

# **CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO**

## **Informe Científico<sup>1</sup>**

**PERIODO <sup>2</sup>: 2014-2015**

Legajo N°:

### **1. DATOS PERSONALES**

*APELLIDO: HOZBOR*

*NOMBRES: DANIELA FLAVIA*

*Dirección Particular: Calle: N°:*

*Localidad: GONNET CP: 1897 Tel:*

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

### **2. TEMA DE INVESTIGACION**

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

### **3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA**

*INGRESO: Categoría: Adjunto con director Fecha: 1998*

*ACTUAL: Categoría: Principal desde fecha: diciembre 2009*

### **4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA**

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

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

*Departamento: Ciencias Biológicas*

*Cátedra:*

*Otros:*

*Dirección: Calle: 47 y 115 N°: XXX*

*Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: 0221 4229777*

*Cargo que ocupa:*

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

*Apellido y Nombres:*

*Dirección Particular: Calle: N°:*

*Localidad: CP: Tel:*

*Dirección electrónica:*

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

<sup>2</sup> 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.*

Desde hace varios años las líneas de trabajo que dirijo las he focalizado hacia el entendimiento de la problemática de pertussis a nivel local e internacional, así como hacia la evaluación y el diseño de nuevas estrategias de control de la enfermedad. Estos objetivos los venimos llevando a cabo a través del desarrollo de diferentes líneas de trabajo de ciencia básica y aplicada ya sea en forma autónoma o interdisciplinaria. A continuación presentaré un breve resumen de las tareas que se han realizado en el marco de cada una de dichas líneas durante el periodo que informo.

Líneas de trabajo y resumen de los resultados más relevantes obtenidos

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 – Lab. VacSal IBBM FCE UNLP (2004-2014), del PAE VacSal-ANPCyT (2008-2014) y PICT2012 (actual) y en la interdisciplina con diferentes profesionales que trabajan en el área de la salud humana: médicos, bioquímicos, epidemiólogos, bacteriólogos.

En particular trabajamos en el diagnóstico de la enfermedad a partir de muestras de pacientes atendidos en hospitales y centros de Salud de nuestro país (más de 1200 muestras clínicas son analizadas cada año) y en el asesoramiento continuo de los profesionales que conforman la red nacional de laboratorios para el diagnóstico de patologías bacterianas respiratorias tales como la tos convulsa. Realizamos además, actividades asociadas al aseguramiento de la calidad de las metodologías diagnósticas transferidas no sólo a nivel local sino a otros países de Latinoamérica a los que también hemos transferido la metodología. En la actualidad formamos parte del Proyecto Latinoamericano sobre el mejoramiento del diagnóstico laboratorial de pertussis. En este proyecto intervienen profesionales de México, Panamá, Colombia, Chile, Argentina y el CDC. Hemos realizado el control de calidad externo correspondiente al 2014 y 2015 que incluye la resolución de un panel de 12 muestras a ciego. En ambos casos hemos logrado una coincidencia del 100% de los resultados.

También trabajamos fuertemente en el análisis de datos obtenidos del trabajo de vigilancia epidemiológica. Durante los últimos cuatro años hemos elaborado de manera mensual informes que difundimos a la red y a otros efectores que trabajan en el área de la salud humana. Las conclusiones extraídas han sido difundidas también en los trabajos y presentaciones a congresos que se detallan más abajo.

Por otra parte hemos trabajado en el mejoramiento de una técnica de ELISA para el diagnóstico de pertussis por serología. Esta metodología es de fundamental importancia para la población adolescente-adulta para la cual las otras metodologías son algo débiles debido a la menor carga bacteriana en ellos presente. En particular hemos clonado, expresado y purificado la subunidad S1 de la toxina pertussis para ser utilizada en reemplazo de la toxina pertussis entera que hay que importar con alto costo. Ya contamos con diferentes lotes de proteína cuya identidad hemos confirmado mediante ensayos de inmunoblot y MALDI- TOF. La proteína purificada la estamos evaluando en los test de ELISA y los resultados hasta ahora alcanzados son promisorios. Para la validación del ensayo hemos iniciado una colaboración con el Centro de Control y Prevención de enfermedades de USA (CDC). Esperamos avanzar en la validación de

forma de poder brindar al sector de salud una alternativa de calidad y más económica para el diagnóstico serológico de la enfermedad .

b) Diseño y empleo de un modelo matemático de transmisión de la enfermedad como herramienta para la evaluación del impacto de diferentes estrategias de vacunación contra pertussis.

Para este trabajo combinamos saberes de diferentes áreas del conocimiento e intercambiamos experiencias sobre todo de los grupos liderados por los Dres Fabricius y Hozbor. Así, logramos diseñar un modelo de transmisión de la enfermedad que permite realizar predicciones. El modelo matemático diseñado incluye diferentes grupos poblacionales diferenciados según el estado de los individuos respecto a la infección. El modelo considera tres grupos: individuos que son susceptibles de adquirir la infección (S), individuos que están infectados (I) e individuos que poseen algún grado de inmunidad ante la infección (GI). Los grupos I y GI están subdivididos de acuerdo al grado de inmunidad de los individuos, adquirido naturalmente (por haber estado infectados) o adquirido artificialmente (por haber recibido distintas dosis de vacuna). Así la clase GI en distintas clases agrupan individuos con un grado creciente de inmunidad, de manera que los individuos de las clases CAI y R poseen inmunidad total (no adquieren la infección en contacto con individuos infectados). Por su parte, el grupo de individuos infectados se dividió en I1, I2 e I3 con el objeto de diferenciar a los que poseen una infección típica (I1) de los que poseen una infección con síntomas atenuados (I2) y de los que están infectados pero no presentan síntomas (I3).

El modelo además se ha estructurado en edades, es decir cada uno de los grupos de individuos incluidos fue particionado en clases etarias. Esta división obedece a dos razones. Por un lado, es sabido que la fuerza de infección no es homogénea, por ejemplo, es mayor para los niños en edad escolar que para cualquier otra franja etaria. Esta heterogeneidad tiene consecuencias que es preciso tener en cuenta si se quiere dar una descripción realista de la dinámica de la enfermedad. Por otro lado, el modelo nos permite estudiar específicamente el impacto de las medidas de control en el grupo de riesgo (0-1 año).

El modelo requiere de parámetros que contienen información de las características de la enfermedad, su transmisión, y de la vacunación. Algunos de ellos son de difícil determinación, como la duración de la inmunidad, aún no consensuada entre los expertos. Otros parámetros no son homogéneos en la población, como las coberturas vacunales y los patrones de contacto específicos por edades. Para contemplar esta variabilidad hemos considerado diferentes escenarios donde se combinan los valores de parámetros de modo de cubrir un amplio rango de situaciones posibles. Este proceder nos permitió/te explorar la sensibilidad de los resultados ante cambios en los parámetros y así distinguir como robustos aquellos que no dependen del escenario particular considerado.

A su vez, estos escenarios verifican los rasgos conocidos de la transmisión de pertussis, de manera que representan posibles realidades epidemiológicas de la enfermedad. Esta estrategia de parametrización desarrollada por el grupo incluye la consideración y análisis de 18 escenarios epidemiológicos. La misma ha sido descripta con detalle en ref. [2: Fabricius et al., E&Inf]. El escenario tipo que hemos analizado fue el el escenario CP1A-MDI. En este escenario se parametrizan los patrones de contacto entre individuos a partir de valores de fuerzas de infección estimados de datos epidemiológicos de la era pre-vacunal y se asume una duración media de la inmunidad de 15 años para aquella adquirida por la infección y 6 para la adquirida mediante vacunación. Consideramos que la población es constante en el tiempo y los nacimientos y muertes se producen siguiendo una mortalidad tipo I, que consiste en suponer que todos los individuos viven

exactamente hasta la misma edad; que hemos tomado 75 años. Hemos considerado que la infección dura un tiempo medio de 21 días. Para la eficacia de cada dosis de vacuna hemos tomado  $VE=0.9$ . Esto implica que entre 1 y 2 años de aplicada la tercer dosis de vacuna, nuestro modelo predice que entre el 86 y el 95% estarían protegidos de contraer una forma severa de pertussis y entre un 63 y 81% estarían protegidos de una enfermedad moderada. En cuanto a las coberturas de las distintas dosis, en este trabajo nos referimos a dos casos: coberturas del 95% y 80%. Cuando consideramos la cobertura del 95% asumimos que un 95% de la población recibe las dosis correspondientes a los 2, 4, 6 meses y 6 años, pero asumimos que una fracción menor (85%) recibe la dosis de los 18 meses. Para la cobertura del 80% usamos el mismo criterio, asumiendo que una fracción del 70% recibe la dosis de los 18 meses.

