001. **7**(3 Suppl): p. 526-8.
9. Warfel, J.M., L.I. Zimmerman, and T.J. Merkel, *Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(2): p. 787-92.
10. Terranella, A., et al., *Pregnancy dose Tdap and postpartum cocooning to prevent infant pertussis: a decision analysis*. Pediatrics, 2013. **131**(6): p. e1748-56.
11. Centers for Disease, C. and Prevention, *Updated recommendations for use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, and acellular pertussis vaccine (Tdap) in pregnant women-- Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2012*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2013. **62**(7): p. 131-5.
12. Kuehn, B.M., *ACIP: Give pertussis vaccine during every pregnancy*. JAMA, 2012. **308**(19): p. 1960.
13. Kretsinger, K., et al., *Preventing tetanus, diphtheria, and pertussis among adults: use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccine recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and recommendation of ACIP, supported by the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC), for use of Tdap among health-care personnel*. MMWR Recomm Rep, 2006. **55**(RR-17): p. 1-37.
14. Broder, K.R., et al., *Preventing tetanus, diphtheria, and pertussis among adolescents: use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccines recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)*. MMWR Recomm Rep, 2006. **55**(RR-3): p. 1-34.
15. Forsyth, K.D., et al., *Prevention of pertussis: recommendations derived from the second Global Pertussis Initiative roundtable meeting*. Vaccine, 2007. **25**(14): p. 2634-42.
16. Forsyth, K.D., et al., *New pertussis vaccination strategies beyond infancy: recommendations by the global pertussis initiative*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(12): p. 1802-9.
17. Poolman, J.T., *Shortcomings of pertussis vaccines: why we need a third generation vaccine*. Expert Rev Vaccines, 2014. **13**(10): p. 1159-62.

18. Plotkin, S.A., *Pertussis: pertussis control strategies and the options for improving current vaccines*. Expert Rev Vaccines, 2014. **13**(9): p. 1071-2.
19. Meade, B.D., S.A. Plotkin, and C. Locht, *Possible options for new pertussis vaccines*. J Infect Dis, 2014. **209 Suppl 1**: p. S24-7.
20. Gaillard, M.E., et al., *Acellular pertussis vaccine based on outer membrane vesicles capable of conferring both long-lasting immunity and protection against different strain genotypes*. Vaccine, 2014. **32**(8): p. 931-7.
21. Ormazabal, M., et al., *Characterization of the key antigenic components of pertussis vaccine based on outer membrane vesicles*. Vaccine, 2014. **32**(46): p. 6084-90.
22. Bottero, D., et al., *Outer membrane vesicles derived from Bordetella parapertussis as an acellular vaccine against Bordetella parapertussis and Bordetella pertussis infection*. Vaccine, 2013. **31**(45): p. 5262-8.
23. Asensio, C.J., et al., *Outer membrane vesicles obtained from Bordetella pertussis Tohama expressing the lipid A deacylase PagL as a novel acellular vaccine candidate*. Vaccine, 2010. **29**(8): p. 1649-56.
24. Roberts, R., et al., *Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis*. Vaccine, 2008. **26**(36): p. 4639-46.
25. Centers for Disease Control and Prevention, C., *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*, H.J. Atkinson W, Wolfe S,, Editor. 2012, Public Health Foundation: Washington DC.
26. Mattoo, S. and J.D. Cherry, *Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to Bordetella pertussis and other Bordetella subspecies*. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(2): p. 326-82.
27. Versteegh F, S.J., Fleer A.,Roord J., *Pertussis: a concise historial review including diagnosis, incidence, clinical manifestations and the rol of treatmen and vaccination in management*. Medical Microbiology, 2005. **16**: p. 79-89.
28. Kohn, G., *Cough of Perinthus*. . The Wordsworth Encyclopedia of Plague and Pestilence, 1998: p. 66.
29. Simpson, J.A., *Oxford English Dictionary , 2nd edn. . 1989 additions 1993-7*.
30. Lieburg, M.J.v., *De Geschiedenis vas de Kindergeneeskunde in Nederland*. Rotterdam; Erasmus Publishing, 1997. **25**: p. 159.
31. Connor, J.D., *Evidence for an etiologic role of adenoviral infection in pertussis syndrome*. N Engl J Med, 1970. **283**(8): p. 390-4.
32. Nelson, K.E., et al., *The role of adenoviruses in the pertussis syndrome*. J Pediatr, 1975. **86**(3): p. 335-41.
33. Sturdy, P.M., S.D. Court, and P.S. Gardner, *Viruses and whooping-cough*. Lancet, 1971. **2**(7731): p. 978-9.
34. Guilfoile, P., *Whooping cough*. 2010, New York: Chelsea House. 108 p.
35. Ledermann D, W., *Breve historia de la Bordetella pertussis, una elusiva damisela*. Revista chilena de infectología, 2004. **21**: p. 241-246.
36. Bordet, J.G., O., *Le microbe de la coqueluche*. Ann. Inst. Pasteur, 1906. **20**: p. 731-741.
37. Locht, C., *Bordetella: Molecular Microbiology*. 2007, Institut Pasteur de Lille, France Horizon Bioscience.

38. Gueirard, P., et al., *Human Bordetella bronchiseptica infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(8): p. 2002-6.
39. Woolfrey, B.F. and J.A. Moody, *Human infections associated with Bordetella bronchiseptica*. Clin Microbiol Rev, 1991. **4**(3): p. 243-55.
40. von Wintzingerode, F., et al., *Bordetella petrii sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus Bordetella*. Int J Syst Evol Microbiol, 2001. **51**(Pt 4): p. 1257-65.
41. Zelazny, A.M., et al., *Adaptability and persistence of the emerging pathogen Bordetella petrii*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e65102.
42. Le Coustumier, A., et al., *Bordetella petrii infection with long-lasting persistence in human*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(4): p. 612-8.
43. Fry, N.K., et al., *Bordetella petrii clinical isolate*. Emerg Infect Dis, 2005. **11**(7): p. 1131-3.
44. Bottero, D., et al., *Bordetella holmesii in children suspected of pertussis in Argentina*. Epidemiol Infect, 2013. **141**(4): p. 714-7.
45. Yih, W.K., et al., *Bordetella holmesii-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms*. Emerg Infect Dis, 1999. **5**(3): p. 441-3.
46. Parkhill, J., et al., *Comparative analysis of the genome sequences of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica*. Nat Genet, 2003. **35**(1): p. 32-40.
47. van der Zee, A., et al., *Molecular evolution and host adaptation of Bordetella spp.: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences*. J Bacteriol, 1997. **179**(21): p. 6609-17.
48. Diavatopoulos, D.A., et al., *Bordetella pertussis, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of B. bronchiseptica*. PLoS Pathog, 2005. **1**(4): p. e45.
49. Preston, A., *Bordetella pertussis: the intersection of genomics and pathobiology*. CMAJ, 2005. **173**(1): p. 55-62.
50. Cherry, J.D., et al., *The respiratory pathology in infants with sudden unexpected deaths in whom respiratory specimens were initially PCR-positive or PCR-negative for Bordetella pertussis*. Infection, 2011. **39**(6): p. 545-8.
51. Mills, K.H., *Immunity to Bordetella pertussis*. Microbes Infect, 2001. **3**(8): p. 655-77.
52. de Gouw, D., et al., *Pertussis: a matter of immune modulation*. FEMS Microbiol Rev.
53. Coutte, L., et al., *Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen*. J Exp Med, 2003. **197**(6): p. 735-42.
54. Mattoo, S., et al., *Mechanisms of Bordetella pathogenesis*. Front Biosci, 2001. **6**: p. E168-86.
55. Burns, V.C., et al., *Role of Bordetella O antigen in respiratory tract infection*. Infect Immun, 2003. **71**(1): p. 86-94.
56. Pishko, E.J., et al., *Bordetella pertussis acquires resistance to complement-mediated killing in vivo*. Infect Immun, 2003. **71**(9): p. 4936-42.
57. Melvin, J.A., et al., *Bordetella pertussis pathogenesis: current and future challenges*. Nat Rev Microbiol, 2014. **12**(4): p. 274-88.
58. Skinner, J.A., et al., *Bordetella type III secretion modulates dendritic cell migration resulting in immunosuppression and bacterial persistence*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4647-52.
59. Carbonetti, N.H., *Immunomodulation in the pathogenesis of Bordetella pertussis infection and disease*. Curr Opin Pharmacol, 2007. **7**(3): p. 272-8.

