

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO Informe Científico¹

PERIODO ²: 2010-2011

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:

Estudios moleculares y epidemiológicos esenciales para la reformulación de una vacuna del calendario nacional de vacunación.

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Adjunto con director Fecha: 1998

ACTUAL: Categoría: Principal desde fecha: 2009

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM)

Facultad: Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata

Departamento: Ciencias Biológicas

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: 47 y 115 N°: xx

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. El componente pertussis está contenido dentro de tres vacunas de nuestro actual Calendario Nacional de Vacunación (www.msal.gov.ar/html/site/vacuna._cal2.asp). Las formulaciones anti-pertussis, si bien han disminuido la morbi-mortalidad causada por la enfermedad, requieren de desarrollos y mejoras sobre todo si se tiene en cuenta que la enfermedad contra la cual está dirigido está considerada reemergente. 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 2500 muestras clínicas analizadas en cada uno de los dos últimos años) y la transferencia de tecnologías no solo en nuestro país sino en otros países latinoamericanos como Ecuador, Colombia, Venezuela y Perú. Hemos implementado además un programa de aseguramiento de la calidad de las metodologías diagnóstica. Como en los periodos anteriores además trabajamos fuertemente en el análisis de datos obtenidos del trabajo de vigilancia epidemiológica. 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 SIVILA 1181 casos mientras que para el año 2011 el número de casos notificados fue de 8326.

Las conclusiones extraídas de los mismos fueron difundidas a la red de vigilancia, a los ministerios y secretarías de salud, en los trabajos y presentaciones a congreso que se incluyen más abajo.

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 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, PID2009. Durante el período informado 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 período anterior al año 2002 (período 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 período además hemos concluido con 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 enviado a una revista internacional con referato para su consideración.

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 período continuamos trabajando sobre 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*. Durante el período que se informa estudiamos 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. 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. Durante el periodo que se informa avanzamos en la caracterización de formulación acelular desarrollada por nosotros 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 a los componentes tetánico y difterico para formular una vacuna triple acelular ya que así se encuentra en los calendarios nacionales de vacunación. Con esta formulación hemos realizados ensayos de protección y toxicidad empleando ensayos recomendados por la OMS. Los resultados alcanzados han sido altamente satisfactorios. Los mismos constituyen 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 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 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, Bettioli 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 COQUELUCHES 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, Piansola 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^a Municipalidad de Rosario: Hosp. De Niños Zona Norte – Rosario – Santa Fe

7 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); Ruggeri 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); Sorhouet 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 a new 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, Bettioli 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

Científicos

En Revistas con referato:

1- 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)

2- 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

3- 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

4- 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. Aceptado.

5- 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

6- 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

7- 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.

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

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- 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 Feb 9
Abstract

Non specific enhancement of the airways innate response has been shown to impair lung infections in several models of infection such diverse as influenza A, Streptococcus pneumoniae and Aspergillus niger. Our aim was to evaluate if a similar event could operate in the context of Bordetella pertussis respiratory infection, not only to enrich the knowledge of host-bacteria interaction but also to establish immunological basis for the development of new control strategies against

the pathogen. Using a *B. pertussis* intranasal infection model and co administration of different TLR agonists at the moment of the infection we observed that the enhancement of innate response activation, in a TLR4 dependent way, could efficiently impair *B. pertussis* colonization ($p < 0.001$). While LPS from different microbial sources were equally effective in promoting this effect, flagellin and poly I:C coadministration, in spite of inducing expression of innate response markers TNF α , CXCL2, CXCL10 and IL6, were not effective to prevent *B. pertussis* colonization. Our results indicate that during the early stage of infection, specific antimicrobial mechanisms triggered by TLR4 stimulation are able to impair *B. pertussis* colonization. These findings could complement our current view of the role of TLR4 dependent processes that contribute to anti-pertussis immunity.

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- 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

Abstract

Pertussis or whooping cough is an acute, highly contagious respiratory infection, which is particularly severe in infants under one year old. In classic disease, clinical diagnosis may present no difficulties. In other cases, it requires laboratory confirmation. Generally used methods are: culture, serology and PCR. For the latter, the sample of choice is a nasopharyngeal aspirate, and the simplest method for processing these samples uses proteinase K. Although results are generally satisfactory, difficulties often arise regarding the mucosal nature of the specimens. Moreover, uncertainties exist regarding the optimal conditions for sample storage. This study evaluated various technologies for processing and storing samples. Results enabled us to select a method for optimizing sample processing, with performance comparable to commercial methods and far lower costs. The experiments designed to assess the conservation of samples enabled us to obtain valuable information to guide the referral of samples from patient care centres to laboratories where such samples are processed by molecular methods.

En esta publicación he dirigido la investigación, he trabajado en el análisis de los datos, y he contribuido a la escritura del trabajo.

3- 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

Abstract

Pertussis remains endemic across the world, with an estimated 279,000 deaths in 2002, the majority in infants under 1 year of age. Worldwide epidemiologic data indicates increasing infection rates in older children and adults, which act as a source of infection to young infants. The Global Pertussis Initiative (GPI) is an expert scientific forum, which has published consensus recommendations for the monitoring, prevention, and treatment of the disease. This paper reports the proceedings of a regional meeting, held in Costa Rica in December 2008. The meeting gathered information on regional epidemiological, diagnostic capabilities and the ability to introduce GPI recommended vaccine strategies in Latin America.

The capacity of Latin American countries to conduct vaccination programs is high and there is considerable government support. Whole-cell pertussis vaccines are used across Latin America, which appear to be quite effective. A 4-dose schedule is typically used (2, 4, 6, and 18 months), and a booster given at 4 to 6 years of age, with coverage often above 90%, but with regions of low coverage due to political and geographical difficulties. Adequate surveillance is lacking in many countries, giving insufficient data to guide vaccination policy. Improvements are being made, with countries such as Costa Rica, Panama, and Argentina introducing polymerase chain reaction (PCR) diagnosis. Those countries that do not currently use a preschool booster should launch one. Implementing vaccination programs in adolescents and/or adults to reduce exposure to infants would be beneficial and possible in most countries, given their current infrastructure.

En este trabajo he contribuido en la obtención de los datos y la discusión de los mismos. He participado además en la escritura del trabajo

4- 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

Abstract

Bordetella bronchiseptica is a well-known animal pathogen sporadically found associated with human infections especially in immunocompromised hosts. We report a fatal case of sepsis caused by *B. bronchiseptica* in a girl with laryngotracheitis and AIDS.

En este trabajo he contribuido en la realización de las metodologías diagnósticas y en la discusión de los datos. He participado además en la escritura del trabajo

5- 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

Abstract

In an effort to devise a safer and effective pertussis acellular vaccine, outer membrane vesicles (OMVs) were engineered to decrease their endotoxicity. The pagL gene from *Bordetella bronchiseptica*, which encodes a lipid A 3-deacylase, was expressed in *Bordetella pertussis* strain Tohama I. The resulting OMVs, designated OMVs(BpPagL), contain tetra- instead of penta-acylated LOS, in addition to pertussis surface immunogens such as pertactin and pertussis toxin, as the wild type OMVs. The characterized pertussis OMVs(BpPagL) were used in murine *B. pertussis* intranasal (i.n.) challenge model to examine their protective capacity when delivered by i.n. routes. Immunized BALB/c mice were challenged with sublethal doses of *B. pertussis*. Significant differences between immunized animals and the PBS treated group were observed ($p < 0.001$). Adequate elimination rates ($p < 0.005$) were observed in mice immunized either with OMVs(BpPagL) and wild type OMVs. All OMV preparations tested were non toxic according to WHO criteria; however, OMVs(BpPagL) displayed almost no weight loss at 3 days post administration, indicating less toxicity when compared with wild type OMVs. Induction of IL6- and IL1-expression in lung after i.n. delivery as well as neutrophil recruitment to airways showed coincident results, with a lower induction of the proinflammatory cytokines and lower recruitment in the case of OMVs(BpPagL) compared to wild type OMVs. Given their lower endotoxic activity and retained protective capacity in the mouse model, OMVs(BpPagL) obtained from *B. pertussis*

seem as interesting candidates to be considered for the development of novel 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.

