

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹

PERIODO ²: 2012-2013

Legajo N°:

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: HOZBOR

NOMBRES: DANIELA FLAVIA

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: GONNET CP: 1897 Tel:

Dirección electrónica (donde desea recibir información): hozbor.daniela@gmail.com

2. TEMA DE INVESTIGACION

Vacunas bacterianas: profundización en los conocimientos básicos, de campo y aplicados como base para el diseño de formulaciones más efectivas en el control de una enfermedad hoy considerada reemergente.

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Adjunto con director Fecha: 1998

ACTUAL: Categoría: Principal desde fecha: diciembre 2009

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: Instituto de Biotecnología y Biología Molecular

Facultad: de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata

Departamento: Ciencias Biológicas

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: 47 y 115 N°: XXX

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: 0221 4229777

Cargo que ocupa:

5. DIRECTOR DE TRABAJOS. (En el caso que corresponda)

Apellido y Nombres:

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: CP: Tel:

Dirección electrónica:

¹ Art. 11; Inc. "e" ; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

² El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2008 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2006 al 31-12-2007, para las presentaciones bianuales.

.....
Firma del Director (si corresponde)

.....
Firma del Investigador

6. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

Debe exponerse, en no más de una página, la orientación impuesta a los trabajos, técnicas y métodos empleados, principales resultados obtenidos y dificultades encontradas en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

Nuestro proyecto aborda distintos aspectos del desarrollo de vacunas bacterianas, en particular la destinada al control de la enfermedad denominada pertussis, tos convulsa o coqueluche. Pertussis es una enfermedad respiratoria inmunoprevenible que pese a más de 60 años de empleo masivo de vacunas continua siendo un problema para la salud pública no solo en nuestro país sino, en otros incluídos los más desarrollados. La problemática de pertussis se ha agravado en los últimos años y ello ha profundizado aún más la necesidad de revisar las estrategias de control y de desarrollar nuevas formulaciones vacunales. Así, el objetivo general de nuestro trabajo contempla entre otros el diseño de nuevas formulaciones más efectivas, no sólo en términos generales, sino en lo que se refiere a su efectividad en Argentina. Este objetivo está siendo abordado en la actualidad a través del desarrollo de diferentes líneas de ciencia básica y aplicada ya sea en forma autónoma o interdisciplinaria y en el contexto de la situación epidemiológica de la enfermedad en nuestro país. A continuación presento un breve resumen de las tareas realizadas en el marco de cada una de dichas líneas:

a) Establecimiento del perfil epidemiológico de la enfermedad en nuestro país. Este trabajo lo venimos desarrollando como laboratorio Nacional de Referencia de Pertussis en el marco del Convenio ANLIS Malbrán – FCE UNLP y del PAE VacSal-ANPCyT. En período que informo hemos continuado trabajando en el diagnóstico de la enfermedad (más de 2000 muestras clínicas analizadas en cada uno de los dos últimos años) y en el asesoramiento continuo de los profesionales que conforman la red nacional. Hemos continuado con las actividades asociadas al aseguramiento de la calidad de las metodologías diagnósticas transferidas.

Como en los periodos anteriores hemos trabajado fuertemente en el análisis de datos obtenidos del trabajo de vigilancia epidemiológica. Durante estos dos años he elaborado de manera mensual informes que difundo a la red y a otros efectores que trabajan en el área de salud humana.

Las conclusiones extraídas han sido difundidas también en los trabajos y presentaciones a congreso que se incluyen más abajo.

En el periodo que informo además hemos trabajado en el mejoramiento de la técnica de ELISA para el diagnóstico de pertussis por serología. En particular hemos trabajado en el clonado, expresión y purificación de la subunidad S1 de la toxina pertussis para ser utilizada en reemplazo de la toxina pertussis entera que hay que importar con alto costo. Ya contamos con diferentes lotes de proteína cuya identidad hemos confirmado mediante ensayos de inmunoblot y MALDI TOF. La proteína purificada la estamos evaluando en los test de ELISA y los resultados hasta ahora alcanzados son promisorios. Para la validación del ensayo hemos iniciado una colaboración con el Centro de Control y prevención de enfermedades de USA (CDC). Esperamos avanzar en la validación de forma de poder brindar una alternativa de calidad pero más económica al sector de salud.

Durante el periodo informado seguimos trabajando en la multidisciplinariedad para evaluar mediante el modelo matemático de transmisión desarrollado por nuestro grupo el impacto que tendrían distintas medidas de control en la población más vulnerable (0 a

1 año). En particular, analizamos el impacto de la inclusión de un refuerzo a los 11 años, el efecto de la mejora en las coberturas de las dosis primarias y la disminución del retraso en la aplicación de estas. También se estimó el efecto de la vacunación a embarazadas.

Los resultados hasta ahora alcanzados muestran que la inclusión de un refuerzo a los 11 años disminuye un 3% la incidencia en los menores de 1 año. Por su parte, la aplicación de las dosis primarias a tiempo calendario (sin retrasos) la reduce un 16%. Al aumentar la cobertura del 80% al 95%, la incidencia en la población vulnerable se reduce significativamente (38%). Cuando el porcentaje de las embarazadas inmunizadas alcanza el 50%, la reducción de los casos más graves en los nfantes superaría el 43% (0 - 2 meses).

Los resultados alcanzados hasta el momento han sido ya difundidos en congreso internacional, el cual se detalla dentro del siguiente listado y ya hemos enviado un trabajo para que sea considerada su publicación en una revista de la especialidad: El detalle de las publicaciones y presentaciones a congreso se detalla más abajo

b) Identificación de las posibles causas de aumento de la enfermedad: caracterización molecular de aislamientos del agente causal Bordetella pertussis propios de nuestro región. Comparación con cepas que se emplean en la producción de vacunas. Estudio del rol de la divergencia entre la población bacteriana circulante y las cepas vacunales en la protección. Potencialidad para el diseño de nuevas vacunas. Este trabajo lo estamos desarrollando en el marco del Convenio Anlis Malbrán – FCE UNLP, PICT 2004 26201. PAE PICT 2007 y PID83. Mediante la plataforma metodológica de MLST que permite el análisis de los polimorfismos en un número mayor de secuencias estamos completando la caracterización de los aislamiento obtenidos durante el periodo que se informa. Nuestros resultados siguen evidenciando que el genotipo predominante que circula en la actualidad en nuestro país es ptx-p3, prn2 y fim3B, el cual se diferencia al del periodo anterior al año 2002 (periodo no epidémico), donde se observaba además la co-circulación de otras variantes alélicas (principalmente ptx-p1, prn1 y fim3A). Esta variación en los genotipos circulantes ha sido detectada en otros países luego de más de cincuenta años de inmunización masiva con vacuna anti-pertussis. La disminución de la diversidad en las variantes alélicas circulantes para los antígenos protectores toxina pertussis, pertactina y fimbria 3 podría responder a la presión de selección ejercida por las vacunas.

Durante este periodo además hemos incorporado técnicas que nos permiten detectar las mutaciones recientemente descritas para el gen de la pertactina. Se ha observado que los aislamientos que circulan en los países que se ha incorporado la vacuna acelular para todo el calendario han dejado de expresar esta proteína que está incluida en dichas formulaciones vacunales. Se ha propuesto que la aparición de estos aislamientos ha ocurrido en respuesta de la presión de selección ejercida por dichas formulaciones acelulares. En este contexto hemos implementado ensayos de PCR y de inmunoblot para detectar estas alteraciones a nivel local. Hasta la fecha hemos detectado sobre un total de 150 aislamientos, 6 aislamientos que no expresan pertactina. La proporción hasta ahora detectada es significativamente menor que la registrada para países como USA y Australia que ha diferencia nuestra han reemplazo completamente la vacuna celular por la acelular. La implicancia de estos resultados hemos comenzado a evaluarlo mediante ensayos in vitro e in vivo.

c) Caracterización de la interacción bacteria–hospedador: identificación de componentes bacterianos y caracterización de la respuesta inmune (innata y adaptativa)

del hospedador frente a infecciones de Bordetella, que se desarrolla en el marco del PAE ANPCYT.

En particular en este periodo continuamos trabajando sobre el fenómeno denominado protección por estimulación de la respuesta innata (en inglés STIR) que hemos podido describir recientemente en *B. pertussis*. Durante el periodo que se informa estudiamos los posibles mecanismos que desencadenan este fenómeno que permite la eliminación temprana del patógeno. Hemos observado que aunque el reclutamiento de neutrófilos es evidente a tiempos muy tempranos del fenómeno, los ensayos de depleción de neutrófilos utilizando un anticuerpo anti-GR1 mostraron que el clearance bacteriano provocado por el LPS ocurre aún en ausencia de neutrófilos. Para evaluar el posible papel de los radicales libres en el fenómeno STIR, hemos realizado ensayos in vivo pero empleando mezclas de LPS con el inactivador de especies oxidantes, la N-acetil cisteína (NAC). En estos ensayos pudimos detectar que la administración NAC evita el clearance de *B. pertussis* inducida por LPS. Estos resultados muestran que las especies reactivas de oxígeno (ROS) desempeñan un papel esencial en el aclaramiento innato TLR4 dependientes de *B. pertussis*. En la actualidad estamos analizando las poblaciones celulares que podrían estar involucradas en este fenómeno mediado por el LPS y las especies reactivas al oxígeno. Los resultados alcanzados ya han sido publicados como hemos detallado más abajo.

d) Identificación de candidatos vacunales, que se desarrolla en el marco del FP6-2004-INCO-DEV-3, PICT 2004 y PAE PICT 2007 29. Durante este periodo por un lado hemos analizado la capacidad protectora de la proteína recombinante fimbria 2 de *Bordetella pertussis* (fim2) fusionada a la subunidad B de la toxina colérica (CTB) Para este fin, la secuencia que codifica para la fimbria 2 fue clonada aguas abajo de la subunidad B de la toxina del cólera. La expresión de la proteína de fusión y el análisis de su conformación pentamérica fue evaluada mediante corridas electroforéticas en geles SDS - PAGE y ensayos de ELISA. Los resultados obtenidos confirmaron el tamaño esperado para la proteína de fusión y la preservación de la estructura CTB pentamérica. Para evaluar la capacidad protectora de la CTB - fim2 empleamos el modelo animal de ratones con desafío intranasal. Los resultados obtenidos mostraron que los ratones inmunizados con CTB - fim2 por vía intranasal o por vía intraperitoneal presentaron una reducción significativa en los recuentos bacterianos de pulmón en comparación con los grupos control ($p < 0,0001$ y $p < 0,001$, respectivamente) . Análisis de isotipos de IgG sugiere que la respuesta provocada por los diferentes inmunizaciones presentó un perfil de Th1/Th2 mixto. Los datos presentados aquí muestran la reversión del pobre poder inmunogenico de la proteína recombinante fim2 en el contexto de una proteína de fusión. Los resultados alcanzados han sido publicados en revistas internacionales con referato.

Durante el periodo que se informa también hemos avanzado en la caracterización de formulación acelular desarrollada por nosotros constituida por componentes proteicos y no proteicos de *B. pertussis*. En particular hemos trabajado en la caracterización de una formulación que además del componente pertussis antes descrito contiene un

componente similar pero derivado de *B. parapertussis*. El objetivo de dicha incorporación fue intentar extender la protección hacia esta otra especie del género *Bordetella* que también induce una enfermedad muy similar a la causada por *B. pertussis* pero para la cual no existe una formulación vacunal efectiva.

Los resultados alcanzados nos han permitido definir una formulación que protege contra las dos especies de manera muy satisfactoria y que además es biosegura. Los resultados alcanzados han sido objeto de la presentación de una patente a nivel nacional e internacional que en la actualidad se encuentra en evaluación.

Parte de los resultados alcanzados hasta el momento han sido divulgados en congresos y han sido publicados en revistas con referato internacional. Hemos presentado además una patente (ver más abajo el detalle).

A continuación incluyo el listado de los congresos y publicaciones realizadas durante el periodo que se informa en el marco de las distintas líneas antes descritas

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS - ENCUENTROS - JORNADAS Y SIMPOSIOS

1- O4 (203) Genotipificación de aislamientos clínicos de *Bordetella pertussis* circulantes en nuestro país en los últimos 10 años. L Basile, D Bottero, D Flores, ME Gaillard, S Fiori, S Zurita, C Castuma, D Hozbor VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas – SADEBAC Ciudad de Buenos Aires del 26 al 30 de Junio 2012

2. P170 (205) Resurgencia de coqueluche en Argentina: caracterización temporal de la sintomatología de los pacientes menores de 1 año edad. D Flores, S Fiori, D Bottero, C Lara, L Pianciola, L Basile, M Ormazabal, C Sorhouet, D Ruggeri, M Galas, D Hozbor. VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas – SADEBAC Ciudad de Buenos Aires del 26 al 30 de Junio 2012

3- Characterization of the stimulated innate resistance event (StiR) in *Bordetella pertussis* Infection. Zurita, E., Errea A., Moreno G., Ormazabal M., Rumbo M., and Hozbor D.

VIII Congreso Microbiología General. 4-6 de Julio 2012. Mar del Plata

4- Defining biotechnological parameters for new pertussis acellular vaccine. Gaillard ME., Bartel E., Zurita E., Rumbo M., and Hozbor D

VIII Congreso Microbiología General. 4-6 de Julio 2012. Mar del Plata

5- Higher protection levels of Fim2 from *Bordetella pertussis* in the murine model of infection.

Castuma C., Gaillard ME., Graieb A and Hozbor D.

VIII Congreso Microbiología General. 4-6 de Julio 2012. Mar del Plata

6-Rol de las especies reactivas a oxígeno en la protección contra el agente causal de la tos convulsa, *Bordetella pertussis*. ZURITA, MARIA EUGENIA; MORENO, GRISELDA; ERREA, AGUSTINA; RUMBO, MARTIN; HOZBOR, DANIELA . Otro.

Congreso. LVII Reunion anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica- LX Reunion Científica anual de la Sociedad argentina de Inmunología. . 2012 - .

7- CEPAS VACUNALES Y AISLAMIENTOS CLÍNICOS ARGENTINOS DE *BORDETELLA PERTUSSIS*: DIFERENCIAS GENOTÍPICAS Y PROTEÓMICAS.

D Bottero, D Gaillard, L Basile, D Hozbor. XIII Congreso Argentino de Microbiología 2013 y II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental 2013

8- VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA DERIVADAS DE BORDETELLA PARAPERTUSSIS COMO UNA VACUNA ACELULAR CONTRA LA INFECCIÓN POR B. PARAPERTUSSIS Y B. PERTUSSIS

D Hozbor, D Bottero, M Gaillard, A Errea, G Moreno, E Zurita, L Pianciola, M Rumbo. XIII Congreso Argentino de Microbiología 2013 y II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental 2013

9- "Descripción de la epidemiología de Coqueluche en Argentina a partir de las notificaciones realizadas al SNVS-SIVILA durante el período 2008 -2012" Primer Simposio de Vigilancia 12-13 de Noviembre de 2013.
PRESENTACIÓN ORAL. Dra. Daniela Hozbor

10- Participación como oradora en la Mesa Redonda "Enfermedades respiratorias bacterianas y virales" Tema: "Enfermedades Composición vacunal para Coqueluche y caracterización laboratorial de la cepas circulantes". Primer Simposio de Vigilancia 12 y 13 de noviembre de 2013, en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Internacionales.

1. Epidemiología Descriptiva de la Internación por Coqueluche. Uriarte, V., Agosti, M., Bettiol, M., García M., Hozbor, D., y Gonzalez Ayala S. III Congreso Internacional de Infectología Pediátrica y Vacunas. Buenos Aires 18 y 19 de Abril 2012.

2. Coqueluche en Argentina: Descripción de la situación epidemiológica durante el periodo 2008-2011. Flores, D., Lara, C., Giovacchini, C., Fiori, S., Sorhuet, C., Pianciola, L, Ruggeri, D., Antman J., Zurita, E., Mazzeo, M., Galas, M., Sagradini, S., Vizotti, C., Echenique, H., y Hozbor, D. III Congreso Internacional de Infectología Pediátrica y Vacunas. Buenos Aires 18 y 19 de Abril 2012.

3. Epidemiología Descriptiva de Casos de Coqueluche causada por Bordetella parapertussis. Pianciola, L., Bottero, D., Mazzeo, M., Flores, D., Navello M., y Hozbor, D. III Congreso Internacional de Infectología Pediátrica y Vacunas. Buenos Aires 18 y 19 de Abril 2012.

4. Coqueluche, situación actual. Coordinadora de mesa redonda. III Congreso Internacional de Infectología Pediátrica y Vacunas. Buenos Aires 18 y 19 de Abril 2012.

5- XII Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Infectología, SADI 2012 16, 17 y 18 de mayo de 2012. Disertante: Mesa Redonda: B. pertussis: una realidad cambiante Diagnóstico.

6- Lower protective capacity of Bordetella pertussis fimbriae 3 compared to fimbriae 2", Castuma C and Hozbor D, reference 0106 has been accepted for poster presentation at the 10th International Symposium on Bordetella. Dublin Irlanda. Septiembre 2013

7- Pertussis Epidemiology in Argentina, Trends over 1969-2012", Darío Flores, Silvana Fiori, Laura Basile, Daniela Bottero, Luis Pianciola , Claudia Lara, María Emilia Gaillard, Marcelo Galas, Mabel Regueira, Diego Ruggeri, Cecilia Sorhouet Daniela Hozbor, reference 0059 has been accepted for poster presentation at the 10th International Symposium. Dublin Irlanda. Septiembre 2013

8- "Acellular Pertussis Vaccine Based on Outer Membrane Vesicles Capable of Conferring Both Long-Lasting Immunity and Protection Against Different Strain Genotypes", Emilia Gaillard (1)

Daniela Bottero, Agustina Errea, Maximiliano Ormazabal, Eugenia Zurita, Griselda Moreno, Martin Rumbo, Peter Van der Ley, Arno Van der Ark, Daniela Hozbor, reference 0102 has been accepted for poster presentation at the 10th International Symposium on Bordetella. Dublin Irlanda. Septiembre 2013

9- "Pertussis Trends in Neuquén Province, Argentina, between 2004 and 2012", Luis Pianciola, Melina Mazzeo, Darío Flores, Silvana Fiori, Mariano Navello, Eugenia Zitta, Constanza Müller, Daniela Bottero, Daniela Hozbor, reference 0058 has been accepted for poster presentation at the 10th International Symposium on Bordetella. Dublin Irlanda. Septiembre 2013. Dublin Irlanda. Septiembre 2013

10- "Stimulated Innate Resistance Event (StIR) in Bordetella pertussis Infection is Dependent on Reactive Oxygen Species Production", Zurita E.1, Moreno G.2, Errea A.2, Ormazabal M.1, Curciarello R.2, Rumbo M2 and Hozbor D1* reference 0090 has been accepted for poster presentation at the 10th International Symposium on Bordetella. Dublin Irlanda. Septiembre 2013

11- "Avirulent factors expression on a virulent phenotype background alter the course of Bordetella pertussis infection in the murine model. 10th International Symposium. Dublin Irlanda. Septiembre 2013. Ormazabal M., Castuma C y Hozbor D.

12- "Participación del III Workshop Internacional "Teste de Diagnóstico com Qualidade Assegurada e Acessíveis para Programas de Saúde Pública" Curitiba. 30 y 31 de Octubre 2013.

Trabajos científicos publicados durante el periodo que informo

1- "Genotypic and phenotypic characterization of Bordetella pertussis strains used in different vaccine formulations in Latin America

Bottero, Daniela; Gaillard, María; Basile, Laura; Fritz, Mariana; Hozbor, Daniela
J Appl Microbiol. 2012 Jun;112(6):1266-76. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05299.x.
Epub 2012 Apr 25.

2- "Modelling pertussis transmission to evaluate the effectiveness of an adolescent booster in Argentina

G. FABRICIUS1*, P. BERGERO1, M. ORMAZABAL2, A. MALTZ3 AND D. HOZBOR2
Received 8 April 2012; Final revision 18 May 2012; Accepted 31 May 2012. Journal of
Epidemiology and Infection ISSN: 0950-2688 EISSN: 1469-4409
2013 Apr;141(4):718-34. doi: 10.1017/S0950268812001380.

3- "Bordetella holmesii in children suspected of pertussis in Argentina. Bottero, Daniela; Griffith, Matthew M.; Lara, Claudia; Flores, Darío; Pianciola, Luis; Gaillard María Emilia, Mazzeo, Melina; Zamboni, Maria Ines; Spoletti, María Julia; Anchart, Eduardo; Ruggeri, Diego; Sorhouet, Cecilia; Fiori, Silvana; Galas, Marcelo; Tondella, Maria L. and Hozbor, Daniela. Aceptado para su publicación en Epidemiology and Infection. Mayo de 2012.

Epidemiology and Infection / Volume 141 / Issue 04 / April 2013, pp 714-

717

ISSN: 0950-2688 EISSN: 1469-4409

4. Resurgence of pertussis calls for re-evaluation of pertussis animal models. van der Ark AA, Hozbor DF, Boog CJ, Metz B, van den Dobbelen GP, van Els CA. *Expert Rev Vaccines*. 2012 (9):1121-37. doi: 10.1586/erv.12.83. ISSN: 1476-0584, 1744-8395

5. CYCLIC-DI-GMP SIGNALING REGULATES MOTILITY AND BIOFILM FORMATION IN *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*. Sisti F, Ha DG, O'Toole GA, Hozbor DF, Fernandez J. *Microbiology*. 2013 Mar 8. Print ISSN: 1350-0872; Online ISSN: 1465-2080.