60. Sebo, P., R. Osicka, and J. Masin, *Adenylate cyclase toxin-hemolysin relevance for pertussis vaccines*. *Expert Rev Vaccines*, 2014. **13**(10): p. 1215-27.
61. Mazar, J. and P.A. Cotter, *Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion*. *Mol Microbiol*, 2006. **62**(3): p. 641-54.
62. Coutte, L., et al., *Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway*. *EMBO J*, 2001. **20**(18): p. 5040-8.
63. Alonso, S., et al., *Role of ADP-ribosyltransferase activity of pertussis toxin in toxin-adhesin redundancy with filamentous hemagglutinin during Bordetella pertussis infection*. *Infect Immun*, 2001. **69**(10): p. 6038-43.
64. Inatsuka, C.S., S.M. Julio, and P.A. Cotter, *Bordetella filamentous hemagglutinin plays a critical role in immunomodulation, suggesting a mechanism for host specificity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(51): p. 18578-83.
65. Funnell, S.G. and A. Robinson, *A novel adherence assay for Bordetella pertussis using tracheal organ cultures*. *FEMS Microbiol Lett*, 1993. **110**(2): p. 197-203.
66. Edwards, J.A., N.A. Groathouse, and S. Boitano, *Bordetella bronchiseptica adherence to cilia is mediated by multiple adhesin factors and blocked by surfactant protein A*. *Infect Immun*, 2005. **73**(6): p. 3618-26.
67. Henderson, M.W., et al., *Contribution of Bordetella filamentous hemagglutinin and adenylate cyclase toxin to suppression and evasion of interleukin-17-mediated inflammation*. *Infect Immun*, 2012. **80**(6): p. 2061-75.
68. Willems, R., et al., *Fimbrial phase variation in Bordetella pertussis: a novel mechanism for transcriptional regulation*. *EMBO J*, 1990. **9**(9): p. 2803-9.
69. Mooi, F.R., et al., *Construction and analysis of Bordetella pertussis mutants defective in the production of fimbriae*. *Microb Pathog*, 1992. **12**(2): p. 127-35.
70. Preston, N.W., *Prevalent serotypes of Bordetella pertussis in non-vaccinated communities*. *J Hyg (Lond)*, 1976. **77**(1): p. 85-91.
71. Storsaeter, J., et al., *Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to Bordetella pertussis*. *Vaccine*, 1998. **16**(20): p. 1907-16.
72. Emsley, P., et al., *Structure of Bordetella pertussis virulence factor P.69 pertactin*. *Nature*, 1996. **381**(6577): p. 90-2.
73. Mooi, F.R., et al., *Variation in the Bordetella pertussis virulence factors pertussis toxin and pertactin in vaccine strains and clinical isolates in Finland*. *Infect Immun*, 1999. **67**(6): p. 3133-4.
74. Arico, B. and R. Rappuoli, *Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica contain transcriptionally silent pertussis toxin genes*. *J Bacteriol*, 1987. **169**(6): p. 2847-53.
75. Tamura, M., et al., *Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model*. *Biochemistry*, 1982. **21**(22): p. 5516-22.
76. Locht, C., L. Coutte, and N. Mielcarek, *The ins and outs of pertussis toxin*. *FEBS J*, 2011. **278**(23): p. 4668-82.
77. Katada, T. and M. Ui, *Unique properties of a new GTP-binding protein with a molecular mass of 24,000 daltons purified from porcine brain membranes*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1988. **53 Pt 1**: p. 255-61.
78. Spangrude, G.J., et al., *Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin*. *J Immunol*, 1985. **135**(6): p. 4135-43.

79. Bruss, J.B., et al., *Treatment of severe pertussis: a study of the safety and pharmacology of intravenous pertussis immunoglobulin*. *Pediatr Infect Dis J*, 1999. **18**(6): p. 505-11.
80. Carbonetti, N.H., *Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of Bordetella pertussis and cell biology tools*. *Future Microbiol*, 2010. **5**(3): p. 455-69.
81. Glaser, P., et al., *Bordetella pertussis adenylate cyclase: the gene and the protein*. *Tokai J Exp Clin Med*, 1988. **13 Suppl**: p. 239-52.
82. Fiser, R., et al., *Calcium influx rescues adenylate cyclase-hemolysin from rapid cell membrane removal and enables phagocyte permeabilization by toxin pores*. *PLoS Pathog*, 2012. **8**(4): p. e1002580.
83. Sakamoto, H., et al., *Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(19): p. 13598-602.
84. Glaser, P., et al., *The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of Bordetella pertussis: cloning and expression in Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 1988. **2**(1): p. 19-30.
85. Kamanova, J., et al., *Adenylate cyclase toxin subverts phagocyte function by RhoA inhibition and unproductive ruffling*. *J Immunol*, 2008. **181**(8): p. 5587-97.
86. Paccani, S.R., et al., *Suppression of T-lymphocyte activation and chemotaxis by the adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis*. *Infect Immun*, 2008. **76**(7): p. 2822-32.
87. Decker, K.B., et al., *The Bordetella pertussis model of exquisite gene control by the global transcription factor BvgA*. *Microbiology*, 2012. **158**(Pt 7): p. 1665-76.
88. Leslie, P.H. and A.D. Gardner, *The Phases of Haemophilus pertussis*. *J Hyg (Lond)*, 1931. **31**(3): p. 423-34.
89. Lacey, B.W., *Antigenic modulation of Bordetella pertussis*. *J Hyg (Lond)*, 1960. **58**: p. 57-93.
90. Jungnitz, H., et al., *A second two-component regulatory system of Bordetella bronchiseptica required for bacterial resistance to oxidative stress, production of acid phosphatase, and in vivo persistence*. *Infect Immun*, 1998. **66**(10): p. 4640-50.
91. Weiss, A.A., et al., *Use of the promoter fusion transposon Tn5 lac to identify mutations in Bordetella pertussis vir-regulated genes*. *Infect Immun*, 1989. **57**(9): p. 2674-82.
92. Hot, D., et al., *Differential modulation of Bordetella pertussis virulence genes as evidenced by DNA microarray analysis*. *Mol Genet Genomics*, 2003. **269**(4): p. 475-86.
93. Cummings, C.A., et al., *Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by Bordetella BvgAS*. *J Bacteriol*, 2006. **188**(5): p. 1775-85.
94. Herrou, J., et al., *Periplasmic domain of the sensor-kinase BvgS reveals a new paradigm for the Venus flytrap mechanism*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(40): p. 17351-5.
95. Melton, A.R. and A.A. Weiss, *Characterization of environmental regulators of Bordetella pertussis*. *Infect Immun*, 1993. **61**(3): p. 807-15.
96. Uhl, M.A. and J.F. Miller, *Autophosphorylation and phosphotransfer in the Bordetella pertussis BvgAS signal transduction cascade*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(3): p. 1163-7.
97. Williams, C.L., et al., *BvgA functions as both an activator and a repressor to control Bvg phase expression of bipA in Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol*, 2005. **56**(1): p. 175-88.
98. Merkel, T.J., et al., *Contribution of regulation by the bvg locus to respiratory infection of mice by Bordetella pertussis*. *Infect Immun*, 1998. **66**(9): p. 4367-73.
99. Merkel, T.J., C. Barros, and S. Stibitz, *Characterization of the bvgR locus of Bordetella pertussis*. *J Bacteriol*, 1998. **180**(7): p. 1682-90.