6- 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

Abstract

Although *Bordetella pertussis* contains and transcribes loci encoding type III secretion system (TTSS) homologues, expression of TTSS-associated proteins has been reported only for non-laboratory-adapted Irish clinical isolates. Here we confirm such a result for clinical isolates obtained from patients treated in Argentinean hospitals. Moreover, we demonstrate that the expression of TTSS-associated proteins is independent both of the year in which the isolate was obtained and of the types of polymorphic alleles for other virulence factors but is dependent on environmental growth conditions. Interestingly, we observed that TTSS-associated protein expression is lost after successive in vitro passages but becomes operative again when bacteria come into contact with the host. This in vivo activation of TTSS expression was observed not only for clinical isolates previously adapted to the laboratory after successive in vitro passages but also for vaccine strains that did not express the system in vitro. The reversibility of TTSS expression, demonstrated by its switching off-on when the bacterium comes into contact with the host, appears to be an adaptive response of this pathogen.

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

7- 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.

Abstract

The present authors have previously obtained the *Bordetella bronchiseptica* mutant BbLP39, which contains a deep-rough lipopolysaccharide (LPS) instead the wild type smooth LPS with O antigen. This mutant was found to be altered in the expression of some proteins and in its ability to colonize mouse lungs. Particularly, in BbLP39 the expression of pertactin is decreased. To differentiate the contribution of each bacterial component to the observed phenotype, here mice defective in the LPS sensing receptor TLR4 (TLR4-defective mice) were used. In contrast to wild-type mice, infection of TLR4-defective mice with BbLP39 resulted in lung infection, which persisted for more than 10 days post-challenge. Comparative analysis of the immune responses induced by purified mutant and wild type LPSs showed that the mutant LPS induced significantly higher degrees of expression of TNF- α and IL-10 mRNA than did the wild type. UV matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI TOF) mass spectrometry analysis revealed that both LPSs had the same penta-acylated lipid A structure. However, the lipid A from BbLP39 contained pyrophosphate instead of phosphate at position 1. This structural difference, in addition to the lack of O-antigen in BbLP39, may explain the functional differences between BbLP39 and wild type strains.

En esta publicación he dirigido la investigación, siendo la autora responsable (corresponding author), 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.*

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.*

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

G. FABRICIUS¹ *, P. BERGERO¹, M. ORMAZABAL², A. MALTZ³ and D. HOZBOR²

¹ Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, CC 16, 1900 La Plata, Argentina

² Laboratorio VacSal. Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata y CCT-La Plata, CONICET. Calles 47 y 115 (1900) La Plata, Argentina.

³ Departamento de Matemática, Universidad Nacional de La Plata, Casilla de Correo 172 (1900) La Plata, Argentina

Running Head: Modeling pertussis transmission

SUMMARY

Due to the current epidemiological situation of pertussis, several countries have implemented different vaccination strategies including 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 to assess the impact of the booster dose at 11 years of age (Tdap booster) to the 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 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 show the robustness of these conclusions.

Bordetella holmesii in children suspected of pertussis

Bottero, Daniela¹; Griffith, Matthew M.²; Lara, Claudia ³; Flores, Darío¹; Pianciola, Luis⁴; Emilia Gaillard¹, Mazzeo, Melina⁴; Zamboni, Maria Ines⁵; Spoletti, María Julia⁶; Anchart, Eduardo⁷; Ruggeri, Diego³; Sorhouet, Cecilia³; Fiori, Silvana¹; Galas, Marcelo³; Tondella, Maria L.²and Hozbor, Daniela^{1*}

¹Laboratorio VacSal Instituto de Biotecnología y Biología Molecular IBBM – FCE – UNLP, calle 115 entre 49 y 50, La Plata, Buenos Aires.

²Meningitis 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, Atlanta GA, USA.

³ Servicio de Bacteriología Clínica-INEI-ANLIS” Dr. Carlos G. Malbrán”, Av. Vélez Sarsfield 563 (AFF 1282) Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

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 Municipalidad de Rosario: Santa Fe

⁶ Municipalidad de Rosario: Hospital. De Niños Zona Norte – Rosario – Santa Fe.

⁷ Dirección Provincial de Farmacia, Bioquímica y Droguería Central del Ministerio de Salud de la Provincia de Santa Fe.

Correspondence

Daniela Hozbor. Laboratorio VacSal. Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, CCT La Plata CONICET. Calles 47 y 115 (1900) La Plata, Argentina Tel 54-221-422-9777; e-mail: hozbor@biol.unlp.edu.ar, hozbor.daniela@gmail.com

ABSTRACT

We describe nine patients (eight <1 year old) 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 deaths were reported. We present the first published report of respiratory-associated *B. holmesii* in infants in Argentina.

7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.

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

TLR4-dependent signaling is critical for the innate defense mechanisms against *Bordetella pertussis* infection

Griselda Moreno, Roy Roberts, Laurye Van Maele, Agustina Errea, Jean Claude Sirard, Arndt Benecke, Daniela Hozbor & Martin Rumbo

The innate immune system plays a crucial role in the first line defense against microbial infections, being activated through germ-line encoded pattern recognition

receptors (PRRs). Several families of PRRs have been characterized including Toll-like receptors (TLRs), NOD-like receptors and lectin-type receptors. PRRs recognize conserved microbial structures, so-called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which are present across a diverse range of microorganisms. Activation of innate immunity is not dependent upon pre-exposure to the pathogen and triggers a very rapid response aiming to contain the microbial menace. Depending on PRRs, the innate response may present particular features. As a general rule, PRR signaling also activates regulatory elements that limit the duration of response in order to prevent tissue damage. Finally, this transient and strongly regulated response settles down the conditions for the articulation of the adaptive immune response.

Bacterial lipopolysaccharides (LPS) or endotoxins found on the cell membrane of Gram negative bacteria, are prototypical PAMPs that are specifically recognized by TLR4 [1]. The pulmonary response to either systemic administration or respiratory exposure to LPS is TLR4-dependent (Int J Exp Pathol. 2007 Dec;88(6):387-91. Toll-like receptor and tumour necrosis factor dependent endotoxin-induced acute lung injury. Togbe D, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Doz E, Noulin N, Janot L, Secher T, Gasse P, Lima C, Coelho FR, Vasseur V, Erard F, Ryffel B, Couillin I, Moser R.). Recent studies demonstrated that the extent of the pulmonary response to inhaled endotoxin is determined by the level of TLR4 expression and the structure of the LPS [4, 5].