En nuestro modelo consideramos también que los individuos en las clases I2 e I3 poseen menor contagiosidad que los individuos en la clase I1. Este aspecto es tenido en cuenta a través de los factores  $\rho_1$  y  $\rho_2$  que por ser menores que uno relativizan la contribución a la fuerza de infección de los infectados con menor contagiosidad.

Hemos tomado  $\rho_1=0.5$  y  $\rho_2=0.25$ .

A partir de este modelo y de estas consideraciones ya hemos evaluado el impacto que tendrían distintas medidas de control en la población más vulnerable (0-1 año). Durante este período hemos trabajado en el impacto que tiene la demora en la efectivización del calendario vacunal para pertussis. Los resultados alcanzados han sido publicados en *Mathematical modeling of delayed pertussis vaccination in infants*. P. Pesco, P. Bergero, G. Fabricius and D. Hozbor. *Vaccine* 2015 aceptado para su publicación. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.07.005 ISSN: 0264-410X

Una mejora en la parametrización del modelo, tendiente a una descripción más precisa de la transmisión de pertussis en la Argentina, en particular en el grupo de riesgo, se encuentra actualmente en desarrollo. Dicha mejora consiste en refinar los valores de los parámetros contrastando los datos de casos reportados de pertussis discriminados en grupos etarios y número de dosis aplicadas (información disponible en el laboratorio Nacional de Referencia VacSal) con las incidencias calculadas utilizando el modelo y discriminadas de la misma forma. Este proyecto se desarrolla en el marco del proyecto PICT2010-0707: "Modelado matemático de la propagación de la tos convulsa en la Argentina" financiado por la ANPCyT del cual G. Fabricius es el investigador responsable.

c) Identificación de las posibles causas de aumento de la enfermedad: caracterización molecular de aislamientos del agente causal Bordetella pertussis propios de nuestra 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. Mediante la plataforma metodológica de MLST que permite el análisis de los polimorfismos en un número mayor de secuencias estamos completando la caracterización de los aislamientos obtenidos en los últimos años. En particular venimos analizando polimorfismos genéticos en distintos antígenos vacunales: 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 (ptxS1), 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, ptxS1, prn y fim. Nuestros resultados siguen evidenciando que el genotipo predominante que circula en la actualidad en nuestro país es ptx-P3, prn2 y fim3B, el cual se diferencia al del 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. En los últimos se ha observado que los aislamientos que circulan en los países que se utilizan exclusivamente la vacuna acelular han dejado de expresar la proteína pertactina; incluida en dichas formulaciones vacunales. Se ha propuesto que la aparición de estos aislamientos ha ocurrido en respuesta de la presión de selección ejercida por dichas formulaciones acelulares. En este contexto hemos implementado ensayos de PCR y de inmunoblot para detectar estas alteraciones en aislamientos clínicos de nuestro país. Hasta la fecha hemos detectado sobre un total de 150 aislamientos, 2 aislamientos que expresan pertactina en niveles muy reducidos. La proporción hasta ahora detectada es significativamente menor que la registrada en países como USA y Australia, que ha diferencia nuestra, han reemplazado completamente la vacuna celular por la acelular. La implicancia de estos resultados ha comenzado a ser evaluada mediante ensayos in vitro e in vivo. Hemos incluido en estos estudios un aislamiento pertactina menos proveniente de un brote de US.

Los ensayos de genotipificación se realizan todos los años con los aislamientos propios del mismo. Es así que durante este periodo hemos completado la genotipificación de 20 aislamientos.

Los resultados alcanzados hasta el momento han sido ya difundidos en congresos internacionales y en trabajos científicos en revistas de la especialidad con referato (ver detalle más abajo)

d) Caracterización de la interacción bacteria–huésped: identificación de componentes bacterianos y caracterización de la respuesta inmune del huésped frente a infecciones de Bordetella, que se desarrolla en el marco del PAE ANPCYT.

Respecto de esta línea, seguimos trabajando sobre el fenómeno denominado protección por estimulación de la respuesta innata (en inglés StIR) que hemos podido describir recientemente en *B. pertussis*. Hemos estudiado los posibles mecanismos que desencadenan este fenómeno que permite la eliminación temprana del patógeno. Hemos observado que aunque el reclutamiento de neutrófilos es evidente a tiempos muy tempranos del fenómeno, los ensayos de depleción de neutrófilos utilizando un anticuerpo anti-GR1 mostraron que el clearance bacteriano provocado por el LPS ocurre aún en ausencia de mismos. Para evaluar el posible papel de los radicales libres en el fenómeno STIR, hemos realizado ensayos in vivo pero empleando mezclas de LPS con el inactivador de especies oxidantes, N-acetil cisteína (NAC). En estos ensayos pudimos detectar que la administración NAC evita el clearance de *B. pertussis* inducida por LPS. Estos resultados muestran que las especies reactivas de oxígeno (ROS) desempeñan un papel esencial en el aclaramiento innata TLR4 dependientes de *B. pertussis*. En la actualidad estamos analizando las poblaciones celulares que podrían estar involucradas en este fenómeno mediado por el LPS y las especies reactivas al oxígeno. Los resultados alcanzados ya han sido publicados como se detalla más abajo. Más aún los resultados obtenidos fueron parte de una tesis doctoral finalizada en el 2015 (Dra. Eugenia Zurita).

e) Identificación de candidatos vacunales. En estos últimos años hemos analizado la capacidad protectora de la proteína recombinante Fimbria 2 de *B. pertussis* (fim2) fusionada a la subunidad B de la toxina colérica (CTB). Para este fin, la secuencia que codifica para la Fimbria 2 fue clonado corriente abajo de la subunidad B de la toxina del cólera. La expresión de la proteína de fusión y el análisis de su conformación pentamérica fue evaluada mediante corridas electroforeticas en geles SDS - PAGE y ensayos de ELISA. Los resultados obtenidos confirmaron el tamaño esperado para la

proteína de fusión y la preservación de la estructura CTB pentamérica. Para evaluar la capacidad protectora de la CTB - Fim2 empleamos el modelo animal de ratones con desafío intranasal. Los resultados obtenidos mostraron que los ratones inmunizados con CTB - Fim2 por vía intranasal o por vía intraperitoneal presentaron una reducción significativa en los recuentos bacterianos de pulmón en comparación con los grupos control ( $p < 0,0001$  y  $p < 0,001$ , respectivamente). Análisis de isotipos de IgG sugiere que la respuesta provocada por los diferentes inmunizaciones presentó un perfil de Th1/Th2 mixto. Los datos presentados aquí muestran la reversión del pobre poder inmunogénico de la proteína recombinante Fim2 en el contexto de una proteína de fusión. Los resultados alcanzados han sido publicados en revistas internacionales con referato y han sido parte de una tesis doctoral que ha finalizado en el 2014 y en el cual me desempeñe como Co-directora (Dra. Noelia Olivera).

En esta línea los mayores esfuerzos están dirigidos a nuestra formulación acelular diseñada a partir de las vesículas de membrana externa de *B. pertussis* y *B. parapertussis*. Los resultados alcanzados nos han permitido definir una formulación que protege contra las dos especies de manera muy satisfactoria y que además es biosegura. Los resultados alcanzados han sido objeto de la presentación de una patente a nivel nacional e internacional que en la actualidad se encuentra en evaluación. Parte de los resultados alcanzados hasta el momento han sido divulgados en congresos y han sido publicados en revistas con referato internacional (ver más abajo el detalle). Aquí por cuestión de espacio presentamos sólo parte de los resultados hasta ahora alcanzados

Caracterización del candidato vacunal vesículas de membrana externa de *B. pertussis* cepa Tohama fase I CIP8132 y de *B. parapertussis* AR729

Hemos obtenido las OMVs siguiendo la técnica previamente descrita por nosotros [1, 2]. Verificamos identidad, pureza y composición. La identidad y la pureza de las muestras obtenidas fue evaluada mediante observaciones al microscopio electrónico y cultivo en medios específicos. El tamaño medio de las vesículas es de 70 nm con un rango de 40 nm a 100 nm. Estas vesículas sólo se obtienen cuando no hay lisis bacteriana. La presencia de componentes propios de la membrana de *B. pertussis* como el lipo-oligosacárido (LOS) y proteínas como los inmunógenos Adenilato Ciclasa - Haemolisina (AC-Hly) y la toxina pertussis (PT) corroboraron la naturaleza de las vesículas.