100. Akerley, B.J., et al., *The bvgAS locus negatively controls motility and synthesis of flagella in Bordetella bronchiseptica*. J Bacteriol, 1992. **174**(3): p. 980-90.
101. Cotter, P.A. and J.F. Miller, *BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of Bordetella bronchiseptica in a rabbit model*. Infect Immun, 1994. **62**(8): p. 3381-90.
102. Akerley, B.J., P.A. Cotter, and J.F. Miller, *Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the Bordetella-host interaction*. Cell, 1995. **80**(4): p. 611-20.
103. Fernandez, J., et al., *Constitutive expression of bvgR-repressed factors is not detrimental to the Bordetella bronchiseptica-host interaction*. Res Microbiol, 2005. **156**(8): p. 843-50.
104. Martinez de Tejada, G., et al., *Neither the Bvg- phase nor the vrg6 locus of Bordetella pertussis is required for respiratory infection in mice*. Infect Immun, 1998. **66**(6): p. 2762-8.
105. Veal-Carr, W.L. and S. Stibitz, *Demonstration of differential virulence gene promoter activation in vivo in Bordetella pertussis using RIVET*. Mol Microbiol, 2005. **55**(3): p. 788-98.
106. Byrd, M.S., et al., *An improved recombination-based in vivo expression technology-like reporter system reveals differential cyaA gene activation in Bordetella species*. Infect Immun, 2013. **81**(4): p. 1295-305.
107. Porter, J.F., R. Parton, and A.C. Wardlaw, *Growth and survival of Bordetella bronchiseptica in natural waters and in buffered saline without added nutrients*. Appl Environ Microbiol, 1991. **57**(4): p. 1202-6.
108. Vergara-Irigaray, N., et al., *Evaluation of the role of the Bvg intermediate phase in Bordetella pertussis during experimental respiratory infection*. Infect Immun, 2005. **73**(2): p. 748-60.
109. Cotter, P.A. and A.M. Jones, *Phosphorelay control of virulence gene expression in Bordetella*. Trends Microbiol, 2003. **11**(8): p. 367-73.
110. Higgs, R., et al., *Immunity to the respiratory pathogen Bordetella pertussis*. Mucosal Immunol, 2012.
111. Friedman, R.L., et al., *Uptake and intracellular survival of Bordetella pertussis in human macrophages*. Infect Immun, 1992. **60**(11): p. 4578-85.
112. Saukkonen, K., et al., *Integrin-mediated localization of Bordetella pertussis within macrophages: role in pulmonary colonization*. J Exp Med, 1991. **173**(5): p. 1143-9.
113. Lamberti, Y.A., et al., *Intracellular trafficking of Bordetella pertussis in human macrophages*. Infect Immun, 2010. **78**(3): p. 907-13.
114. Carbonetti, N.H., et al., *Pertussis toxin targets airway macrophages to promote Bordetella pertussis infection of the respiratory tract*. Infect Immun, 2007. **75**(4): p. 1713-20.
115. Higgins, S.C., et al., *TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to Bordetella pertussis: role of IL-17-producing T cells*. J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7980-9.
116. Ross, P.J., et al., *Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to Bordetella pertussis: towards the rational design of an improved acellular pertussis vaccine*. PLoS Pathog. **9**(4): p. e1003264.
117. Banus, S., et al., *The role of Toll-like receptor-4 in pertussis vaccine-induced immunity*. BMC Immunol, 2008. **9**: p. 21.
118. Lamberti, Y., et al., *Cholesterol-rich domains are involved in Bordetella pertussis phagocytosis and intracellular survival in neutrophils*. Microb Pathog, 2008. **44**(6): p. 501-11.
119. Andreasen, C. and N.H. Carbonetti, *Role of neutrophils in response to Bordetella pertussis infection in mice*. Infect Immun, 2009. **77**(3): p. 1182-8.

120. Byrne, P., et al., *Depletion of NK cells results in disseminating lethal infection with Bordetella pertussis associated with a reduction of antigen-specific Th1 and enhancement of Th2, but not Tr1 cells.* Eur J Immunol, 2004. **34**(9): p. 2579-88.
121. Mills, K.H., et al., *Cell-mediated immunity to Bordetella pertussis: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model.* Infect Immun, 1993. **61**(2): p. 399-410.
122. Hellwig, S.M., et al., *Immunoglobulin A-mediated protection against Bordetella pertussis infection.* Infect Immun, 2001. **69**(8): p. 4846-50.
123. Kirimanjeswara, G.S., P.B. Mann, and E.T. Harvill, *Role of antibodies in immunity to Bordetella infections.* Infect Immun, 2003. **71**(4): p. 1719-24.
124. De Magistris, M.T., et al., *Human T cell clones define S1 subunit as the most immunogenic moiety of pertussis toxin and determine its epitope map.* J Exp Med, 1989. **169**(5): p. 1519-32.
125. Ryan, M., et al., *Bordetella pertussis respiratory infection in children is associated with preferential activation of type 1 T helper cells.* J Infect Dis, 1997. **175**(5): p. 1246-50.
126. Mascart, F., et al., *Bordetella pertussis infection in 2-month-old infants promotes type 1 T cell responses.* J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1504-9.
127. Hafler, J.P. and A. Pohl-Koppe, *The cellular immune response to Bordetella pertussis in two children with whooping cough.* Eur J Med Res, 1998. **3**(11): p. 523-6.
128. McGuirk, P., et al., *Compartmentalization of T cell responses following respiratory infection with Bordetella pertussis: hyporesponsiveness of lung T cells is associated with modulated expression of the co-stimulatory molecule CD28.* Eur J Immunol, 1998. **28**(1): p. 153-63.
129. Dunne, A., et al., *Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against Bordetella pertussis.* J Immunol, 2010. **185**(3): p. 1711-9.
130. Canthaboo, C., et al., *Investigation of role of nitric oxide in protection from Bordetella pertussis respiratory challenge.* Infect Immun, 2002. **70**(2): p. 679-84.
131. Torre, D., et al., *In vitro and in vivo induction of nitric oxide by murine macrophages stimulated with Bordetella pertussis.* FEMS Immunol Med Microbiol, 1996. **13**(2): p. 95-9.
132. Mahon, B.P., et al., *Atypical disease after Bordetella pertussis respiratory infection of mice with targeted disruptions of interferon-gamma receptor or immunoglobulin mu chain genes.* J Exp Med, 1997. **186**(11): p. 1843-51.
133. Fedele, G., et al., *Bordetella pertussis commits human dendritic cells to promote a Th1/Th17 response through the activity of adenylate cyclase toxin and MAPK-pathways.* PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8734.
134. Kirimanjeswara, G.S., et al., *Pertussis toxin inhibits neutrophil recruitment to delay antibody-mediated clearance of Bordetella pertussis.* J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3594-601.
135. McGuirk, P. and K.H. Mills, *Direct anti-inflammatory effect of a bacterial virulence factor: IL-10-dependent suppression of IL-12 production by filamentous hemagglutinin from Bordetella pertussis.* Eur J Immunol, 2000. **30**(2): p. 415-22.
136. Hewlett, E.L. and K.M. Edwards, *Clinical practice. Pertussis--not just for kids.* N Engl J Med, 2005. **352**(12): p. 1215-22.
137. CDC, *Guidelines for the Control of Pertussis Outbreaks.* . 2000, Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta, GA,.
138. Madsen, T., *Vaccination against Whooping cough.* JAMA, 1933. **101**: p. 187-188.
139. Madsen, T., *Pertussis in Feroe Islands.* Boston Med Surg J 1925. **192**: p. 50.