6. Stimulated innate resistance event (StIR) in *Bordetella pertussis* infection is dependent on reactive oxygen species production." by Eugenia Zurita, Griselda Moreno, Agustina Errea, Maximiliano Ormazabal, Martin Rumbo, and Daniela Hozbor. *Infect Immun*. 2013 Jul;81(7):2371-8. doi: 10.1128/IAI.00336-13. Print ISSN: 0019-9567; Online ISSN: 1098-5522

7. Assessment of pertussis vaccination strategies using a mathematical model of disease transmission. Pesco P, Bergero P, Fabricius G y Hozbor D. *Arch Argent Pediatr*. 2013 Oct;111(5):377-83. doi: 10.1590/S0325-00752013000500004. ISSN 0325-0075versión impresa ISSN 1668-3501versión on-line aceptado para su publicación

- 8- Toll- like receptor 4 orchestrates neutrophil recruitment into airways during the first hours of *Bordetella pertussis* infection. Griselda Moreno, Agustina Errea, Laurye Van Maele, Roy Roberts, Hélène Léger, Jean Claude Sirard, Arndt Benecke, Martin Rumbo& Daniela Hozbor. *Microbes Infect*. 2013 Sep-Oct;15(10-11):708-18. doi: 10.1016/j.micinf.2013.06.010. ISSN: 1286-4579)

- 9- *Bordetella parapertussis* as an acellular vaccine against *Bordetella parapertussis* and *Bordetella pertussis* infection, by Bottero D., Gaillard ME, Errea A., Moreno G., Zurita E., Pianciola L., Rumbo M. and Hozbor D. *Vaccine*. 2013 Oct 25;31(45):5262-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.08.059.

- 10- Acellular pertussis vaccine based on outer membrane vesicles capable of conferring both long-lasting immunity and protection against different strain genotypes. Gaillard ME, Bottero D, Errea A, Ormazabal M, Zurita ME, Moreno G, Rumbo M, Castuma C, Bartel E, Flores D, van der Ley P, van der Ark A, and Hozbor D. *Vaccine* 2014, 32(8):931-937.

- 11- Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination.
 Marieke J Bart , Dr. Simon R. Harris , Reza Advani , Yoshichika Arakawa , Daniela Bottero , Valérie Bouchez , Pamela Cassidy , Chuen-Sheue Chiang , Dr. Tine Dalby , Norman K Fry , María Emilia Gaillard , Marjolein van Gent , Nicole Guiso , Hans Hallander , Dr. Eric T Harvill , Qiushui He , Han GJ van der Heide , Kees Heuvelman , Daniela Hozbor , Dr. Kazunari Kamachi , Gennady I Karataev , Dr. Ruiting Lan , Dr. Anna Lutyńska , Ram P Maharjan , Prof. Jussi Mertsola , Dr. Tatsuo Miyamura , Sophie Octavia , Dr. Andrew Preston , Dr. Michael A. Quail , Dr. Vitali Sintchenko , Paola Stefanelli , Dr. Maria Lucia Tondella , Dr. Raymond S W Tsang , Yinghua Xu , Shu-Man Yao , Shumin Zhang , Dr. Frits R Mooi
 Aceptado para su publicación mBio ASM 2014 mBio01074-14

12- Modelling the effect of changes in vaccine effectiveness and transmission contact rates on pertussis epidemiology. Pablo Pesco; Paula Bergero; Gabriel Fabricius; Daniela Hozbor. Epidemics aceptado para su publicación 2014

13. Immunization with the recombinant Cholera Toxin B fused to Fimbria2 protein protects against Bordetella pertussis infection," by Noelia Olivera, Celina Castuma, Daniela Hozbor, María E. Gaillard, Martin Rumbo and Ricardo Gomez aceptado para su publicación en BioMed Research International Abril 2014

14- "Development of improved pertussis vaccines" Rumbo M and Hozbor D has been accepted for publication in Human Vaccines & Immunotherapeutics, Volume 10 Issue 8.

He elaborado además algunos trabajos de divulgación y he contribuido en la elaboración de un tutorial para la vigilancia de coqueluche. Ver más abajo

He actuado como evaluadora de numerosos trabajos científicos, de proyectos y como editora académica de la revista PlosOne

7. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

7.1 PUBLICACIONES. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

1-Genotypic and phenotypic characterization of Bordetella pertussis strains used in different vaccine formulations in Latin America.

Bottero D1, Gaillard ME, Basile LA, Fritz M, Hozbor DF.

J Appl Microbiol. 2012 Jun;112(6):1266-76. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05299.x.

Epub 2012 Apr 25.

Abstract

AIM:

To characterize Bordetella pertussis vaccine strains in comparison with current circulating bacteria.

METHODS AND RESULTS:

Genomic and proteomic analyses of Bp137 were performed in comparison with other vaccine strains used in Latin America (Bp509 and Bp10536) and with the clinical Argentinean isolate Bp106. Tohama I strain was used as reference strain. Pulse-field gel electrophoresis (PFGE) and pertussis toxin promoter (ptxP) sequence analysis revealed that Bp137 groups with Bp509 in PFGE group III and contains ptxP2 sequence. Tohama I (group II) and Bp10536 (group I) contain ptxP1 sequence, while Bp106 belongs to a different PFGE cluster and contains ptxP3. Surface protein profiles diverged in at least 24 peptide subunits among the studied strains. From these 24 differential proteins, Bp10536 shared the expression of ten

proteins with Tohama I and Bp509, but only three with Bp137. In contrast, seven proteins were detected exclusively in Bp137 and Bp106.

CONCLUSIONS:

Bp137 showed more features in common with the clinical isolate Bp106 than the other vaccine strains here included.

SIGNIFICANCE AND IMPACT OF THE STUDY:

The results presented show that the old strains included in vaccines are not all equal among them. These findings together with the data of circulating bacteria should be taken into account to select the best vaccine to be included in a national immunization programme.

En esta publicación he dirigido la investigación, siendo la autora responsable (corresponding author), he realizado algunos de los experimentos que se describen, he trabajado en el análisis de los datos, y he escrito el trabajo.

2- Bordetella holmesii in children suspected of pertussis in Argentina.

Bottero D1, Griffith MM, Lara C, Flores D, Pianciola L, Gaillard ME, Mazzeo M, Zamboni MI, Spoleti MJ, Anchart E, Ruggeri D, Sorhouet C, Fiori S, Galas M, Tondella ML, Hozbor DF. *Epidemiol Infect.* 2013 Apr;141(4):714-7. doi: 10.1017/S095026881200132X. Epub 2012 Jul 5.

Abstract

We describe nine patients (eight aged <1 year) clinically diagnosed with pertussis yet laboratory-confirmed with *Bordetella holmesii* infections, a human pathogen normally isolated from blood. Most patients reported cough and cold symptoms. No death was reported. We report *B. holmesii* isolation in infants with respiratory symptoms in Argentina.

En esta publicación he dirigido la investigación, siendo la autora responsable (corresponding author), he realizado algunos de los experimentos que se describen, he trabajado en el análisis de los datos, y he escrito el trabajo.

3- Modelling pertussis transmission to evaluate the effectiveness of an adolescent booster in Argentina.

Fabricius G1, Bergero PE, Ormazabal ME, Maltz AL, Hozbor DF. *Epidemiol Infect.* 2013 Apr;141(4):718-34. doi: 10.1017/S0950268812001380. Epub 2012 Jul 6.

Abstract

Due to the current epidemiological situation of pertussis, several countries have implemented vaccination strategies that include a booster dose for adolescents. Since there is still no evidence showing that the adolescent booster has a positive effect on the most vulnerable group represented by infants, it is difficult to universalize the recommendation to include such reinforcement. In this work we present an age-structured compartmental deterministic model that considers the outstanding epidemiological features of the disease in order to assess the impact of the booster dose at age 11 years (Tdap booster) to infants. To this end, we performed different parameterizations of the model that represent distinct possible epidemiological scenarios. The results obtained show that the inclusion of a single Tdap dose at age 11 years significantly reduces the incidence of the disease within this age group, but has a very low impact on the risk group (0-1 year). An effort to improve the coverage of the first dose would have a much greater impact on infants. These results hold in the 18 scenarios considered, which demonstrates the robustness of these conclusions.

En esta publicación he participado activamente en la conceptualización del trabajo, en el análisis de los datos y en el diseño y escritura del trabajo.

4- Resurgence of pertussis calls for re-evaluation of pertussis animal models.
van der Ark AA1, Hozbor DF, Boog CJ, Metz B, van den Dobbelsteen GP, van Els CA.
Expert Rev Vaccines. 2012 Sep;11(9):1121-37. doi: 10.1586/erv.12.83.

Abstract

Pertussis has recently re-emerged in well-vaccinated populations most likely due to a combination of pathogen adaptation and waning of vaccine-induced pertussis immunity. Changes in genomic content of the etiologic agent, *Bordetella pertussis*, observed in the postvaccination era can have a bearing on the efficacy of vaccines currently in use. Moreover, protective immune responses in vaccinees wane gradually depending on their originally induced size and breadth, and memory responses may not be as regularly boosted by circulating strains as was the case in the prevaccination era. This pertussis scenario asks for new, improved vaccines with at least a longer duration of protection. Pertussis vaccine research, development and postmarketing surveillance require re-evaluation and innovation of the currently available pertussis animal models, with emphasis on the use of circulating *B. pertussis* strains.

En esta publicación he trabajado en la elaboración, análisis y discusión de datos y en la escritura del trabajo .

5- Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*.
Sisti F1, Ha DG, O'Toole GA, Hozbor D, Fernández J.
Microbiology. 2013 May;159(Pt 5):869-79. doi: 10.1099/mic.0.064345-0. Epub 2013 Mar 8.

Abstract

The signalling molecule bis-(3'-5')-cyclic-dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) is a central regulator of diverse cellular functions, including motility, biofilm formation, cell cycle progression and virulence, in bacteria. Multiple diguanylate cyclase and phosphodiesterase-domain-containing proteins (GGDEF and EAL/HD-GYP, respectively) modulate the levels of the second messenger c-di-GMP to transmit signals and obtain such specific cellular responses. In the genus *Bordetella* this c-di-GMP network is poorly studied. In this work, we evaluated the expression of two phenotypes in *Bordetella bronchiseptica* regulated by c-di-GMP, biofilm formation and motility, under the influence of ectopic expression of *Pseudomonas aeruginosa* proteins with EAL or GGDEF domains that regulates the c-di-GMP level. In agreement with previous reports for other bacteria, we observed that *B. bronchiseptica* is able to form biofilm and reduce its motility only when GGDEF domain protein is expressed. Moreover we identify a GGDEF domain protein (BB3576) with diguanylate cyclase activity that participates in motility and biofilm regulation in *B. bronchiseptica*. These results demonstrate for the first time, to our knowledge, the presence of c-di-GMP regulatory signalling in *B. bronchiseptica*.

En esta publicación he contribuido en la discusión y escritura del trabajo.

6- The stimulated innate resistance event in *Bordetella pertussis* infection is dependent on reactive oxygen species production.
Zurita E1, Moreno G, Errea A, Ormazabal M, Rumbo M, Hozbor D.

fect Immun. 2013 Jul;81(7):2371-8. doi: 10.1128/IAI.00336-13. Epub 2013 Apr 29
Abstract

The exacerbated induction of innate immune responses in airways can abrogate diverse lung infections by a phenomenon known as stimulated innate resistance (StIR). We recently demonstrated that the enhancement of innate response activation can efficiently impair *Bordetella pertussis* colonization in a Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent manner. The aim of this work was to further characterize the effect of lipopolysaccharide (LPS) on StIR and to identify the mechanisms that mediate this process. Our results showed that bacterial infection was completely abrogated in treated mice when the LPS of *B. pertussis* (1 µg) was added before (48 h or 24 h), after (24 h), or simultaneously with the *B. pertussis* challenge (10⁷ CFU). Moreover, we detected that LPS completely cleared bacterial infection as soon as 2 h posttreatment. This timing suggests that the observed StIR phenomenon should be mediated by fast-acting antimicrobial mechanisms. Although neutrophil recruitment was already evident at this time point, depletion assays using an anti-GR1 antibody showed that *B. pertussis* clearance was achieved even in the absence of neutrophils. To evaluate the possible role of free radicals in StIR, we performed animal assays using the antioxidant N-acetyl cysteine (NAC), which is known to inactivate oxidant species. NAC administration blocked the *B. pertussis* clearance induced by LPS. Nitrite concentrations were also increased in the LPS-treated mice; however, the inhibition of nitric oxide synthetases did not suppress the LPS-induced bacterial clearance. Taken together, our results show that reactive oxygen species (ROS) play an essential role in the TLR4-dependent innate clearance of *B. pertussis*.

En esta publicación he dirigido la investigación, siendo la autora responsable (corresponding author), he realizado algunos de los experimentos que se describen, he trabajado en el análisis de los datos, y he escrito el trabajo.

7- Toll-like receptor 4 orchestrates neutrophil recruitment into airways during the first hours of *Bordetella pertussis* infection.

Moreno G1, Errea A, Van Maele L, Roberts R, Léger H, Sirard JC, Benecke A, Rumbo M, Hozbor D.

Microbes Infect. 2013 Sep-Oct;15(10-11):708-18. doi: 10.1016/j.micinf.2013.06.010. Epub 2013 Jun 28.

Abstract

Most of the knowledge on the impact of *Bordetella pertussis* lipo-oligosaccharide (LOS) on the infectious process was obtained when the bacteria was established within the host. The aim of the present work was to determine the role of TLR4 at a very early step of the infectious process. To this end we used a transcriptomic approach on *B. pertussis* intranasal infection model in C3H/HeN, a TLR4-competent mouse strain, and C3H/HeJ, a TLR4-deficient mouse strain. The expression of approximately 140 genes was significantly changed 2 h post-infection in the C3H/HeN animals compared to the C3H/HeJ animals, which were essentially non-responders at this early time point. Pathways specific for immunity and defense, chemokine- and cytokine-mediated functions and TLR signaling, were activated upon infection in the TLR4 competent mice either at 2 h or 24 h. Furthermore, we observed that TLR4 signaling is absolutely required to promote the rapid recruitment of neutrophils into the airways. Interestingly, the depletion of those neutrophils impacted on *B. pertussis* lung counts in the first three days, thereby exacerbating the lung infection. In summary, we determined that TLR4 is a central player in initial neutrophil recruitment and orchestration of the very early innate defense against *B. pertussis*.

En esta publicación he dirigido la investigación, siendo la autora responsable (corresponding author), he realizado algunos de los experimentos que se describen, he trabajado en el análisis de los datos, y he escrito el trabajo.

8- Outer membrane vesicles derived from *Bordetella parapertussis* as an acellular vaccine against *Bordetella parapertussis* and *Bordetella pertussis* infection.

Bottero D1, Gaillard ME, Errea A, Moreno G, Zurita E, Pianciola L, Rumbo M, Hozbor D.

Vaccine. 2013 Oct 25;31(45):5262-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.08.059. Epub 2013 Sep 5.

Abstract

Bordetella parapertussis, a close related species of *B. pertussis*, can also cause the disease named pertussis or whooping cough. The number of cases caused by this related pathogen has risen sustained in the last years. The widely used cellular (wP) or acellular (aP) pertussis vaccines have little or no efficacy against *B. parapertussis*. In an effort to devise an effective acellular vaccine against *B. parapertussis* infection, outer membrane vesicles (OMVs) were obtained from *B. parapertussis*. Proteomic analysis of the resulting OMVs, designated OMVsBpp, evidenced the presence of several surface immunogens including pertactin. The characterized OMVsBpp were used in murine *B. parapertussis* intranasal challenge model to examine their protective capacity when administered by systemic route. Immunized BALB/c mice were challenged with sublethal doses of *B. parapertussis*. Significant differences between immunized animals and the negative control group were observed ($p < 0.001$). OMVsBpp protected against *B. parapertussis* infection, whereas current commercial aP vaccine showed little protection against such pathogen. More interestingly, protection induced by OMVsBpp against *B. pertussis* was comparable to our previously designed vaccine consisting in OMVs derived from *B. pertussis* (OMVsBp). For these experiments we used as a positive control the current commercial aP vaccine in high dose. As expected aP offered protection against *B. pertussis* in mice. Altogether the results presented here showed that the OMVs from *B. parapertussis* are an attractive vaccine candidate to protect against whooping cough induced by *B. parapertussis* but also by *B. pertussis*.

En esta publicación he dirigido la investigación, siendo la autora responsable (corresponding author), he realizado algunos de los experimentos que se describen, he trabajado en el análisis de los datos, y he escrito el trabajo.

9- Assessment of pertussis vaccination strategies using a mathematical model of disease transmission.

[Article in English, Spanish]

Pesco P1, Bergero P, Fabricius G, Hozbor D.

Arch Argent Pediatr. 2013 Oct;111(5):377-83. doi: 10.1590/S0325-00752013000500004.

Abstract

Pertussis or whooping cough is a vaccine-preventable respiratory disease that has reemerged in the past decades. A higher morbidity and mortality has been recorded in infants, although cases have also been reported in adolescents and adults. The epidemiological scenario for this condition has urged to review and implement new strategies aimed at improving its control. However, many of these strategies have not been investigated in depth so as to be established as universal. In this context, mathematical models of disease transmission are useful decision-making tools. Using a mathematical model of pertussis, this study assessed the possible impact of the different control measures on the most vulnerable population (0-1 year old infants). In particular, the analysis focused on the impact of including a booster

vaccination at 11 years old, the effect of improving the coverage provided by primary doses, and the reduction of any delay in their administration. The assessment also estimated the effect of immunizing pregnant women. Results show that including a booster dose at 11 years reduces the incidence of pertussis by 3% in infants younger than 1 year old. In addition, administering primary doses in compliance with the schedule (with no delays) reduces pertussis incidence by 16%. Increasing coverage from 80% to 95% results in a significantly decreased incidence in the vulnerable population (38%). If the percentage of immunized pregnant women reaches 50%, the reduction of the most severe infant cases could be more than 43% (0-2 month-old infants).

En esta publicación he trabajado en la conceptualización, en el análisis de los datos, y en la escritura del trabajo.

10- Acellular pertussis vaccine based on outer membrane vesicles capable of conferring both long-lasting immunity and protection against different strain genotypes.

Gaillard ME1, Bottero D1, Errea A2, Ormazábal M1, Zurita ME1, Moreno G2, Rumbo M2, Castuma C1, Bartel E1, Flores D1, van der Ley P3, van der Ark A3, F Hozbor D4.

Vaccine. 2014 Feb 12;32(8):931-7. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.12.048. Epub 2014 Jan 4.

Abstract

Despite high vaccination coverage rates, pertussis continues to be a global concern, with increased incidence widely noted. The current pertussis epidemiologic situation has been mainly attributed to waning immunity and pathogen adaptation. To improve the disease control, a new generation of vaccines capable to overcome those weaknesses associated to the current vaccines need to be developed. Previously we have demonstrated that the outer membrane vesicles obtained from the recombinant *Bordetella pertussis* strain expressing PagL enzyme (OMVs(BpPagL)) are good vaccine candidates to protect against pertussis. In this work the OMVs(BpPagL) formulated with diphtheria and tetanus toxoids (Tdap(OMVsBpPagL)) was used to evaluate its capacity to offer protection against Argentinean clinical isolates and to induce long-term immunity. To these aims BALB/c mice were immunized with Tdap(OMVsBpPagL) and challenged with sublethal doses of the clinical isolate Bp106 selected as a representative circulating isolate. Comparisons with a current commercial Tdap vaccine used at a dose in which pertussis toxin level was equivalent to that of Tdap(OMVsBpPagL) were performed. With the normalized doses of both vaccines we observed that Tdap(OMVsBpPagL) protected against the clinical isolate infection, whereas current commercial Tdap vaccine showed little protection against such pathogen. Regarding long-term immunity we observed that the Tdap(OMVsBpPagL) protective capacity against the recommended WHO reference strain persisted at least 9 months. In agreement with these results Tdap(OMVsBpPagL) induced Th1 and Th2 immune response. In contrast, commercial Tdap induced Th2 but weak Th1 responses. All results presented here showed that Tdap(OMVsBpPagL) is an interesting formulation to be considered for the development of novel acellular multi-antigen vaccine.

En esta publicación he dirigido la investigación, siendo la autora responsable (corresponding author), he realizado algunos de los experimentos que se describen, he trabajado en el análisis de los datos, y he escrito el trabajo.

11- Global Population Structure and Evolution of *Bordetella pertussis* and Their Relationship with Vaccination.

Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, Cassidy PK, Chiang CS, Dalby T, Fry NK, Gaillard ME, van Gent M, Guiso N, Hallander HO, Harvill ET, He Q, van der Heide HG, Heuvelman K, Hozbor DF, Kamachi K, Karataev GI, Lan R, Lutyńska A, Maharjan RP, Mertsola J, Miyamura T, Octavia S, Preston A, Quail MA, Sintchenko V, Stefanelli P, Tondella ML, Tsang RS, Xu Y, Yao SM, Zhang S, Parkhill J, Mooi FR.

MBio. 2014 Apr 22;5(2). pii: e01074-14. doi: 10.1128/mBio.01074-14.

Abstract

ABSTRACT *Bordetella pertussis* causes pertussis, a respiratory disease that is most severe for infants. Vaccination was introduced in the 1950s, and in recent years, a resurgence of disease was observed worldwide, with significant mortality in infants. Possible causes for this include the switch from whole-cell vaccines (WCVs) to less effective acellular vaccines (ACVs), waning immunity, and pathogen adaptation. Pathogen adaptation is suggested by antigenic divergence between vaccine strains and circulating strains and by the emergence of strains with increased pertussis toxin production. We applied comparative genomics to a worldwide collection of 343 *B. pertussis* strains isolated between 1920 and 2010. The global phylogeny showed two deep branches; the largest of these contained 98% of all strains, and its expansion correlated temporally with the first descriptions of pertussis outbreaks in Europe in the 16th century. We found little evidence of recent geographical clustering of the strains within this lineage, suggesting rapid strain flow between countries. We observed that changes in genes encoding proteins implicated in protective immunity that are included in ACVs occurred after the introduction of WCVs but before the switch to ACVs. Furthermore, our analyses consistently suggested that virulence-associated genes and genes coding for surface-exposed proteins were involved in adaptation. However, many of the putative adaptive loci identified have a physiological role, and further studies of these loci may reveal less obvious ways in which *B. pertussis* and the host interact. This work provides insight into ways in which pathogens may adapt to vaccination and suggests ways to improve pertussis vaccines. **IMPORTANCE** Whooping cough is mainly caused by *Bordetella pertussis*, and current vaccines are targeted against this organism. Recently, there have been increasing outbreaks of whooping cough, even where vaccine coverage is high. Analysis of the genomes of 343 *B. pertussis* isolates from around the world over the last 100 years suggests that the organism has emerged within the last 500 years, consistent with historical records. We show that global transmission of new strains is very rapid and that the worldwide population of *B. pertussis* is evolving in response to vaccine introduction, potentially enabling vaccine escape.