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

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

Las corridas electroforéticas en geles SDS-PAGE nos permitieron evidenciar que los perfiles proteicos de las OMVs de *B. pertussis* y *B. parapertussis* se mantienen lote a lote. Más aún, los inmunoblots mostraron que en todos los lotes de OMVs de *B. pertussis* están presentes inmunógenos relevantes en la protección como pertactina y fimbria. En el caso de las OMVs de *B. parapertussis*, en todos los lotes se detecta la expresión de la pertactina.

Todos estos resultados obtenidos muestran la robustez de los protocolos empleados en la obtención de las OMVs y la reproducibilidad de los mismos. Estos resultados forman parte de la patente presentada en el 2014

Patente internacional: VACCINES FOR THE PREVENTION OF INFECTIONS WITH BORDETELLA. Submission Number: 060143 Application Number: PCT/IB2014/060143 Date of Receipt: 25 March 2014 Receiving Office: International Bureau of the World Intellectual Property Organization

#### Ensayos de protección en modelo de desafío intranasal

Para inmunización activa empleamos ratones BALB/c hembras de 4 semanas de edad libres de patógenos (Biol SAIC, Argentina). Los ensayos se realizaron en forma comparativa con las formulaciones aP comerciales en uso.

Grupos de 10 BALB/c ratones se inmunizaron por vía sistémica i.p. con la vacuna aP o con la formulación a base de las vesículas de membrana externa derivadas de la cepa B. pertussis Tohama fase I CIP 8132, o de B. parapertussis AR729 o de ambas OMVs. En todos los casos el protocolo de inmunización comprende un esquema de dos dosis en un período de 2 semanas. Los ratones inmunizados son luego desafiados 2 semanas después de la última inmunización por vía intranasal tanto con la cepa de referencia de la Organización Mundial de la Salud, la cepa B. pertussis 18323, como con la cepa Tohama fase I CIP8132, o un aislamiento característico de la población bacteriana circulante local o una cepa de B. parapertussis (en todos los casos  $10^7$ -  $10^8$  CFU  $50 \mu\text{l}^{-1}$ ). La evaluación del poder protector de las formulaciones se realiza a través del recuento de bacterias que colonizan los pulmones de los ratones inmunizados y desafiados. Los recuentos se realizaron al día 7 luego del desafío. Para ello, los pulmones son removidos de manera aséptica siguiendo normas adecuadas para el manejo de animales. Estos ensayos se han repetido al menos 6 veces y los resultados representativos se muestran a continuación. En todos los casos se presentan la media y las desviaciones estándar calculadas a partir de los valores de las CFU transformados en Log<sub>10</sub>. La significación de las diferencias entre las medias fueron determinadas mediante ANOVA y test pos hoc Bonferroni con un nivel de significancia de  $p < 0,05$  level.

A continuación y a modo de ejemplo se presentan resultados obtenidos al emplear formulaciones que sólo contienen a las OMVs de B. pertussis o de B. parapertussis o ambas OMVs

Resultados obtenidos con formulaciones que contienen OMVs derivadas de B. pertussis.

Estos ensayos mostraron una diferencia de protección significativa entre los animales que fueron inmunizados con las formulaciones antes descriptas en comparación con el grupo control de ratones que fueron tratados solo con un buffer fosfato estéril ( $p < 0.001$ ). Una adecuada eliminación de bacterias ( $p < 0.001$ ) se observó en los ratones inmunizados con la vacuna aP basadas en OMVs y con la Tdap comercial pero en alta dosis. Todos los resultados obtenidos muestran que el poder protector de las OMVs frente a la infección por diferentes genotipos de B. pertussis.

Para evaluar la toxicidad del candidato vacunal basado en OMVs se empleó el test de ganancia de peso recomendado por la OMS. Este test involucra el empleo de 8 ratones Balb/c de 15—20 g a los que luego de inmunizar se los evalúa en cuanto a la evolución de sus pesos corporales a lo largo de 7 días. Las vacunas se consideran no tóxicas cuando pasan los siguientes requerimientos de la OMS y EP: (a) el peso de los ratones a los tres días después del tratamiento tiene que ser igual o mayor al del día cero antes de ser tratados (b) a los 7 días post tratamiento el peso promedio de los ratones de cada grupo no debe ser menor del 60% del valor promedio del grupo control no inmunizado (c) durante el período que dura el test no deben morir más del 5% de los animales. Los animales son observados durante 7 días registrando los pesos luego de

las 16 h, 3 y 7 días post inmunización. Los resultados que se obtuvieron de estos ensayos para la formulación conteniendo las vesículas de membrana externa fueron comparados con los correspondientes a la formulación a base de células enteras y el grupo control tratado con buffer fosfato estéril. Se emplearon cantidades de vesículas que variaron entre 1 y 5 µg de proteína. En todos los casos los resultados obtenidos mostraron que ambas formulaciones vacunales pasan los criterios de toxicidad para ser consideradas vacunas seguras. En la condición de 5 µg al día 3 post inmunización se observó que los ratones vacunados ganaron más peso al ser vacunados con la vacuna de vesículas que los del grupo control. En este grupo la ganancia de peso fue  $11 \pm 2\%$ , mientras que para la vacuna celular comercial fue de  $3 \pm 2\%$  y para la celular formulada en el laboratorio fue de  $8 \pm 3\%$ . Para el grupo control la ganancia de peso a los 3 días fue de  $13 \pm 3\%$ .

Estos ensayos fueron extendidos a muestra de sangre humana aplicando una metodología descrita por Stoddard y colaboradores [3]. Los resultados obtenidos en todas las metodologías aplicadas muestran a las vesículas de membrana externa derivadas de *B. pertussis* como un buen candidato vacunal, protector y bioseguro.

Resultados obtenidos con formulaciones que contienen OMV derivadas de una cepa de *B. paraptussis*.

Siguiendo las metodologías descritas, también evaluamos la capacidad de protección inducida por las OMV preparadas a partir de una cepa de *B. paraptussis*

Efecto de la inmunización de la vacuna acelular formulada con OMVs de *B. paraptussis*. Los ratones fueron desafiados con dosis subletales de la cepa AR729 de *B. paraptussis* o con la cepa de referencia de *B. pertussis* Tohama fase I. Como controles se utilizaron animales sin inmunizar (Control) o inmunizados con la vacuna acelular comercial.

Con esta formulación hemos logrado evidenciar en el modelo de ratón que el nivel de protección conferido contra *B. paraptussis* no se obtiene con la vacuna acelular comercial ni con la vacuna formulada a partir de las OMVs obtenidas de *B. pertussis* fase Tohama. Mientras que en los ratones inmunizados con las vacunas aP comercial o la formulada por nosotros con OMVs derivadas de *B. pertussis*, el número de colonias recuperadas de los pulmones fue alta, en ratones inmunizados con OMVsBpp (3 µg) el número de colonias de *B. paraptussis* recuperadas al día 7 se redujo al menos 4 órdenes de magnitud en relación con el recuento de colonias realizado en los pulmones de los ratones no inmunizados. Los datos presentados aquí apoyan el uso de las OMV derivadas de la cepa de *B. paraptussis* para eliminar de manera eficiente a *B. paraptussis* de los pulmones de los ratones.

Otra característica atractiva que presentan las OMVsBpp es la capacidad de protección frente a la infección por *B. pertussis*. Los resultados obtenidos mostraron que la protección contra *B. pertussis* inducida por OMVsBpp es comparable a la inducida por dos inmunizaciones con la vacuna diseñada a partir de las OMVs derivadas de *B. pertussis*. Como era de esperar, la vacuna acelular comercial utilizada en altas dosis como control positivo ofreció muy buen nivel de protección contra *B. pertussis*. Las diferencias entre los recuentos bacterianos en pulmón de los animales inmunizados y los del grupo de control fueron significativas ( $p < 0,001$ ). Los resultados que obtuvimos con las OMVsBpp no eran esperados, ya que hasta el momento no había reportes que mostraran vacunas de *B. paraptussis* pudieran ser efectivas contra *B. pertussis*.

Komatsu et al. logró obtener una vacuna celular de *B. parapertussis* que resultó ser efectiva contra *B. parapertussis* pero no contra *B. pertussis* [4].

En cuanto a la protección cruzada, sólo recientemente la vacuna atenuada formulada por el grupo del Dr. Camille Locht ha mostrado ser efectiva tanto contra *B. pertussis* y *B. parapertussis*[5]. Este hallazgo resulta interesante ya que está de acuerdo con la observación que se genera protección recíproca en el modelo murinodespués de la infección con *B. pertussis* o *B. parapertussis* [43].

Resultados obtenidos con las OMVs de *B. parapertussis* solas o combinadas con las de *B. pertussis*.