140. Shapiro-Shapin, C.G., *Pearl Kendrick, Grace Eldering, and the pertussis vaccine*. Emerg Infect Dis, 2010. **16**(8): p. 1273-8.
141. Kendrick, P.L., *Use of Alum-Treated Pertussis Vaccine, and of Alum-Precipitated Combined Pertussis Vaccine and Diphtheria Toxoid, for Active Immunization*. Am J Public Health Nations Health, 1942. **32**(6): p. 615-26.
142. Kendrick, P.L., et al., *Mouse Protection Tests in the Study of Pertussis Vaccine: A Comparative Series Using the Intracerebral Route for Challenge*. Am J Public Health Nations Health, 1947. **37**(7): p. 803-10.
143. Di Sant Agnese, P.A., *Combined immunization against diphtheria, tetanus and pertussis in newborn infants, duration of antibody levels; antibody titers after booster dose; effect of passive immunity to diphtheria on active immunization with diphtheria toxoid*. Pediatrics, 1949. **3**(2): p. 181-94.
144. Willems, R.J., et al., *The efficacy of a whole cell pertussis vaccine and fimbriae against Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis infections in a respiratory mouse model*. Vaccine, 1998. **16**(4): p. 410-6.
145. Gustafsson, L., et al., *A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine*. N Engl J Med, 1996. **334**(6): p. 349-55.
146. Fine, P.E. and J.A. Clarkson, *Reflections on the efficacy of pertussis vaccines*. Rev Infect Dis, 1987. **9**(5): p. 866-83.
147. Wendelboe, A.M.V.R.A., Salmaso S., Englund J.A., *Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination*. Pediatr Infect Dis J, 2005. **24** (5 suppl): p. 58-61.
148. van der Zeijst, B.A., et al., *On the design of national vaccination programmes*. Vaccine, 2007. **25**(16): p. 3143-5.
149. Girard, D.Z., *Which strategy for pertussis vaccination today?* Paediatr Drugs, 2002. **4**(5): p. 299-313.
150. Brooks, D.A. and R. Clover, *Pertussis infection in the United States: role for vaccination of adolescents and adults*. J Am Board Fam Med, 2006. **19**(6): p. 603-11.
151. http://www.msal.gov.ar/hm/site/vacuna_cal2.asp, M.d.S.d.I.N.
152. Raguckas, S.E., et al., *Pertussis resurgence: diagnosis, treatment, prevention, and beyond*. Pharmacotherapy, 2007. **27**(1): p. 41-52.
153. Celentano, L.P., et al., *Resurgence of pertussis in Europe*. Pediatr Infect Dis J, 2005. **24**(9): p. 761-5.
154. Poland, G.A., *Pertussis outbreaks and pertussis vaccines: new insights, new concerns, new recommendations?* Vaccine, 2012. **30**(49): p. 6957-9.
155. Hong, J.Y., *Update on pertussis and pertussis immunization*. Korean J Pediatr, 2010. **53**(5): p. 629-33.
156. Hozbor, D., et al., *Pertussis epidemiology in Argentina: trends over 2004-2007*. J Infect, 2009. **59**(4): p. 225-31.
157. Fisman, D.N., et al., *Pertussis resurgence in Toronto, Canada: a population-based study including test-incidence feedback modeling*. BMC Public Health, 2011. **11**: p. 694.
158. Chiappini, E., et al., *Pertussis re-emergence in the post-vaccination era*. BMC Infect Dis, 2013. **13**: p. 151.
159. Nteyayabo, B., G. De Serres, and B. Duval, *Pertussis resurgence in Canada largely caused by a cohort effect*. Pediatr Infect Dis J, 2003. **22**(1): p. 22-7.

160. de Melker, H.E., et al., *Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of the Netherlands: observations on surveillance data*. Emerg Infect Dis, 2000. **6**(4): p. 348-57.
161. -, C.f.D.C.a.P.-C. *Pertussis (whooping cough): surveillance & reporting*. September 8, 2014.]; Available from: <http://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting.html>.
162. CDC, *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. 2008, Atkinson W, Hamborsky J, McIntyre L, Wolfe S, eds.: Washington DC: Public Health Foundation, 2008.
163. Galanis, E., et al., *Changing epidemiology and emerging risk groups for pertussis*. CMAJ, 2006. **174**(4): p. 451-2.
164. Gabutti, G., et al., *Pertussis: Current perspectives on epidemiology and prevention*. Hum Vaccin Immunother, 2014. **11**(1).
165. Clark, T.A., N.E. Messonnier, and S.C. Hadler, *Pertussis control: time for something new?* Trends Microbiol, 2012. **20**(5): p. 211-3.
166. Clark, T.A., *Changing pertussis epidemiology: everything old is new again*. J Infect Dis, 2014. **209**(7): p. 978-81.
167. Halperin, S.A., *Pertussis--a disease and vaccine for all ages*. N Engl J Med, 2005. **353**(15): p. 1615-7.
168. Fine, P.E. and J.A. Clarkson, *The recurrence of whooping cough: possible implications for assessment of vaccine efficacy*. Lancet, 1982. **1**(8273): p. 666-9.
169. Roush, S.W. and T.V. Murphy, *Historical comparisons of morbidity and mortality for vaccine-preventable diseases in the United States*. JAMA, 2007. **298**(18): p. 2155-63.
170. Jefferson, T., M. Rudin, and C. DiPietrantonj, *Systematic review of the effects of pertussis vaccines in children*. Vaccine, 2003. **21**(17-18): p. 2003-14.
171. Baxter, P., *Pertussis vaccine encephalopathy: 'Oh! Let us never, never doubt '*. Dev Med Child Neurol, 2010. **52**(10): p. 883-4.
172. Preston, A. and D.J. Maskell, *A new era of research into Bordetella pertussis pathogenesis*. J Infect, 2002. **44**(1): p. 13-6.
173. Skoff, T.H., et al., *Early Impact of the US Tdap vaccination program on pertussis trends*. Arch Pediatr Adolesc Med, 2012. **166**(4): p. 344-9.
174. McGirr, A. and D.N. Fisman, *Duration of Pertussis Immunity After DTaP Immunization: A Meta-analysis*. Pediatrics, 2015. **135**(2): p. 331-343.
175. Clark, T.A. and N. Bobo, *CDC update on pertussis surveillance and Tdap vaccine recommendations*. NASN Sch Nurse, 2012. **27**(6): p. 297-300.
176. Cortese, M.M., et al., *Pertussis hospitalizations among infants in the United States, 1993 to 2004*. Pediatrics, 2008. **121**(3): p. 484-92.
177. EUVAC.NET, *Pertussis surveillance report 2003-2007*. www.euvac.net 2009(last access April 2014).
178. EUVAC.NET., *Pertussis surveillance report 2010*. issued 5 August 2011, (Last access April 2014).
179. (ECDC), E.C.f.D.P.a.C., *Surveillance reports. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) Web site*. Available at: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/surveillance_reports/Pages/index.aspx, (Accessed September 8, 2014.).
180. Matter, H.C., *Pertussis surveillance in Switzerland, 1992 to 1997 - a large epidemic in 1994. What next?* Euro Surveill, 1999. **4**(12): p. 130-133.