Bordetella pertussis is the causative agent of pertussis or whooping cough, a respiratory infection that, in spite of widespread vaccination, is still among the top 10 worldwide causes of infant death [6]. *B. pertussis* is highly transmissible through aerosols generated by infected individuals being most prevalent among pediatric population (ref). Although *B. pertussis* is a human pathogen, intranasal infection mouse model has been extensively used to determine critical pathways and molecules in the host-pathogen interaction (ref). *B. pertussis* LPS is a lipooligosaccharide (LOS), which plays an important role in the host response against the pathogen [7, 8]. C3H/HeJ mice carries a mutation in the gene coding for TLR4 that renders unresponsive to LOS, and various studies have shown that adaptive immunity to *B. pertussis* is impaired in these animals [9, 10].

It is assumed that TLR4 is important for the initial response against *B. pertussis*; however, scarce information regarding the early stages of the infection is available. In the present work, we aimed to dissect the TLR4 contribution to the anti-pertussis response during the initial phase of the immune response. We determined that TLR4 is absolutely necessary for the initial recognition early clearance of *B. pertussis*. Using transcriptomics, we found that TLR4 signaling triggers a gene expression signature that is characterized by the swift expression of genes encoding pro-inflammatory mediators and chemokines specific for immune cells including neutrophils. Finally, we showed that neutrophils are instrumental for the control of the infection by the rapid recruitment of neutrophils to airways.

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

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 Claudia², Griffith Matthew³, Flores Darío¹, Pianciola Luis⁴, Mazzeo, Melina⁴, Zamboni Maria Ines⁵, Spoleti María Julia⁶, Anchart Eduardo⁷, Ruggeri Diego², Sorhouet Cecilia², Fiori Silvana¹, Galas Marcelo² y Hozbor Daniela¹

1 Instituto 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

3 Meningitis 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^a Municipalidad de Rosario: Hosp. De Niños Zona Norte – Rosario – Santa Fe

7 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); Ruggeri 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); Sorhouet 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 a new 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, MI6, 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

Fabricsius, 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.

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)

Tutorial para notificación de Coqueluche a través de SIVILA. Sep 2010

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

10- Transferencia de Protocolos de Vigilancia epidemiológica para pertussis. Taller Whonet y Red de Meningitis e IRAs bacterianas. 9 -11 Mayo 2010. Mar de Plata.

11- Transferencia técnico Académica a Secretaria de Salud de Colombia y al Instituto Nacional de Salud de Colombia (Abril 2011). Diagnóstico, caracterización y vigilancia laboratorial de Bordetella pertussis: Revisión y Mejoramiento. Dra. Daniela Hozbor. Segunda etapa

12- Transferencia técnico Académica a Secretaria de Salud de Ecuador (Julio 2011). Diagnóstico, caracterización y vigilancia laboratorial de Bordetella pertussis: Revisión y Mejoramiento. Dra. Daniela Hozbor.

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.*

Vacuna intranasal para la prevención de las infecciones por Bordetella pertussis, método de inmunización y procedimiento para su preparación. Daniela Hozbor, Martin Rumbo, Roy Roberts Griselda Moreno, Emilia Gaillard, Daniela Bottero, Augusto Graieb, Matías Fingerhann, Federico Sisti, Julieta Fernández. Presentado para su consideración como patente al Instituto Nacional de la Propiedad Intelectual P070104765. en trámite

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 Microscopía avanzada en nuestra facultad. A través de los subsidios ganados hemos adquirido equipamiento de gran envergadura como los son: un microscopio de disección laser, un microscopio invertido de fluorescencia y un criotomo. Estos equipos junto al microscopio confocal aportado desde otro consorcio académico constituimos la plataforma. 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.

He trabajado activamente para que se emplace en nuestra facultad un bioterio que cumpla con normas de calidad y funcionamiento nacionales e internacionales

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.

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

- Episteme. Revista de Ciencias. Instituto de Física La Plata CONICET. Año 4 N°11. Pag. 18-20. 2011. Pertussis, una enfermedad inmunoprevenible vigente. Dra. Daniela Hozbor

- Vigilancia nacional de tos convulsa, coqueluche o pertussis: Experiencia del Hospital Garrahan y de los Laboratorios Nacionales de Referencia. D. Hozbor, D. Flores, D. Bottero, C. Lara, S. Fiori, C. Sorhouet, M. Regueira, M. Galas, M.E. Venuta, H. Lopardo. Revista Medicina Infantil. Número 4- 2010; Volumen XVII, 366

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

Becarios:

Daniela Bottero. Becaria Posdoc CONICET

Emilia Gaillard. Becaria Posdoc CONICET

Eugenia Zurita Becaria Doctoral CONICET

Maximiliano Ormazabal Becario Doctoral CONICET

Investigadores:

Federico Sisti. Investigador Asistente CONICET

Julieta Fernández. Investigadora Asistente. 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.*

Dirección de Tesis finalizadas en el periodo que se informa

Apellido y Nombres: Bioq. Daniela Bottero

Universidad: Universidad Nacional de La Plata.

Tema: "Bases moleculares para la prevención de enfermedades causadas por Bordetella pertussis, un patógeno re emergente".

Defensa: Junio de 2010 Calificación: sobresaliente diez (10)

Apellido y Nombres: Bioq. Augusto Graieb

Universidad: Universidad Nacional de La Plata.

Tema: "Nuevas estrategias basadas en genómica para el mejoramiento de vacunas contra un patógeno re emergente".

Defensa: 18 de Octubre de 2011. Calificación: sobresaliente diez (10)

Apellido y Nombres: Bioq. Matías Fíngermann

Universidad: Universidad Nacional de La Plata.

Tema: "CARACTERIZACION MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LA RESPUESTA A LA ACIDEZ EN BORDETELLA BRONCHISEPTICA. POSIBLE ROL EN LA INFECCION PERSISTENTE".

Defensa: 30 de Noviembre de 2011. Calificación: sobresaliente diez (10)

Co- dirección Tesis doctorales finalizadas

Apellido y Nombres: Bioq. Agustina Errea

Universidad: Universidad Nacional de La Plata.

Tema: Análisis de la respuesta innata mucosaldesencadenada por agonistas de receptores tipo toll

(TLR). Evaluación de su relevancia en la interacción B. pertussis-huésped

Defensa: 26 de Marzo de 2012. Calificación: sobresaliente diez (10)

Dirección de Trabajo Final de grado FCE UNLP

Apellido y Nombres: Lucia Avila

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

Tema: "Expresión y Purificación de la subunidad activa de la toxina pertussis".

Presentación: Junio de 2011 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.*
ver 7.5

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

ENTRENAMIENTO PARA TOMA DE DECISIONES EN VACUNAS

Organizado por la Fondation Mérieux & Université de Genève, at "Les Pensières", Veyrier-du-Lac . (French Alps), near Geneva. 14 – 27 de Mayo 2011. ADVAC: a two-week training programme for decision-makers, including academia, industry, governmental and non-governmental agencies, in all fields related to vaccines and vaccination, vaccine trials, new vaccines, vaccination strategies and policies, vaccine-specific issues (including hepatitis, meningitis, polio, measles, pneumococcal diseases, influenza, malaria, HIV and AIDS, tuberculosis, HPV, rotavirus, dengue & JE), ethical issues related to vaccine trials, financing of immunization policy, communication.

Over 60 top-level international lecturers and working group supervisors, all experts in vaccinology

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

Convenio ANLIS Malbran - IBBM FCE UNLP Responsable Dra. Daniela Hozbor
Diagnóstico laboratorial de Bordetella spp.

Proyecto PAE 37207 ANPCyT.