Resultados más que interesantes logramos a partir de las vacunas formuladas con las OMVs de *B. parapertussis* solas o combinadas con las de *B. pertussis*. Con ambos tipos de formulaciones se logró no sólo evitar la infección con *B. pertussis* sino también la causada por *B. parapertussis* aún con los toxoides tetánico y diftérico.

Los resultados obtenidos permitieron corroborar la capacidad protectora de estas formulaciones que contienen además los toxoides tetánico y diftérico contra *B. parapertussis* y *B. pertussis*.

Efecto de la inmunización de la vacuna acelular combinada (Tdap(OMVsBpp+OMVsBp)). Los ratones fueron desafiados con dosis subletales de la cepa AR729 de *B. parapertussis* o con la cepa de referencia de *B. pertussis* Tohama fase I. Como controles se utilizaron animales sin inmunizar (Control) o inmunizados con de la vacuna formuladas con las OMVs derivadas de *B. pertussis* (TdapOMVBp) o *B. parapertussis* (TdapOMVBpp). Los resultados obtenidos evidenciaron que la combinación de ambas OMVs resulta más que conveniente para la protección contra las infecciones causadas por *B. pertussis* y *B. parapertussis*, sobre todo frente a aislamientos circulantes de *B. pertussis* en los que la protección cruzada por parte de las OMVBpp no es tan fuerte. La vacuna combinada que contiene a ambas OMVs también cumple satisfactoriamente los requisitos de bioseguridad.

En conjunto, los datos presentados aquí apoyan el uso de las OMVs obtenidas de *B. pertussis* y *B. parapertussis* como una formulación muy buena y segura con potencialidad de mejorar el control de pertussis causada tanto por *B. pertussis* y *B. parapertussis*.

Los resultados alcanzados hasta el momento han sido ya difundidos en congresos internacionales y en patentes y trabajos científicos en revistas de la especialidad con referato como se detalla a continuación

Más abajo se incluye los antecedentes logrados del trabajo interdisciplinario hasta ahora realizado: patentes presentadas, las publicaciones científicas realizadas y congresos.

Finalmente durante el periodo informado hemos evaluado en forma comparativa con las vacunas comerciales hoy en uso la capacidad protectora de nuestra formulación vacunal frente a aislamiento de *B. pertussis* circulante defectivo en la expresión de pertactina

Para evaluar la capacidad protectora de la vacuna basada en OMVs desarrollada frente a la infección causada por aislamientos locales que contienen una deficiencia en la expresión de pertactina, se utilizó el modelo murino de desafío intranasal. Los protocolos utilizados fueron aprobados por el Cicual de nuestra facultad y los decriptos más arriba. Los resultados hasta ahora alcanzados muestran claramente que la deficiencia de la expresión en pertactina representaría una ventaja para la infección en individuos inmunizados con vacunas comerciales que contienen pocos componentes purificados. Las vacunas de mayor complejidad antigénica de las vacunas como las

basadas en OMVs o a células enteras superarían a la anterior en lo que se refiere a capacidad protectora. Teniendo en cuenta estos resultados por demás adecuados para nuestra formulación decidimos avanzar en identificar a los actores involucrados en la inducción de la protección para ello evaluamos en primer lugar el rol de la respuesta humoral. Para ello realizamos ensayos *in vitro* como también *in vivo*. Se ensayó la capacidad opsonizante de los sueros de animales inmunizados con las diferentes formulaciones vacunales, sobre las diferentes cepas de *B. pertussis* estudiadas. Esto se hizo mediante ensayos de opsonofagocitosis *in vitro* con macrófagos murinos, y se encontró una correlación entre la capacidad opsonizante de los sueros de animales vacunados con las diferentes formulaciones y la capacidad protectora de estas frente a las cepas estudiadas. Estos resultados sugieren a este mecanismo como importante en la respuesta humoral inducida por cada vacuna contra la infección de *B. pertussis*.

Por otro lado, se analizó la capacidad protectora de los sueros de animales vacunados con las diferentes formulaciones frente a las cepas de *B. pertussis* estudiadas. Se transfirieron los sueros de animales inmunizados a animales no inmunizados previo al desafío. Al analizar los recuentos de bacterias/pulmón, se encontró que mientras las vacunas a OMVs o a células enteras los sueros inmunes confieren protección frente a la infección por el aislamiento circulante deficiente en pertactina, el suero de la vacuna acelular no. Esto confirmaría la importancia de la respuesta humoral y su rol en las diferencias en la protección conferida por las diferentes vacunas frente a esta cepa deficiente en pertactina. Estos ensayos fueron repetidos al menos 3 veces de manera independiente hallando siempre los mismos resultados.

Los resultados hasta aquí alcanzados muestran sin dudas que nuestro candidato vacunal superaría a las actuales formulaciones acelulares en lo que se refiere a la protección frente a aislamientos deficientes en PRN. La capacidad protectora en este parecería estar mediada por los anticuerpos inducidos por nuestra formulación. Estos resultados forman parte de un manuscrito que hemos enviado para su consideración a Vaccine. El trabajo de esta línea corresponde al plan presentado oportunamente pero como puede desglosarse no es el único que llevamos adelante

Además de la respuesta inmune humoral, nos proponemos estudiar la respuesta celular generada por cada una de las formulaciones vacunales, en el contexto de la infección de las distintas cepas de *B. pertussis* en el modelo animal murino. Para ello, se procede a la extracción de tejidos linfoides de los animales correspondientes a los experimentos de protección, para luego hacer un cultivo de células *in vitro* y analizar el perfil de citoquinas liberadas luego de la estimulación con antígenos específicos de *B. pertussis*. Estos experimentos se encuentran en curso, y esperamos nos permitan estudiar la importancia de la respuesta inmune celular en las diferencias entre la protección conferida por cada cepa.

Durante el periodo que informo además de llevar adelante estas líneas de investigación he trabajado en el diseño y escritura de los manuscritos que ya están publicados en revistas de la especialidad como se detalla a continuación. He escrito capítulos de libro para docencia. He trabajado en la realización de una patente que se encuentra en evaluación en fase internacional. He dirigido trabajos de tesis en curso y 2 trabajos finales de grado (1 finalizado). He sido jurado de tesis y revisora de numerosos artículos y proyectos de investigación nacionales e internacionales. He organizado el primer taller de Vacunología durante el año 2014. He promovido la creación del Cicual de nuestra facultad del cual soy miembro activo. He continuado con las tareas asociadas al

Laboratorio de Referencia del que soy responsable. Estas actividades incluyen tareas de de capacitación y asesoramiento continuo a profesionales de la salud.

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

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

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

Abstract

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

formulation to be considered for the development of novel acellular multi-antigen vaccine.

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

## 2- Global Population Structure and Evolution of Bordetella pertussis and Their Relationship with Vaccination.

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

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

### Abstract

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

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

3- Modelling the effect of changes in vaccine effectiveness and transmission contact rates on pertussis epidemiology. Pablo Pesco; Paula Bergero; Gabriel Fabricius; Daniela Hozbor. *Epidemics*.

2014 Jun;7:13-21. doi: 10.1016/j.epidem.2014.04.001. ISSN: 1755-4365

#### Abstract

The incidence of the highly infectious respiratory disease named pertussis or whooping cough has been increasing for the past two decades in different countries, as in much of the highly vaccinated world. A decrease in vaccine effectiveness over time, especially when acellular vaccines were used for primary doses and boosters, and pathogen adaptation to the immunity conferred by vaccines have been proposed as possible causes of the resurgence. The contributions of these factors are not expected to be the same in different communities, and this could lead to different epidemiological trends. In fact, differences in the magnitude and dynamics of pertussis outbreaks as well as in the distribution of notified cases by age have been reported in various regions. Using an age-structured mathematical model designed by us, we evaluated how the changes in some of the parameters that could be related to the above proposed causes of disease resurgence - vaccine effectiveness and effective transmission rates - may impact on pertussis transmission. When a linear decrease in vaccine effectiveness (VE) was assayed, a sustained increase in pertussis incidence was detected mainly in infants and children. On the other hand, when changes in effective transmission rates ( $\beta_{ij}$ ) were made, a dynamic effect evidenced by the presence of large peaks followed by deep valleys was detected. In this case, greater incidence in adolescents than in children was observed. These different trends in the disease dynamics due to modifications in VE or  $\beta_{ij}$  were verified in 18 possible scenarios that represent different epidemiological situations. Interestingly we found that both incidence trends produced by the model and their age distribution resemble the profiles obtained from data reported in several regions. The implications of these correlations are discussed.