181. Mooi, F.R., *Bordetella pertussis and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen*. Infect Genet Evol, 2009.
182. Mooi, F.R., N.A. Van Der Maas, and H.E. De Melker, *Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin*. Epidemiol Infect, 2014. **142**(4): p. 685-94.
183. Basile, L.A.B., D; Flores D. Gaillard ME; Fiori S; Zurita ME; Castuma CE; Hozbor DF., *CAMBIOS GENOTÍPICOS EN LA POBLACION DE BORDETELLA PERTUSSIS CIRCULANTE EN ARGENTINA* in *Revista Argentina de Microbiología*. 2012: Congreso SADEBAC , Junio 2012- Buenos Aires - Argentina
184. Advani, A., et al., *Appearance of Fim3 and ptxP3-Bordetella pertussis strains, in two regions of Sweden with different vaccination programs*. Vaccine, 2011. **29**(18): p. 3438-3442.
185. Bart, M.J., et al., *Global population structure and evolution of Bordetella pertussis and their relationship with vaccination*. MBio, 2014. **5**(2): p. e01074.
186. 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. , *Brote de coqueluche en Esquel*. Arch.Argent.Pediatr., 2002: p. 11-18.
187. Riva Posse, C.A. and I.N. Miceli, *[Pertussis: its evolution in Argentina at the end of the twentieth century]*. Medicina (B Aires), 2005. **65**(1): p. 7-16.
188. Cherry, J.D., *The present and future control of pertussis*. Clin Infect Dis, 2010. **51**(6): p. 663-7.
189. Cherry, J.D., *The science and fiction of the "resurgence" of pertussis*. Pediatrics, 2003. **112**(2): p. 405-6.
190. Cherry, J.D., *Pertussis: challenges today and for the future*. PLoS Pathog, 2013. **9**(7): p. e1003418.
191. Sato, Y. and H. Sato, *Development of acellular pertussis vaccines*. Biologicals, 1999. **27**(2): p. 61-9.
192. Cherry, J.D. and P. Olin, *The science and fiction of pertussis vaccines*. Pediatrics, 1999. **104**(6): p. 1381-3.
193. Stehr, K., et al., *A comparative efficacy trial in Germany in infants who received either the Lederle/Takeda acellular pertussis component DTP (DTaP) vaccine, the Lederle whole-cell component DTP vaccine, or DT vaccine*. Pediatrics, 1998. **101**(1 Pt 1): p. 1-11.
194. Cherry, J.D., et al., *The effect of investigator compliance (observer bias) on calculated efficacy in a pertussis vaccine trial*. Pediatrics, 1998. **102**(4 Pt 1): p. 909-12.
195. Storsaeter, J. and P. Olin, *Relative efficacy of two acellular pertussis vaccines during three years of passive surveillance*. Vaccine, 1992. **10**(3): p. 142-4.
196. Blackwelder, W.C., et al., *Acellular pertussis vaccines. Efficacy and evaluation of clinical case definitions*. Am J Dis Child, 1991. **145**(11): p. 1285-9.
197. Greco, D., et al., *A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group*. N Engl J Med, 1996. **334**(6): p. 341-8.
198. Cherry, J.D., *Why do pertussis vaccines fail?* Pediatrics, 2012. **129**(5): p. 968-70.
199. Olin, P., et al., *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, 1997. **350**(9091): p. 1569-77.
200. Anderson, R.M. and R.M. May, *Infectious diseases of humans: dynamics and control* Oxford University Press, 1991.

201. Bart, M.J., et al., *Comparative genomics of prevaccination and modern Bordetella pertussis strains*. BMC Genomics, 2010. **11**: p. 627.
202. Lam, C., et al., *Rapid increase in pertactin-deficient Bordetella pertussis isolates, Australia*. Emerg Infect Dis, 2014. **20**(4): p. 626-33.
203. Mooi, F.R., *Bordetella pertussis and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen*. Infect Genet Evol, 2010. **10**(1): p. 36-49.
204. Bouchez, V., et al., *First report and detailed characterization of B. pertussis isolates not expressing pertussis toxin or pertactin*. Vaccine, 2009.
205. Hegerle, N., et al., *Evolution of French Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis isolates: increase of Bordetellae not expressing pertactin*. Clin Microbiol Infect, 2012.
206. Pawloski, L.C., et al., *Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient Bordetella pertussis in the United States*. Clin Vaccine Immunol, 2014. **21**(2): p. 119-25.
207. Hegerle, N. and N. Guiso, *Bordetella pertussis and pertactin-deficient clinical isolates: lessons for pertussis vaccines*. Expert Rev Vaccines, 2014. **13**(9): p. 1135-46.
208. Plotkin, S.A., *The pertussis problem*. Clin Infect Dis, 2014. **58**(6): p. 830-3.
209. Misegades, L.K., et al., *Association of childhood pertussis with receipt of 5 doses of pertussis vaccine by time since last vaccine dose, California, 2010*. JAMA, 2012. **308**(20): p. 2126-32.
210. Winter, K., et al., *California pertussis epidemic, 2010*. J Pediatr, 2012. **161**(6): p. 1091-6.
211. Klein, N.P., et al., *Waning protection after fifth dose of acellular pertussis vaccine in children*. N Engl J Med, 2012. **367**(11): p. 1012-9.
212. Sheridan, S.L., et al., *Waning vaccine immunity in teenagers primed with whole cell and acellular pertussis vaccine: recent epidemiology*. Expert Rev Vaccines, 2014. **13**(9): p. 1081-106.
213. Sheridan, S.L., et al., *Number and order of whole cell pertussis vaccines in infancy and disease protection*. JAMA, 2012. **308**(5): p. 454-6.
214. Liko, J., S.G. Robison, and P.R. Cieslak, *Priming with whole-cell versus acellular pertussis vaccine*. N Engl J Med, 2013. **368**(6): p. 581-2.
215. Ausiello, C.M., et al., *Vaccine- and antigen-dependent type 1 and type 2 cytokine induction after primary vaccination of infants with whole-cell or acellular pertussis vaccines*. Infect Immun, 1997. **65**(6): p. 2168-74.
216. Smits, K., et al., *Different T cell memory in preadolescents after whole-cell or acellular pertussis vaccination*. Vaccine, 2013. **32**(1): p. 111-8.
217. Ryan, M., et al., *Distinct T-cell subtypes induced with whole cell and acellular pertussis vaccines in children*. Immunology, 1998. **93**(1): p. 1-10.
218. Edwards, K.M. and G.A. Berbers, *Immune responses to pertussis vaccines and disease*. J Infect Dis, 2014. **209** Suppl 1: p. S10-5.
219. Warfel, J.M. and T.J. Merkel, *Bordetella pertussis infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates*. Mucosal Immunol. **6**(4): p. 787-96.
220. Warfel, J.M. and T.J. Merkel, *The baboon model of pertussis: effective use and lessons for pertussis vaccines*. Expert Rev Vaccines, 2014. **13**(10): p. 1241-52.
221. Warfel, J.M., J. Beren, and T.J. Merkel, *Airborne transmission of Bordetella pertussis*. J Infect Dis, 2012. **206**(6): p. 902-6.

222. Warfel, J.M., et al., *Nonhuman primate model of pertussis*. Infect Immun, 2012. **80**(4): p. 1530-6.
223. Burns, D.L., B.D. Meade, and N.E. Messonnier, *Pertussis resurgence: perspectives from the Working Group Meeting on pertussis on the causes, possible paths forward, and gaps in our knowledge*. J Infect Dis, 2014. **209 Suppl 1**: p. S32-5.
224. Barkoff, A.M., et al., *Appearance of Bordetella pertussis strains not expressing the vaccine antigen pertactin in Finland*. Clin Vaccine Immunol, 2012. **19**(10): p. 1703-4.
225. Otsuka, N., et al., *Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient Bordetella pertussis in Japan*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31985.
226. Queenan, A.M., P.K. Cassidy, and A. Evangelista, *Pertactin-negative variants of Bordetella pertussis in the United States*. N Engl J Med, 2013. **368**(6): p. 583-4.
227. Cherry, J.D. and B.L. Seaton, *Patterns of Bordetella parapertussis respiratory illnesses: 2008-2010*. Clin Infect Dis, 2012. **54**(4): p. 534-7.
228. Lugner, A.K., et al., *Cost-effectiveness of targeted vaccination to protect new-borns against pertussis: comparing neonatal, maternal, and cocooning vaccination strategies*. Vaccine. **31**(46): p. 5392-7.
229. de Greeff, S.C., et al., *Estimation of household transmission rates of pertussis and the effect of cocooning vaccination strategies on infant pertussis*. Epidemiology, 2012. **23**(6): p. 852-60.
230. Harriman, K. and K. Winter, *Pertussis vaccine uptake during pregnancy: we need to do better in the U.S*. Prev Med, 2014. **67**: p. 320-1.
231. Kharbanda, E.O., et al., *Receipt of pertussis vaccine during pregnancy across 7 Vaccine Safety Datalink sites*. Prev Med, 2014. **67**: p. 316-9.
232. Hviid, A., et al., *The impact of pre-school booster vaccination of 4--6-year-old children on pertussis in 0--1-year-old children*. Vaccine, 2006. **24**(9): p. 1401-7.
233. de Greeff, S.C., et al., *Impact of acellular pertussis preschool booster vaccination on disease burden of pertussis in The Netherlands*. Pediatr Infect Dis J, 2008. **27**(3): p. 218-23.
234. Hviid, A., *Acellular pertussis preschool booster vaccination*. Pediatr Infect Dis J, 2008. **27**(6): p. 573-4.
235. Ausiello, C.M. and A. Cassone, *Acellular pertussis vaccines and pertussis resurgence: revise or replace?* MBio, 2014. **5**(3): p. e01339-14.
236. Zorzeto, T.Q., et al., *Immunogenicity of a whole-cell pertussis vaccine with low lipopolysaccharide content in infants*. Clin Vaccine Immunol, 2009. **16**(4): p. 544-50.
237. Eby, J.C., et al., *Quantification of the adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis in vitro and during respiratory infection*. Infect Immun, 2013. **81**(5): p. 1390-8.
238. Alvarez Hayes, J., et al., *Identification of a new protective antigen of Bordetella pertussis*. Vaccine, 2011. **29**(47): p. 8731-9.
239. Alvarez Hayes, J., et al., *Bordetella pertussis iron regulated proteins as potential vaccine components*. Vaccine, 2013. **31**(35): p. 3543-8.
240. Sugai, T., et al., *A CpG-containing oligodeoxynucleotide as an efficient adjuvant counterbalancing the Th1/Th2 immune response in diphtheria-tetanus-pertussis vaccine*. Vaccine, 2005. **23**(46-47): p. 5450-6.
241. Gracia, A., et al., *Antibody responses in adult and neonatal BALB/c mice to immunization with novel Bordetella pertussis vaccine formulations*. Vaccine, 2011. **29**(8): p. 1595-604.