Producción nacional de vacunas bacterianas del Calendario Nacional de Vacunación Argentina. Empleo de estrategias ómicas para el mejoramiento y diseño de nuevas formulaciones. Investigador Responsable: Dra. D. Hozbor. Monto total asignado al proyecto: \$ 9.511.874

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.*

Integrante de la Comisión Específica de carrera de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata

Responsable del Diagnostico molecular para de Bordetella (agente causal de la tos convulsa) que se realiza en el IBBM sobre muestras de pacientes pediátricos y sus contactos provenientes de diferentes provincias de nuestro país. Enero de 2004-Actual.

Integrante del Consejo directivo del consorcio que ha obtenido un subsidio para la compra de grandes equipos PME. Se nos ha autorizado la compra del MALDI – TOF TOF que se constituiría en el primer equipo de esta categoría en el país en el sector público.

-Revisor Científico de Acta Neuropathologica 2010

- Revisor Científico de European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 2010
- Revisor Científico de Journal of Pediatric Infectious Diseases 2010
- Revisor Científico de Toxicon TOXCON-D-10-00486 2011
- Revisor Científico de Journal of Infection YJINF-D-11-00087 2011
- Revisor Científico del Journal Plos Pathogens PONE 10 04840
- Revisor Científico del Journal Plos Pathogens PONE D 11 02064
- Revisor Científico del Journal Plos Pathogens PONE-D-11-05819
- Revisor Científico del Journal Emerging Infectious Diseases EID-11-0957
- Revisor Científico del FEMS Immunology & Medical Microbiology FEMSIM-11-08-0206
- Revisor Científico de Journal of Infection YJINF-D-11-00732
- Revisor Científico de International Journal of Infectious Diseases IJID-D-11-00515
- Revisor Científico del Journal Plos Pathogens PONE-D-11-18331
- Revisor Científico del Journal of Proteomics JPROT-D-11-00555
- Revisor Científico del Journal Microbial Pathogenesis YMPAT-D-12-00013
- Revisor Científico del Journal Plos Pathogens PONE-D-11-23632R1
- Revisor Científico del Journal Vaccine JVAC-D-12-00204
- Revisor Científico del Clinical and Vaccine Immunology CVI00159-12
- Revisor Científico del Clinical and Vaccine Immunology CVI21830-12

Evaluador proyectos Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. 2009 PICT 2008.

- Evaluador Proyecto Internacional Holanda 2009
- Evaluador Proyectos de Extensión UNLP 2009
- Evaluador Proyecto Bicentenario Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica 2010
- Evaluador de Proyectos de Extensión UNLP 2010
- Evaluador de Proyectos PAE EBT ANPCYT 2010
- Evaluador de Proyecto PAE EBT ANPCYT 2010
- Evaluador de Proyecto PAE EBT ANPCYT 2011
- Evaluador de Proyecto PICT ANPCYT 2011

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

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

PONE-D-11-25485
PONE-D-11-22471
PONE-D-11-20082R1
PONE-D-12-01308
PONE-D-12-01433
PONE-D-11-22724

PONE-D-12-02241
PONE-D-11-21681R1

Jurado de la Tesis Doctoral de Sebastián Sarbacki, Tema: " Mutantes de Salmonella enterica en el gen de ADN adenina metil transferasa (dam). ¿Cepas apropiadas para la construcción de vacunas? "FCE UBA 22 de Marzo 2010

Jurado de la Tesis Doctoral de Florencia Alvarez, Tema: " Selección de rizobacterias con potencial de biocontrol contra hongos fitopatógenos: Estudios de antagonismos in vitro e in vivo e identificación de genes implicados. Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Ciencias Exactas, Físico Químicas y Naturales. 2 de septiembre 2010

Jurado como representante del claustro de Profesores del Concurso para aspirar a un cargo de Ayudante Diplomado Ordinario Asignatura Fisiología Facultad de Ciencias Exactas. UNLP Febrero 2011.

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.

Coordinadora Segundo Taller: Estudio de la genómica funcional a través de la espectrometría de masa. 31 de Marzo de 2010 de 09 a 17hs.

Lugar de realización: Sede Central de la AAM, Dean Funes 472. C.A.B.A.

Docente de la Maestría en Microbiología Molecular. Centro Nacional de Redes de Laboratorio ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" Av. Vélez Sársfield 563. Septiembre 2010.

Docente de la Maestría en Biología Molecular de la FCE UNLP. 29 de Octubre 2010.

Docente del CURSO DE POSTGRADO: DISEÑO DE VACUNAS EXPERIMENTALES PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS
DIRECTOR: Dr. Iván Marcipar

FECHA: 6 de septiembre al 29 de Noviembre de 2011

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.*

A continuación incluyo uno de los proyectos en curso

OBJETIVOS GENERALES (Máx 1 pág.) 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 pero pese a ello, quedan aún dolencias de vieja data por 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*. Esta enfermedad no sólo no se ha podido erradicar, pese al uso masivo de vacunas desde 1940, sino que en la actualidad ha reemergido (de Serres et al., 1995, Mooi et al., 1999, de Melker et al., 2000, Fry et al., 2001). Mundialmente se registran por año 60 millones de casos de los cuales 500.000 resultan ser fatales. Pertussis es particularmente grave en menores de 1 año de edad y ocupa el quinto lugar como causa de muerte en niños.

En Argentina la enfermedad ha evolucionado en forma de brotes epidémicos cada cuatro años (Romano et al., 2002). Aún por encima de este perfil epidemiológico se ha venido registrando un aumento significativo de casos de pertussis reportados al Ministerio de Salud de la Nación en el marco de las notificaciones obligatorias, sobre todo durante los últimos dos años. Particularmente, nuestro laboratorio viene realizando el diagnóstico molecular de *Bordetella* desde 1997 primero a nivel de la provincia de Buenos Aires y luego abarcando a otras provincias de nuestro país (Córdoba, Catamarca, Tucumán, Neuquén, Santiago del Estero). Los datos obtenidos han mostrado un claro aumento de la incidencia de pertussis en nuestra población (Fingermann et al., 2003, 2004, 2006, Bottero et al., 2007, Hozbor et al 2009. Hemos observado 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.

Esta situación de reemergencia de la enfermedad no es privativa de Argentina ya que la misma viene registrándose en varios lugares del mundo desde 1990 (de Melker et al. 2000, Mooi et al., 2001, He et al., 2003). Varias son las causas que podrían explicarla, la mayoría de ellas están asociadas a deficiencias en la vacuna: baja efectividad, corta duración de la inmunidad conferida, inmunoselección de variantes del agente causal con diferencias inmunogénicas respecto de la cepa vacunal (Trollfors et al., 1984, Delafuente et al., 1989, Miller et al., 1997, Mooi et al., 1998, Mastrantonio et al., 1999, Makela, 2000, Jefferson 2002, David et al., 2003).