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

4. Immunization with the Recombinant Cholera Toxin B Fused to Fimbria 2 Protein Protects against *Bordetella pertussis* Infection, Noelia Olivera, Celina E. Castuma, Daniela Hozbor, María E. Gaillard, Martín Rumbo, and Ricardo M. Gómez BioMed Research International

Volume 2014 (2014), Article ID 421486, 11 pages

#### Abstract

This study examined the immunogenic properties of the fusion protein fimbria 2 of *Bordetella pertussis* (Fim2)-cholera toxin B subunit (CTB) in the intranasal murine model of infection. To this end *B. pertussis* Fim2 coding sequence was cloned downstream of the cholera toxin B subunit coding sequence. The expression and assembly of the fusion protein into pentameric structures (CTB-Fim2) were evaluated by SDS-PAGE and monosialotetrahexosylganglioside (GM1-ganglioside) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). To evaluate the protective capacity of CTB-Fim2, an intraperitoneal or intranasal mouse immunization schedule was performed with 50  $\mu$ g of CTB-Fim2. Recombinant (rFim2) or purified (BpFim2) Fim2, CTB, and phosphate-buffered saline (PBS) were used as controls. The results showed that mice immunized with BpFim2 or CTB-Fim2 intraperitoneally or

intranasally presented a significant reduction in bacterial lung counts compared to control groups ( $P < 0.01$  or  $P < 0.001$ , resp.). Moreover, intranasal immunization with CTB-Fim2 induced significant levels of Fim2-specific IgG in serum and bronchoalveolar lavage (BAL) and Fim2-specific IgA in BAL. Analysis of IgG isotypes and cytokines mRNA levels showed that CTB-Fim2 results in a mixed Th1/Th2 (T-helper) response. The data presented here provide support for CTB-Fim2 as a promising recombinant antigen against *Bordetella pertussis* infection.

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

5- "Development of improved pertussis vaccines" Rumbo M and Hozbor D  
Hum Vaccin Immunother. 2014 Jun 5;10(8). ISSN: 2164-5515 (Print), 2164-554X (Electronic)

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

En esta publicación he actuado como la autora responsable (corresponding author), he trabajado en el análisis de los datos, y he trabajado en la escritura del artículo.

6- Pertussis seroprevalence in adults, post-partum women and umbilical cord blood.

Fallo A, Manonelles G, Hozbor D, Lara C, Huespe M, Mazzeo S, Canle O, Galas M, López E.

Arch Argent Pediatr. 2014 Aug;112(4):315-322. ISSN 0325-0075 versión impresa ISSN 1668-3501 versión on-line

Abstract

Pertussis is a vaccine-preventable disease that affects people of all ages. Young adults who have lost their immunity to pertussis are the major source of infection in infants. Given the steady increase of pertussis cases, new prevention strategies are required. Objective. To assess pertussis seroprevalence in adult blood donors, post-partum women, and umbilical cords. Metod. Measurement of total titers of anti-*Bordetella* spp. (*Bordetella*) antibodies using an enzyme-linked immunosorbent assay. Serum samples from 103 donors, 101 post-partum women and 100 umbilical cords were analyzed. Titers  $<80$  were considered of low impact against the disease. The assessment included transplacental transfer of antibodies and the umbilical cord/maternal ratio of antibody titers. Results. Donors mean age was:  $28 \pm 6$  years old. Median anti-*Bordetella* titers: 320; interquartile range (IQR):160-320; 10% had titers  $<80$ . Post-partum women mean age was:  $26 \pm 6$  years old. Median anti-*Bordetella* titers:160 (IQR:80-320), with titers significantly lower than in female donors ( $p= 0.00002$ ). Titers  $<80$  were found in 30% of post-partum women. Median

anti-Bordetella titers in umbilical cords: 160 (IQR: 80-160). Titers <80 were more frequently found in umbilical cords than in mothers (44% versus 30%,  $p= 0.04$ ). Transplacental transfer was 0.83. Umbilical cord titers were equal to maternal titers in 54% of cases, lower in 37%, and higher only in 8%. Conclusion. Titers of anti-Bordetella antibodies in post-partum women were significantly lower than in female blood donors. Titers <80 were found in 30% of post-partum women and 44% of umbilical cords. These data may account for the high rates of pertussis in young infants who have not yet completed their vaccination schedule.

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

7 - Situación epidemiológica de coqueluche y estrategias para su control. Argentina, 2002-2011

Viviana Romanin, Vanina Agostinho, Califano, Sandra Sagradini, Analía Aquino, María del Valle Juárez,

Julián Antman, Carlos Giovacchini, Marcelo Galas, Claudia Lara, Daniela Hozbor, Ángela Gentile y Carla Vizzotti. Arch Argent Pediatr. 2014 112(5):413-20. doi: 10.1590/S0325-00752014000500005. ISSN 0325-0075 versión impresa ISSN 1668-3501 versión on-line

#### Abstract

##### INTRODUCTION:

Pertussis is a challenge for public health.

##### OBJECTIVES:

To describe pertussis-related morbidity and mortality and immunization coverage for the 2002-2011 period, profile of cases for 2011, and control strategies implemented by the Ministry of Health (MoH) of Argentina.

##### METHODS:

Descriptive, epidemiological surveillance study. Morbidity data were obtained from the National Health Surveillance System, while mortality data were obtained from the MoH's Health Statistics and Information Department and official jurisdictional reports. Administrative immunization coverage was used based on the data provided by the MoH's jurisdictions. The Epi Info software, version 7.1.2, was used for analysis.

##### RESULTS:

The number of reported cases of pertussis increased between 2002 and 2011, reaching its peak in 2011: an incidence of 16 x 100 000 inhabitants, and 76 deaths. Most deaths occurred in infants younger than 1 year old. Immunization coverage achieved at a national level with the third dose and the dose administered at the time of starting primary education was >90%, while the coverage achieved with the first booster dose was 80%-90%. In 2011, 2821 confirmed cases were reported (incidence of 7 x 100 000 inhabitants): 84% in infants <1 year old; 76 deaths: 97% in infants <1 year old (60.5% in infants <2 months old). Among the strategies that were deployed, a total of 906 clinical nodes and 405 laboratory nodes were consolidated; the use of the polymerase chain reaction as a diagnostic method and the differential classification of cases were implemented, and additional vaccine doses were administered.

##### CONCLUSIONS:

The number of pertussis cases increased between 2002 and 2011; the highest morbidity and mortality occurred in infants younger than 1 year old; immunization coverage reached 80%-90%. . The highest number of pertussis-related deaths was

recorded in 2011. The MoH strengthened the epidemiological surveillance and set guidelines for control measures.

Comment in

- [Epidemiological surveillance of Pertussis: the experience of Argentina and its relevance for the other countries in the region]. [Arch Argent Pediatr. 2015]

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

8- Pertussis in Latin America: Epidemiology and Control Strategies. Luiza Helena Falleiros Arlant, Agustín de Colsa, Dario Flores, José Brea, Maria L. Avila Aguero; and Daniela Hozbor. Expert Rev Anti Infect Ther. 2014 Oct;12(10):1265-75. doi: 10.1586/14787210.2014.948846. ISSN: 1478-7210 (print), 1744-8336 (electronic)

Abstract

Pertussis is a serious respiratory disease in infants that can also affect children and adults. Vaccination against pertussis was introduced in the 1950s and in the 1990s a resurgence of pertussis was observed worldwide. The aim of this work is to summarize the recent data concerning pertussis disease in different countries of Latin America. In this geographic region, pertussis is nationally notifiable and cases should be reported to the appropriate health department/Ministry. Though the surveillance systems are not the same among Latin America countries, over recent decades an increasing number of cases have been detected. Most of these cases correspond to patients younger than 6 months old who received fewer than three doses of vaccine. However, cases in adolescent and adults have also been detected. For this situation, which is not peculiar to Latin America countries, several explanations have been proposed.

En esta publicación he participado como autora responsable, en el análisis de los datos y en el diseño y escritura del trabajo.

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

Maximiliano Ormazábal1\*, Erika Bartel1\*, María Emilia Gaillard1, Daniela Bottero1, Agustina Errea2, M. Eugenia Zurita1, Griselda Moreno2, Martin Rumbo2, Celina Castuma1, Dario Flores1, María Julia Martín1 and Daniela Hozbor1#. Vaccine. 2014 Oct 21;32(46):6084-90. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.08.084. ISSN: 0264-410X

Abstract

Pertussis has resurged during the last two decades in different countries. In particular in the 2010-2013 period large outbreaks were detected in US, Australia, UK and The Netherlands with significant mortality in infants. The epidemiological situation of pertussis points out the need to develop new vaccines and in this regard we previously developed a new vaccine based on outer membrane vesicles (OMVs) which have been shown to be safe and to induce protection in mice. Here we have further investigated the properties of OMVs vaccines; in particular we studied the contribution of pertussis toxin (PTx) and pertactin (Prn) in OMVs-mediated protection against pertussis. PTx-deficient OMVs and Prn-deficient OMVs were obtained from defective Bordetella pertussis mutants. The absence of PTx or Prn did compromise the protective capacity of the OMVs formulated as Tdap vaccine.