242. Mielcarek, N., et al., *Live attenuated B. pertussis as a single-dose nasal vaccine against whooping cough*. PLoS Pathog, 2006. **2**(7): p. e65.
243. Mielcarek, N., et al., *Attenuated Bordetella pertussis: new live vaccines for intranasal immunisation*. Vaccine, 2006. **24 Suppl 2**: p. S2-54-5.
244. Kammoun, H., et al., *Immunogenicity of Live Attenuated B. pertussis BPZE1 Producing the Universal Influenza Vaccine Candidate M2e*. PLoS ONE, 2013. **8**(3): p. e59198.
245. Thorstensson, R., et al., *A phase I clinical study of a live attenuated Bordetella pertussis vaccine--BPZE1; a single centre, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of BPZE1 given intranasally to healthy adult male volunteers*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e83449.
246. Holst, J., et al., *Vaccines against meningococcal serogroup B disease containing outer membrane vesicles (OMV): lessons from past programs and implications for the future*. Hum Vaccin Immunother, 2013. **9**(6): p. 1241-53.
247. Sandbu, S., et al., *Immunogenicity and safety of a combination of two serogroup B meningococcal outer membrane vesicle vaccines*. Clin Vaccine Immunol, 2007. **14**(9): p. 1062-9.
248. Kulp, A. and M.J. Kuehn, *Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles*. Annu Rev Microbiol, 2010. **64**: p. 163-84.
249. Holst, J., et al., *Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from Neisseria meningitidis*. Vaccine, 2009. **27 Suppl 2**: p. B3-12.
250. Hozbor, D., et al., *Release of outer membrane vesicles from Bordetella pertussis*. Curr Microbiol, 1999. **38**(5): p. 273-8.
251. Grabenstein, J.D., *Toxoid vaccines*, in *Vaccines: A Biography*. 2010, Springer. p. 105-124.
252. Plotkin, S., W. Orenstein, and P. Offit, *Vaccines Saunders Elsevier*. Philadelphia, PA, 2008.
253. Hethcote, H.W., *An age-structured model for pertussis transmission*. Math Biosci, 1997. **145**(2): p. 89-136.
254. Hethcote, H.W., *Simulations of pertussis epidemiology in the United States: effects of adult booster vaccinations*. Math Biosci, 1999. **158**(1): p. 47-73.
255. Van Rie, A. and H.W. Hethcote, *Adolescent and adult pertussis vaccination: computer simulations of five new strategies*. Vaccine, 2004. **22**(23-24): p. 3154-65.
256. Hethcote, H.W., P. Horby, and P. McIntyre, *Using computer simulations to compare pertussis vaccination strategies in Australia*. Vaccine, 2004. **22**(17-18): p. 2181-91.
257. van Boven, M., et al., *Waning immunity and sub-clinical infection in an epidemic model: implications for pertussis in The Netherlands*. Math Biosci, 2000. **164**(2): p. 161-82.
258. van Boven, M., et al., *A model based evaluation of the 1996-7 pertussis epidemic in The Netherlands*. Epidemiol Infect, 2001. **127**(1): p. 73-85.
259. Bailleux, F., et al., *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, 2008. **26**(31): p. 3903-8.
260. Coudeville, L., A. van Rie, and P. Andre, *Adult pertussis vaccination strategies and their impact on pertussis in the United States: evaluation of routine and targeted (cocoon) strategies*. Epidemiol Infect, 2008. **136**(5): p. 604-20.
261. McGirr, A.A., A.R. Tuite, and D.N. Fisman, *Estimation of the underlying burden of pertussis in adolescents and adults in Southern Ontario, Canada*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83850.

262. McLean, A.R., D.J. Nokes, and R.M. Anderson, *Model-based comparisons of measles immunization strategies using high dose Edmonston-Zagreb type vaccines*. Int J Epidemiol, 1991. **20**(4): p. 1107-17.
263. Mossong, J., et al., *Social contacts and mixing patterns relevant to the spread of infectious diseases*. PLoS Med, 2008. **5**(3): p. e74.
264. Kretzschmar, M., P.F. Teunis, and R.G. Pebody, *Incidence and reproduction numbers of pertussis: estimates from serological and social contact data in five European countries*. PLoS Med, 2010. **7**(6): p. e1000291.
265. Rohani, P., X. Zhong, and A.A. King, *Contact network structure explains the changing epidemiology of pertussis*. Science. **330**(6006): p. 982-5.
266. Sato, Y., M. Kimura, and H. Fukumi, *Development of a pertussis component vaccine in Japan*. Lancet, 1984. **1**(8369): p. 122-6.
267. Andreasen, C. and N.H. Carbonetti, *Pertussis toxin inhibits early chemokine production to delay neutrophil recruitment in response to Bordetella pertussis respiratory tract infection in mice*. Infect Immun, 2008. **76**(11): p. 5139-48.
268. Roberts, M., et al., *A mutant pertussis toxin molecule that lacks ADP-ribosyltransferase activity, PT-9K/129G, is an effective mucosal adjuvant for intranasally delivered proteins*. Infect Immun, 1995. **63**(6): p. 2100-8.
269. Samore, M.H. and G.R. Siber, *Pertussis toxin enhanced IgG1 and IgE responses to primary tetanus immunization are mediated by interleukin-4 and persist during secondary responses to tetanus alone*. Vaccine, 1996. **14**(4): p. 290-7.
270. Ryan, M., et al., *Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28*. Int Immunol, 1998. **10**(5): p. 651-62.
271. Shive, C.L., et al., *The enhanced antigen-specific production of cytokines induced by pertussis toxin is due to clonal expansion of T cells and not to altered effector functions of long-term memory cells*. Eur J Immunol, 2000. **30**(8): p. 2422-31.
272. Nasso, M., et al., *Genetically detoxified pertussis toxin induces Th1/Th17 immune response through MAPKs and IL-10-dependent mechanisms*. J Immunol, 2009. **183**(3): p. 1892-9.
273. Hellwig, S.M., et al., *Crucial role of antibodies to pertactin in Bordetella pertussis immunity*. J Infect Dis, 2003. **188**(5): p. 738-42.
274. Cherry, J.D., et al., *A search for serologic correlates of immunity to Bordetella pertussis cough illnesses*. Vaccine, 1998. **16**(20): p. 1901-6.
275. Smith, A.M., C.A. Guzman, and M.J. Walker, *The virulence factors of Bordetella pertussis: a matter of control*. FEMS Microbiol Rev, 2001. **25**(3): p. 309-33.
276. Antoine, R. and C. Locht, *Roles of the disulfide bond and the carboxy-terminal region of the S1 subunit in the assembly and biosynthesis of pertussis toxin*. Infect Immun, 1990. **58**(6): p. 1518-26.
277. Roberts, M., et al., *Construction and characterization of Bordetella pertussis mutants lacking the vir-regulated P.69 outer membrane protein*. Mol Microbiol, 1991. **5**(6): p. 1393-404.
278. Locht, C., M.C. Geoffroy, and G. Renaud, *Common accessory genes for the Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the papC and papD gene families*. EMBO J, 1992. **11**(9): p. 3175-83.