Para la prevención de la enfermedad, en un comienzo se utilizaron vacunas celulares, aunque más recientemente se fueron introduciendo diversos tipos de vacunas acelulares. Así, en algunos países como Argentina se utilizan sólo vacunas celulares, en tanto que en otros se usan sólo acelulares o bien una combinación de ambas. 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 buena vacuna, ya sea por la severidad de sus efectos colaterales (celulares) o por su baja eficacia (celulares y acelulares) (Trollfors et al., 1984, Fine y Clarkson 1987, Jefferson et al., 2002). Recientemente se han detectado más inconvenientes en 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 (David et al., 2003). Otro 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 (Mooi et al., 1999,

Mooi et al., 2000, Mooi et al., 2001, Weber et al., 2001, He et al., 2003). Estos hallazgos inquietantes han motivado que en el Simposio de Pertussis en Cambridge en Octubre de 2002 se consensara la necesidad urgente de hacer un relevamiento de la diversidad antigénica de las cepas de *B. pertussis* de prevalencia en cada país. En este sentido, Francia, Holanda, Canadá, Finlandia y EEUU han comenzado estos estudios. En Argentina, nuestro laboratorio ha encarado simultáneamente un relevamiento similar, siendo hasta nuestro conocimiento, el único realizado en América Latina (Fingerman et al, 2006). Allí hemos detectado que el 100% de los aislamientos obtenidos de hospitales pediátricos poseen variantes alélicas de inmunógenos protectores diferentes a las de la CV (actualmente importada en su totalidad).

Todos estos datos señalan la necesidad de desarrollar nuevas formulaciones sobre la base de conocimientos que no sólo incluyan los referidos al patógeno, al hospedador y a su interacción, sino que además abarquen a aspectos tales como la incidencia de las diferentes especies en la población y el grado de divergencia entre la PBC y las CV como así también su relevancia en la protección. Claramente deben identificarse nuevos inmunógenos que confieran protección no sólo contra *B. pertussis* sino también contra las otras especies que tengan relevancia epidemiológica. En esta propuesta abordaremos estos aspectos esperando que los resultados que se obtengan permitan definir la composición de nuevas formulaciones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO. (Máx 1 pág)

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.

Teniendo en cuenta la clara necesidad de una vacuna anti-Bordetella mejorada, proponemos intensificar la búsqueda de nuevos inmunógenos aplicando por un lado una metodología de concepción clásica basada en la identificación de inmunógenos mediante el empleo de técnicas como geles 2D, MALDI-TOF, huella peptídica y western blot, por otro empleando una metodología desarrollada más recientemente para otros patógenos, la vacunología reversa (Pizza et al., 2000, Adu-Bobie et al., 2003) (este proyecto).

Con la primera estrategia intentaremos identificar nuevos inmunógenos mediante la comparación de los proteomas superficiales de las cepas vacunales hoy en uso con los de aislamientos locales elegidos como representativos de la población bacteriana circulante local en base a los perfiles en la electroforesis en campo pulsátil. Las proteínas diferenciales expresadas en los aislamientos locales podrían mejorar la protección contra aquellos aislamientos que hoy se escapan de la inmunidad que confiere una cepa vacunal. Realizaremos para ello geles 2D asociados a espectrometría de masa del tipo MALDI TOF. Identificaremos los spots diferenciales basándonos en el conocimiento de la secuencia del genoma de *B. pertussis*. 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 su reactividad frente a sueros de individuos infectados en comparación con sueros provenientes de individuos vacunados. Se analizará el poder inmunogénico del candidato seleccionado mediante ensayos ex in vivo e in vivo empleando el modelo de desafío intranasal en ratones. Para toda esta metodología ya contamos con experiencia.

En paralelo aplicaremos la metodología denominada vacunología reversa que comienza con el conocimiento de la secuencia genómica del patógeno y con el análisis de la misma in silico. Utilizando varios softwares y bancos de datos se pueden

seleccionar putativos marcos de lectura abiertos (ORF) que codifiquen para componentes que a priori serían esenciales en la protección (Pizza et al., 2003). Así, se pueden identificar secuencias que codifiquen para proteínas de superficie o proteínas que se secretan, lipoproteínas, dominios RGD y también proteínas con homología a factores bacterianos involucrados en la virulencia o patogénesis (Scarselli et al., 2001, Montigiani et al., 2002). En este caso en particular, dado que conocemos las secuencias completas de los genomas de las tres especies de *Bordetella* (Parkhill et al., 2003), podremos seleccionar en base a ellas no sólo inmunógenos comunes a las tres sino propios, ya que como hemos descripto más arriba, la utilización de vacunas acelulares sólo con componentes de *B. pertussis* ocasiona un incremento de la incidencia de, por ejemplo, *B. parapertussis* (David et al., 2003).

Los ORF que así se seleccionen pueden amplificarse por PCR y clonarse en *Escherichia coli* para ser expresados cada uno como proteínas de fusión con motivos que permiten su rápida purificación por cromatografía de afinidad. A partir de preparaciones puras, puede evaluarse por un lado si las mismas son reconocidas por sueros de pacientes infectados y por otro su capacidad inmunogénica y protectora en el modelo animal de infección hoy en uso.

En esta presentación se espera analizar un número mayor de candidatos vacunales y profundizar la caracterización de los mismos mediante técnicas de análisis de la respuesta y la influencia del polimorfismo del antígeno seleccionado en la efectividad de la protección. Los nuevos inmunógenos que así se identifiquen deberán analizarse además en el contexto del polimorfismo y su relevancia en la protección. Para ello se compararán las secuencias correspondientes a dichos inmunógenos entre los diferentes aislamientos ya realizados y con los que esperamos obtener de ser aprobada esta propuesta.

En resumen, con el desarrollo de esta propuesta esperamos identificar nuevos inmunógenos que permitan conferir una mejor protección contra pertussis y además contra las otras especies que tengan 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 -.

Dentro del calendario de vacunación nacional, una vacuna que Argentina importa en su totalidad es la vacuna anti-pertussis incluida en las vacunas triple y cuádruple bacteriana. Sobre el componente pertussis de estas vacunas existe información contundente acerca de la relativamente baja eficiencia en la protección que confieren, corta duración de la inmunidad y la aparición de reacciones secundarias adversas que pueden llegar hasta la muerte (Fine y Clarkson, 1987, Edwards et al., 1995). Más aún, se ha informado que estas vacunas estarían ejerciendo una presión de selección de variantes bacterianas más virulentas sobre las que las vacunas en uso tendrían una eficacia aún menor (Mooi et al., 1999, de Melker et al., 1997, de Melker et al., 2000, Weber et al., 2001, Fry et al., 2001, Mooi et al., 2002). Esta situación en general ha ocasionado el incremento de la incidencia de pertussis en la población aún en lugares con altos índices de vacunación (De Serres et al., 1995, Mooi et al., 1999, Cherry et al., 2000, de Melker et al., 2000, Van Loo and Mooi 2002, Gilberg et al., 2002). Esta reemergencia de pertussis también ha sido registrada en Argentina (Ministerio de Salud de la Nación y nuestro grupo)

Algunos países como Japón, Suecia, Canadá o Francia han incorporado dentro de los esquemas de vacunación la utilización de formulaciones acelulares de diferente composición: vacunas monovalentes conteniendo solamente la toxina pertussis (PT), bivalentes compuestas por PT y la adhesina hemaglutinina filamentosa (FHA),

trivalentes compuestas por PT, FHA y la adhesina pertactina (Prn) y pentavalentes: PT, FHA, Prn, fimbrias FIM2 y FIM3 (Edwards et al., 1995). En otros países como Argentina este tipo de formulaciones, que recientemente han aparecido en el mercado, se aplican sólo por recomendación del médico. En Francia y Canadá se está estudiando la aplicación de formulaciones acelulares menos reactogénicas sobre la población adolescente-adulta de manera de evitar así la existencia de portadores del patógeno (French vaccination calendar, Canadian vaccination recommendations). Esta nueva inmunización en edades adolescente – adulta respondería a la necesidad de interrumpir el ciclo de transmisión del patógeno. Como se muestra en la Figura 1, los adolescentes-adultos no tendrían inmunidad protectora contra *Bordetella* aproximadamente a los doce años de edad -seis años después de haber recibido el último refuerzo de pertussis- por lo que podrían volver a infectarse convirtiéndose en el reservorio del patógeno (Yaari et al 1999, Hoey 2003, National Advisory Committee on Immunization. 2003). Este grupo poblacional infectado no presenta sintomatología típica y en general no se lo diagnostica ni se lo trata por lo que puede distribuir el patógeno a la población susceptible de alto riesgo constituida por los niños menores de 1 año.