Whereas the protective efficacy of the PTx-deficient OMVs in mice was comparable to Prn-deficient OMVs, the protective capacity of both of them was significantly impaired when it was compared with the wild type OMVs. Interestingly, using OMVs obtained from a *B. pertussis* strain which does not express any of the virulence factors but expresses the avirulent phenotype; we observed that the protective ability of such OMVs was lower than that of OMVs obtained from virulent *B. pertussis* phase. However, it was surprising that although the protective capacity of avirulent OMVs was lower, they were still protective in the used mice model. These results allow us to hypothesize that OMVs from avirulent phase shares protective components with all OMVs assayed. Using an immune proteomic strategy we identified some common components that could play an important role in protection against pertussis.

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

10- Intranasal administration of TLR agonists induces a discriminated local innate response along murine respiratory tract.

Errea A, González Maciel D, Hiriart Y, Hozbor D, Rumbo M.

Immunol Lett. 2015 Jan 28. pii: S0165-2478(15)00005-X. doi: 10.1016/j.imlet.2015.01.004. ISSN: 0165-2478

Abstract

Adjuvants are relevant for mucosal immunization in order to induce long lasting protective immunity. It has been shown that targeting to different regions of the airway results in different capacity to trigger adaptive/protective immunity. Nevertheless there is scarce knowledge regarding topological responsiveness along airways to TLR agonists. We analyzed the effects of intranasal administration of lipopolysaccharide (LPS), poly I:C and flagellin on the expression of a panel of innate response markers along murine airways by laser microdissection and RTqPCR. In all cases treatment induced recruitment of inflammatory cells to airways. However, regional gene expression indicated that whereas deeper airways (mainly alveoli) respond with high expression of IL6, CXCL1 and CXCL10, the response in conductive airways (bronchi and bronchioles) is dominated by expression of CCL20. On the other hand, triggering TLR3 elicits a response dominated by CXCL10, showing higher expression at 6h compared to 2h, whereas LPS and flagellin induce a response peaking at 2h and dominated by IL6 and CXCL1. The results presented here showed difference in topological response triggered by different TLR agonist. These results make the targeting of different sites of airways a variable to evaluate when selecting the appropriate combinations of TLR and vaccinal antigens for intranasal delivery.

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

11- Pertussis Across the Globe: Recent Epidemiologic Trends From 2000-2013. Tan T, Dalby T, Forsyth K, Halperin SA, Heining U, Hozbor D, Plotkin S, Ulloa-Gutierrez R, von König CH. *Pediatr Infect Dis J.* 2015 Jun 16

ISSN:0891-3668. Online ISSN:1532-0987.

### Abstract

Pertussis has reemerged as a problem across the world. To better understand the nature of the resurgence, we reviewed recent epidemiologic data and we report disease trends from across the world. Published epidemiologic data from January 2000 to July 2013 were obtained via PubMed searches and open-access websites. Data on vaccine coverage and reported pertussis cases from 2000 through 2012 from the 6 World Health Organization (WHO) regions were also reviewed. Findings are confounded by the lack of systematic and comparable observations in many areas of the world, but also by the cyclic nature of pertussis with peaks occurring every 3 to 5 years. It appears that pertussis incidence has increased in school-age children in North America and western Europe, where acellular pertussis vaccines are used, but an increase has also occurred in some countries that use whole-cell vaccines. Worldwide, pertussis remains a serious health concern, especially for infants, who bear the greatest disease burden. Factors that may contribute to the resurgence include lack of booster immunizations, low vaccine coverage, improved diagnostic methods, and genetic changes in the organism. To better understand the epidemiology of pertussis and optimize disease control, it is important to improve surveillance worldwide, irrespective of pertussis vaccine types and schedules used in each country.

En esta publicación he trabajado en el análisis de los datos, y he contribuido con la trabajo.

12- Mathematical modeling of delayed pertussis vaccination in infants. P. Pesco, P. Bergero, G. Fabricius and D. Hozbor. Vaccine 2015 aceptado para su publicación. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.07.005 ISSN: 0264-410X

### Abstract

Pertussis is an acute vaccine-preventable respiratory disease that remains a public health problem. In an attempt to improve the control of the disease, many countries have incorporated new boosters in their vaccination schedule. Since the incorporation of these boosters is relatively recent, there are not enough data about their impact to support and/or universalize their use. Alternative strategies such as the improvement in vaccine coverage and reduction in vaccination delays, in addition to the incorporation of boosters, could be implemented. Though these strategies are not new, they have not been adequately evaluated in order to be implemented and/or prioritized. To evaluate the potential impact of these alternative strategies on pertussis incidence, we developed a methodology that involves the use of data collected from vaccination centers and an age-structured deterministic mathematical model for pertussis transmission. The results obtained show that strategies that avoid delays in vaccination have a strong impact on incidence reduction in the most vulnerable population (infants less than 1 y). In regions with high vaccination coverage (95%) the elimination of delays in the three primary doses decreases pertussis incidence in infants by approximately 20%. In regions where delays in the administration of vaccines are higher, the combined action to reduce delays and improve coverage leads to a significant improvement in disease control in infants. By repeating the calculations using different sets of parameters that describe different possible epidemiologic scenarios, we determined the robustness of our results. All the results presented highlight the importance of having high vaccine coverage and shorter delays in vaccine administration in order to reduce the impact of the disease in infants.

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

13- Strategies and new developments to control pertussis, an actual health problem. Gaillard, María; Bottero, Daniela; Moreno, Griselda; Rumbo, Martin; Hozbor, Daniela Pathogens and Disease 2015 aceptado para su publicación. Online ISSN: 2049-632X

**Abstract**

The aim of this article is to describe the current epidemiological situation of pertussis, as well as different short-term strategies that have been implemented to alleviate this threat. The state of the art of the development of new vaccines that are expected to provide long-lasting immunity against pertussis was also included.

En esta publicación he participado como autora responsable (corresponding author), he trabajado en el análisis de los datos, y he escrito el trabajo

14. Acid tolerance response of *Bordetella bronchiseptica* in avirulent phase. M. Fingermann<sup>1</sup>, D. Hozbor\* Microbiological Research 181 (2015) 52–60. ISSN: 0944-5013

**Abstract**

*Bordetella bronchiseptica* is a Gram-negative bacterium responsible for respiratory diseases in many mammalian hosts, including humans. This pathogen has been shown as able to persist inside the host cells, even in the phagosomes that are acidified to pH 4.5-5.0 after bacterial infection. Here we evaluated the resistance of *B. bronchiseptica* to survive under acidic conditions. In particular we analyzed the bacterial capacity to develop the mechanism known as acid tolerance response (ATR). Our studies were mainly focused on the avirulent phase of the bacteria since this phenotypic phase was reported to be more resistant to environmental stress conditions than the virulent phase. Results from *B. bronchiseptica* in virulent phase were also included for comparison purposes. In fact, for *B. bronchiseptica* 9.73 bacteria in virulent phase we observed that the viability of bacteria does not decrease significantly when grown at pH as low as 4.5, but it is affected when the pH of the medium was equal to or less than 4.0. After acid-adaptation at pH 5.5 for several hours, the survival rate of *B. bronchiseptica* 9.73 at lethal pH 4.0 for 6h was increased. Interestingly, the avirulent phase mediated by the two-component BvgAS system conferred further resistance to lethal acid challenge and a marked increase in the magnitude of the expressed ATR. The ATR for this avirulent phase seems to be associated with changes in LPS and surface protein profiles. 2D-gel electrophoresis revealed at least 25 polypeptides differentially expressed, 17 of which were only expressed or over-expressed under acid conditions. Using MALDI-TOF mass spectrometry, 10 of these differentially expressed polypeptides were identified.

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

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

Vaccine. 2016 May 3. pii: S0264-410X(16)30244-4. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.04.079. [Epub ahead of print]

Characterization of the immune response induced by pertussis OMVs-based vaccine.

Bottero D1, Gaillard ME1, Zurita E1, Moreno G2, Martinez DS1, Bartel E1, Bravo S1, Carriquiriborde F1, Errea A2, Castuma C1, Rumbo M2, Hozbor D3.