En esta publicación he dirigido la investigación, siendo la autora responsable (corresponding author), he realizado algunos de los experimentos que se describen, he trabajado en el análisis de los datos, y he escrito el trabajo.

7.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que figurarán en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el investigador deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

1- Immunization with the recombinant Cholera Toxin B fused to Fimbria2 protein protects against Bordetella pertussis infection

Noelia Olivera*, Celina E. Castuma*, Daniela Hozbor*, María E. Gaillard*, Martín Rumbo**, Ricardo M. Gómez*§.

Abstract This study examined the vaccine potential of the fusion protein fimbria 2 of Bordetella pertussis (Fim2) - cholera toxin B subunit (CTB) in the sublethal intranasal murine respiratory challenge model of infection. To this end B. pertussis fimbria 2 coding sequence (fim2) was cloned downstream of the highly immunogenic cholera toxin B subunit (ctb) coding sequence. The expression and assembly of the fusion protein into pentameric structures (CTB-Fim2) was evaluated by SDS-PAGE and monosialotetrahexosylganglioside (GM1-ganglioside) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results obtained confirmed the expected protein fusion size and suggested proper folding and preservation of the pentameric CTB structure. To evaluate the protective capacity of CTB-Fim2, a intranasal (20 µg) or intraperitoneal (50 µg) mouse immunization schedule was performed with CTB-Fim2. Recombinant Fim2 (rFim2, 20 µg), CTB (5 µg), rFim2+CTB, or phosphate-buffered saline (PBS) were used as controls. The results showed that mice immunized with CTB-Fim2 intranasally or intraperitoneally presented a significant reduction in bacterial lung counts compared to control groups ($p < 0.0001$ and $p < 0.001$, respectively). Moreover, intranasal immunization with CTB-Fim2 induced significant levels of Fim2-specific IgG in serum and bronchoalveolar lavage (BAL), and Fim2-specific IgA in BAL. Analysis of IgG isotypes suggested that the response elicited by the different immunizations presented a mixed Th1/Th2 profile. The data presented here provide support for CTB-Fim2 as a promising recombinant antigen against Bordetella pertussis infection.

En este trabajo he realizado algunos de los experimentos que se describen, he trabajado en el análisis de los datos, y he contribuido a la escritura del trabajo.

2- Development of improved pertussis vaccine

Rumbo M and Hozbor D

1 Laboratorio VacSal. Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM). Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. CCT-CONICET La Plata. Calles 50 y 115. 1900. La Plata. Argentina.

2 Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune (LISIN). Facultad de Ciencias Exactas, UNLP 47 y 115 (1900) La Plata, Argentina

#Corresponding Author:

Dra. Daniela Hozbor

Telephone: +54-221-425-0497 ext 31

E-mail: hozbor.daniela@gmail.com, hozbor@biol.unlp.edu.ar.

Abstract

Rates of infection with *Bordetella pertussis*, the gram-negative bacterium that causes the respiratory disease called whooping cough or pertussis, have not abated and 16 million cases with almost 200,000 deaths are estimated by the WHO to have occurred worldwide in 2008. Despite relatively high vaccination rates, the disease has come back in recent years to afflict people in numbers not seen since the pre-vaccine days. Indeed, pertussis is now recognized as a frequent infection not only in newborn and infants but also in adults. The disease symptoms also can be induced by the non-vaccine-preventable infection with the close species *B. parapertussis* for which an increasing number of cases have been reported. The epidemiologic situation and current knowledge of the limitations of pertussis vaccine point out the need to design improved vaccines. Several alternative approaches and their challenges are summarized.

En esta publicación he dirigido la investigación, siendo la autora responsable (corresponding author), y he escrito el trabajo.

7.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION.

Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.

Characterization of the key antigenic components of pertussis vaccine based on outer membrane vesicles.

Maximiliano Ormazábal^{1*}, Erika Bartel^{1*}, María Emilia Gaillard¹, Daniela Bottero¹, Agustina Errea², M. Eugenia Zurita¹, Griselda Moreno², Martín Rumbo², Celina Castuma¹, Dario Flores¹, María Julia Martín¹ and Daniela Hozbor^{1#}.

1 Laboratorio VacSal. Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM). Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. CCT-CONICET La Plata. Calles 50 y 115. 1900. La Plata. Argentina.

2 Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune (LISIN). Facultad de Ciencias Exactas, UNLP 47 y 115 (1900) La Plata, Argentina

* These authors have equally contributed to the work

#Corresponding Author:

Dra. Daniela Hozbor

Telephone: +54-221-425-0497 ext 31

E-mail: hozbor.daniela@gmail.com, hozbor@biol.unlp.edu.ar.

Abstract

Pertussis has resurged during the last two decades in different countries. In particular in 2010-2013 period large outbreaks were detected in US, Australia, UK and The Netherlands with significant mortality in infants. The epidemiological

situation of pertussis point out the need to develop new vaccines and in this sense we previously developed a new vaccine based on outer membrane vesicle (OMV) which have been shown to be safe and to induce protection in mice. We have here further investigated the properties of OMV vaccines; in particular we investigated the contribution of pertussis toxin (PTx) and pertactin (Prn) in OMVs-mediated protection against pertussis. A PTx-deficient OMVs and Prn-deficient OMVs were obtained from defective *B. pertussis* mutants. The absence of PTx or Prn did compromise the protective capacity of the OMVs formulated as Tdap vaccine. In vivo, whereas the protective efficacy of the PTx-deficient OMVs in mice was comparable to Prn-deficient OMVs, the protective capacity of both of them was significantly impaired when it was compared with the wild type OMVs. Interestingly, using OMVs obtained from *B. pertussis* strain which does not express any of the virulence factors but express the avirulent phenotype; we observed that the protective ability of such OMVs was lower than that of OMVs obtained from virulent *B. pertussis* phase. However, it was surprising that although the protective capacity of avirulent OMVs was lower, they were still protective in the used mice model. These results allow us to hypothesize that OMVs from avirulent phase shares protective components with all OMVs assayed. Using immune proteomic strategy we identified some common components could play an important role in protection against pertussis.

Keywords: whooping cough, *Bordetella pertussis*, acellular vaccine, OMVs, avirulent phase,

enviado a Vaccine

7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.

Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.

7.5 COMUNICACIONES. *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS - ENCUENTROS - JORNADAS Y SIMPOSIOS
1- O4 (203) Genotipificación de aislamientos clínicos de *Bordetella pertussis* circulantes en nuestro país en los últimos 10 años. L Basile, D Bottero, D Flores, ME Gaillard, S Fiori, S Zurita, C Castuma, D Hozbor VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas – SADEBAC Ciudad de Buenos Aires del 26 al 30 de Junio 2012

2. P170 (205) Resurgencia de coqueluche en Argentina: caracterización temporal de la sintomatología de los pacientes menores de 1 año edad. D Flores, S Fiori, D Bottero, C Lara, L Pianciola, L Basile, M Ormazabal, C Sorhouet, D Ruggeri, M Galas, D Hozbor. VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas – SADEBAC Ciudad de Buenos Aires del 26 al 30 de Junio 2012

3- Characterization of the stimulated innate resistance event (StiR) in *Bordetella pertussis* Infection. Zurita, E., Errea A., Moreno G., Ormazabal M., Rumbo M., and Hozbor D.

VIII Congreso Microbiología General. 4-6 de Julio 2012. Mar del Plata

4- Defining biotechnological parameters for new pertussis acellular vaccine. Gaillard ME., Bartel E., Zurita E., Rumbo M., and Hozbor D

VIII Congreso Microbiología General. 4-6 de Julio 2012. Mar del Plata

5- Higher protection levels of Fim2 from Bordetella pertussis in the murine model of infection.

Castuma C., Gaillard ME., Graieb A and Hozbor D.

VIII Congreso Microbiología General. 4-6 de Julio 2012. Mar del Plata

6-Rol de las especies reactivas a oxígeno en la protección contra el agente causal de la tos convulsa, Bordetella pertussis. ZURITA, MARIA EUGENIA; MORENO, GRISELDA; ERREA, AGUSTINA; RUMBO, MARTIN; HOZBOR, DANIELA . Otro. Congreso. LVII Reunion anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica- LX Reunion Científica anual de la Sociedad argentina de Innunología. . 2012 - .

7- CEPAS VACUNALES Y AISLAMIENTOS CLÍNICOS ARGENTINOS DE BORDETELLA PERTUSSIS: DIFERENCIAS GENOTÍPICAS Y PROTEOMICAS.

D Bottero, D Gaillard, L Basile, D Hozbor. XIII Congreso Argentino de Microbiología 2013 y II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental 2013

8- VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA DERIVADAS DE BORDETELLA PARAPERTUSSIS COMO UNA VACUNA ACELULAR CONTRA LA INFECCIÓN POR B. PARAPERTUSSIS Y B. PERTUSSIS

D Hozbor, D Bottero, M Gaillard, A Errea, G Moreno, E Zurita, L Pianciola, M Rumbo. XIII Congreso Argentino de Microbiología 2013 y II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental 2013

9- "Descripción de la epidemiología de Coqueluche en Argentina a partir de las notificaciones realizadas al SNVS-SIVILA durante el período 2008 -2012" Primer Simposio de Vigilancia 12-13 de Noviembre de 2013.

PRESENTACIÓN ORAL. Dra. Daniela Hozbor

10- Participación como oradora en la Mesa Redonda "Enfermedades respiratorias bacterianas y virales" Tema: "Enfermedades Composición vacunal para Coqueluche y caracterización laboratorial de la cepas circulantes". Primer Simposio de Vigilancia 12 y 13 de noviembre de 2013, en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Internacionales.

1. Epidemiología Descriptiva de la Internación por Coqueluche. Uriarte, V., Agosti, M., Bettioli, M., Garcia M., Hozbor, D., y Gonzalez Ayala S. III Congreso Internacional de Infectología Pediátrica y Vacunas. Buenos Aires 18 y 19 de Abril 2012.

2. Coqueluche en Argentina: Descripción de la situación epidemiológica durante el periodo 2008-2011. Flores, D., Lara, C., Giovacchini, C., Fiori, S., Sorhuet, C., Pianciola, L, Ruggeri, D., Antman J., Zurita, E., Mazzeo, M., Galas, M., Sagradini, S., Vizotti, C., Echenique, H., y Hozbor, D. III Congreso Internacional de Infectología Pediátrica y Vacunas. Buenos Aires 18 y 19 de Abril 2012.

3. Epidemiología Descriptiva de Casos de Coqueluche causada por Bordetella parapertussis. Pianciola, L., Bottero, D., Mazzeo, M., Flores, D., Navello M., y Hozbor, D. III Congreso Internacional de Infectología Pediátrica y Vacunas. Buenos Aires 18 y 19 de Abril 2012.

4. Coqueluche, situación actual. Coordinadora de mesa redonda. III Congreso Internacional de Infectología Pediátrica y Vacunas. Buenos Aires 18 y 19 de Abril 2012.

5- XII Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Infectología, SADI 2012 16, 17 y 18 de mayo de 2012. Disertante: Mesa Redonda: B. pertussis: una realidad cambiante
Diagnóstico.

6- Lower protective capacity of Bordetella pertussis fimbriae 3 compared to fimbriae 2", Castuma C and Hozbor D, reference 0106 has been accepted for poster presentation at the 10th International Symposium on Bordetella. Dublin Irlanda. Septiembre 2013

7- Pertussis Epidemiology in Argentina, Trends over 1969-2012", Darío Flores, Silvana Fiori, Laura Basile, Daniela Bottero, Luis Pianciola, Claudia Lara, María Emilia Gaillard, Marcelo Galas, Mabel Regueira, Diego Ruggeri, Cecilia Sorhouet Daniela Hozbor, reference 0059 has been accepted for poster presentation at the 10th International Symposium. Dublin Irlanda. Septiembre 2013

8- Acellular Pertussis Vaccine Based on Outer Membrane Vesicles Capable of Conferring Both Long-Lasting Immunity and Protection Against Different Strain Genotypes", Emilia Gaillard (1)
Daniela Bottero, Agustina Errea, Maximiliano Ormazabal, Eugenia Zurita, Griselda Moreno, Martin Rumbo, Peter Van der Ley, Arno Van der Ark, Daniela Hozbor, reference 0102 has been accepted for poster presentation at the 10th International Symposium on Bordetella. Dublin Irlanda. Septiembre 2013

9- Pertussis Trends in Neuquén Province, Argentina, between 2004 and 2012", Luis Pianciola, Melina Mazzeo, Darío Flores, Silvana Fiori, Mariano Navello, Eugenia Zitta, Constanza Müller, Daniela Bottero, Daniela Hozbor, reference 0058 has been accepted for poster presentation at the 10th International Symposium on Bordetella. Dublin Irlanda. Septiembre 2013. Dublin Irlanda. Septiembre 2013

10- Stimulated Innate Resistance Event (StIR) in Bordetella pertussis Infection is Dependent on Reactive Oxygen Species Production", Zurita E.1, Moreno G.2, Errea A.2, Ormazabal M.1, Curciarello R.2, Rumbo M2 and Hozbor D1* reference 0090 has been accepted for poster presentation at the 10th International Symposium on Bordetella. Dublin Irlanda. Septiembre 2013

11- Avirulent factors expression on a virulent phenotype background alter the course of Bordetella pertussis infection in the murine model. 10th International Symposium. Dublin Irlanda. Septiembre 2013. Ormazabal M., Castuma C y Hozbor D.

12- Participación del III Workshop Internacional "Teste de Diagnóstico com Qualidade Assegurada e Acessíveis para Programas de Saúde Pública" Curitiba. 30 y 31 de Octubre 2013.

7.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS. *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda.*

Informes bimestrales en el marco del Convenio ANLIS Malbrán UNLP

Informes mensuales sobre situación de coqueluche a la red nacional de pertussis
(visitar pagina www.vacunas-vacsal.org.ar)

8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

8.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS. *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.*

Responsable del Diagnóstico de Bordetella (agente causal de la tos convulsa) mediante la técnica de PCR sobre muestras de pacientes pediátricos y sus contactos.

Provincia de Buenos Aires - Nación

Participación activa en la transferencia tecnológica y el apoyo a las investigaciones relacionadas con la Tos Convulsa o Coqueluche y el desarrollo de investigaciones de campo 2004- actual. Trabajos de Extensión.

Proyecto de extensión "Desarrollo e implementación del diagnóstico, caracterización y vigilancia laboratorial de Bordetella spp. Aprobado por la FCE-UNLP desde Dic. 2004 hasta la fecha

Responsable: Dra. Daniela Hozbor

Objetivos generales: Fortalecimiento de la vigilancia activa de Bordetella pertussis en el componente de laboratorio

Objetivos específicos:

- a) Fortalecimiento del Laboratorio Nacional de Referencia para el diagnóstico y caracterización del microorganismo causante de Coqueluche
- b) Fortalecimiento de laboratorios jurisdiccionales que participarán de la vigilancia activa
- c) Desarrollo metodológico aplicado a la epidemiología molecular para la vigilancia de Bordetella spp
- d) Propuesta e implementación de un sistema de control de calidad de las pruebas de laboratorio

1- Transferencia técnico Académica a Ministerio de Salud de La Rioja (Septiembre 2012). Diagnóstico, caracterización y vigilancia laboratorial de Bordetella pertussis: Revisión y Mejoramiento. Dra.Daniela Hozbor.

2- Transferencia técnico Académica a Ministerio de Salud Chubut (Noviembre 2012). Diagnóstico, caracterización y vigilancia laboratorial de Bordetella pertussis: Revisión y Mejoramiento. Dra.Daniela Hozbor.

3- Transferencia técnico Académica a Ministerio de Salud Rio Gallegos (Noviembre 2012). Diagnóstico, caracterización y vigilancia laboratorial de Bordetella pertussis: Revisión y Mejoramiento. Dra.Daniela Hozbor.

4- Transferencia de la experiencia del trabajo en forma de red en pertussis o coqueluche a profesionales del Ministerio de Salud de Chile. Reunión Abril 2013.

8.2 PATENTES O EQUIVALENTES. *Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.*

Patente: "Vacuna para la prevención de infecciones con Bordetella". Bottero, D., Gaillard, ME, Zurita, E., Ormazabal M., Errea, A., Moreno G, Rumbo M y Hozbor D. INPI el día 27/03/2013 Expediente 20130101023 en trámite

Patente internacional: VACCINES FOR THE PREVENTION OF INFECTIONS WITH BORDETELLA. Submission Number: 060143 Application Number: PCT/IB2014/060143

Date of Receipt: 25 March 2014 Receiving Office: International Bureau of the World Intellectual Property Organization

8.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO. *Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.*

8.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES *(desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.).*

He participado activamente en la instalación de una plataforma de experimentación en ratones en nuestra facultad (Bioterio). A través de los subsidios ganados hemos adquirido equipamiento de gran envergadura como los son: jaulas con aire filtrado individual, cabinas de flujo laminar, autoclave de doble entrada, sistema de aire filtrado y control de temperatura. El objetivo de la misma es brindar las capacidades en ella incluidas no solo a profesionales de nuestra institución sino de otras instituciones tanto públicas y privadas de otras de forma garantizar la obtención de resultados de precisión y calidad.

8.5 Sugiera nombres (e informe las direcciones) de las personas de la actividad privada y/o pública que conocen su trabajo y que pueden opinar sobre la relevancia y el impacto económico y/o social de la/s tecnología/s desarrollada/s.

Mariana Berenstein Vinculación tecnológica CONICET

Alejandro Costa Ministerio de Salud de La Provincia de Buenos Aires

9. SERVICIOS TECNOLÓGICOS. *Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.*

10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

10.1 DOCENCIA

10.2 DIVULGACIÓN

11. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES. *Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.*

2010-actual	CONICET	Becario Doctoral	Maximiliano Ormazabal
2010-actual	CONICET	Becaria Doctoral	Eugenia Zurita
2013-actual	CONICET	Becaria Doctoral	Erika Bartel

Co dirección de becarios acreditados

2012 –actual Pablo Pesco, Becario doctoral ANPCYT
2008- 2014 Noelia Olivera tesista doctoral

Investigadores
Dra María Emila Gaillard CONICET
Dra. Paula Bergero CONICET

12. DIRECCION DE TESIS. *Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.*

Tesis en ejecución

2010-actual	CONICET	Becario Doctoral	Maximiliano Ormazabal
2010-actual	CONICET	Becaria Doctoral	Eugenia Zurita
2013-actual	CONICET	Becaria Doctoral	Erika Bartel

2012 –actual Pablo Pesco, Becario doctoral ANPCYT
Tesis finalizadas

Apellido y Nombres: Noelia Olivera

Universidad: Universidad Nacional de La Plata.

Tema: "PROTEÍNAS RECOMBINANTES ÚTILES PARA LA PREVENCIÓN DE LA INFECCIÓN POR BORDETELLA PERTUSSIS" Defensa: 29 de Abril de 2014.
Calificación: sobresaliente diez (10)

13. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS. *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

Idem títulos incluidos en el punto 7.5

1- O4 (203) Genotipificación de aislamientos clínicos de Bordetella pertussis circulantes en nuestro país en los últimos 10 años. L Basile, D Bottero, D Flores, ME Gaillard, S Fiori, S Zurita, C Castuma, D Hozbor VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas – SADEBAC Ciudad de Buenos Aires del 26 al 30 de Junio 2012

2. P170 (205) Resurgencia de coqueluche en Argentina: caracterización temporal de la sintomatología de los pacientes menores de 1 año edad. D Flores, S Fiori, D Bottero, C Lara, L Pianciola, L Basile, M Ormazabal, C Sorhouet, D Ruggeri, M Galas, D Hozbor. VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas – SADEBAC Ciudad de Buenos Aires del 26 al 30 de Junio 2012

3- Characterization of the stimulated innate resistance event (StiR) in Bordetella pertussis Infection. Zurita, E., Errea A., Moreno G., Ormazabal M., Rumbo M., and Hozbor D.

VIII Congreso Microbiología General. 4-6 de Julio 2012. Mar del Plata

4- Defining biotechnological parameters for new pertussis acellular vaccine. Gaillard ME., Bartel E., Zurita E., Rumbo M., and Hozbor D
VIII Congreso Microbiología General. 4-6 de Julio 2012. Mar del Plata

5- Higher protection levels of Fim2 from Bordetella pertussis in the murine model of infection.
Castuma C., Gaillard ME., Graieb A and Hozbor D.
VIII Congreso Microbiología General. 4-6 de Julio 2012. Mar del Plata

6-Rol de las especies reactivas a oxígeno en la protección contra el agente causal de la tos convulsa, Bordetella pertussis. ZURITA, MARIA EUGENIA; MORENO, GRISELDA; ERREA, AGUSTINA; RUMBO, MARTIN; HOZBOR, DANIELA . Otro.
Congreso. LVII Reunion anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica- LX Reunion Científica anual de la Sociedad argentina de Inmunología. . 2012 - .

7- CEPAS VACUNALES Y AISLAMIENTOS CLÍNICOS ARGENTINOS DE BORDETELLA PERTUSSIS: DIFERENCIAS GENOTÍPICAS Y PROTEOMICAS.
D Bottero, D Gaillard, L Basile, D Hozbor. XIII Congreso Argentino de Microbiología 2013 y II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental 2013

8- VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA DERIVADAS DE BORDETELLA PARAPERTUSSIS COMO UNA VACUNA ACELULAR CONTRA LA INFECCIÓN POR B. PARAPERTUSSIS Y B. PERTUSSIS
D Hozbor, D Bottero, M Gaillard, A Errea, G Moreno, E Zurita, L Pianciola, M Rumbo.
XIII Congreso Argentino de Microbiología 2013 y II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental 2013

9- "Descripción de la epidemiología de Coqueluche en Argentina a partir de las notificaciones realizadas al SNVS-SIVILA durante el período 2008 -2012" Primer Simposio de Vigilancia 12-13 de Noviembre de 2013.
PRESENTACIÓN ORAL. Dra. Daniela Hozbor

10- Participación como oradora en la Mesa Redonda "Enfermedades respiratorias bacterianas y virales" Tema: "Enfermedades Composición vacunal para Coqueluche y caracterización laboratorial de la cepas circulantes". Primer Simposio de Vigilancia 12 y 13 de noviembre de 2013, en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Internacionales.