279. Donnelly, S., et al., *Whole-cell but not acellular pertussis vaccines induce convulsive activity in mice: evidence of a role for toxin-induced interleukin-1beta in a new murine model for analysis of neuronal side effects of vaccination*. *Infect Immun*, 2001. **69**(7): p. 4217-23.
280. Mogensen, T.H., *Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses*. *Clin Microbiol Rev*, 2009. **22**(2): p. 240-73, Table of Contents.
281. Department of Immunization, V.a.B.-W.H.O. *Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines*. 2013.
282. Elahi, S., J. Holmstrom, and V. Gerdtts, *The benefits of using diverse animal models for studying pertussis*. *Trends Microbiol*, 2007. **15**(10): p. 462-8.
283. Hall, E., R. Parton, and A.C. Wardlaw, *Responses to acellular pertussis vaccines and component antigens in a coughing-rat model of pertussis*. *Vaccine*, 1998. **16**(17): p. 1595-603.
284. Elahi, S., et al., *Infection of newborn piglets with Bordetella pertussis: a new model for pertussis*. *Infect Immun*, 2005. **73**(6): p. 3636-45.
285. Foreman-Wykert, A.K. and J.F. Miller, *A new animal model of Bordetella pertussis infection and immunity*. *Trends Microbiol*, 2005. **13**(12): p. 559-60.
286. Pittman, M., B.L. Furman, and A.C. Wardlaw, *Bordetella pertussis respiratory tract infection in the mouse: pathophysiological responses*. *J Infect Dis*, 1980. **142**(1): p. 56-66.
287. Mills, K.H., et al., *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*, 1998. **66**(2): p. 594-602.
288. Gzyl, A., et al., *Potency of pertussis component in the DTP vaccine--an overview of three decade study in Poland*. *Biologicals*, 2004. **32**(3): p. 129-37.
289. Guiso, N., et al., *Intranasal murine model of Bordetella pertussis infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines*. *Vaccine*, 1999. **17**(19): p. 2366-76.
290. Sato, Y., et al., *Aerosol infection of mice with Bordetella pertussis*. *Infect Immun*, 1980. **29**(1): p. 261-6.
291. Rodriguez, M.E. and W.L. van der Pol, *Humoral immunity against Bordetella pertussis: antibodies or B cells?* *Infect Immun*, 2003. **71**(11): p. 6686; author reply 6686.
292. Rodriguez, M.E., et al., *Fc receptor-mediated immunity against Bordetella pertussis*. *J Immunol*, 2001. **167**(11): p. 6545-51.
293. Hewlett, E.L., C.R. Manclark, and J. Wolff, *Adenyl cyclase in Bordetella pertussis vaccines*. *J Infect Dis*, 1977. **136 Suppl**: p. S216-9.
294. Glaser, P., et al., *Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of Bordetella pertussis*. *EMBO J*, 1988. **7**(12): p. 3997-4004.
295. Linhartova, I., et al., *RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism*. *FEMS Microbiol Rev*, 2010. **34**(6): p. 1076-112.
296. Bauche, C., et al., *Structural and functional characterization of an essential RTX subdomain of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(25): p. 16914-26.
297. Zaretzky, F.R., M.C. Gray, and E.L. Hewlett, *Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of Bordetella pertussis: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction*. *Mol Microbiol*, 2002. **45**(6): p. 1589-98.
298. Hewlett, E.L., et al., *Extracytoplasmic adenylate cyclase of Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976. **73**(6): p. 1926-30.

299. Hewlett, E.L., et al., *Bordetella extracytoplasmic adenylate cyclase: actions as a bacterial toxin*. Dev Biol Stand, 1985. **61**: p. 21-6.
300. Benz, R., et al., *Adenylate cyclase toxin (CyaA) of Bordetella pertussis. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of Escherichia coli*. J Biol Chem, 1994. **269**(44): p. 27231-9.
301. Bellalou, J., et al., *Deletions affecting hemolytic and toxin activities of Bordetella pertussis adenylate cyclase*. Infect Immun, 1990. **58**(10): p. 3242-7.
302. Gueirard, P., et al., *Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during Bordetella pertussis infection in vivo*. Infect Immun, 1998. **66**(4): p. 1718-25.
303. Vojtova, J., et al., *Bordetella adenylate cyclase toxin induces a cascade of morphological changes of sheep erythrocytes and localizes into clusters in erythrocyte membranes*. Microsc Res Tech, 2006. **69**(2): p. 119-29.
304. Arciniega, J.L., et al., *Human serologic response to envelope-associated proteins and adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis*. J Infect Dis, 1991. **163**(1): p. 135-42.
305. Cherry, J.D., et al., *Determination of serum antibody to Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin in vaccinated and unvaccinated children and in children and adults with pertussis*. Clin Infect Dis, 2004. **38**(4): p. 502-7.
306. Orr, B., et al., *Adjuvant effects of adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis after intranasal immunisation of mice*. Vaccine, 2007. **25**(1): p. 64-71.
307. Simsova, M., P. Sebo, and C. Leclerc, *The adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis--a novel promising vehicle for antigen delivery to dendritic cells*. Int J Med Microbiol, 2004. **293**(7-8): p. 571-6.
308. Fayolle, C., et al., *Delivery of multiple epitopes by recombinant detoxified adenylate cyclase of Bordetella pertussis induces protective antiviral immunity*. J Virol, 2001. **75**(16): p. 7330-8.
309. Mascarell, L., et al., *Delivery of the HIV-1 Tat protein to dendritic cells by the CyaA vector induces specific Th1 responses and high affinity neutralizing antibodies in non human primates*. Vaccine, 2006. **24**(17): p. 3490-9.
310. Mascarell, L., et al., *Induction of neutralizing antibodies and Th1-polarized and CD4-independent CD8+ T-cell responses following delivery of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein by recombinant adenylate cyclase of Bordetella pertussis*. J Virol, 2005. **79**(15): p. 9872-84.
311. Macdonald-Fyall, J., et al., *Adjuvanticity of native and detoxified adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis towards co-administered antigens*. Vaccine, 2004. **22**(31-32): p. 4270-81.
312. Cheung, G.Y., et al., *Effect of different forms of adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis on protection afforded by an acellular pertussis vaccine in a murine model*. Infect Immun, 2006. **74**(12): p. 6797-805.
313. Guermonprez, P., et al., *The adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18)*. J Exp Med, 2001. **193**(9): p. 1035-44.
314. Confer, D.L. and J.W. Eaton, *Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase*. Science, 1982. **217**(4563): p. 948-50.
315. Betsou, F., P. Sebo, and N. Guiso, *CyaC-mediated activation is important not only for toxic but also for protective activities of Bordetella pertussis adenylate cyclase-hemolysin*. Infect Immun, 1993. **61**(9): p. 3583-9.
316. Weiss, A.A. and S. Falkow, *Genetic analysis of phase change in Bordetella pertussis*. Infect Immun, 1984. **43**(1): p. 263-9.