Author information

Abstract

For the development of a third generation of pertussis vaccine that could improve the control of the disease, it was proposed that the immune responses induced by the classic whole cell vaccine (wP) or after infection should be used as a reference point. We have recently identified a vaccine candidate based on outer membrane vesicles (OMVs) derived from the disease etiologic agent that have been shown to be safe and protective in mice model of infection. Here we characterized OMVs-mediated immunity and the safety of our new candidate. We also deepen the knowledge of the induced humoral response contribution in pertussis protection. Regarding the safety of the OMVs based vaccine (TdapOMVsBp,) the in vitro whole blood human assay here performed, showed that the low toxicity of OMVs-based vaccine previously detected in mice could be extended to human samples. Stimulation of splenocytes from immunized mice evidenced the presence of IFN- $\gamma$  and IL-17-producing cells, indicated that OMVs induces both Th1 and Th17 response. Interestingly TdapOMVsBp-raised antibodies such as those induced by wP and commercial acellular vaccines (aP) which contribute to induce protection against Bordetella pertussis infection. As occurs with wP-induced antibodies, the TdapOMVsBp-induced serum antibodies efficiently opsonized B. pertussis. All the data here obtained shows that OMVs based vaccine is able to induce Th1/Th17 and Th2 mixed profile with robust humoral response involved in protection, positioning this candidate among the different possibilities to constitute the third generation of anti-pertussis vaccines.

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

**7.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION.** *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.*

Title: Infection caused by Bordetella pertussis pertactin negative bacteria could be controlled by a pertussis vaccine based on outer membrane vesicles

Article Type: Regular Research Article

Keywords: whooping cough, Bordetella pertussis, PRN(-) bacteria, OMVs, commercial acellular vaccine.

Corresponding Author: Dr. Daniela Flavia Hozbor, PhD

Corresponding Author's Institution: Instituto de Biotecnología y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. CCT-La Plata CONICET

First Author: Erika Bartel

Order of Authors: Erika Bartel; Eugenia Zurita; Francisco Carriquiriborde; Daniela Bottero; Maria Emilia Gaillard; Sol Bravo; David Sabater Martínez; Martín Rumbo; Daniela Flavia Hozbor, PhD

Abstract: Bordetella pertussis isolates deficient in the vaccine antigen pertactin [PRN(-)] have been increased substantially in acellularvaccinated population. Based on the hypothesis that a new vaccine containing multiple epitopes could subvert the protective deficiency of the current acellular vaccines (aP) against such deficient isolates, in this work we assessed the protective capacity of outer membrane vesicle based vaccine (TdapOMVs) previously designed by us. Comparisons with a current commercial aP consisting in few epitopes were also performed. We observed that the TdapOMVs but not aP vaccine, protected mice against the infection caused by a PRN(-) isolate selected as a representative outbreak circulating isolate. Since other unidentified feature of the tested isolate different to the absence of PRN could also affect the detected loss of protection for aP vaccine, we evaluated the efficacy of the studied acellular vaccines against isogenic bacteria that in principle only differ in PRN expression. Again, while the TdapOMVs vaccine protected mice adequately against both PRN(+) parental strain and its derivative PRN(-) defective mutant, the aP vaccine exhibited a reduced protective capacity against the defective mutant. Mice protection assays using commercial whole cell vaccine (wP) rendered results that were in agreement with the hypothesis of vaccines comprised of multiple epitopes are most appropriate to address infections caused by isolates exhibiting altered expression of vaccine antigens. Performing immune mice serum transfer assays, we detected that TdapOMVs and wP vaccine-induced antibodies but not those induced by aP reduced the number of lungs recovered bacteria. Interestingly the TdapOMVs and wP-induced antibodies opsonized the B. pertussis PRN(-) isolate more efficiently than the aP vaccine did. All the results here presented position the TdapOMVs among the different possibilities to constitute the third generation of antipertussis vaccines.

enviado a Vaccine

**7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.**  
*Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.*

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

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS - ENCUENTROS - JORNADAS Y SIMPOSIOS

- 1- Involucramiento de diferentes poblaciones celulares del huésped en el fenómeno STIR detectado en las infecciones de Bordetella pertussis". Eugenia Zurita, Griselda Moreno, Emilia Gaillard, Daniela Bottero, Martín Rumbo y Daniela Hozbor. Congreso de la Sociedad Argentina de Inmunología –Mar del Plata, Noviembre 2014
- 2- Characterization of the key antigenic components of pertussis vaccine based on outer membrane vesicles. Maximiliano Ormazábal1\*, Erika Bartel1\*, María Emilia Gaillard1, Daniela Bottero1, Agustina Errea2, M. Eugenia Zurita1, Griselda Moreno2, Martin Rumbo2, Celina Castuma1, Dario Flores1, María Julia Martín1 and Daniela Hozbor1#. (hozbor.daniela@gmail.com). 8th Vaccine and ISV Congress. Filadelfia USA 26-28 de Octubre. 2014.
3. New vaccine against pertussis. Bottero D1, Gaillard ME1, Errea A2, Ormazábal M1, Zurita ME1, Moreno G2, Bartel E1, Flores D1, Castuma C1, Rumbo M2 and Hozbor D1 (hozbor.daniela@gmail.com). 8th Vaccine and ISV Congress. Filadelfia USA 26-28 de Octubre. 2014.
- 4- Mathematical modeling of pertussis transmission: evaluating the impact of delayed vaccination in infants. G. Fabricius, P. Pesco, P. Bergero and D. Hozbor. Mathematical and Computational Epidemiology of Infectious diseases – the interplay between models and public health policies. August 30 2015 – September 5 2015. Aceptación presentación Oral a cargo de Gabriel Fabricius
- 5- Safety of a new pertussis vaccine candidate based on bordetella pertussis outer membrane vesicles. David Sabater Martínez, Emilia Gaillard, Griselda Moreno, Daniela Bottero, Agustina Errea, Eugenia Zurita, Erika Bartel, Martin Rumbo y Daniela Hozbor. LASID SAI FAIC 2015 Noviembre. Buenos Aires.
- 6- Immune response triggered by a novel vaccine against pertussis. Griselda Moreno, María Emilia Gaillard, David Sabater Martínez, Eugenia Zurita, Daniela Bottero, Agustina Errea, Erika Bartel, Sol Bravo, Francisco Carriquiriborde, Castuma Celina, Martin Rumbo, Daniela Hozbor. LASID SAI FAIC 2015 Noviembre. Buenos Aires.
- 7- Moderadora en la sesión de Diseño de Vacunas en el 11th International Bordetella Symposium. Buenos Aires. 5-8 Abril 2016.
- 8- Bordetella Pertussis Pertactin Deficient Clinical Isolates Were Not Detected In Whole Cell Vaccinated Population From Argentina. CARRIQUIRIBORDE F; BARTEL E; BOTTERO D; BRAVO S; HOZBOR D. 11th International Bordetella Symposium. Buenos Aires. 5-8 Abril 2016.
- 9- Pertussis Epidemiology In Argentina Over 2005-2015: Trends By Age Group And Status Of Vaccination  
BOTTERO D1; MARTIN AISPURO P1; FLORES D1; HOZBOR D. 11th International Bordetella Symposium. Buenos Aires. 5-8 Abril 2016.
- 10- Acellular Pertussis Vaccine Candidate Based On Outer Membrane Vesicles (Omvs) Protects Against Bordetella Pertussis Pertactin Deficient Strains  
BARTEL E1; ZURITA E1; BRAVO S1; SABATER D1; RUMBO M2; HOZBOR D1. 11th International Bordetella Symposium. Buenos Aires. 5-8 Abril 2016.

11- Protective Capacity Of Outer Membrane Vesicles Derived From Bordetella Bronchiseptica

BOTTERO D1; GAILLARD M1; HOZBOR D1. 11th International Bordetella Symposium. Buenos Aires. 5-8 Abril 2016.

12- Protective Capacity Of The Humoral Response Induced By A Novel Acellular Pertussis Vaccine Candidate

ZURITA M1; GAILLARD M1; BOTTERO D1; MORENO G2; CARRIQUIRIBORDE F1; SABATER D1; ERREA A2; CASTUMA C1; RUMBO M2; HOZBOR D1. 11th International Bordetella Symposium. Buenos Aires. 5-8 Abril 2016.

13- USING A DETERMINISTIC MATHEMATICAL MODEL TO EVALUATE THE IMPACT OF

ALTERNATIVE VACCINATION STRATEGIES ON PERTUSSIS INCIDENCE. Bergero, O., Pesco, P., Fabricius, G., and Hozbor, D. 11th International Bordetella Symposium. Buenos Aires. 5-8 Abril 2016.