1. Epidemiología Descriptiva de la Internación por Coqueluche. Uriarte, V., Agosti, M., Bettioli, M., Garcia M., Hozbor, D., y Gonzalez Ayala S. III Congreso Internacional de Infectología Pediátrica y Vacunas. Buenos Aires 18 y 19 de Abril 2012.

2. Coqueluche en Argentina: Descripción de la situación epidemiológica durante el periodo 2008-2011. Flores, D., Lara, C., Giovacchini, C., Fiori, S., Sorhuet, C., Pianciola, L, Ruggeri, D., Antman J., Zurita, E., Mazzeo, M., Galas, M., Sagradini, S., Vizotti, C., Echenique, H., y Hozbor, D. III Congreso Internacional de Infectología Pediátrica y Vacunas. Buenos Aires 18 y 19 de Abril 2012.

3. Epidemiología Descriptiva de Casos de Coqueluche causada por Bordetella parapertussis. Pianciola, L., Bottero, D., Mazzeo, M., Flores, D., Navello M., y Hozbor, D. III Congreso Internacional de Infectología Pediátrica y Vacunas. Buenos Aires 18 y 19 de Abril 2012.

4. Coqueluche, situación actual. Coordinadora de mesa redonda. III Congreso Internacional de Infectología Pediátrica y Vacunas. Buenos Aires 18 y 19 de Abril 2012.

5- XII Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Infectología, SADI 2012 16, 17 y 18 de mayo de 2012. Disertante: Mesa Redonda: B. pertussis: una realidad cambiante

Diagnóstico.

6- Lower protective capacity of Bordetella pertussis fimbriae 3 compared to fimbriae 2", Castuma C and Hozbor D, reference 0106 has been accepted for poster presentation at the 10th International Symposium on Bordetella. Dublin Irlanda. Septiembre 2013

7- Pertussis Epidemiology in Argentina, Trends over 1969-2012", Darío Flores, Silvana Fiori, Laura Basile, Daniela Bottero, Luis Pianciola, Claudia Lara, María Emilia Gaillard, Marcelo Galas, Mabel Regueira, Diego Ruggeri, Cecilia Sorhouet Daniela Hozbor, reference 0059 has been accepted for poster presentation at the 10th International Symposium. Dublin Irlanda. Septiembre 2013

8- Acellular Pertussis Vaccine Based on Outer Membrane Vesicles Capable of Conferring Both Long-Lasting Immunity and Protection Against Different Strain Genotypes", Emilia Gaillard (1)

Daniela Bottero, Agustina Errea, Maximiliano Ormazabal, Eugenia Zurita, Griselda Moreno, Martin Rumbo, Peter Van der Ley, Arno Van der Ark, Daniela Hozbor, reference 0102 has been accepted for poster presentation at the 10th International Symposium on Bordetella. Dublin Irlanda. Septiembre 2013

9- Pertussis Trends in Neuquén Province, Argentina, between 2004 and 2012", Luis Pianciola, Melina Mazzeo, Darío Flores, Silvana Fiori, Mariano Navello, Eugenia Zitta, Constanza Müller, Daniela Bottero, Daniela Hozbor, reference 0058 has been accepted for poster presentation at the 10th International Symposium on Bordetella. Dublin Irlanda. Septiembre 2013. Dublin Irlanda. Septiembre 2013

10- Stimulated Innate Resistance Event (StIR) in Bordetella pertussis Infection is Dependent on Reactive Oxygen Species Production", Zurita E.1, Moreno G.2, Errea A.2, Ormazabal M.1, Curciarelo R.2, Rumbo M2 and Hozbor D1* reference 0090 has been accepted for poster presentation at the 10th International Symposium on Bordetella. Dublin Irlanda. Septiembre 2013

11- Avirulent factors expression on a virulent phenotype background alter the course of Bordetella pertussis infection in the murine model. 10th International Symposium. Dublin Irlanda. Septiembre 2013. Ormazabal M., Castuma C y Hozbor D.

12- Participación del III Workshop Internacional "Teste de Diagnóstico com Qualidade Assegurada e Acessíveis para Programas de Saúde Pública" Curitiba. 30 y 31 de Octubre 2013.

14. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*

15. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO. *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

26- PPL-2011-2-0009 Plataforma proteómica CEQUIBIEM-Centro de estudios químicos y biológicos por espectrometría de masa. Área Proteómica y Biología Estructura IR Silvia Moreno de Colonna IR Nodo purificación de proteínas Dra. Daniela Hozbor. Monto total del proyecto pesos 5. 278.000

27- PICT 2012 2719 Nuevas vacunas multicomponentes contra los agentes causales de la tos convulsa: diseño y caracterización funciona. IR: Dra. Daniela Hozbor Monto: 329.680 pesos

16. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO. *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*

17. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

18. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA. *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*

- Evaluador proyectos Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. 2012 PICT

- Evaluadora Externa disciplinaria en el marco del proceso de Categorización efectuada por la Resolución Conjunta SPUN|1 y SACT N1 del 12 de enero del 2009 en el Area de Medicina, Odontología y Ciencias de la Salud. Buenos Aires 5 y 6 de Julio 2011

- Evaluación Proyectos de Investigación National Science Center, Poland Abril 2013 Funding scheme OPUS, Analysis of the potential use of Campylobacter jejuni outer membrane vesicles (OMVs) for the immunization of chickens., dr Renata Alicja Godlewska, University of Warsaw, No. 203559, Panel NZ6

- Evaluación Proyectos de Investigación National Science Center, Poland Octubre 2013 Funding scheme OPUS, Evaluation of epidemic potential of Bordetella pertussis strains in conditions of waning immunity as a possible reason of pertussis vaccination., dr hab. Anna Lutyńska, National Institute of Public Health- National Institute of Hygiene (NIPH - NIH), No. 223624, Panel NZ7

- Evaluación Proyectos de Investigación National Science Center, Poland Octubre 2013 Funding scheme PRELUDIUM, Endosomal-like pre-processing of oligosaccharides isolated from Bordetella pertussis lipooligosaccharide - structure and immunogenicity., mgr Sabina Dorota Koj, No. 223346, Panel NZ6

- Evaluadora Externa Proyectos INTA 2013 Biotecnología

- Evaluadora de Ingreso a Carrera del Investigador CONICET 2012

- Evaluadora de Promoción a Carrera del Investigador CONICET 2013

- Evaluadora Resúmenes XIII Congreso Argentino de Microbiología. 23 al 26 de septiembre de 2013, Palais Rouge, Buenos Aires, Argentina

- Evaluadora de dos proyecto FOCANLIS 2013
- Revisor Científico del Journal Vaccine Manuscript Number JVAC-D-13-01091R1
- Evaluadora Proyectos PICT 2013: 3 proyectos en total
- Evaluadora resúmenes presentados al SIMPOSIO NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA. Ciudad de Buenos Aires durante los días 12 y 13 de Noviembre de 2013
- Revisora científica del manuscrito # EID-13-1478 del Emerging infectious disease Noviembre 2013
- Revisora científica del manuscrito # mic/2013/074690 del Microbiology Noviembre 2013
- Revisora científica del manuscrito enviado a la Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública (www.ins.gob.pe/rpmesp), diciembre 2013
- Evaluadora PICT 2013-0109
- Revisora científica del manuscrito # EID-13-1478.R1 del Emerging infectious disease Diciembre 2013
- Evaluadora PICT 2013 1017
- Evaluadora Proyecto Salud Investiga Ministerio de Salud de La Nación. 2014. N°1268
- Evaluadora Proyecto Salud Investiga Ministerio de Salud de La Nación. 2014. N°1485
- Evaluadora Proyecto Salud Investiga Ministerio de Salud de La Nación. 2014. N°1500
- Evaluadora Proyecto Salud Investiga Ministerio de Salud de La Nación. 2014. N°1560
- Revisora científica del manuscrito # Number JVAC-D-14-00118. Marzo 2014
- Evaluadora Postulación Beca UNLP BECA TIPO "A" 2014
- Evaluadora proyectos PIP GRUPO INVESTIGACIÓN PIP 2014-2016 GI
- Evaluadora proyecto PROYECTOS UBACYT 2014-2017 GC
- Evaluadora proyecto UBACYT 2014-2017 Grupos En Formación.
- Revisora Científica de Manuscript ID ERV-2014-0054 for Expert Review of Vaccines Abril 2014
- Revisora Científica del ms IAI01846-14 Abril 2014
- Revisora Científica del ms ERV-2014-0074 for Expert Review of Vaccines Mayo de 2014

- Editora Académica de la revista Plos One 2011-presente. Número de Artículos en los que he actuado como editora académica: 65

19. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO. *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*

Cargo: Profesor Adjunto

Dedicación: Exclusiva

Cátedra: Area de Biotecnología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Asignaturas: Bioquímica I para las carreras de Bioquímica, Biotecnología y Tecnología de Alimentos (primer semestre) y Química Biológica para las carreras de Farmacia y Tecnología del Medio Ambiente (segundo semestre). Periodicidad: Julio 2004 al presente (por concurso ordinario). Dedicación: 8 horas semanales frente a alumnos y 4 horas semanales para consultas y elaboración y corrección de exámenes parciales y finales.

Docente Invitada en la Carrera de Especialización en Bioquímica Clínica y por la Carrera de Especialista en Bacteriología del departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Tema: Infección por Bordetella pertussis. 14 de Noviembre 2012 Hospital de Clínicas José de San Martín. Buenos Aires

Disertante en la Roundtable Meeting of the Global Pertussis Initiative (GPI) entitled Can Control of pertussis be Improved by New Vaccines? 25-27 January 2013 en París Francia. Tema: nuevos antígenos y cepas para nuevas vacunas.

Disertante sobre Coqueluche en el Ateneo Central del servicio de Pediatría del Hospital Posadas, realizado el 3 de Octubre del 2013.

Docente de la Maestría en Microbiología Molecular. Centro Nacional de Redes de Laboratorio ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" Av. Vélez Sársfield 563. 4 de Septiembre 2012.

20. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES. *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*

21. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO. *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

Este proyecto fue presentado en la convocatoria ANPCyT 2012 y en la actualidad está siendo financiado por dicha institución. Código del proyecto: PICT 2012 2719

DESCRIPCIÓN TÉCNICA

TÍTULO DEL PROYECTO: Nuevas vacunas multicomponentes contra los agentes causales de la tos convulsa: diseño y caracterización funcional.

GRUPO RESPONSABLE

Investigador responsable: Dra. Daniela Hozbor
 Integrante del grupo responsable: Dra. Daniela Bottero, Dra. María Emilia Gaillard
 Integrantes: Dr. Martín Rumbo, Dra Griselda Moreno, Dra Agustina Errea, Dra Laura Basile, Dra. Celina Castuma, Eugenia Zurita y Maximiliano Ormazabal

INSTITUCIÓN BENEFICIARIA

Facultad de Ciencias Exactas. UNLP
 Nombre del representante: Dra. Graciela De Antoni. Decana

Palabras clave: Vacunas bacterianas, Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis, resurgencia, polimorfismos, factores de virulencia

Abreviaturas: AN: aspirado(s) nasofaríngeo(s); CV: cepa(s) vacunal(es); LPS: lipopolisacárido; ORF: marco(s) de lectura abierto(s); PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida; PBC: población bacteriana circulante; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; Prn: pertactina; PT: toxina pertussis; SDS: dodecil sulfato de sodio.

OBJETIVOS GENERALES: Objetivos Generales e impacto: Identificar el problema general en estudio, contextualizar el problema a nivel local, identificar que parte del problema se intenta abordar /contribuir con la investigación.

Durante la mayor parte de la historia humana, las enfermedades infecciosas constituyeron la principal causa de muerte, aparte de las ocasionadas por la guerra. Con la invención de las vacunas (Jenner 1789, Pasteur, 1886), por un momento pareció haberse derrotado a las enfermedades infecciosas, sin embargo y a pesar de ello, aún quedan dolencias de vieja data por controlar y/o erradicar. Una de ellas es pertussis, tos convulsa o coqueluche, que es una enfermedad infecciosa aguda de las vías respiratorias causada principalmente por Bordetella pertussis y también por B. parapertussis. Esta enfermedad no sólo no se ha podido erradicar, pese al uso masivo de vacunas desde los años cincuenta, sino que en la actualidad ha resurgido [1-6],. Para ejemplificar esta situación epidemiologica de resurgencia basta con revisar los números de casos de pertussis registrados en los últimos años en distintos países, incluida Argentina. En Estados Unidos y en particular en el estado de California el número de casos notificados en el 2010 fue de 9.477 casos, el más alto en 65 años desde 1945, cuando se registró un total de 13.492 casos [7]. La enfermedad está fuertemente presente no sólo en dicho estado sino también en otros estados como Washington, donde en este año (2012) se está registrando un brote fuera de escala con más de 1.300 casos, la mayoría de ellos (72%) en menores de 13 años. Argentina no es ajena a esta situación ya que viene registrando un aumento sostenido de casos desde el año 2002, con brotes de gran envergadura en diferentes provincias [8]. En particular en el año 2011 se registró un brote epidémico en todo el país con más de 8.300 casos notificados y 70 muertes en niños menores de 6 meses de edad (www.snvs.msal.gov.ar). Particularmente, nuestro laboratorio como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR), ha contribuido a este registro realizando los test diagnósticos específicos sobre más de 15.000 muestras clínicas, obteniendo resultados positivos que fueron incrementandose año tras año [8]. Desde el año 2004 hemos trabajado fuertemente en establecer una red nacional de vigilancia laboraral y gracias a ello se ha mejorado el conocimiento de la situación epidemiológica en nuestro país (informes

sobre situación epidemiológica pueden encontrarse en nuestra página web www.vacunas-vacsal.org.ar en la solapa de LNR). Gracias al trabajo conjunto con hospitales, secretarías de salud, Ministerios Provinciales y Nacionales hemos podido observar que al grupo de alto riesgo constituido por niños menores de 1 año de edad se le han sumado niños escolares, adolescentes y adultos que actuarían además como reservorio y agentes de transmisión de la enfermedad. Detectamos además la circulación de *B. parapertussis* en niños y adolescents [9].

Esta situación epidemiológica de pertussis por demás preocupante ha obligado a la comunidad científica, junto a otros profesionales de la salud, a focalizar sus actividades en pos de comprender esta nueva situación, identificar sus posibles causas y revisar e implementar nuevas estrategias para el control de la enfermedad. Respecto de las causas que podrían explicar la resurgencia de la enfermedad ya se han propuesto varias, la mayoría de ellas asociadas a las vacunas actualmente en uso (vacunas celulares y vacunas acelulares o de componentes): relativa baja efectividad de las mismas obligando a aplicaciones de varias dosis (inclusive en adultos) y metas de coberturas altas (más del 90%) ; corta duración de la inmunidad conferida por las vacunas y adaptación de la población bacteriana circulante a huéspedes inmunizados [7, 10-15]. En relación a este último aspecto se ha determinado que *B. pertussis* ha evolucionado en lapsos de tiempo de 6 a 19 años, a través de mutaciones puntuales que impactan, significativamente en la estructura de la población bacteriana circulante [16]. Nuestros resultados y los de otros autores sugieren que las nuevas variantes de los antígenos afectados por estas mutaciones, la adhesina pertactina, la toxina pertussis y las fimbrias; se presentan como candidatos noveles a ser considerados en nuevas formulaciones destinadas a mejorar la situación epidemiológica de pertussis [14, 17].

Teniendo en cuenta todo este contexto y con el fin de contar con una herramienta adicional para el control de pertussis, nuestro laboratorio ha desarrollado una nueva vacuna acelular en el marco del Proyecto PAE VacSal (ANPCyT). Esta nueva formulación acelular se ha obtenido a partir de componentes de membrana de *B. pertussis* y ha resultado ser no sólo inmunogénica sino también protectora y biosegura en el modelo de desafío intranasal en ratones aceptado [18-20]. En este punto es importante aclarar que las formulaciones acelulares son las únicas recomendadas para la población adolescente-adulta pudiendo emplearse también en la población pediátrica. En la actualidad nuestro país ha incluido dentro del Calendario Nacional de Vacunación, un nuevo refuerzo del componente pertussis para la población de 11 años y el personal de salud. Más aún, en el año 2012 se ha recomendado la vacunación con vacunas acelulares en mujeres embarazadas luego de la semana 20 de gestación (<http://www.msal.gov.ar/index.php/programas-y-planes/184-calendario-nacional-de-vacunacion-2012>). La vacuna que actualmente se emplea para cubrir los requerimientos del calendario nacional de vacunación en adolescentes y adultos se importa en su totalidad y consiste en una formulación que contiene Tétanos (T), Difteria (dosis para adultos d) y Pertussis (dosis para adultos y en formato acelular ap) y se designa Tdap. En la formulación de este tipo de vacuna se emplean componentes proteicos de pertussis obtenidos de cultivos de cepas vacunales aisladas en su mayoría en los años cincuenta. Estos aislamientos antiguos, no contienen ninguno de los antígenos con las mutaciones actuales antes descritas. Más aún, ninguna de estas formulaciones contienen componentes contra el otro agente causal, *B. parapertussis*, sobre el que se está reportando en nuestro país y otros un aumento de su incidencia [9, 21].

Ante la necesidad de desarrollar mejores herramientas de control para pertussis, en esta presentación proponemos incorporar a nuestra formulación novel no sólo las variantes alélicas características de la población de *B. pertussis* actualmente circulante en nuestro país sino también componentes de la otra especie que también causa la patología, *B. parapertussis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Identificar los Objetivos específicos relacionados con el problema que se abordará. Describir la hipótesis de trabajo y como se abordará el problema en cuestión a través de la experimentación y estudio.

Hipótesis de trabajo:

La incorporación de distintos serotipos y nuevas variantes alélicas de los inmunógenos protectores de *B. pertussis* y de componentes específicos de *B. parapertussis* en una formulación vacunal acelular novel, permitirá la obtención de una vacuna de eficacia mejorada contra la población bacteriana circulante con potencialidad de mejorar la situación epidemiológica de pertussis local.

En el marco de esta hipótesis abordaremos dos estrategias experimentales para modificar la formulación vacunal basada en vesículas de membrana externa (OMVs) ya desarrolladas por nosotros (Instituto Nacional de la Propiedad Intelectual P070104765. 2007, patente en trámite). Por un lado proponemos modificar, mediante herramientas de ingeniería genética, la cepa *B. pertussis* PagL a partir de la cual obtenemos dicha formulación. Por otro lado y con la experiencia ya adquirida obtendremos OMVs de *B. parapertussis* para caracterizar su poder protectorio.

Bases para la modificación de la cepa *B. pertussis* PagL. Específicamente construiremos una cepa recombinante de *B. pertussis* capaz de expresar simultáneamente los alelos *prn1* y *prn2* y los serotipos FIM2 y FIM3. La cepa *B. pertussis* PagL expresa el alelo *prn1* y el serotipo FIM2 por lo que proponemos adicionar el alelo predominante en la población bacteriana circulante *prn2* y un serotipo más del antígeno vacunal fimbria, la Fimbria 3. En el contexto de adaptación de la población bacteriana circulante a huéspedes inmunizados, la incorporación de componentes propios de la población bacteriana circulante a nuestra formulación acelular novel podría ser una opción válida a la hora de diseñar mejoras en las estrategias de control de pertussis. Más aún, en lo que se refiere a la producción de vacunas bacterianas, la Organización Mundial de la Salud recomienda el desarrollo regionalizado de vacunas en base a las situaciones locales específicas.

Con esta estrategia, lograríamos obtener una nueva vacuna formulada a base de las OMVs, pero con un procedimiento que partiría de una única cepa (*B. pertussis* PagL PRN1,2 FIM2,3). Esto traería ventajas biotecnológicas ya que implicaría trabajar con un solo cultivo y un solo procedimiento downstream empleando metodologías experimentales prácticamente ya establecidas para la cepa parental (*B. pertussis* PagL). A lo sumo requeriremos de unos pequeños ajustes, pero nos evitaremos el trabajar con dos cepas de *B. pertussis* (cada una expresando ciertos alelos y serotipos).

Incorporación de componente de *B. parapertussis* a la formulación basada en OMVs. Obtendremos OMVs de *B. parapertussis* para caracterizar su poder protectorio. Identificaremos mediante el empleo de estrategias proteómica comparativa los componentes diferenciales de *B. parapertussis* relevantes en la protección y evaluaremos la necesidad de incorporar las vesículas completas de *B. parapertussis* o parte de ellas, a las formulaciones de OMVs de *B. pertussis*. Para realizar la estrategia proteómica comparativa trabajaremos con geles 2D asociados a espectrometría de masa del tipo MALDI TOF. Identificaremos los spots diferenciales basándonos en el conocimiento de la secuencia de los genoma de *B. pertussis* y *B. parapertussis*. Validaremos las diferencias detectadas por ensayos de transcripción reversa. A partir de la secuencia de los candidatos así confirmados, diseñaremos primers para clonar,

expresar y purificar a las potenciales proteínas vacunales. Se analizará el poder inmunogénico del candidato seleccionado mediante ensayos *ex vivo* e *in vivo* empleando el modelo de desafío intranasal en ratones. En base a los resultados que se obtengan evaluaremos la necesidad de incorporarlos a la OMVs de *B. pertussis* siguiendo metodologías de ingeniería genética como las que emplearemos para expresar los distintos alelos de *prn*.

Para el logro de estos objetivos trabajaremos con metodologías de Bioquímica, Biología Molecular, Inmunología y de Biología de Sistemas ya puestas a punto por nuestro grupo véanse las referencias [14, 18, 20, 22-25]

Con el desarrollo de esta propuesta esperamos contar con una formulación novel con potencialidad de controlar no sólo a la enfermedad provocada por *B. pertussis* sino también por *B. parapertussis*, otra especie del género con relevancia epidemiológica.