Pese a que cualquiera de las formulaciones acelulares hasta hoy diseñadas han resultado ser seguras y estar asociadas a efectos colaterales menos severos, la eficacia de las mismas contra la enfermedad clínica no es mejor que la correspondiente a la clásica vacuna celular (Edwards et al., 1995). Además recientemente se ha observado que las vacunas formuladas sólo con componentes de *B. pertussis* no protegerían efectivamente contra las infecciones causadas por otras especies del género que producen también infecciones respiratorias en el hombre (David et al., 2003). Las más efectivas de todas formas son las constituidas por un mayor número de componentes, pero aún así ellas presentan el problema de la existencia de polimorfismos en antígenos protectores.

En muchos países se ha registrado como causante de epidemias a bacterias antigénicamente diferentes a las CV o a los componentes de las vacunas acelulares (De Moissac et al., 1994, Mooi et al., 1999, Mastrantonio et al., 1999, Mooi et al., 2000, Fry et al., 2001, He et al., 2003). Esta variación entre la PBC y las CV se observó al menos, en dos proteínas cuyo rol parece ser esencial en la protección contra *Bordetella*: la pertactina (Prn) y la toxina pertussis (PT). La Prn se expresa en *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* mientras que PT se expresa sólo en *B. pertussis*.

La Prn es una proteína de membrana externa cuyos epitopes inmunodominantes y protectores incluyen dos regiones repetitivas denominadas simplemente regiones I y II (Everest et al., 1996, Mooi et al., 1998, King et al., 2001). Los estudios publicados hasta el momento muestran que *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 (King et al., 2001). 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 (Mooi et al., 2000, Boursaux-Eude y Guiso 2000, Fingermann et al., 2002; 2003).

El polimorfismo en PT (Kamachi et al., 2003) está restringido principalmente a la subunidad S1 que contiene la actividad tóxica pero también se puede observar en la subunidad S3 (Mooi et al., 1998, Mooi et al., 2000). 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. Los datos obtenidos hasta el presente muestran una clara divergencia entre las CV y los aislamientos obtenidos de pacientes. Estos últimos se han clasificado como S1A mientras que las CV como S1B y S1D (Mooi et al., 2000).

Es en base a estos resultados que se ha propuesto que las variaciones observadas tanto en Prn como PT se deben a una presión de selección inmune. Aún no ha sido esclarecida la relevancia del polimorfismo de PT, pero la variación antigénica de Prn

podría contribuir a la inmunoevasión bacteriana y a la persistencia de Bordetella en la población (Mooi et al., 2000). Resultados publicados recientemente 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 (Rodríguez et al., 2001 a,b, Hellwig et al 2003).

En Argentina los únicos datos informados en relación al polimorfismo de Prn y PT son los obtenidos por nuestro grupo. Actualmente, contamos con 300 aislamientos de Bordetella, que ya fueron analizados desde el punto de vista del polimorfismo de Prn y PT. Estos aislamientos fueron clasificados como S1A (98 % de los aislamientos) y Prn2 (92% de los aislamientos) o Prn1/7 (8% de los aislamientos), clasificación que resultó concordante con la tendencia observada a nivel mundial (Fingerman et al., 2003, 2004, 2006).

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 vacunología reversa descrita más arriba (Adu-Bobie et al., 2003, Ross et al., 2001, Wizemann et al., 2001, Pizza et al., 2003)

Nuestra propuesta ha sido elaborada en base a lo expuesto sobre la problemática existente acerca de las estrategias de prevención contra este patógeno reemergente, y a los conocimientos tanto propios del tema como generales de la proteómica, genómica y la patogénesis. Estas metodologías ya las hemos comenzado a aplicar y los resultados alcanzados se muestran en la sección de Resultados Preliminares de esta presentación.

CONSTRUCCION DE LA HIPOTESIS y JUSTIFICACION GENERAL DE LA METODOLOGIA DE TRABAJO.

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 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. Así, la eficacia de las vacunas podría incrementarse si en su formulación se incluyeran nuevos inmunógenos (abarcando este concepto a cepas, componentes bacterianos y variantes polimórficas) que además sean propios de la PBC regional. Esta propuesta requiere, en primer lugar, un estudio epidemiológico más detallado y abarcativo de la incidencia de pertussis en nuestra población y la variación existente entre los inmunógenos conocidos y en segundo lugar, 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 del Calendario Nacional de Vacunación. A continuación exponemos los lineamientos generales de las metodologías propuestas.

Para intensificar la búsqueda de nuevos inmunógenos aplicaremos una tecnología más clásica que emplea técnicas como MALDI-TOF, identificación por huella peptídica y western blot, y una tecnología más reciente denominada vacunología reversa, la cual es posible gracias a que en la actualidad se conoce el genoma de las tres especies que pueden producir enfermedades en el hombre. Para esta última, utilizando varios softwares y bancos de datos, seleccionaremos putativos ORF como se describió anteriormente. Los ORF seleccionados serán amplificados por PCR y clonados en *E. coli* para ser expresados cada uno como proteínas de fusión His-tag. Las proteínas de fusión que se expresen serán purificadas y a partir de preparaciones puras se evaluará por un lado si las mismas son reconocidas por sueros de pacientes infectados y por otro su capacidad inmunogénica y protectora en el modelo animal de infección hoy en uso. En colaboración con el Dr. Rumbo realizaremos estudios de la capacidad de estimulación de la respuesta innata por los candidatos vacunales seleccionados a través de las dos metodologías. Realizaremos ensayos in vivo de forma de poder analizar a nivel molecular la respuesta inmune inducida por los distintos candidatos vacunales. Se seguirá además 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. Analizaremos también la respuesta celular incluyendo la identificación de las poblaciones celulares involucradas en una respuesta protectora mediante el uso de microscopía de disección y de fluorescencia.

Con toda esta batería de ensayo esperamos identificar los inmunógenos que sean relevantes en la protección contra la enfermedad.

Una vez seleccionados los nuevos inmunógenos se analizará la divergencia de los mismos en el panel de bacterias que colectemos durante el desarrollo de las primeras etapas del proyecto y la relevancia de la divergencia en la protección. Este último dato nos marcará la necesidad de incluir una o más variantes en las nuevas formulaciones.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

Identificación de componentes bacterianos inmunológicamente activos, comunes y diferenciales de los aislamientos locales. Comparación con cepas de referencia

Empleo de estrategias proteómicas

Trabajaremos comparando cepas vacunales con los aislamientos que seleccionemos de acuerdo a los perfiles de PFGE de manera que sean los representativos de la población bacteriana circulante local.

Obtención de proteínas de membrana: La fracción de proteínas de membrana de *B. pertussis* se obtendrá siguiendo protocolos previamente descritos con pequeñas modificaciones. Para cada cepa, la preparación de la muestra, la electroforesis en 2-DE y la identificación de proteínas se realizarán por triplicado.