317. Weiss, A.A., et al., *Tn5-induced mutations affecting virulence factors of Bordetella pertussis*. Infect Immun, 1983. **42**(1): p. 33-41.
318. Miller, J.F., et al., *Constitutive sensory transduction mutations in the Bordetella pertussis bvgS gene*. J Bacteriol, 1992. **174**(3): p. 970-9.
319. Deora, R., et al., *Diversity in the Bordetella virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene*. Mol Microbiol, 2001. **40**(3): p. 669-83.
320. Stockbauer, K.E., et al., *Identification and characterization of BipA, a Bordetella Bvg-intermediate phase protein*. Mol Microbiol, 2001. **39**(1): p. 65-78.
321. Beattie, D.T., M.J. Mahan, and J.J. Mekalanos, *Repressor binding to a regulatory site in the DNA coding sequence is sufficient to confer transcriptional regulation of the vir-repressed genes (vrg genes) in Bordetella pertussis*. J Bacteriol, 1993. **175**(2): p. 519-27.
322. Stenson, T.H. and M.S. Pepler, *Identification of two bvg-repressed surface proteins of Bordetella pertussis*. Infect Immun, 1995. **63**(10): p. 3780-9.
323. Plotkin, S.A., *Complex correlates of protection after vaccination*. Clin Infect Dis, 2013. **56**(10): p. 1458-65.
324. Plotkin, S.A., *Correlates of protection induced by vaccination*. Clin Vaccine Immunol, 2010. **17**(7): p. 1055-65.
325. Geurtsen, J., K.C. Fae, and G.P. van den Dobbelsteen, *Importance of (antibody-dependent) complement-mediated serum killing in protection against Bordetella pertussis*. Expert Rev Vaccines, 2014. **13**(10): p. 1229-40.
326. Weiss, A.A., et al., *Characterization of human bactericidal antibodies to Bordetella pertussis*. Infect Immun, 1999. **67**(3): p. 1424-31.
327. Mountzouros, K.T., A. Kimura, and J.L. Cowell, *A bactericidal monoclonal antibody specific for the lipooligosaccharide of Bordetella pertussis reduces colonization of the respiratory tract of mice after aerosol infection with B. pertussis*. Infect Immun, 1992. **60**(12): p. 5316-8.
328. Archambault, D., et al., *Characterization and comparative bactericidal activity of monoclonal antibodies to Bordetella pertussis lipo-oligosaccharide A*. J Gen Microbiol, 1991. **137**(4): p. 905-11.
329. Weiss, A.A., et al., *Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of Bordetella pertussis*. J Infect Dis, 1984. **150**(2): p. 219-22.
330. Weiss, A.A., et al., *Acellular pertussis vaccines and complement killing of Bordetella pertussis*. Infect Immun, 2004. **72**(12): p. 7346-51.
331. Weingart, C.L., et al., *Characterization of bactericidal immune responses following vaccination with acellular pertussis vaccines in adults*. Infect Immun, 2000. **68**(12): p. 7175-9.
332. Stefanelli, P., et al., *Role of immune sera in the in-vitro phagocytosis of Bordetella pertussis strains*. Microb Pathog, 2002. **32**(3): p. 135-41.
333. Aase, A., et al., *Immunization of teenagers with a fifth dose of reduced DTaP-IPV induces high levels of pertussis antibodies with a significant increase in opsonophagocytic activity*. Clin Vaccine Immunol, 2011. **18**(8): p. 1269-74.
334. Burns, D.L., et al., *Purification and immunological characterization of a GroEL-like protein from Bordetella pertussis*. Infect Immun, 1991. **59**(4): p. 1417-22.
335. Antila, M., et al., *Bordetella holmesii DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis*. J Med Microbiol, 2006. **55**(Pt 8): p. 1043-51.

336. Liu, C., et al., *Immunogenic characterization of outer membrane porins OmpC and OmpF of porcine extraintestinal pathogenic Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. **337**(2): p. 104-11.
337. de Gouw, D., et al., *Proteomics-identified Bvg-activated autotransporters protect against bordetella pertussis in a mouse model*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e105011.
338. WHO. *Global burden of disease*. 2007; Available from: http://www.who.int/entity/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/index.html.
339. MSAL. *Epidemia de coqueluche. Provincia de Neuquén*. 2005; Available from: http://www.msal.gov.ar/htm/site/sala_situacion/PANELES/boletines/Coqueluche_Neuqu%C3%A9n.pdf.
340. Lin, Y.C., et al., *Epidemiological shift in the prevalence of pertussis in Taiwan: implications for pertussis vaccination*. J Med Microbiol, 2007. **56**(Pt 4): p. 533-7.
341. Quinn, H.E. and P.B. McIntyre, *Pertussis epidemiology in Australia over the decade 1995-2005--trends by region and age group*. Commun Dis Intell, 2007. **31**(2): p. 205-15.
342. Hunter, K., *Helping prevent the spread of pertussis*. Nurs N Z, 2013. **19**(4): p. 26-8.
343. Falleiros Arlant, L.H., et al., *Pertussis in Latin America: epidemiology and control strategies*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2014. **12**(10): p. 1265-75.
344. Xu, Y., et al., *Seroprevalence of pertussis in China: need to improve vaccination strategies*. Hum Vaccin Immunother, 2014. **10**(1): p. 192-8.
345. Centers for Disease, C. and Prevention, *Updated recommendations for use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccine (Tdap) in pregnant women and persons who have or anticipate having close contact with an infant aged <12 months --- Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2011*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2011. **60**(41): p. 1424-6.
346. Quinn, H.E. and P.B. McIntyre, *The impact of adolescent pertussis immunization, 2004-2009: lessons from Australia*. Bull World Health Organ, 2011. **89**(9): p. 666-74.
347. Jardine, A., et al., *Who gives pertussis to infants? Source of infection for laboratory confirmed cases less than 12 months of age during an epidemic, Sydney, 2009*. Commun Dis Intell. **34**(2): p. 116-21.
348. Fabricius, G., et al., *Modelling pertussis transmission to evaluate the effectiveness of an adolescent booster in Argentina*. Epidemiol Infect, 2013. **141**(4): p. 718-34.
349. Witt, M.A., P.H. Katz, and D.J. Witt, *Unexpectedly limited durability of immunity following acellular pertussis vaccination in preadolescents in a North American outbreak*. Clin Infect Dis, 2012. **54**(12): p. 1730-5.
350. Koepke, R., et al., *Estimating the effectiveness of tetanus-diphtheria-acellular pertussis vaccine (Tdap) for preventing pertussis: evidence of rapidly waning immunity and difference in effectiveness by Tdap brand*. J Infect Dis, 2014. **210**(6): p. 942-53.
351. Mills, K.H., et al., *Do we need a new vaccine to control the re-emergence of pertussis?* Trends Microbiol, 2014. **22**(2): p. 49-52.
352. Ferrari, G., et al., *Outer membrane vesicles from group B Neisseria meningitidis delta gna33 mutant: proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles*. Proteomics, 2006. **6**(6): p. 1856-66.
353. de Kleijn, E.D., et al., *Immunogenicity and safety of a hexavalent meningococcal outer-membrane-vesicle vaccine in children of 2-3 and 7-8 years of age*. Vaccine, 2000. **18**(15): p. 1456-66.

354. Quakyi, E.K., et al., *Immunization with meningococcal outer-membrane protein vesicles containing lipooligosaccharide protects mice against lethal experimental group B Neisseria meningitidis infection and septic shock*. J Infect Dis, 1999. **180**(3): p. 747-54.
355. He, Q., et al., *Bordetella pertussis protein pertactin induces type-specific antibodies: one possible explanation for the emergence of antigenic variants?* J Infect Dis, 2003. **187**(8): p. 1200-5.
356. King, A.J., et al., *Role of the polymorphic region 1 of the Bordetella pertussis protein pertactin in immunity*. Microbiology, 2001. **147**(Pt 11): p. 2885-95.
357. Beattie, D.T., R. Shahin, and J.J. Mekalanos, *A vir-repressed gene of Bordetella pertussis is required for virulence*. Infect Immun, 1992. **60**(2): p. 571-7.
358. Wu, Y., et al., *Sustained high-titer antibody responses induced by conjugating a malarial vaccine candidate to outer-membrane protein complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(48): p. 18243-8.
359. Dennehy, R. and S. McClean, *Immunoproteomics: the key to discovery of new vaccine antigens against bacterial respiratory infections*. Curr Protein Pept Sci, 2012. **13**(8): p. 807-15.