RELEVANCIA DEL PROBLEMA Desarrollar la importancia e impacto a nivel local, general y para la especialidad del problema, los objetivos y el conocimiento que se generará. Describir antecedentes, avances y el estado del arte – búsqueda bibliográfica actualizada -.

La estrategia más efectiva y versátil para prevenir una enfermedad infecciosa es la inmunización o vacunación [12]. Pese a que el comienzo del uso de las vacunas data del siglo XVIII y XIX (Jenner 1798, Pasteur 1886) aún hoy se necesitan mejorar las formulaciones existentes e incluso desarrollar nuevas vacunas contra enfermedades de elevada morbi-mortalidad frente a las cuales no existen medidas preventivas ni terapéuticas eficaces. Durante el siglo XX y comienzos del XXI el diseño de vacunas ha incorporado con grandes expectativas metodologías nuevas como la tecnología del ADN recombinante para producir vacunas de componentes y el uso de la tecnología proteómica y de la genómica que se inicia con el conocimiento de la secuencia del genoma del patógeno y el análisis *in silico* [26]. Estas metodologías o una combinación de ellas deben ser explotadas en su máximo punto para lograr formulaciones eficaces contra diversos patógenos que aún constituyen un problema en el área de salud.

Argentina, como el resto del mundo, tiene que vacunar a su población incluyendo las regiones más apartadas e inaccesibles, no sólo con las vacunas existentes sino con formulaciones mejoradas que sean realmente efectivas en el país. Durante muchos años el esquema de vacunación nacional no tuvo modificaciones. Recién en 1998 se comenzaron a incorporar como medida de prevención primaria a vacunas tales como la triple viral, anti-*Haemophilus influenzae* tipo B y anti-hepatitis B (vacunas cuádruple y quíntuple respectivamente). Recientemente se ha incorporado la vacuna acelular Tdap para los adolescentes, personal de salud en riesgo y mujeres embarazadas (última incorporación). La vacuna contra el HPV se ha incluido en el calendario para niñas de 11 años. También se ha incorporado recientemente la vacuna contra el neumococo para combatir la meningitis por este patógeno en niños menores de 1 año.

Dentro del calendario de vacunación nacional, una vacuna que Argentina importa en su totalidad es la vacuna anti-pertussis incluida en formulaciones celulares (dosis pediátricas) o acelulares (dosis para adolescentes y adultos). Si bien el uso de estas formulaciones permitió disminuir la mortalidad y morbilidad de la enfermedad, ninguna de las ellas cumple totalmente con los requerimientos para ser considerada una vacuna óptima, ya sea por la severidad de sus efectos colaterales (vacunas celulares) o por su relativa baja eficacia (vacunas celulares y acelulares) [27-29]. Recientemente se han detectado más inconvenientes asociados a estas formulaciones. Uno de ellos está referido a que estas vacunas están constituidas sólo por componentes de *B. pertussis* y ello parece haber ocasionado un aumento en la incidencia de las otras especies

relacionadas que también pueden provocar enfermedades respiratorias en el hombre [7, 21, 30]. Aquí es importante aclarar que la protección cruzada de *B. pertussis* contra *B. parapertussis* parece ser muy limitada [7, 31]. Otro inconveniente es que las vacunas, tanto celulares como acelulares están constituidas por cepas (cepa vacunal, CV) o componentes que divergen antigénicamente de los de la población bacteriana circulante (PBC). Estas diferencias alélicas entre las CV y las PBC parecerían ser las responsables de disminuir aún más la ya baja eficacia de las vacunas [2, 3, 11, 13, 32-35]. Estas variantes alélicas identificadas sobre inmunógenos con actividad protectora demostrada, como los son la toxina pertussis (PT) y la pertactina (PRN), han sido detectadas en la mayoría de los países incluido el nuestro [8, 14, 24]. La PRN es una proteína de membrana externa cuyos epitopes inmunodominantes y protectores incluyen dos regiones repetitivas denominadas simplemente regiones I y II [10, 36, 37]. Los estudios publicados hasta el momento muestran que la pertactina de *B. pertussis* varía fundamentalmente a nivel de la región I, a partir de la cual se han clasificado las distintas variantes en PRN1, PRN2 y PRN3 [10]. Las variaciones encontradas en los aislamientos obtenidos de pacientes corresponden a PRN2 y PRN3, mientras que los de las CV en uso corresponden a PRN1 o PRN7 [24, 38, 39]

El polimorfismo en PT [40] está restringido principalmente a la subunidad S1 que contiene la actividad tóxica pero también se puede observar en la subunidad S3 y en la secuencia promotora del gen *ptxP* [37, 38]. La variación en S1 ocurre en dos regiones, y en particular, uno de los residuos polimórficos está implicado en la unión a receptores de las células T.

Se ha propuesto que las variaciones observadas tanto en PRN como PT se deben a una presión de selección inmune ejercidas por las vacunas. Aún no ha sido esclarecida la relevancia del polimorfismo de la subunidad S1 de la PTx, pero la variación antigénica de PRN podría contribuir a la inmunoevasión bacteriana y a la persistencia de *Bordetella* en la población [38]. Resultados publicados por nuestro grupo agregan sustento a esta hipótesis al demostrar que la fagocitosis y muerte de *B. pertussis* sólo tienen lugar si hay anticuerpos opsonizantes en el sitio de infección y que los anticuerpos anti-PRN se comportan como opsoninas [22, 41, 42]. Más aún, los anticuerpos anti PRN reconocen específicamente la región polimórfica I y cualquier cambio en esta secuencia impactará en el reconocimiento cruzado.

De manera interesante hemos detectado no solo que el 92% de los aislamientos obtenidos de hospitales pediátricos poseen variantes alélicas de inmunógenos protectores diferentes a las de la CV (actualmente importada en su totalidad) sino que la proporción de las bacterias que contienen dichos alelos se ha incrementado año tras año desde el año 2000 [43]. Más aún, en nuestro laboratorio empleando el modelo de protección en ratones, hemos podido evidenciar que en el contexto de inmunidad disminuida la divergencia de cepas tiene impacto en la protección disminuyendo aun más la eficacia de las vacunas [14].

Esta situación aquí descrita para Argentina pero observada en otros países parece haber contribuido, al menos en parte, a la resurgencia de la enfermedad detectada en varios lugares del mundo incluidos aquellos con altas coberturas de vacunación [1, 3, 44-46]. En Argentina dicho incremento en el número de casos se viene registrando desde hace varios años (Ministerio de Salud de la Nación y nuestro grupo como Laboratorio Nacional de Referencia para Pertussis, Tabla 1 y Figura 1). Como puede verse en la Figura 1 la mayoría de los casos se registran en los niños más pequeños aunque también se registra un aumento en todos los grupos etáreos.

Ante la preocupante situación y con el objetivo de disminuir sin demoras la carga de enfermedad e incluso la incidencia de pertussis en los más pequeños se ha incluido en varios países la vacunación de los adolescentes por constituir, al menos en parte, la fuente de infección de los infantes [47-49]. Estas medidas resultan de relativa fácil realización porque no requieren de un nuevo desarrollo, sino de la utilización

formulaciones vacunales ya existentes. El término relativo refiere a la implementación de una vacuna ya desarrollada versus el desarrollo de una nueva vacuna y su posterior implementación.

La recomendación de vacunación en adolescentes, sin embargo, no ha sido universalizada como estrategia para disminuir la incidencia de la enfermedad en la población más vulnerable (niños menores de 1 año de edad) ya que es muy reciente su incorporación en los calendarios como para contar con datos suficientes para hacerlo. Solo algunos países han comenzado este año a reportar el impacto de dicha incorporación. En general se está observando que dicha dosis es eficiente en proteger al grupo etario al que se aplica pero no al de los infantes. En acuerdo con estos datos, utilizando un modelo matemático de transmisión de la enfermedad diseñado por nosotros, hemos predicho que la incorporación de la vacuna en adolescentes conlleva a una reducción de la incidencia de la enfermedad en los niños menores de 1 año que no supera el 5% [50].

Los datos presentados aquí muestran claramente la necesidad de mejorar la formulación vacunal para aumentar su eficacia no sólo en términos generales sino en lo que se refiere a su efectividad en Argentina en particular. Bordetella constituye uno de los ejemplos en los que hoy además de aplicar metodologías moleculares convencionales en la identificación de componentes vacunales, se puede ensayar gracias al conocimiento de la secuencia completa de los genomas de las distintas especies, la estrategia proteómica comparativa [14].

Nuestra propuesta ha sido elaborada en base a lo expuesto sobre la problemática existente acerca de la epidemiología y de las estrategias de prevención contra este patógeno reemergente, y a los conocimientos tanto propios del tema como generales de la genómica y la patogénesis. Durante el desarrollo de la misma intentaremos mejorar una formulación novel de probada capacidad protectora en los modelos animales a través de la incorporación de serotipos y alelos propios de la población bacteriana circulante. Identificaremos e incluiremos además nuevos inmunógenos de *B. parapertussis* de forma de lograr una formulación con un espectro más amplio que sirva para proteger a la población de las infecciones que puedan causar no solo *B. pertussis* sino también *B. parapertussis*.

RESULTADOS PRELIMINARES Y APORTES DEL GRUPO AL ESTUDIO DEL PROBLEMA EN CUESTIÓN. Describir con suficiente detalle los resultados ya obtenidos por el grupo, sean publicados o no, que indican la capacidad técnica del grupo y la dedicación previa del grupo para el estudio propuesto.

Desde hace varios años nuestro trabajo se ha focalizado hacia el diseño de nuevas formulaciones vacunales contra pertussis. Este objetivo lo venimos llevando a cabo a través del desarrollo de diferentes líneas de ciencia básica y aplicada ya sea en forma autónoma o interdisciplinaria y en el contexto de la situación epidemiológica de la enfermedad en nuestro país. A continuación presentaremos un breve resumen de las tareas realizadas en el marco de cada una de dichas líneas haciendo mayor énfasis en la que se refiere a el desarrollo de la formulación acelular basada en las OMVs.

a) Establecimiento del perfil epidemiológico de la enfermedad en nuestro país. Este trabajo lo venimos desarrollando como laboratorio Nacional de Referencia de Pertussis en el marco del Convenio ANLIS Malbrán – FCE UNLP y del PAE VacSal-ANPC, en conjunto con Ministerios de Salud, Secretarías y hospitales. Trabajamos en forma de Red de Vigilancia Nacional no solo en el diagnóstico de la enfermedad (más de 2.200 muestras clínicas por año) sino también en la transferencia de tecnologías diagnósticas dentro de nuestro país pero también en otros países latinoamericanos (Ecuador,

Colombia, Venezuela y Perú). Hemos implementado además un programa de aseguramiento de la calidad de las metodologías diagnóstica en los laboratorios que han recibido la capacitación y que funcionan como nodos de diagnóstico regionales. Trabajamos fuertemente en el análisis de datos obtenidos del trabajo de vigilancia epidemiológica no solo profundizar el conocimiento sobre la patología sino para difundir periódicamente las conclusiones a cada efector del sistema de salud (pueden encontrarse informes en la página nuestra www.vacunas-vacsal.org.ar) y referenciar a cada efector dentro del marco de la situación epidemiológica de la patología a nivel nacional. En particular, durante el período 2009 –2011, recibimos como Laboratorio Nacional de referencia 6.624 muestras provenientes de pacientes con sospecha clínica de coqueluche las cuales fueron analizadas mediante técnicas moleculares basadas en PCR y microbiológicas. Del total de muestras recibidas, 5.322 se correspondieron a muestras provenientes de pacientes menores de 1 año de edad pero, al igual que en otros países, se ha comenzado a detectar casos también en la población adolescente adulta. Así año a año en nuestro país se viene registrando un aumento en el número de casos. Para ejemplificar este aumento sostenido basta con revisar los datos del año 2008 y 2011: en el 2008 se notificaron al sistema Nacional de Vigilancia Laboratorial SIVILA 1.181 casos mientras que para el año 2011 el número de casos notificados fue de 8.326. Este trabajo conjunto ha permitido evidenciar la circulación de *B. paraptussis* en nuestra población.

Avanzamos además en un trabajo multidisciplinario sobre el diseño de un modelo de transmisión de la enfermedad que permita en lo posible realizar predicciones. Los resultados alcanzados hasta el momento han sido ya difundidos en un congreso internacional y se ha presentado un trabajo en una revista de la especialidad:

Las publicaciones y presentaciones a congreso se detallan más abajo.

b) Identificación de las posibles causas del aumento de la enfermedad. El trabajo de nuestro laboratorio como LNR y de la interacción con numerosos centros de salud que se ha mencionado en el apartado anterior, nos ha permitido gracias al diagnóstico microbiológico de la enfermedad conformar una colección de aislamientos locales de *B. pertussis*. Así, hemos podido realizar la caracterización molecular de aislamientos propios de nuestra región y la comparación de estos con cepas que se emplean en la producción de vacunas. Asimismo hemos estudiado del rol de la divergencia entre la población bacteriana circulante y las cepas vacunales en la protección. Este trabajo lo estamos desarrollando en el marco del Convenio Anlis Malbrán – FCE UNLP, PICT 2004 26201. PAE PICT 2007, PID2009. Recientemente hemos incorporado dentro de la plataforma metodológica de caracterización de los aislamientos circulantes, la metodología MLST que permite el análisis de los polimorfismos en un número mayor de secuencias. En particular, la secuencia promotora de la toxina pertussis (ptx-p), una secuencia incluida en la secuencia que codifica para la subunidad S1 de la toxina pertussis, una secuencia dentro del gen que codifica para la adhesina pertactina (prn), y secuencias incluidas en los genes de las fimbrias (fim2 y fim3). La genotipificación realizada permitió detectar cambios en las secuencias de ptx-p, prn y fim3. Así durante el período 2002-2004 se detectó la co-circulación de variantes alélicas: del total de los aislamientos estudiados en dicho período (n=17) el 12% presentó la combinación 1-1-A para ptx-p-prn-fim3 respectivamente, el 6% 3-1-A, mientras que los restantes aislamientos resultaron 3-2-B. Para el período 2005-2011 el 84% de las muestras estudiadas (n=62) correspondió al genotipo 3-2-B. El 16% restante presentó el alelo A de fim3 pero mantuvo las variantes alélicas ptx-p3 y prn-2. De los aislamientos conteniendo el alelo A para la fim 3, el 90% fue obtenido durante el año 2011. Los resultados muestran una drástica disminución de la combinación de alelos distinta de 3-2-B en dicho período. Cabe destacar que los aislamientos provenientes del período

1969-2001 (n=19) mostraron las combinaciones 1-1-A (47%), 3-2-B (42%) y 3-2-A (11%). Nuestros resultados muestran que el genotipo predominante que circula en la actualidad en nuestro país es ptx-p3, prn2 y fim3B, el cual se diferencia al del periodo anterior al año 2002 (periodo no epidémico), donde se observaba además la co-circulación de otras variantes alélicas (principalmente ptx-p1, prn1 y fim3A)[43]. Esta variación en los genotipos circulantes ha sido detectada en otros países luego de más de cincuenta años de inmunización masiva con vacuna anti-pertussis. La disminución de la diversidad en las variantes alélicas circulantes para los antígenos protectores toxina pertussis, pertactina y fimbria 3 podría responder a la presión de selección ejercida por las vacunas.

Hemos avanzado además en la caracterización de diferentes cepas vacunales que hoy se incluyen en las vacunas. Los resultados alcanzados han sido incluidos en un artículo que ha sido aceptado para su publicación [51].

c) Caracterización de la interacción bacteria–hospedador. Identificación de componentes bacterianos y caracterización de la respuesta inmune (innata y adaptativa) del huésped frente a infecciones de Bordetella, que se desarrolla en el marco del PAE ANPCYT.

En particular estamos trabajando en el fenómeno denominado protección por estimulación de la respuesta innata (en inglés StIR) que ha sido recientemente descrito para diferentes microorganismos patógenos. Nosotros hemos detectado este fenómeno también en *B. pertussis* empleando como molécula estimuladora de la respuesta innata al Lipopolisacárido (LPS) de *B. pertussis*. Hemos estudiado los posibles mecanismos que desencadenan este fenómeno que permite la eliminación temprana del patógeno. Empleando el modelo de infección intranasal en ratones hemos caracterizado al fenómeno de eliminación bacteriana inducida por el LPS en cuanto a su cinética, la celularidad y el perfil de interleuquinas y quimoquinas inducidas. La rapidez en la que se desencadena el fenómeno nos indujo a pensar que los radicales libres podrían ser responsable al menos en parte de este efecto. Los resultados alcanzados parecen verificar esta hipótesis. En la actualidad estamos repitiendo los ensayos in vivo para confirmarlos. Parte de los resultados alcanzados hasta el momento han sido recientemente publicados y divulgados en congresos. Ver listado más abajo.

d) Identificación de candidatos vacunales, que se desarrolla en el marco del FP6-2004-INCO-DEV-3, PICT 2004 y PAE PICT 2007 29. Hemos desarrollado y caracterizado una formulación acelular constituida por componentes proteicos y no proteicos (patente en trámite Vacuna intranasal para la prevención de las infecciones por Bordetella pertussis, método de inmunización y procedimiento para su preparación. En particular hemos incluido nuestro componente vacunal anti pertussis a los componentes tetánico y difterico para formular una vacuna triple acelular ya que es en este formato como se la utiliza en los calendarios nacionales de vacunación. Con esta formulación hemos realizados ensayos de protección y toxicidad empleando las recomendaciones de la OMS. Los resultados alcanzados han sido altamente satisfactorios. Los mismos consisten en los ensayos preclínicos que deben realizarse durante el desarrollo de una formulación vacunal. Hemos elaborado un informe detallado con todos los datos obtenidos, el cual fue enviado a la ANMAT para su consideración. Parte de los mismos los presentamos a continuación:

Caracterización del candidato vacunal vesículas de membrana externa de *B. pertussis* cepa Tohama fase I CIP8132

Hemos obtenido las OMVs siguiendo la técnica previamente descrita por nosotros. Verificamos identidad, pureza y composición. La identidad y la pureza de las muestras

asi obtenidas fue evaluada mediante observaciones al microscopio electrónico y cultivo en medios específicos. El tamaño medio de las vesículas es de 70 nm con un rango de 40 nm a 100 nm. Estas vesículas solo se obtienen cuando no hay lisis bacteriana. La presencia de componentes propios de la membrana de *B. pertussis* como el lipooligosacárido (LOS) y proteínas como los inmunógenos Adenilato Ciclasa - Haemolisina (AC-Hly) y la toxina pertussis (PT) [19] corroboraron la naturaleza de las vesículas.

Las proteínas que constituyen las vesículas de membrana fueron separadas y detectadas en corridas electroforéticas en dos dimensiones (2D electroforesis). Cuarenta y tres proteínas que constituyen las vesículas se han identificado mediante espectrometría de masa asociada a la 2D electrophoresis [19].

Se han realizado 20 obtenciones de vesículas de membrana externa con el procedimiento antes descrito y en todos los casos los tamaños, la morfología y los inmunógenos de superficie fueron comparables.

La formulación vacunal la realizamos con hidróxido de aluminio como adyuvante (0,2 mg/ml). La detoxificamos con formalina (0,37% a 37°C overnight).

Ensayos de protección en modelo de desafío intranasal

Para inmunización activa empleamos ratones BALB/c hembras de 4 semanas de edad libres de patógenos (Biol SAIC, Argentina). Los ensayos se realizaron en forma comparativa con formulaciones de conocida actividad protectora como lo son las formulaciones conteniendo a la bacteria entera muerta por calor y detoxificada de la misma manera que las vesículas de membrana externa.

Grupos de 15 BALB/c ratones se inmunizaron por vía sistémica i.p. con la vacuna celular formulada a partir de la cepa Tohama fase I CIP8132 en una concentración de 2×10^8 CFU ml⁻¹ o con la formulación a base de las vesículas de membrana externa derivadas de la cepa Tohama fase I CIP 8132, en una concentración de 5 µg. El protocolo de inmunización comprendió un esquema de dos dosis en un período de 2 semanas. Los ratones inmunizados fueron luego desafiados 2 semanas después de la última inmunización por vía intranasal tanto con la cepa de referencia de la Organización Mundial de la Salud, la cepa *B. pertussis* 18323 como con la cepa Tohama fase I CIP8132 en una concentración de (10⁷- 10⁸ CFU 50 µl⁻¹). La evaluación del poder protector de las formulaciones se realizó a través del recuento de bacterias que colonizan los pulmones de los ratones inmunizados y desafiados. Los recuentos se realizaron a las 2 h, 5 días y 8 días luego del desafío. Para ello los pulmones fueron removidos de manera aséptica siguiendo normas adecuadas para el manejo de animales. Estos ensayos se han repetido al menos 6 veces y los resultados representativos se muestran en la Figura. Se presentan la media y las desviaciones estándar calculadas a partir de los valores de las CFU transformados en Log₁₀. La significación de las diferencias entre las medias fueron determinadas mediante el Student's t-tests con un nivel de significancia de $p < 0,05$ level.

Estos ensayos mostraron una diferencia de protección significativa entre los animales que fueron inmunizados con las formulaciones antes descritas en comparación con el grupo control de ratones que fueron tratados solo con un buffer fosfato estéril ($p < 0.001$) (Fig). Una adecuada eliminación de bacterias ($p < 0.005$) en los ratones inmunizados con cualquiera de las dos formulaciones antes descritas. Mientras que en los ratones control el número de bacterias recuperadas al día 8 fueron similares a las recuperadas a las 2 h después del desafío, en los ratones inmunizados con la vacuna a célula entera o la formulada a partir de las vesículas de membrana externa, el número de las bacterias recuperadas en los pulmones al día 5 post desafío disminuyó drásticamente al menos en 4 órdenes de magnitud comparadas con las obtenidas a las 2 h post desafío. Al día 8 se recuperan menos colonias aún en los grupos de ratones

inmunizados con las dos formulaciones (Fig 1). Todos los resultados obtenidos muestran que el poder protector de las OMVs.