Cuantificación de proteínas: La concentración de proteínas se determinará mediante el método Bradford [Bradford M.M. 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], usando sero albúmina bovina como estándar.

Electroforesis 2-D. La primera dimensión (isoelectroenfoco, 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% anfólitos (pH 4.0 a 7.0 [Amersham]) y 0,01% Azul de

Bromophenol. 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 μ A/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 Multilmager (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 acetone 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% trifluoroacetic acid (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 sera amplificado empleando primers específicos. Estos experimentos se repetirán al menos por triplicado.

Análisis de la reactividad de los diferentes aislamientos a sueros de pacientes infectados. Inmunodetección (Western blot). Se realizarán inmunodetecciones de las proteínas de superficie de los distintos aislamientos seleccionados de los ensayos de protección en ratones. Realizaremos corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida (en una dimensión y dos dimensiones) y transferencia a membranas de polivinildifluoruro (PVDF), según el método de Towbin y colaboradores. Las proteínas

inmovilizadas se ensayarán con antisueros de individuos sanos con o sin esquema de vacunación completo, y de individuos infectados con los aislamientos clasificados en los distintos grupos. Se emplearán además proteínas de superficie extraídas de cepas de referencia y cepas vacunales. En todos los casos el revelado se llevará a cabo con anticuerpos anti-Ig humana, marcados con fosfatasa alcalina.

Identificación de componentes bacterianos inmunológicamente activos. Las bandas que se clasifiquen como diferenciales también en la inmunodetección se analizarán en su capacidad protectora. Para ello y como primer paso realizaremos la identificación de cada proteína a través de la técnica de MALDI-TOF. En nuestro laboratorio ya contamos con la infraestructura necesaria para realizar los geles bidimensionales. Además formo parte (Dra. Hozbor) del consorcio de PME que permitió la compra de un equipo MALDI TOF TOF.

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. pertussis* 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 aplicaremos la tecnología conocida como Gateway. Dicha tecnología utiliza sitios de recombinación específicos del fago

BP clonasa (que catalizan la recombinación), en vez de enzimas de restricción y ligasa para transferir segmentos de ADN a través de diferentes vectores (Landy, 1989). Así, iniciaremos el clonado de los ORF amplificadas en el vector de entrada pENTR-TOPO de Invitrogen (de 2,6 kpb con secuencias flanqueantes attL al sitio de inserción; Kmr), que permite el clonado rápido del segmento de ADN en la orientación correcta. Los productos clonados serán confirmados por secuenciamiento y luego transferidos con la LR clonasa (Invitrogen) a un vector de destino y expresión. En este caso emplearemos al vector pDEST17 (de 6,3 kpb, Apr), que contiene un promotor del bacteriófago T7 para una alta expresión de los ORF en *E. coli* y secuencias attR flanqueantes para una recombinación eficiente con las secuencias attL del vector de entrada (en este caso pENTR). Además, el pDEST17 contiene una secuencia codificante de seis histidinas en el extremo N-terminal del sitio de recombinación para una rápida purificación de la proteína de fusión con resinas de níquel. Los plásmidos recombinantes que así se obtengan serán transformados a *E. coli* BL21 (DE3) ya que permiten un alto nivel de expresión de las proteínas de fusión 6xHis-tagged bajo control del promotor T7 a escala de screening. Para obtener un rendimiento aún más alto llevaremos a cabo una inducción con IPTG. Las proteínas serán purificadas a partir de pellets celulares solubilizados con urea 8M utilizando la resina superflow Ni nitriloacetic acid de Qiagen.

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 descriptas más abajo. Algunas de ellas se realizarán en colaboración con el Dr. Rumbo

Empleo de estrategias genómicas

Identificación de candidatos vacunales contra Bordetella utilizando la genómica disponible de las tres especies que pueden producir enfermedades respiratorias en el hombre. Vacunología reversa.

1- Selección de los ORF. Análisis de secuencias.

Como hemos descripto anteriormente el primer screening de potenciales secuencias codificantes de los genomas de Bordetella: B. pertussis, B. parapertussis y B. bronchiseptica, se realiza in silico utilizando bancos de datos y programas de computación (BLAST, FASTA, MOTIFS, FINDPATTERNS, ProDom, PSORT, PSMART). Se seleccionarán nuevas secuencias que pueden estar asociadas a proteínas de superficie tales como dominios transmembrana, secuencias leader, homologías con proteínas de superficie conocidas, lipoproteínas, motivos de proteínas de membrana externa, dominios que interaccionan con células del hospedador como son los RGD, etc.

Del empleo de bancos de datos y los programas de computación esperamos seleccionar un nuevo conjunto de secuencias codificantes con potencialidades de candidato vacunal tanto propias de cada especie como comunes a las tres para lograr mejorar la protección contra las diferentes especies.

2- Clonado y expresión de los ORF seleccionados.

Los ORF seleccionados serán amplificados a partir de los datos de secuencias de los genomas de las distintas especies de Bordetella 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 los ORF amplificados aplicaremos la tecnología conocida como Gateway ya descripta en el subproyecto 1. Las proteínas clonadas en los plásmidos de expresión serán purificadas como se describió anteriormente utilizando la resina superflow Ni nitriloacetic acid de Qiagen.

Ya hemos seleccionados los candidatos que incluyen ORF que codificarían para proteínas de membrana externa (algunas con dominios RGD, otras lipoproteínas) y periplasmáticas (putative ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein, putative exported protein). Con la extensión de este proyecto esperamos seleccionar nuevos candidatos. Con todos aplicaremos la metodología descripta anteriormente para luego seguir con la caracterización de los candidatos desde el punto de vista de la protección y del polimorfismo como se detalla más abajo.

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 ORFs seleccionados en el punto anterior.

3- Evaluación de la capacidad protectora de los ORFs/candidatos vacunales seleccionados mediante el empleo de las estrategias ómicas arribas descriptas.

Para evaluar la capacidad protectora de los distintos candidatos vacunales estamos empleando y se emplearán metodologías tales como: inmunoblots empleando el suero de individuos infectados, el modelo de desafío intranasal en ratones y análisis del panel de citoquinas estimuladas por los distintos candidatos.

Inmunodetección (Western blot). Análisis de reactividad frente a distintos sueros. La Inmunodetección de las distintas proteínas purificadas correspondientes a la expresión de los ORFs/candidatos vacunales seleccionados en los pasos anteriores se llevará a cabo a partir de su electroforesis en SDS-PAGE y posterior transferencia a membranas de polivinildifluoruro (PVDF), según el método de Towbin y colaboradores. Las proteínas inmovilizadas se ensayarán con antisueros de individuos sanos, de individuos infectados y de individuos con esquema de vacunación completo. En todos los casos el revelado se llevará a cabo con anticuerpos anti-Ig humana, marcados con fosfatasa alcalina.

Modelo de infección en ratones. Como hemos descripto más arriba para los ensayos de protección emplearemos ratones Balb/c de 3 a 4 semanas de edad que serán inmunizados con el candidato vacunal seleccionado a los días 0 y 14. Luego, al día 28, los ratones serán desafiados por vía intranasal con 50 de desafío conteniendo una dosis de 10⁶ a 10⁹ unidades formadoras de colonias. Posteriormente y siguiendo las recomendaciones de OMS, a las 2 h, 5 días y 8 días post desafío se evaluará el número de unidades formadoras de colonias en pulmón.