Para evaluar la toxicidad del candidato vacunal basado en OMVs se empleó el test de ganancia de peso recomendado por la OMS. Este test involucra el empleo de 8 ratones Balb/c de 15—20 g a los que luego de inmunizar se les evalúa la evolución de sus pesos corporales a lo largo de 7 días. Las vacunas se consideran no tóxicas cuando pasan los siguientes requerimientos de la OMS y EP: (a) el peso de los ratones a los tres días después del tratamiento tiene que ser igual o mayor al del día cero antes de ser tratados (b) a los 7 días post tratamiento el peso promedio de los ratones de cada grupo no debe ser menor del 60% del valor promedio del grupo control no inmunizado (c) durante el periodo que dura el test no deben morir más del 5% de los animales. Los animales son observados durante 7 días registrando los pesos luego de las 16 h, 3 y 7 días post inmunización. Los resultados que se obtuvieron de estos ensayos para la formulación conteniendo las vesículas de membrana externa fueron comparados con los correspondientes a la formulación a base de células enteras y el grupo control tratado con buffer fosfato estéril. Se emplearon cantidades de vesículas que variaron entre 1 y 5 μg de proteínas. En todos los casos los resultados obtenidos mostraron que ambas formulaciones vacunales pasan los criterios de toxicidad para ser consideradas vacunas seguras. En la condición de 5 μg al día 3 post inmunización se observó ganancia de peso que para todos los ratones vacunados, siendo mayor el peso en los ratones vacunados con la vacuna a vesículas. En este grupo la ganancia de peso fue $11 \pm 2\%$, mientras que para la vacuna celular comercial fue de $3 \pm 2\%$ y para la celular formulada en el laboratorio fue de $8 \pm 3\%$. Para el grupo control la ganancia de peso a los 3 días fue de $13 \pm 3\%$.

Los resultados obtenidos muestran a las vesículas de membrana externa como un buen candidato protector y bioseguro. Esta formulación tiene en principio ventajas importantes respecto de las actuales vacunas acelulares ya que las vesículas contienen inmunógenos en estado nativo y un espectro más amplio de los mismos incluyendo algunos con capacidad adyuvante tales como proteínas de membrana externa (OMP) y lipooligosacárido (LOS). Hemos trabajado incluso con cepas que contienen la estructura del LOS alterada de forma de que sean aún más seguras.

En un esfuerzo por diseñar una vacuna acelular contra pertussis aún más segura trabajamos con una cepa de *B. pertussis* que exprese una enzima que modifica la estructura del lípido A del LOS. De esta forma las vesículas de membrana externa contienen un lípido A tetra acilado en lugar de penta acilado. Las modificaciones de este LOS se corroboraron mediante espectrometría de masa del tipo electrospray ESI-MS en el modo de iones negativos.

Los pasos de obtención y caracterización se repitieron exactamente igual para este candidato vacunal que se obtiene de la cepa Tohama PagL. En todos los casos se empleó como control las vesículas provenientes de la cepa parental Tohama fase I y también la cepa parental conteniendo el plásmido vacío pMMB67EH.

Se llevaron a cabo por lo menos 8 repeticiones independientes de los procesos de obtención y caracterización (parte de los resultados alcanzados ya fueron publicados, [18]). En todos los casos se observaron morfología, distribución del tamaño y presencia de inmunógenos de superficie similares entre las tres cepas y entre los ensayos. Estos resultados muestran reproducibilidad e indican que los cambios introducidos en LOS por la expresión de la enzima PagL no afecta a las características estudiadas de las vesículas.

Con el fin de evaluar la capacidad protectora inducida por las vacunas preparadas a partir de B. pertussis Tohama cepa que lleva el pMMB67EH vector recombinante:: pagL se realizaron ensayos en ratones similares a los descritos más arriba. Estos ensayos mostraron una diferencia de protección significativa entre los animales que fueron inmunizados con las formulaciones antes descritas en comparación con el grupo control de ratones que fueron tratados solo con un buffer fosfato estéril ($p < 0.001$). En todos los ratones inmunizados se observaron adecuadas tasas de eliminación bacteriana ($p < 0,001$). En los ratones inmunizados el número de bacterias recuperadas disminuyó por lo menos cinco órdenes de magnitud en relación a las recuperadas de los ratones no inmunizados. Se obtuvieron resultados similares en inmunizaciones intranasales con 3 y con 20 μg . Estos resultados muestran que las vesículas derivadas de la cepa B. pertussis Tohama PagL presentan una actividad protectora similar a la de las derivadas de la cepa parental, no siendo afectada por la expresión de PagL.

Para evaluar la toxicidad del candidato vacunal empleamos el el test de ganancia de peso recomendado por la OMS y descrito en esta presentación. Los resultados obtenidos con la formulación de vesículas de membrana externa obtenidas a partir de la cepa Tohama PagL se compararon con los de las cepas parental y parental conteniendo el vector vacío. Todas las formulaciones utilizadas para la vacunación no produjeron alteración en la curva de aumento de peso, lo que significa que todas las formulaciones resultaron no tóxicas. Con formulaciones conteniendo cantidades altas de vesículas, 20 μg por dosis, el peso de los ratones baja a las 16 h e incluso a los 3 días, con excepción de la formulación derivada de la cepa Tohama PagL con la que recuperan su peso a los tres días de la inmunización.

Al día 7 los ratones tratados con las vesículas derivadas de la cepa parental y la cepa Tohama PagL superaron el peso registrado en el día 3. Los ratones tratados con PBS registraron aumento de pesos en todos los tiempos analizados. En conjunto, estos resultados muestran que las vesículas derivadas de la cepa Tohama PagL es aún menos tóxico que las derivadas de la cepa parental.

Recientemente y junto al Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP) Instituto Biológico "Tomás Perón" Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires hemos avanzado en la formulación de una vacuna acelular trivalente que contiene las vesículas de membrana externa derivadas de la cepa Tohama PagL como componente pertussis, formuladas junto con los toxoides tétánico y diftérico. Estos toxoides son producidos habitualmente en el Instituto Biológico como componentes de la vacuna doble (DT) que es producida por dicha institución y aplicada en la población de la Provincia de Buenos Aires desde hace más de 20 años.

Trabajando en escala de laboratorio hemos realizado una formulación de una vacuna triple acelular (Tdap). A partir de esta formulación hemos realizado ensayos de protección y toxicidad para los tres componentes obteniendo en todos los casos resultados satisfactorios. Estos ensayos mostraron una diferencia de protección significativa entre los animales que fueron inmunizados con las formulaciones antes descritas en comparación con el grupo control de ratones que fueron tratados solo con un buffer fosfato estéril ($p < 0.001$). En todos los ratones inmunizados se observan adecuadas tasas de eliminación bacteriana ($p < 0,001$). En los ratones inmunizados, el número de bacterias recuperadas disminuyó por lo menos 4 órdenes de magnitud en relación a las recuperadas de los ratones no inmunizados. Estos resultados muestran que la formulación acelular aVacSal presenta una actividad protectora similar a la de las derivadas de la vacuna acelular hoy en uso.

Para evaluar la toxicidad del candidato vacunal empleamos el el test de ganancia de peso recomendado por la OMS y descrito en el punto 1.6 de esta presentación. Los resultados obtenidos con la formulación a VacSal se compararon con los de las cepas parental y parental conteniendo el vector vacío. Todas las formulaciones utilizadas para

la vacunación no produjeron alteración en la curva de aumento de peso, lo que significa que todas las formulaciones resultaron no tóxicos.

Los ratones tratados con PBS registraron aumento de pesos en todos los tiempos analizados. En conjunto, estos resultados muestran que las vesículas derivadas de la cepa Tohama PagL es aún menos tóxico que las derivadas de la cepa parental.

En vista de estos resultados, la formulación trivalente incluyendo como componente pertussis a las OMVs se presenta como un excelente material para desarrollar distintas etapas de escalado a fin establecer la prueba de concepto para su potencial aplicación en ensayos clínicos.

A continuación incluyo el listado de los congresos y publicaciones realizadas durante los últimos dos años en el marco de las distintas líneas antes descriptas

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS - ENCUENTROS - JORNADAS Y SIMPOSIOS Nacionales

1- EPIDEMIOLOGÍA DE PERTUSSIS EN ARGENTINA DURANTE EL PERÍODO 2006-2010: TENDENCIAS POR GRUPO DE EDAD Y ESTADO DE VACUNACIÓN

Lara C.2, Flores D.1, Zurita, E.1, Sorhouet C, Fioriti A.1, Fiori, S.1, Bottero D.1, Barbero P. 3, Bettiol M.4, Gatti, B .4, Pianciola L, Graieb, A.1, González Ayala S4, Galas M.2 y Hozbor D1 . XII CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGÍA

VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología

Micología y Parasitología Clínica - SADEBAC

I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental Octubre 2010

2- CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS ARGENTINOS DE BORDETELLA PERTUSSIS MEDIANTE ESTRATEGIAS INMUNO-PROTEÓMICAS EN COMPARACIÓN CON CEPAS VACUNALES EN USO

AUTORES: HOZBOR, DANIELA; GAILLARD, MARA EMILIA (IBBM FCE UNLP); BOTTERO, DANIELA (IBBM FCE UNLP); FRITZ, MARIANA (IBBM FCE UNLP); CASTUMA, CELINA (IBBM FCE UNLP); GRAIEB, AUGUSTO (IBBM FCE UNLP); FINGERMANN, MATIAS (IBBM FCE UNLP)

XII CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGÍA

VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología

Micología y Parasitología Clínica - SADEBAC

I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental Octubre 2010

3- Identificación de nuevos factores bacterianos regulados por el sistema de dos componentes BvgAS de Bordetella. Fernández, J., Sisti, F., Ormazabal, M. y Hozbor D.

XII CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGÍA

VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología

Micología y Parasitología Clínica - SADEBAC

I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental Octubre 2010

4- Mesa Redonda Controversias en vacunas.

Título de la charla: Pertusis: una enfermedad resurgente que requiere de una revisión en sus estrategias de control Disertante: Daniela Hozbor

XII CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGÍA

VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología

Micología y Parasitología Clínica - SADEBAC

I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental Octubre 2010

5- c-di-GMP Regulates Motility And Biofilm Formation In Bordetella bronchiseptica. Sisti, F, Hozbor, D, Fernández J. XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de

Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Puerto Madryn, Argentina. Diciembre 2010.

6- c-di-GMP enhanced biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica* is not BvgA regulated. Fernández J Hozbor, D, Sisti, F. VII Congreso Argentino de Microbiología General "Samige del Bicentenario". Tucumán, Argentina. Mayo 2011. Presentación oral.

7- Mesa Redonda Coqueluche: una enfermedad inmunoprevenible resurgente Disertante: Daniela Hozbor

Infecciones respiratorias en Pediatría. Puesta al día 2011. Simposio Internacional SADIP. 5 de Mayo 2011. Buenos Aires Argentina

8- DIAGNOSTICO MOLECULAR PARA COQUELUCHE EMPLEANDO UNA PLATAFORMA MULTIPLEX DE PCR EN TIEMPO REAL

Flores Dario¹; Lara Claudia²; Bottero Daniela¹; Fiori Silvana¹; Sorhouet Cecilia²; Ruggieri, Diego L. 2, Zurita Eugenia¹, Galas Marcelo², Hozbor Daniela F. 1

¹Instituto de Biotecnología y Biología Molecular IBBM – FCE – UNLP, calle 115 entre 49 y 50, La Plata, Buenos Aires. hozbor@biol.unlp.edu.ar

² Servicio de Bacteriología Clínica-INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Av. Velez Sarfield 563 (AFF 1282) Ciudad Autónoma de Buenos Aires. cslara@anlis.gov.ar

Congreso Redes de Laboratorio. Rosario 5-7 Septiembre 2011

9- *Bordetella holmesii* en niños con sospecha clínica de pertussis

Bottero Daniela¹, Lara Claudia ², Griffith Matthew³, Flores Darío¹, Pianciola Luis⁴, Mazzeo, Melina⁴, Zamboni Maria Ines⁵, Spoleti María Julia⁶, Anchart Eduardo⁷, Ruggieri Diego², Sorhouet Cecilia², Fiori Silvana¹, Galas Marcelo² y Hozbor Daniela¹

¹Instituto de Biotecnología y Biología Molecular IBBM – FCE – UNLP, calle 115 entre 49 y 50, La Plata, Buenos Aires. hozbor@biol.unlp.edu.ar

² Servicio de Bacteriología Clínica-INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Av. Velez Sarfield 563 (AFF 1282) Ciudad Autónoma de Buenos Aires. cslara@anlis.gov.ar

³Meningitis and Vaccine Preventable Diseases, Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Office of Infectious Diseases, US Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road, MS C-25, Atlanta GA, 30316, USA MMGriffith@cdc.gov

⁴ Laboratorio Central-Subsecretaría de Salud de Neuquén. Gregorio Martínez 65. Neuquén

⁵ CEMAR – Dirección de Servicios de Laboratorios y Análisis Clínicos de la secretaría de Salud Pública de la 6 6 Municipalidad de Rosario: Hosp. De Niños Zona Norte – Rosario – Santa Fe

⁶ Hospital de Niños "Víctor J. Vilela"– Rosario – Santa Fe⁷ Dirección Provincial de Farmacia, Bioquímica y Droguería Central del Ministerio de Salud de la Provincia de Santa Fe

Congreso Redes de Laboratorio. Rosario 5-7 Septiembre 2011

10- CASOS DE COQUELUCHE EN CIUDAD AUTONOMA Y CONURBANO BONAERENSE REGISTRADOS EN LOS LABORATORIOS NACIONALES DE REFERENCIA

Sorhouet Cecilia (1); Lara Claudia S. (1); Flores Darío (2); Ruggieri Diego L. (1); Bottero Daniela (2); Fiori Silvana (2); Zurita Eugenia (2); Galas Marcelo F. (1); Hozbor Daniela F. (2)

(1)-Servicio de Bacteriología Clínica - INEI - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" Av. Vélez Sarsfield 563 (AFF 1281) Ciudad Autónoma de Buenos Aires cslara@anlis.gov.ar

(2)- Instituto de Biotecnología y Biología Molecular IBBM – FCE – UNLP Calle 115 entre 49 y 50, La Plata, Buenos Aires. hozbor@biol.unlp.edu.ar
Congreso Redes de Laboratorio. Rosario 5-7 Septiembre 2011.

11- SEROLOGIA APLICADA AL DIAGNOSTICO DE COQUELUCHE EN PACIENTES ADOLESCENTES Y ADULTOS

Lara Claudia S.(1); Flores Darío _(2); Sorohuet Cecilia (1); Ruggeri Diego L.(1); Bottero Daniela -(2); Fiore Silvana ..(2); Zurita Eugenia (2); Regueira Mabel _(1), Galas Marcelo F.(1), Hozbor Daniela F.(2)

(1)-Servicio de Bacteriología Clínica - INEI - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" Av. Velez Sarsfield 563 CP AFF 1282 cslara@anlis.gov.ar

(2)- Instituto de Biotecnología y Biología Molecular IBBM – FCE – UNLP, calle 115 entre 49 y 50, La Plata, Buenos Aires. hozbor@biol.unlp.edu.ar
Congreso Redes de Laboratorio. Rosario 5-7 Septiembre 2011

Internacionales.

1. A deep rough type structure in Bordetella bronchiseptica lipopolysaccharide affects the host immune response. Federico Sisti, Juliet Fernández, Sarah C. Higgins, Kingston H. Mills, Daniela Hozbor. Ninth International Bordetella Symposium. Baltimore 30 Septiembre – 3 de octubre 2010.

2- Molecular basis for the selection of vaccine candidates to be included in anew anti pertussis formulation

Bottero, D, Gaillard ME and Hozbor D. Ninth International Bordetella Symposium. Baltimore 30 Septiembre – 3 de octubre 2010.

3- Fim2 and Fim3 from Bordetella pertussis only protect against the infection from their respective producer strains. Celina E. Castuma, Augusto Graieb, Emilia Gaillard, Daniela Bottero and Daniela Hozbor. Ninth International Bordetella Symposium. Baltimore 30 Septiembre – 3 de octubre 2010.

4- EPIDEMIOLOGY OF PERTUSSIS IN ARGENTINA DURING THE 2006-2010 PERIOD: TRENDS BY AGE GROUP AND STATUS OF VACCINATION. POSSIBLE SOURCE OF INFECTION

Flores D.1, Lara C.2, Zurita, E.1, Sorhouet C, Fioriti A.1, Fiori, S.1, Bottero D.1, Barbero P. 3, Bettiol M.4, Gatti, B .4, Pianciola L. 5, Mazzeo, M.5, Zamboni, M.6, Anchart E.6., Graieb, A.1, González Ayala S4, Galas M.2 y Hozbor D1 . Ninth International Bordetella Symposium. Baltimore 30 Septiembre – 3 de octubre 2010.

5- TLR4 is critical for early recruitment to airways of phagocytes during the initial steps of B. pertussis infection

Agustina Errea¹, Griselda Moreno¹, Roy Roberts², Augusto Graieb², Laurye Van Maele³, Jean Claude Sirard³, Martin Rumbo¹, Arndt Beneke³ and Daniela Hozbor²

Ninth International Bordetella Symposium. Baltimore 30 Septiembre – 3 de octubre 2010.

6- TLR4 activation concomitant to B. pertussis infection potentiates bacterial clearance. Eugenia Zurita¹, Agustina Errea², Mariana Fritz¹, Federico Sisti², Griselda Moreno², Martin Rumbo² and Daniela Hozbor¹ Ninth International Bordetella Symposium. Baltimore 30 Septiembre – 3 de octubre 2010.

7- Modeling and simulation of pertussis transmission in Argentina: effect of adding a booster in adolescents

Fabricius, G.1, Bergero, P.2, Ormazabal, M.3, Maltz, A.4, Hozbor D.3

Ninth International Bordetella Symposium. Baltimore 30 Septiembre – 3 de octubre 2010.

8- Prevalence of pertussis antibodies in adults, maternal delivery and cord serum in Buenos Aires, Argentina Gabriela Manonelles¹, Aurelia Fallo¹; Daniela Hozbor,² Claudia Lara³ ; Eduardo López¹. IDSA 48th Annual Meeting. Vancouver, 21 al 24 de Octubre 2010. Presentación de Poster.

9- Coordinación Mesa EU-Pertgenomics / EU-Pertstrain meeting
16-17th June, 2011 Health Protection Agency Microbiology Services Division
Colindale, London UK

Session 5: Bordetella spp. and strain variation

Chairs: Nicole Guiso, France & Daniela Hozbor, Argentina

10- A mathematical pertussis transmission model to analysis the epidemiological impact of adolescent booster

Fabricius, G.1, Bergero, P.2, Ormazabal, M.3, Hozbor D.3

1 Institute of Applied Research and Fisicoquímicas Teóricas (INIFTA), UNLP

2 Physics department FCEyN, UBA

3 Institute of Biotechnology and Molecular Biology (IBBM FCE UNLP), UNLP.
CONICET

7th World Congress of the World Society for Pediatric Infectious Diseases (WSPID) in Melbourne. 16-19 de Noviembre de 2011.

TRABAJOS PUBLICADOS O ACEPTADOS PARA PUBLICAR

- Mucosal innate response stimulation induced by lipopolysaccharide protects against Bordetella pertussis colonization. Errea A, Moreno G, Sisti F, Fernández J, Rumbo M, Hozbor DF. Med Microbiol Immunol. 2010 199(2):103-8. ISSN: 0300-8584 (print version) ISSN: 1432-1831 (electronic version)

- Optimization of processing and storage of clinical samples to be used for the molecular diagnosis of pertussis. Pianciola L, Mazzeo M, Flores D, Hozbor D. Rev Argent Microbiol. 2010 ;42(2):108-13. ISSN 0325-7541, OCLC: 85449370

- The global pertussis initiative: Meeting report from the regional Latin America meeting, Costa Rica, 5-6 December, 2008. Ulloa-Gutierrez R, Hozbor D, Avila-Aguero ML, Caro J, König CH, Tan T, Plotkin S. Hum Vaccin. 2010 1;6(11). Print ISSN: 1554-8600 Online ISSN: 1554-8619

-Fatal laryngotracheitis caused by Bordetella bronchiseptica in a girl with AIDS. Lopardo, H, Ruvinsky S, Casimir L, Bologna, R, Mecikovsky D, and Hozbor, D. Journal of Pediatric Infectious Diseases. 2011 Volume 6 (2) IOS Press – Jan 1, 2

- Outer membrane vesicles obtained from Bordetella pertussis Tohama expressing the lipid A deacylase PagL as a novel acellular vaccine candidate. Asensio C., Moreno G, Gaillard ME, Bottero D., Zurita E., Rumbo M., van der Ley P., van der Ark, A., and Hozbor D. Vaccine 2011 29:1649-56. ISSN 0264-410X Elsevier

- Laboratory adaptation of Bordetella pertussis is associated with the loss of Type Three Secretion System functionality.

Gaillard ME, Bottero D, Castuma CE, Basile LA, Hozbor D.
Infect Immun. 2011 Jul 5. [Epub ahead of print] Print ISSN: 0019-9567

- A deep rough type structure in Bordetella bronchiseptica lipopolysaccharide modulates host immune responses

Sisti F., Fernández J., Higgins, S., Cassabuono A., Couto A., Mills K and Hozbor D. Microbiology and Immunology. 2011. 55:847-54. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00395.x.

- Genotypic and phenotypic characterization of Bordetella pertussis strains used in different vaccine formulations in Latin America

Bottero, Daniela; Gaillard, María; Basile, Laura; Fritz, Mariana; Hozbor, Daniela. J Appl Microbiol 112(6): 1266-1276.

- Modelling pertussis transmission to evaluate the effectiveness of an adolescent booster in Argentina

G. FABRICIUS^{1*}, P. BERGERO¹, M. ORMAZABAL², A. MALTZ³ AND D. HOZBOR²

Received 8 April 2012; Final revision 18 May 2012; Accepted 31 May 2012. Journal of epidemiology and Infection

- Bordetella holmesii in children suspected of pertussis in Argentina".

Bottero, Daniela; Griffith, Matthew M.; Lara, Claudia; Flores, Darío; Pianciola, Luis; Gaillard María Emilia, Mazzeo, Melina; Zamboni, Maria Ines; Spoleti, María Julia; Anchart, Eduardo; Ruggeri, Diego; Sorhouet, Cecilia; Fiori, Silvana; Galas, Marcelo; Tondella, Maria L. and Hozbor, Daniela. Aceptado para su publicación en Epidemiology and Infection. Mayo de 2012.

CONSTRUCCION DE LA HIPOTESIS y JUSTIFICACION GENERAL DE LA METODOLOGIA DE TRABAJO. (Máx 1 pág.) A partir de lo expuesto en la introducción y los datos preliminares proponer la hipótesis de trabajo y justificar la metodología propuesta

Nuestra propuesta está basada en las siguientes observaciones fundamentales que ya fueron descritas en las secciones precedentes: deficiencia en la protección conferida tanto por las vacunas celulares como por las acelulares hasta hoy diseñadas contra pertussis, ineficacia de dichas vacunas contra las otras especies de Bordetella que pueden infectar al hombre, y divergencias inmunogénicas entre la población bacteriana circulante (PBC) y las cepas vacunales en uso (CV) detectadas en diferentes países incluyendo Argentina. En consecuencia, nuestra hipótesis de trabajo plantea que la histórica relativa baja eficacia de las vacunas, preparadas en base a una única especie y a una única variante polimórfica de los inmunógenos protectores se ve incrementada porque en la población circulan distintas especies que pueden causar la enfermedad y porque existe divergencia entre la PBC y la CV, frente a las cuales la protección es menor [14]. Así, la eficacia de las vacunas podría incrementarse si en su formulación se incluyeran nuevos inmunógenos que además sean propios de la PBC regional. Esta propuesta se realiza en base al conocimiento epidemiológico hasta ahora alcanzado de pertussis en nuestra población que refleja no sólo la circulación del patógeno sino el aumento de casos en el tiempo y la variación existente entre los inmunógenos conocidos, conocimientos que reflejan la clara necesidad de la búsqueda e identificación de nuevos inmunógenos con un papel clave en la eficacia vacunal. La definición de nuevos inmunógenos debería extenderse para lograr de ser posible la protección de la población contra las distintas especies de Bordetella. Los resultados

que se obtengan serán esenciales para el desarrollo local de una vacuna mejorada con potencialidades de ser incluida en el Calendario Nacional de Vacunación.

A continuación exponemos los lineamientos generales de las metodologías propuestas.

Para mejorar la formulación ya desarrollada por nosotros a base de vesículas de membrana externa de *B. pertussis* intentaremos incluirle mediante el empleo de técnicas de ingeniería genética sencillas serotipos y alelos de inmunógenos característicos de la población bacteriana circulante. Las OMVs recombinantes que se obtengan serán evaluadas en su capacidad protectora frente a cepas de referencia, cepas vacunales y aislamientos propios de la colección bacteriana local. Exploraremos por otra parte la capacidad protectora de OMVs provenientes del otro agente causal de la enfermedad, *B. parapertussis*. Intensificaremos la búsqueda de nuevos inmunógenos propios de *B. parapertussis* para lo cual aplicaremos la tecnología proteómica comparativa ya utilizada por nosotros. Identificaremos componentes superficiales diferenciales de *B. parapertussis* respecto de *B. pertussis*. A partir de esta identificación que así se realice y para evaluar el rol de los candidatos en la protección, realizaremos el clonado en *E. coli* para expresarlos a cada uno como proteínas de fusión His-tag. A partir de las proteínas de fusión que obtendremos realizaremos estudios para evaluar su capacidad inmunogénica y protectora en el modelo animal de infección hoy en uso en nuestro laboratorio. Estas actividades se realizarán en parte en colaboración con el grupo que lidera el Dr. Rumbo con quien venimos trabajando hace ya más de 6 años.

Con toda esta batería de ensayos esperamos identificar los inmunógenos que sean relevantes en la protección contra la enfermedad inducida por *B. parapertussis*. Una vez seleccionados los nuevos inmunógenos y evaluadas sus capacidades protectoras analizaremos la conveniencia incluirlos en las OMVs de *B. pertussis* aplicando las mismas tecnologías de ADN recombinante que utilizaremos en la construcción de las OMVs recombinantes de *B. pertussis* antes descripta.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS (Máx. 9 pág.)

1) Construcción de una cepa de *B. pertussis* recombinante que exprese simultáneamente los alelos *prn1* y *prn2* y los serotipos 2 y 3 de fimbria (BpPagL PRN1,2-FIM2,3)

Construcción de la cepa de *B. pertussis* recombinante PRN1 y PRN2.

Se amplificarán los genes completos de pertactina a partir de los genomas de las cepas *B. pertussis* Tohama fase I que contiene el alelo *prn1* y del aislamiento local *B. pertussis* 106 (de nuestra colección) que contiene el alelo *prn2* [14]. Los primers que se diseñen para la reacción de amplificación contendrán sitios de restricción para permitir el clonado contiguo y los adaptadores attB. Los productos de PCR ligados serán luego clonados en pDONRTM221 (Sistema Gateway Invitrogen) para obtener pDONR-PRN1PRN2 mediante técnicas de recombinación específica de sitio utilizando el sistema de clonación Gateway (Invitrogen). Las regiones transferidas al plásmido pDONRTM221 serán secuenciadas para su confirmación. El plásmido pDONR-PRN1PRN2-se mezclará con el plásmido pABB-CRS2 (la descripción de este plásmido se incluye en la figura) [52] para obtener el plásmido pABB- PRN1PRN2 mediante el sistema de clonación Gateway. El plásmido así construido será transferido por electroporación a la cepas *E. coli* S17-1 para luego ser movilizado por conjugación a la cepa de *B. pertussis* Tohama PagL [53, 54]. Para verificar la correcta recombinación homóloga aplicaremos secuencias apropiadas que nos permitan detectar ambos alelos.

Construcción de la cepa recombinante que exprese los dos serotipos de fimbria, FIM 2-3. Trabajaremos sobre la cepa recombinante PRN1,PRN2 que construiremos según los pasos antes detallados. Para ello amplificaremos la secuencia promotora del gen que codifica para la FIM2 y el gen estructural que codifica para la FIM3. Para ello emplearemos nuevamente primers específicos que incluyan cortes de enzimas y flanqueo de los adaptadores attB. Los productos que obtengamos serán clonados en el plásmido pDONR221 para continuar con los mismos pasos descriptos para pertactina.

2) Caracterización del mutante BpPagL PRN1,2-FIM 2,3.

a. Curvas de crecimiento de BpPagL PRN1,2-FIM 2,3. Para el cultivo sólido de *B. pertussis* emplearemos Agar Bordet Gengou suplementado con sangre desfibrinada de carnero (BGAS). A partir stocks conservados a -20 °C se realizará un agotamiento por estría en placas conteniendo BGAS de la cepa BpPagL PRN1,2-FIM2,3 y de la cepa parental y se cultivarán a 36 °C por 72 h. Luego se realizará un repique por 24 h en el mismo medio a 36 °C y el desarrollo bacteriano que así se obtenga será utilizado para inocular el medio líquido sintético Stainer-Scholte [55] de forma tal de alcanzar una absorbancia de 650 nm (DO650nm) de 0.2. El crecimiento bacteriano se evaluará mediante medidas de DO650nm y por recuento de viables en placas de BGAS. El cultivo se monitoreará hasta alcanzar la fase de crecimiento estacionaria. Se establecerán comparaciones de las cinéticas de crecimiento de la cepa recombinante y la correspondiente de la cepa parental.

b. Análisis de la expresión de las distintas variantes de Pertactina y Fimbrias.

Serotipificación. Se determinarán los serotipos fimbriales mediante aglutinación en portaobjetos. Se emplearán anticuerpos monoclonales anti-FIM2 y anti-FIM3 [Antibody-National Institute of Biological Standards and Control NIBSC Potters Bar, Hertfordshire, United Kingdom-códigos de los productos: 04/156] ya adquiridos y empleados en nuestro laboratorio [51]. La reacción de aglutinación se observará a ojo desnudo luego de 2 min de homogeneización manual suave. Como controles positivos de cada antisuero se emplearán cepas de referencia con serotipo fimbrial conocido. Como control negativo de autoaglutinación se empleará una alícuota de la suspensión bacteriana que se la mezclará con solución fisiológica.

Análisis de la expresión de PRN1 y PRN2 por RT-PCR. La expresión de los distintos alelos de pertactina será evaluada mediante ensayos de RT-PCR empleando primers apropiados [56]. Para estos ensayos el RNA se obtendrá a partir de los pellets bacterianos empleando el sistema ilustra RNAspin Mini RNA isolation Kit (GE) siguiendo las instrucciones del fabricante. La transcripción reversa (RT) se realizará con Random Primers (Invitrogen) a partir de 1 µg de RNA empleando la enzima MMLV-RT (Invitrogen).

Inmunodetección (Inmunoblot). Se realizarán inmunodetecciones sobre preparaciones de proteínas totales de la cepa BpPagL PRN1,2-FIM 2,3. Se realizarán corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y transferencia a membranas de polivinildifluoruro (PVDF), según el método de Towbin y colaboradores [57]. Las proteínas inmovilizadas se ensayarán con antisueros dirigidos a los distintos inmunógenos: pertactina 1 y 2 (PRN) y fimbrias (FIM2 y FIM3). En todos los casos el revelado se llevará a cabo con anticuerpos anti-IgG, marcados con fosfatasa alcalina. Se analizará presencia o ausencia de expresión. Alternativamente se llevará a cabo el revelado utilizando anticuerpos anti-IgG conjugados con fluoróforos y detectando la señal con un scanner de infrarrojo Odyssey. Este sistema de detección permite hacer estimaciones cuantitativas.

3) Obtención y caracterización de las vesículas de membrana externa de la cepa recombinante BpPagL PRN1,2-FIM 2,3.

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo: Para la obtención de las vesículas de membrana externa se empleará la cepa recombinante y la cepa parental como control. Las mismas se obtendrán siguiendo las metodologías ya puestas a punto en nuestro laboratorio [19]. En el último paso de la obtención, las vesículas serán resuspendidas y luego dializadas para poder ser utilizadas en el modelo animal de protección. Las vesículas así obtenidas se conservarán en glicerol 1% a 4°C hasta el momento de su uso.

Observación al microscopio electrónico. La identidad y la pureza de las muestras serán evaluadas mediante observaciones al microscopio electrónico y cultivo en medios específicos. Para la observación al microscopio electrónico las vesículas de membrana externa se resuspenderán en acetato de amonio 0.1 M a pH 7.0. Treinta µl de esta suspensión se colocarán en una grilla de carbón reforzado fomvar film. Luego de 30 s, las grillas serán teñidas con ácido fosfotúngstico 2% (p/v) pH 5.2. El examen se realizará en un microscopio JEM 1200 EX Jeol.

Identificación de componentes propios de las OMVs. La presencia de componentes propios de la membrana de *B. pertussis* como el lipo-oligosacárido (LOS,) y proteínas como los inmunógenos, la toxina pertussis (PT), la FIM y la PRN se evaluarán mediante corridas electroforéticas SDS-PAGE y ensayos de inmunoblot para corroborar la naturaleza de las vesículas.

Sobre las vesículas provenientes de la cepa recombinante evaluaremos la presencia de los dos alelos de *prn* y los dos serotipos de FIM empleando las técnicas antes descriptas.

Evaluación de la composición de las OMV provenientes de la cepa recombinante mediante corridas electroforéticas en geles 2D asociadas a espectrometría de masa del tipo MALDI-TOF. Se propone aplicar estrategias proteómicas del tipo comparativas entre las OMVs obtenidas de la cepa recombinante y la cepa parental. Para el isoelectroenfoco (IEF) se emplearán tiras comerciales de pH inmovilizado (Immobiline™ DryStrip Amersham Biosciences-AB). La segunda dimensión (SDS-PAGE) se realizará siguiendo el método de Laemmli [58] con 12.5% poliacrilamida para el gel de separación y sin gel de apilamiento. Las proteínas resueltas serán visualizadas usando la tinción de Coomassie coloidal (<http://prospector.ucsf.edu>). Los geles serán escaneados y las imágenes analizadas y comparadas entre sí con el programa Image Master (GE Healthcare). Los spots de interés serán escindidos del gel y luego de una serie de lavados serán digeridos con la enzima tripsina. Los digestos serán analizados por espectrometría de masa MALDI-TOF y posterior identificación por la técnica de huella peptídica utilizando el programa disponible on-line MASCOT (Matrix Science at <http://matrixscience.com>), con una base de datos que contiene 3.436 números de acceso derivados del genoma completo de *B. pertussis* (obtenidas de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4) Evaluación de la inmunogenicidad de las OMVs

Ensayos de protección en modelo de desafío intranasal. Se formularán como vacuna las OMVs obtenidas a partir de la cepa recombinante y la parental. La formulación se realizará a partir del conocimiento del contenido de proteínas en las vesículas estimado por el método de Bradford utilizando BSA como estándar. Las vesículas se

emulsificarán con hidróxido de aluminio como adyuvante (0.2 mg/ml) y se detoxificarán con formalina (0,37 % a 37 °C overnight).

Para la inmunización activa se emplearán ratones BALB/c hembras de 4 semanas de edad libres de patógenos (Biol SAIC, Argentina). Los ensayos se realizarán en forma comparativa con formulaciones de conocida actividad protectora que ya se emplean en nuestro calendario nacional de inmunizaciones.

El protocolo de inmunización comprende un esquema de 2 inmunizaciones con intervalos de 14 días por vía intraperitoneal. Los ratones inmunizados serán desafiados por vía intranasal dos semanas después de la última inmunización, tanto con una suspensión bacteriana de la cepa de referencia de la Organización Mundial de la Salud -la cepa B. pertussis 18323- como con la cepa Tohama fase I CIP8132, o con un aislamiento representativo de la población bacteriana circulante (dosis 107- 108 CFU en 50 µl). La evaluación del poder protector de las formulaciones se determinará mediante la técnica ya puesta a punto en el laboratorio [14]. A las 2 horas, 5 días y 8 días post desafío se evaluará el número de unidades formadoras de colonias en pulmón por recuento en placas de BGAS. Brevemente, los pulmones serán removidos de manera aséptica siguiendo normas adecuadas para el manejo de animales. Los pulmones serán homogeneizados en buffer fosfato estéril y luego de realizar diluciones seriadas las mismas se plaquearán en BGAS para determinar el número de bacterias recuperadas de los pulmones de los ratones.

Estudio de la respuesta inmune desencadenada por la inmunización. Se inmunizarán ratones como fuera descripto previamente para los ensayos de protección empleando las OMVs recombinante y parental. Siete días después de la última inmunización se analizará la respuesta humoral midiendo por ELISA títulos de IgG sérica específica. Se analizará el perfil de subclases de IgG específica a fin de correlacionarlo con el perfil de respuesta Th1/Th2.

Toxicidad. Para evaluar la toxicidad del candidato vacunal que se presenta se empleará el test de ganancia de peso recomendado por la OMS. Este test involucra el empleo de 8 ratones Balb/c de 15—20 g a los que luego de inmunizar se les evaluará la evolución de sus pesos corporales a lo largo de 7 días. Como fue anteriormente descripto.

Análisis estadístico. Los datos correspondientes a la media y desviaciones estándar de los recuentos de UFC/pulmón de ratón, correspondientes a los distintos tratamientos, serán transformados a $\text{Log}_{10}(1+\text{UFC})$. Para los recuentos de viables por debajo del límite de detección (<100 UFC/pulmón) se utilizará un valor correspondiente al Log_{10} de 50 UFC. Las diferencias entre $\text{Log}_{10}(\text{UFC})$ de las medias entre los distintos grupos serán analizadas mediante Test de ANOVA. Se realizaron comparaciones a posteriori en las que se efectuarán comparaciones múltiples y se establecerán diferencias entre grupos mediante los Test LSD y Tukey's HSD. Valores de $p < 0.05$ serán considerados estadísticamente significativos. Para el análisis estadístico de los datos se utilizará el software STATISTICA.

Los resultados que aquí se obtengan serán de fundamental importancia para el mejoramiento de un candidato vacunal de desarrollo local con probada capacidad protectora y bioseguro. Esta formulación tiene en principio ventajas importantes respecto de las actuales vacunas acelulares ya que las vesículas contienen inmunógenos en estado nativo y un espectro más amplio de los mismos incluyendo algunos con capacidad adyuvante tales como proteínas de membrana externa (OMP) y lipooligosacárido (LOS). La concreción de los objetivos de este plan nos permitirá cubrir

un espectro aún más amplio de genotipos de *B. pertussis* que incluirían a los circulantes en la actualidad.

Obtención y caracterización de Vesículas de membrana externa de *B. parapertussis*

A partir stocks de *B. parapertussis* conservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se realizará un agotamiento por estría en placas conteniendo BGAS y se cultivarán a $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 h. Luego se realizará un repique por 24 h en el mismo medio a $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el desarrollo bacteriano que así se obtenga será utilizado para inocular el medio líquido sintético Stainer-Scholte suplementado con casaminoácidos al 1% [55] de forma tal de alcanzar una absorbancia de 650 nm (DO650nm) de 0.2. Cuando el cultivo haya llegado a fase exponencial tardía (20h) se cosechan las células mediante centrifugación a $5600\times g$ durante 20 minutos en centrífuga refrigerada. Las vesículas se obtendrán y caracterizarán de acuerdo a las metodologías descriptas en el punto 3 .

Los ensayos de protección se realizarán del mismo modelo que lo descrito en el punto 4 sólo que el desafío lo realizaremos con una suspensión de *B. parapertussis*.

A partir de las vesículas obtenidas realizaremos ensayos de protección cruzada, es decir inmunizaremos ya sea con las OMVs de *B. pertussis* o con las de *B. parapertussis* para luego desafiar con *B. pertussis* y *B. parapertussis*. De estos ensayos esperamos confirmar la ya reportada (para otras formulaciones) falta de reacción cruzada entre estas dos especies.

Identificación de componentes bacterianos inmunológicamente activos, comunes y diferenciales de las vesículas de *B. parapertussis* en comparación con las de las OMVs de *B. pertussis*

Empleo de estrategias proteómicas

Trabajaremos comparando el perfil de las OMVs de *B. parapertussis* con el de las OMVs de *B. pertussis*.

Para ellos realizaremos electroforesis 2D asociada a espectrometría de masas del tipo MALDI TOF.

La concentración de proteínas de nuestras preparaciones se determinará mediante el método Bradford [59], usando sero albúmina bovina como estándar.

Electroforesis 2-D. La primera dimensión (isoelectroenfoque, IEF) se realizará empleando tiras IPG (Immobiline™ DryStrip Amersham Biosciences-AB). Se aplicarán 200 µg de proteínas en tiras de 7 cm con rango de pH de 4.0 a 7.0. Las tiras se rehidratarán durante una noche a temperatura ambiente con 125 µl de buffer de rehidratación (7M urea, 2M tiourea, 10% isopropanol y 2% Triton X100) suplementado con 1.25 µl 28% DTT, 0.62 µl 0.5% anfolitos (pH 4.0 a 7.0 [Amersham]) y 0,01% Azul de Bromofenol. Se ejecutarán tres programas siguiendo las instrucciones del distribuidor: el primero a 500 V durante 30 min para remover los iones y contaminantes cargados, luego se incrementará durante 30 min el voltaje a 1,000 V. Finalmente se realizará el enfoque a un voltaje que se va incrementando hasta llegar a 5000 V h con una corriente que no debe superar 50 µA/tira. Después del IEF, las tiras se equilibrarán en 50 mM Tris (pH 8.8) conteniendo 6M urea, 2% SDS, 30% glicerol, 1% dithiothreitol (DTT), seguido de una incubación de una hora con el mismo buffer pero suplementado con 4.5% iodoacetamida. La segunda dimensión (SDS-PAGE) se realizará siguiendo el método de Laemmli con 12.5% poliacrilamida para el gel de separación y sin gel de apilamiento. Los geles se correrán a 40 volts.

Teñido con Coomassie. Las proteínas resueltas serán visualizadas usando la tinción de Coomassie coloidal (ver <http://prospector.ucsf.edu>)

Image analysis. La imagen se obtendrá con el Fluor-S Multimager (Bio-Rad). La misma se documentará con PDQUEST 2-D gel analysis software (versión 6; Bio-Rad).

Digestión triplica de proteínas. Se cortarán los spots de los geles 2-DE, los cuales se lavarán con 100 μ l de 25 mM de bicarbonato de amonio durante 10 min. Luego se incubarán durante 30 min a 60°C en 20 μ l de una solución de DTT 5mM en 25 mM bicarbonato de amonio. Este paso luego es seguido por otra incubación de 15 a temperatura ambiente en la oscuridad con 20 μ l 55mM iodoacetamida en 25mM bicarbonato de amonio. Luego de dos lavados más, uno con 25mM bicarbonato de amonio y otro 100 μ l acetonitrilo, los spots se someterán a deshidratación y cuando queden blancos, el acetónitro se eliminará por evaporación. Los spots se rehidratarán con un volumen pequeño de 50mM de bicarbonato de amonio conteniendo tripsina (20 μ g/ml). Se realizarán incubaciones de 45 min a 4°C y luego a 37°C durante toda una noche. Después de la digestión los spots se lavarán dos veces con 20 μ l acetonitrilo: 0.1% ácido trifluoroacético (TFA) 33:66 durante 10 min y se recogerán los sobrenadantes. Se procederá luego a la concentración de las muestras en un Speedvac.

Determinación de huella peptídica. 0.4 μ l de una mezcla de matriz (α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid (0.2 g/l) in 50% acetonitrilo and 0.25% TFA) con la muestra problema se aplicará en un dispositivo denominado anchorchip. La mezcla se dejará secar para luego someterla a la espectrometría de masa del tipo MALDI-TOF utilizando el espectrómetro Ultraflex (Bruker).

Identificación de las proteínas. La identificación de las proteínas se realizará con el software MASCOT (Matrix Science at <http://matrixscience.com>), con una base de datos que contiene 3436 accession number derivadas del genoma completa de B. pertussis (obtenidas de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Las proteínas diferenciales serán confirmadas mediante RT-PCR. El RNA total sera aislado empleando el sistema NucleSpin RNAII (Macherey-Nagel, Germany) siguiendo las instrucciones de la empresa. La transcripción reversa se realizará (RT) a partir de 100 ng de RNA empleando MMLV-RT (Promega). El cDNA resultante será amplificado empleando primers específicos. Estos experimentos se repetirán al menos por triplicado.