□1 de una

Análisis de la Respuesta inmune mediante ELISA y RT PCR. Este aspecto será realizado en forma conjunta con el Dr. Rumbo.

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 descriptas (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* (1ug/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 descripto en secciones precedentes. Se caracterizará la respuesta humoral y celular frente a los mismos empleando ensayos estandarizados entre los distintos grupos que participan del SP3.

Análisis de la respuesta humoral: Se inmunizarán ratones como fuera descripto previamente para los ensayos de protección empleando los antígenos seleccionados emulsionados en Adyuvante de Freund completo (primer inmunización) e incompleto (segunda inmunización) 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 (McCluskie and Davis, 2000).

Análisis de la respuesta celular :

a.- Capacidad de producción de células T específica.

En animales inmunizados como fuera descripto 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 descripto 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 γ .

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 (Rumbo y col. 2004, 2005). 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.

Estos estudios se complementarán con en análisis de la respuesta generada por la administración de los mismos antígenos por vía intranasal.

En esta sección sobre la evaluación de la capacidad protectora de los ORFs seleccionados, comenzaremos el trabajo con una técnica sencilla como es el inmunoblot, que nos permitirá analizar la reactogenicidad de los diferentes polipéptidos frente a sueros de individuos infectados, vacunados o sanos. La comparación de los resultados empleando los distintos sueros nos orientará sobre la relevancia de cada polipéptido en la infección y en la inmunidad. Los posteriores ensayos in vivo e in vitro con los candidatos que hayan demostrado reactogenicidad en el inmunoblot son los que realmente nos marcarán la capacidad protectora de los distintos polipéptidos que se hayan podido purificar en el paso anterior.

Análisis del polimorfismo del candidato vacunal seleccionado.

Los candidatos vacunales seleccionados serán analizados en cuanto a su polimorfismo dentro de la colección de bacterias locales. Se amplificarán las secuencias blanco y se secuenciarán. A partir de los datos de secuencia se establecerán las divergencias entre las bacterias circulantes y las vacunales. Los análisis se extenderán a las secuencias de las tres especies de Bordetella.

De encontrar divergencias en el candidato vacunal propuesto se procederá a establecer la relevancia de las mismas en la protección para lo cual emplearemos el modelo de ensayo de protección en ratones más arriba descripto.

De este análisis se espera determinar la divergencia del candidato vacunal seleccionado dentro de la PBC de nuestro país y la relevancia de la misma en la protección. Estos aspectos son esenciales para definir la composición de una nueva formulación.

Los resultados que se obtengan de la ejecución de este subproyecto nos responderán a la siguiente pregunta ya planteada a lo largo de esta presentación

¿Qué nuevos componentes deben incluirse en una nueva formulación para lograr mayor efectividad no sólo contra *B. pertussis* sino contra las otras especies?

Es decir, de la aplicación de la metodología denominada vacunología reversa esperamos identificar nuevos inmunógenos que protejan a la población de las infecciones que puedan causar no sólo *B. pertussis* sino cualquiera de las otras especies de *Bordetella*.

Quiero destacar que ya contamos con un candidato vacunal que hemos identificado mediante estrategias clásicas. Hemos realizado estudios in vivo e in vitro sobre su capacidad protectora obteniendo resultados por demás satisfactorios (ver publicaciones realizadas durante el periodo Ascencio et al 2011). En la actualidad estamos profundizando la caracterización presentando al candidato ya como una formulación triple acelular en la que incluimos además de nuestro componente *pertussis* a los toxoides tetánico y diftérico. En la caracterización emplearemos parte de las metodologías descritas más arriba.

REFERENCIAS

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

Bottero D, Gaillard M, Fingermann M, Weltman G, Fernández J, Sisti F, Graieb A, Roberts R, Rico O, Ríos G, Regueira M, Binsztein N and Hozbor D (2007) Pulse field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms and surfaceome analysis of vaccine and clinical *Bordetella pertussis* strains, *Clinical and Vaccine immunology* /en prensa)

Bottero, D., Gaillard ME, Fernández J., Weltman G., and Hozbor D. Comparative genomics and surface proteomics analysis of three *Bordetella pertussis* strains used in vaccine production . Eighth International Symposium: Saga of Genus *Bordetella*, 1906-2006 . Institut Pasteur, París Francia. 7-10 Noviembre de 2006.

de Melker, H. E., M. A. Conyn-van Spaendonck, H. C. Rumke, J. K. van Wijngaarden, F. R. Mooi, and J. F. P. Schellekens. 1997. Pertussis in The Netherlands: an outbreak despite high levels of immunization with whole cell vaccine. *Emerg. Infect. Dis.* 3:175-178.

de Melker HE, Schellekens JF, Neppelenbroek SE, Mooi FR, Rumke HC, Conyn-van Spaendonck MA. 2000. Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of the Netherlands: observations on surveillance data. *Emerg Infect Dis.* 6:348-357.

Fine P.E.M. and Clarkson J.A. (1987). Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. *Rev. Infect. Dis.* 9: 866–883

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

Fingermann M, Fernandez J, Sisti F, Rodriguez ME, Gatti B, Bottero D, Graieb A, Gaillard ME, Ayala SG, Mooi FR, Lopardo H, Hozbor D. 2006. Differences of circulating *Bordetella pertussis* population in Argentina from the strain used in vaccine production. *Vaccine.* 24:3513-21

Graieb, A., Fingerhann M., Sisti F., Roberts R. and Hozbor D Whole genome bioinformatics-based approaches for pertussis vaccine design.. Eighth International Symposium: Saga of Genus Bordetella, 1906-2006 . Institut Pasteur, París Francia. 7-10 Noviembre de 2006.

Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 913-949.

Makela, P. 2000. Vaccines, coming of age after 200 years. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 9-20.

McCluskie MJ, Davis HL. Oral, intrarectal and intranasal immunizations using CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants. *Vaccine.* 2000 Oct 15;19(4-5):413-22.

Montigiani S., Falugi F, Scarselli M. et al. (2002). Genomic approach for analysis of surface proteins in Chlamydia pneumoniae. *Infect. Immun.* 70: 368–379

Parkhill J., Sebaihia M., Preston A., et al. (2003). Comparative analysis of the genome sequences of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica. *Nature Genetics.* 35: 32-40.

Ross B.C., Czajkowski L., Hocking D. et al., (2001), Identification of vaccine candidate antigens from a genomic analysis of Porphyromonas gingivalis. *Vaccine* 19: 4135–4142.

Rumbo M, Courjault-Gautier F, Siervo F, Sirard JC, Felley-Bosco E. Polarized distribution of inducible nitric oxide synthase regulates activity in intestinal epithelial cells. *FEBS J.* 2005 Jan;272(2):444-53.

Rumbo M, Siervo F, Debard N, Kraehenbuhl JP, Finke D. Lymphotoxin beta receptor signaling induces the chemokine CCL20 in intestinal epithelium. *Gastroenterology.* 2004 Jul;127(1):213-23.

Scarselli M., Rappuoli R. and Scarlato V. (2001). A common conserved amino acid motif module shared by bacterial and intercellular adhesions: bacterial adherence mimicking cell–cell recognition?. *Microbiology* 147:250–252.

Wizemann T.M., Heinrichs J.H., Adamou J.E. et al., (2001). Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against Streptococcus pneumoniae Infection. *Infect. Immun.* 69: 1593–1598.

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.