En nuestro laboratorio ya contamos con la infraestructura necesaria para realizar los geles bidimensionales. Además formamos parte (Dra. Hozbor) del consorcio de PME que permitió la compra de un equipo MALDI TOF TOF que opera en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA.

Una vez identificadas, se procederá al clonado y expresión de dichas proteínas como se detalla a continuación. De esta forma obtendremos cantidad del inmunógeno de forma de poder realizar los ensayos de protección y sus repeticiones.

Clonado y expresión de los inmunógenos seleccionados. Las secuencias de los inmunógenos seleccionados serán amplificadas a partir de los datos de secuencia del genoma de B. paraptussis recientemente terminado utilizando Pfx de Invitrogen y primers diseñados en base a la secuencia a amplificar teniendo en cuenta las recomendaciones del fabricante.

Para realizar el clonado y la expresión de las secuencias amplificadas utilizaremos el vector pET200 (Invitrogen). Este vector posee las características necesarias para el clonado direccionado y la expresión en bacterias de la secuencia de interés y contiene además una secuencia codificante de seis histidinas en el extremo N-terminal que permite una rápida purificación de la proteína de fusión con resinas de níquel. Además

este vector también posee fusionado un sitio de corte EK que permite la eliminación de la secuencia N terminal con el tag de His mediante la digestión con una proteasa comercial.

Las mezclas de ligación se transformarán en células de E.coli TOP10. Los transformantes conteniendo las secuencias de interés serán seleccionados de acuerdo a la resistencia a antibiótico y mediante ensayos de PCR empleando primers específicos.

Para la expresión de la proteína de interés los vectores recombinantes pET200:prn1 y pET200:prn2 serán transformados en E. coli BL21 (DE3) ya que estas células permiten un alto nivel de expresión de las proteínas de fusión 6xHis-tagged bajo el control del promotor T7 a escala de screening. Para obtener un rendimiento aún mayor llevaremos a cabo una inducción con IPTG. Las proteínas serán purificadas en condiciones nativas a partir de pellets celulares utilizando la resina NiNTA (Invitrogen).

Mediante la utilización de herramientas moleculares que hoy están en el mercado y son relativamente sencillas en cuanto a su manipulación, de buena sensibilidad y especificidad, esperamos clonar, expresar y purificar los distintos inmunógenos seleccionados en el punto anterior.

Evaluación de la capacidad protectora de los inmunógenos seleccionados.

Para evaluar la capacidad protectora de los distintos candidatos vacunales se empleará las metodologías descritas más arriba. Trabajaremos nuevamente con el modelo de protección en ratones.

A partir de todos los resultados hasta aquí obtenidos definiremos la composición de nuestra nueva formulación. A partir de la misma trabajaremos en la caracterización de la respuesta a través de la siguiente metodología

Análisis de la Respuesta inmune mediante ELISA y RT PCR.

Estudios de la capacidad de estimulación de la respuesta innata por los candidatos vacunales: como parte de la caracterización de las propiedades de los candidatos seleccionados, se estudiará su capacidad para estimular la respuesta innata empleando ensayos in vitro. Se incubarán líneas celulares epiteliales humanas: A549 (pneumocitos tipo II), Hep-2 (epiteliales derivadas de carcinoma laríngeo) o monocitarias: THP-1 con los candidatos a analizar. Se estudiará la respuesta transcripcional establecida luego de dos horas de estimulación por RT-qPCR de acuerdo a técnicas previamente descritas (Rumbo y col 2004, Rumbo y col 2005). Se analizará la expresión de un panel de genes característicos de la respuesta innata (CCL20, CXCL2, CXCL10, CCL2). Como control positivo en cada ensayo se empleará incubación con flagelina de *S. typhimurium* (1 µg/mL) para las líneas epiteliales y LPS de E.coli (200 ng/mL) para las THP-1.

Estudio de la respuesta inmune desencadenada por la inmunización: Se realizarán ensayos in vivo de forma de poder analizar a nivel molecular la respuesta inmune inducida por los distintos candidatos vacunales.

Se realizará el protocolo de inmunización con los distintos candidatos a estudiar como fuera descrito en secciones precedentes. Se caracterizará la respuesta humoral y celular frente a los mismos empleando ensayos ya estandarizados.

Análisis de la respuesta humoral: Se inmunizarán ratones como fuera descrito previamente para los ensayos de protección empleando los antígenos seleccionados. Siete días después de la última inmunización se realizarán los siguientes estudios: Se seguirá la respuesta humoral midiendo por ELISA títulos de IgG sérica específica. Se analizará el perfil de subclases de IgG específica a fin de correlacionarlo con el perfil de respuesta Th1/Th2 observado en la producción de citoquinas para cada adyuvante en

etapas previas. Se analizarán los niveles de IgA específica en lavado broncoalveolar mediante técnicas descriptas previamente.

Análisis de la respuesta celular:

a.- Capacidad de producción de células T específica.

En animales inmunizados como fuera descrito en la sección anterior, se aislarán células T de bazo tratados previamente con los candidatos vacunales+agonistas y se realizará un ensayo de proliferación frente a APC obtenidas de bazo en presencia de los antígenos analizados. Se espera determinar la capacidad de los distintos tratamientos de generar una respuesta T específica. Como control se emplearán APC obtenidas en presencia de antígenos irrelevantes.

b.- Perfil de respuesta T generado.

En el mismo formato de ensayo descrito en el paso anterior, se determinará la secreción de distintas citoquinas en el sobrenadante a fin de determinar el perfil de la respuesta. Se emplearán sistemas de ELISA comerciales para IL-2, IL-4, IL-12p70, IL-10 e IFN beta, IL-17.

Análisis de las poblaciones celulares involucradas en una respuesta protectora:

Una vez establecidos los esquemas de inmunización de mayor eficacia en la protección contra el desafío intranasal, se identificarán los actores claves en el establecimiento de esta respuesta. Empleando un ensayo de protección y/o desafío, se analizarán las regiones de las vías aéreas comprometidas en la captación antigénica y establecimiento de la respuesta inmune empleando microscopía de disección y de fluorescencia. A tal fin se emplearán antígenos/microorganismos marcados con colorantes fluorescentes. Se identificarán poblaciones celulares involucradas en la captación antigénica mediante inmunofluorescencia confocal. Se analizará la respuesta local a nivel transcripcional empleando microscopía de disección siguiendo técnicas previamente descriptas [60, 61]. Estos resultados serán claves para mejorar nuestro conocimiento de los mecanismos puestos en juego en el establecimiento de una respuesta inmune protectora en vías respiratorias, pudiendo tener un impacto sobre el desarrollo de vacunas para otras patologías respiratorias.

FACILIDADES

El Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) CCT La Plata donde desarrollamos nuestras actividades se encuentra instalado en la planta baja del edificio Bosque Oeste de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Dentro de las instalaciones pertinentes al proyecto, presentes en este Instituto, se encuentran, bioterio, cuarto para electroforesis de agarosa con bromuro de etidio, cuarto de bioseguridad con flujo de bioseguridad biológica tipo IIA, laboratorios, cuarto de esterilización con autoclaves. El IBBM posee diversos equipos mayores, a saber: centrifugas sorvall, ultracentrífuga, freezers de -80° C y -20° C, agitadores orbitales con control de temperatura, estufas de 60° C y 37° C, estufas con CO2, horno de hibridación, cámaras de flujo horizontal, equipo de PCR en tiempo real (Bio.Rad), adquisidor de imágenes. A su vez, el grupo forma parte del consorcio de un PME adjudicado para un equipo de MALDI-TOF ubicado en la Facultad de Ciencias Exactas, UBA.

A través de este proyecto PAE VacSal del que soy la IR logramos la adquisición de un lector de ELISA (fluorescencia, luminiscencia, UV-Visible), criótomo, centrifugas, un equipo de purificación automática de proteínas (AKTA de GE), un equipo de isoelectroenfoque (IGPForce de GE), microscopio invertido de fluorescencia Nikon Modelo Eclipse Ti-U y microscopio de disección laser de la marca Leica Modelo LMD 6000 por laser de diodos y otros equipamientos menores. En el transcurso del corriente año se procederá a la inauguración de un nuevo bioterio, de mayor capacidad y calidad.

Recursos humanos: el Instituto cuenta con dos técnicos, personal no-docente de la Facultad de Ciencias Exactas, Sr. Rubén Bustos y Sra Catalina López. Además se cuenta con Personal de Apoyo de CONICET, Sra Gisela Verdecana, secretaria, Sr Bernabé Castillo, Ing. Abel Bortolameotti, Sr. Juan Guzmán; Lic. Paula Giménez y Silvana Tongiani.

REFERENCIAS

1. De Serres G, Boulianne N, Douville Fradet M, Duval B: Pertussis in Quebec: ongoing epidemic since the late 1980s. *Can Commun Dis Rep* 1995, 21(5):45-48.
2. Mooi FR, He Q, van Oirschot H, Mertsola J: Variation in the Bordetella pertussis virulence factors pertussis toxin and pertactin in vaccine strains and clinical isolates in Finland. *Infect Immun* 1999, 67(6):3133-3134.
3. de Melker HE, Schellekens JF, Neppelenbroek SE, Mooi FR, Rumke HC, Conyn-van Spaendonck MA: Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of the Netherlands: observations on surveillance data. *Emerg Infect Dis* 2000, 6(4):348-357.
4. Fry NK, Neal S, Harrison TG, Miller E, Matthews R, George RC: Genotypic variation in the Bordetella pertussis virulence factors pertactin and pertussis toxin in historical and recent clinical isolates in the United Kingdom. *Infect Immun* 2001, 69(9):5520-5528.
5. Pertussis outbreak in California. *Hum Vaccin* 2010, 6(9).
6. Octavia S, Sintchenko V, Gilbert GL, Lawrence A, Keil AD, Hogg G, Lan R: Newly emerging clones of Bordetella pertussis carrying prn2 and ptxP3 alleles implicated in Australian pertussis epidemic in 2008-2010. *J Infect Dis* 2012, 205(8):1220-1224.
7. David S, van Furth R, Mooi FR: Efficacies of whole cell and acellular pertussis vaccines against Bordetella parapertussis in a mouse model. *Vaccine* 2004, 22(15-16):1892-1898.
8. Hozbor D, Mooi F, Flores D, Weltman G, Bottero D, Fossati S, Lara C, Gaillard ME, Pianciola L, Zurita E et al: Pertussis epidemiology in Argentina: trends over 2004-2007. *J Infect* 2009, 59(4):225-231.
9. Pianciola L, BD, Mazzeo M., Flores D., Navello M., Hozbor D.: EPIDEMIOLOGÍA DESCRIPTIVA DE CASOS DE COQUELUCHE CAUSADOS POR BORDETELLA PARAPERTUSSIS. In: Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología, Buenos Aires. ; 2012.
10. King AJ, Berbers G, van Oirschot HF, Hoogerhout P, Knipping K, Mooi FR: Role of the polymorphic region 1 of the Bordetella pertussis protein pertactin in immunity. *Microbiology* 2001, 147(Pt 11):2885-2895.
11. Mooi FR, van Loo IH, King AJ: Adaptation of Bordetella pertussis to vaccination: a cause for its reemergence? *Emerg Infect Dis* 2001, 7(3 Suppl):526-528.
12. Mäkelä PH: Vaccines, coming of age after 200 years. *FEMS Microbiol Rev* 2000, 24(1):9-20.
13. He Q, Makinen J, Berbers G, Mooi FR, Viljanen MK, Arvilommi H, Mertsola J: Bordetella pertussis protein pertactin induces type-specific antibodies: one possible explanation for the emergence of antigenic variants? *J Infect Dis* 2003, 187(8):1200-1205.
14. Bottero D, Gaillard ME, Fingerhann M, Weltman G, Fernandez J, Sisti F, Graieb A, Roberts R, Rico O, Rios G et al: Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms, and surfaceome analysis of vaccine and clinical Bordetella pertussis strains. *Clin Vaccine Immunol* 2007, 14(11):1490-1498.
15. Gzyl A, Augustynowicz E, Gniadek G, Rabczenko D, Dulny G, Slusarczyk J: Sequence variation in pertussis S1 subunit toxin and pertussis genes in Bordetella

pertussis strains used for the whole-cell pertussis vaccine produced in Poland since 1960: efficiency of the DTwP vaccine-induced immunity against currently circulating *B. pertussis* isolates. *Vaccine* 2004, 22(17-18):2122-2128.

16. Mooi FR: *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol* 2010, 10(1):36-49.

17. Komatsu E, Yamaguchi F, Abe A, Weiss AA, Watanabe M: Synergic effect of genotype changes in pertussis toxin and pertactin on adaptation to an acellular pertussis vaccine in the murine intranasal challenge model. *Clin Vaccine Immunol* 2010, 17(5):807-812.

18. Asensio CJ, Gaillard ME, Moreno G, Bottero D, Zurita E, Rumbo M, van der Ley P, van der Ark A, Hozbor D: Outer membrane vesicles obtained from *Bordetella pertussis* Tohama expressing the lipid A deacylase PagL as a novel acellular vaccine candidate. *Vaccine* 2011, 29(8):1649-1656.

19. Roberts R, Moreno G, Bottero D, Gaillard ME, Fingermann M, Graieb A, Rumbo M, Hozbor D: Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. *Vaccine* 2008, 26(36):4639-4646.

20. Hozbor D, Rodriguez ME, Fernandez J, Lagares A, Guiso N, Yantorno O: Release of outer membrane vesicles from *Bordetella pertussis*. *Curr Microbiol* 1999, 38(5):273-278.

21. Cherry JD, Seaton BL: Patterns of *Bordetella parapertussis* respiratory illnesses: 2008-2010. *Clin Infect Dis* 2012, 54(4):534-537.

22. Rodriguez ME, Hellwig SM, Hozbor DF, Leusen J, van der Pol WL, van de Winkel JG: Fc receptor-mediated immunity against *Bordetella pertussis*. *J Immunol* 2001, 167(11):6545-6551.

23. Sisti F, Fernandez J, Rodriguez ME, Lagares A, Guiso N, Hozbor DF: In vitro and in vivo characterization of a *Bordetella bronchiseptica* mutant strain with a deep rough lipopolysaccharide structure. *Infect Immun* 2002, 70(4):1791-1798.

24. Fingermann M, Fernandez J, Sisti F, Rodriguez ME, Gatti B, Bottero D, Graieb A, Gaillard ME, Ayala SG, Mooi FR et al: Differences of circulating *Bordetella pertussis* population in Argentina from the strain used in vaccine production. *Vaccine* 2006, 24(17):3513-3521.

25. Errea A, Moreno G, Sisti F, Fernandez J, Rumbo M, Hozbor DF: Mucosal innate response stimulation induced by lipopolysaccharide protects against *Bordetella pertussis* colonization. *Med Microbiol Immunol* 2010, 199(2):103-108.

26. Adu-Bobie J, Capecchi B, Serruto D, Rappuoli R, Pizza M: Two years into reverse vaccinology. *Vaccine* 2003, 21(7-8):605-610.

27. Trollfors B: *Bordetella pertussis* whole cell vaccines--efficacy and toxicity. *Acta Paediatr Scand* 1984, 73(4):417-425.

28. Fine PE, Clarkson JA: Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. *Rev Infect Dis* 1987, 9(5):866-883.

29. Jefferson T, Rudin M, DiPietrantonj C: Systematic review of the effects of pertussis vaccines in children. *Vaccine* 2003, 21(17-18):2003-2014.

30. Hegerle N, Paris AS, Brun D, Dore G, Njamkepo E, Guillot S, Guiso N: Evolution of French *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* isolates: increase of *Bordetella* not expressing pertactin. *Clin Microbiol Infect* 2012.

31. Bjornstad ON, Harvill ET: Evolution and emergence of *Bordetella* in humans. *Trends Microbiol* 2005, 13(8):355-359.

32. Cassidy P, Sanden G, Heuvelman K, Mooi F, Bisgard KM, Popovic T: Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935-1999. *J Infect Dis* 2000, 182(5):1402-1408.

33. Weber C, Boursaux-Eude C, Coralie G, Caro V, Guiso N: Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, where a single

effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years. *J Clin Microbiol* 2001, 39(12):4396-4403.

34. Fiett J, Letowska I, Gniadkowski M, Hryniewicz W: The new strategy for allele identification of the genes coding for pertussis toxin subunit S1 (ptx S1) and pertactin (prn) in *Bordetella pertussis*. *J Microbiol Methods* 2003, 55(3):651-666.

35. Mastrantonio P, Spigaglia P, van Oirschot H, van der Heide HG, Heuvelman K, Stefanelli P, Mooi FR: Antigenic variants in *Bordetella pertussis* strains isolated from vaccinated and unvaccinated children. *Microbiology* 1999, 145 (Pt 8):2069-2075.

36. Everest P, Li J, Douce G, Charles I, De Azavedo J, Chatfield S, Dougan G, Roberts M: Role of the *Bordetella pertussis* P.69/pertactin protein and the P.69/pertactin RGD motif in the adherence to and invasion of mammalian cells. *Microbiology* 1996, 142 (Pt 11):3261-3268.

37. Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, van der Heide HG, Gaastra W, Willems RJ: Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect Immun* 1998, 66(2):670-675.

38. Mooi FR, Hallander H, Wirsing von Konig CH, Hoet B, Guiso N: Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000, 19(3):174-181.

39. Boursaux-Eude C, Guiso N: Polymorphism of repeated regions of pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* 2000, 68(8):4815-4817.

40. Kamachi K, Fukuda T, Han HJ, Toyozumi-Ajisaka H, Mochida K, Konda T, Horiuchi Y, Arakawa Y: Genetic verification of *Bordetella pertussis* seed strains used for production of Japanese acellular pertussis vaccines. *Biologicals*, 38(2):290-293.

41. Hellwig SM, van Oirschot HF, Hazenbos WL, van Spriël AB, Mooi FR, van De Winkel JG: Targeting to Fcγ receptors, but not CR3 (CD11b/CD18), increases clearance of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis* 2001, 183(6):871-879.

42. Hellwig SM, Rodriguez ME, Berbers GA, van de Winkel JG, Mooi FR: Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity. *J Infect Dis* 2003, 188(5):738-742.

43. Basile LAB, 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. Congreso SADEBAC , Junio 2012- Buenos Aires - Argentina 2012.

44. Jackson LA, Cherry JD, Wang SP, Grayston JT: Frequency of serological evidence of *Bordetella* infections and mixed infections with other respiratory pathogens in university students with cough illnesses. *Clin Infect Dis* 2000, 31(1):3-6.

45. Van Loo IH, Mooi FR: Changes in the Dutch *Bordetella pertussis* population in the first 20 years after the introduction of whole-cell vaccines. *Microbiology* 2002, 148(Pt 7):2011-2018.

46. Gilberg S, Njamkepo E, Du Chatelet IP, Partouche H, Gueirard P, Ghasarossian C, Schlumberger M, Guiso N: Evidence of *Bordetella pertussis* infection in adults presenting with persistent cough in a french area with very high whole-cell vaccine coverage. *J Infect Dis* 2002, 186(3):415-418.

47. Brooks DA, Clover R: Pertussis infection in the United States: role for vaccination of adolescents and adults. *J Am Board Fam Med* 2006, 19(6):603-611.

48. Edelman K, He Q, Makinen J, Sahlberg A, Haanpera M, Schuerman L, Wolter J, Mertsola J: Immunity to pertussis 5 years after booster immunization during adolescence. *Clin Infect Dis* 2007, 44(10):1271-1277.

49. Leung AK, Robson WL, Davies HD: Pertussis in adolescents. *Adv Ther* 2007, 24(2):353-361.

50. G. FABRICIUS PB, M. ORMAZABAL, A. MALTZ AND D. HOZBOR: Modelling pertussis transmission to evaluate the effectiveness of an adolescent booster in Argentina. *Journal of epidemiology and Infection* Accepted 31 May 2012 2012.
51. Bottero D, Gaillard ME, Basile LA, Fritz M, Hozbor DF: Genotypic and phenotypic characterization of *Bordetella pertussis* strains used in different vaccine formulations in Latin America. *J Appl Microbiol* 2012, 112(6):1266-1276.
52. Donnenberg MS, Kaper JB: Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* 1991, 59(12):4310-4317.
53. Fernandez J, Sisti F, Bottero D, Gaillard ME, Hozbor D: Constitutive expression of *bvgR*-repressed factors is not detrimental to the *Bordetella bronchiseptica*-host interaction. *Res Microbiol* 2005, 156(8):843-850.
54. Komatsu E, Yamaguchi F, Abe A, Weiss AA, Watanabe M: Synergic Effect of Genotype Changes in Pertussis Toxin and Pertactin on Adaptation to an Acellular Pertussis Vaccine in the Murine Intranasal Challenge Model. *Clin Vaccine Immunol* 2010.
55. Stainer DW, Scholte MJ: A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol* 1970, 63(2):211-220.
56. Muyldermans G, Pierard D, Hoebrex N, Advani R, Van Amersfoorth S, De Schutter I, Soetens O, Eeckhout L, Malfroot A, Lauwers S: Simple Algorithm for Identification of *Bordetella pertussis* Pertactin Gene Variants. *J Clin Microbiol* 2004, 42(4):1614-1619.
57. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Immunoblotting in the clinical laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989, 27(8):495-501.
58. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227(5259):680-685.
59. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72:248-254.
60. Rumbo M, Sierro F, Debard N, Kraehenbuhl JP, Finke D: Lymphotoxin beta receptor signaling induces the chemokine CCL20 in intestinal epithelium. *Gastroenterology* 2004, 127(1):213-223.
61. Rumbo M, Courjault-Gautier F, Sierro F, Sirard JC, Felley-Bosco E: Polarized distribution of inducible nitric oxide synthase regulates activity in intestinal epithelial cells. *FEBS J* 2005, 272(2):444-453.

Condiciones de la presentación:

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Investigador, la que deberá incluir:
 - a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 21).
 - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período"
 - c. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:

- a. Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: ininvest@cic.gba.gov.ar (puntos 1 al 21), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
- b. En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.

Nota: El Investigador que desee ser considerado a los fines de una promoción, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.