**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](http://www.vacunas-vacsal.org.ar))

## **8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.**

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

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

Provincia de Buenos Aires - Nación

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

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

Responsable: Dra. Daniela Hozbor

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

Objetivos específicos:

a) Fortalecimiento del Laboratorio Nacional de Referencia para el diagnóstico y caracterización del microorganismo causante de Coqueluche

- b) Fortalecimiento de laboratorios jurisdiccionales que participarán de la vigilancia activa
- c) Desarrollo metodológico aplicado a la epidemiología molecular para la vigilancia de Bordetella spp
- d) Propuesta e implementación de un sistema de control de calidad de las pruebas de laboratorio

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

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

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

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

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

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

Estoy trabajando activamente en el funcionamiento de una plataforma de experimentación en ratones en nuestra facultad (Bioterio). El objetivo de la misma es brindar las capacidades en ella incluidas no solo a profesionales de nuestra institución sino de otras instituciones tanto públicas y privadas de otras de forma garantizar la obtención de resultados de precisión y calidad.

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

Mariana Berenstein Vinculación tecnológica CONICET

Alejandro Costa Ministerio de Salud de La Provincia de Buenos Aires

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

**10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:**

**10.1 DOCENCIA**

- 1- Capítulo VI: Efectos del pH y la Temperatura. A. Lodeiro-D. Hozbor. Catálisis Enzimática. Fundamentos Químicos de la Vida. EDULP. La Plata (en prensa y ISBN en trámite). 2015

2- Capítulo IX: Purificación de Enzimas. D. Hozbor-D. Bottero. . Catálisis Enzimática. Fundamentos Químicos de la Vida. EDULP. La Plata (en prensa y ISBN en trámite). 2015

3- Capítulo X: Protocolos de Ensayo de Actividad Enzimática D. Hozbor-D. Bottero. . Catálisis Enzimática. Fundamentos Químicos de la Vida. EDULP. La Plata (en prensa y ISBN en trámite). 2015

## 10.2 DIVULGACIÓN

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

2014-actual	CONICET	Becaria posdoctoral	Eugenia Zurita
2013-actual	CONICET	Becaria Doctoral	Erika Bartel
2015- actual	CONICET	Becario Doctoral	Francisco Carriquiriborde

Investigadores  
 Dra María Emila Gaillard CONICET  
 Dra. Paula Bergero CONICET

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

Tesis en ejecución

2013-actual	CONICET	Becaria Doctoral	Erika Bartel
2015- actual	CONICET	Becario Doctoral	Francisco Carriquiriborde

Tesis finalizadas

Apellido y Nombres: Bioq. María Eugenia Zurita  
 Universidad: Universidad Nacional de La Plata.  
 Tema: ESTUDIO DE LA ESTIMULACIÓN DE LA RESPUESTA INNATA EN MUCOSAS POR AGONISTAS EN LA PROTECCIÓN CONTRA PERTUSSIS. UNA ENFERMEDAD CONSIDERADA RESURGENTE  
 Defensa: 27 de Marzo de 2015. Calificación: sobresaliente diez (10)

Apellido y Nombres: Bioq. Maximiliano Ormazábal  
 Universidad: Universidad Nacional de La Plata.  
 Tema: Epidemiología y estrategias de control para pertussis, una enfermedad resurgente  
 Defensa: 31 de Marzo de 2015. Calificación: sobresaliente diez (10)

Co- dirección Tesis doctorales finalizadas  
 Apellido y Nombres: Noelia Olivera  
 Universidad: Universidad Nacional de La Plata.

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

Dirección de Trabajo Final de grado FCE UNLP

Apellido y Nombres: Francisco Carriquiriborde

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

Becario CIN

Tema: Caracterización de aislamientos clínicos locales de Bordetella pertussis, agente causal de la enfermedad resurgente denominada tos convulsa

Presentación: Diciembre de 2014 Calificación: sobresaliente diez (10)

Dirección de Trabajo Final de grado FCE UNLP

Apellido y Nombres: Pablo Martin Aispuri

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

Tema: "Etiología y Epidemiología de pertussis o coqueluche, una enfermedad inmunoprevenible vigente".

Presentación: Abril de 2016 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 títulos incluidos en el punto 7.5

Disertante ciclo charlas con expertos. ANLIS Malbran Noviembre 2014.

Disertante Mesa redonda El Imàcto de una estrategia integrada de abordaje en pertussis o coqueluche. Diez años de trayectoria en la Region Sanitaria II

Tema: Panorama internacional y nacional. El diagnóstico de laboratorio en pertussis o coqueluche

6to congreso Argentino de Pediatría General Ambulatoria, El derecho a salud, el de la infancia y adolescencia. Un desafío para pensar y actuar.

19-21 de Noviembre de 2014. Buenos Aires Argentina.

Disertante en el curso de Actualización en vacunas en pediatría. Escuela de Educación médica Prof. Dr. Heraldo Tavella. Tem Vacunación Coqueluche. Junio 2015. La Plata

Disertante en la Rountable Meeting of the Global Pertussis Initiative (GPI) entitled The Challenge of pertussis: optimizing current and future strategies. 24-25 Julio 2015. en Amsterdam Holanda. Tema: The current pertussis situation across the globe and lessons learned from existing immunization and surveillance programs (Latin America).

Disertante. Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas. Servicio de Bioquímica. Charla de Actualización en el diagnóstico de Coqueluche. Abril 2016.

Disertante en el 11th International Bordetella Symposium. Título de la charla: OUTER MEMBRANE VESICLES AS AN ATTRACTIVE CANDIDATE FOR PERTUSSIS VACCINE. Abril 2016 Buenos Aires

## CURSOS DICTADOS

Coordinadora y Docente del Taller sobre vacunas: Vacunología 2014  
COORDINACION: Angel Cataldi, Graciela Glikman y Daniela Hozbor  
Profesionales participantes en la organización: Daniela Bottero, Angel Cataldi, Emilia Gaillard, Graciela Glikman y Daniela Hozbor, 24-26 de septiembre 2014 en CCT La Plata

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

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

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

2- Subsidio CONICET. 2015 Vacuna para la prevención de infecciones por Bordetella. Dres. M. Rumbo y D. Hozbor. Monto 150.000

3- Resolución SACT N° 030/15 de Aprobación de Financiamiento para el "Fortalecimiento de equipamiento relacionado con el cuidado, limpieza y alojamiento de los animales, y con el acondicionamiento ambiental bioterio FCE UNLP", BF-3. Responsable: Dra. Daniela Hozbor

4- PICT-2014-3617 Empleo de una formulación acelular contra pertussis de diseño nacional en la inmunización maternal y neonatal. Plan Argentina Innovadora 2020 A IR: Hozbor, Daniela Flavia. Ciencias Médicas Monto total \$ 525.000

**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.*

- Evaluadora Proyecto Salud Investiga Ministerio de Salud de La Nación. 2014. N°1268
- Evaluadora Proyecto Salud Investiga Ministerio de Salud de La Nación. 2014. N°1485
- Evaluadora Proyecto Salud Investiga Ministerio de Salud de La Nación. 2014. N°1500
- Evaluadora Proyecto Salud Investiga Ministerio de Salud de La Nación. 2014. N°1560
- Revisora científica del manuscrito # Number JVAC-D-14-00118. Marzo 2014
- Evaluadora Postulación Beca UNLP BECA TIPO "A" 2014
- Evaluadora proyectos PIP GRUPO INVESTIGACIÓN PIP 2014-2016 GI

- Evaluadora proyecto PROYECTOS UBACYT 2014-2017 GC
- Evaluadora proyecto UBACYT 2014-2017 Grupos En Formación.
- Revisora Científica de Manuscript ID ERV-2014-0054 for Expert Review of Vaccines Abril 2014
- Revisora Científica del manuscrito IAI01846-14 Abril 2014
- Revisora Científica del manuscrito ERV-2014-0074 for Expert Review of Vaccines Mayo de 2014
- Evaluadora de Resúmenes presentados a "XV Jornadas Argentinas de Microbiología" Junio 2014.
- Revisora Científica de PONE-D-14-23742 enviado al PLOS One Junio 2014
- Revisora Científica de JVAC-D-14-01030 Agosto 2014
- Revisora Científica del trabajo PAD-14-07-0093 Agosto 2014
- Revisora Científica del Trabajo 2014HV0431 for Human Vaccines & Immunotherapeutics. Agosto 2014
- Evaluador externo para el programa Proyectos I+D 2014. Uruguay 2014
- Revisora Científica del Manuscript ID ERV-2014-0193 for Expert Review of Vaccines Noviembre 2014
- Evaluador Proyecto PICT 2014 2126 Noviembre 2014
- Evaluador Proyecto PICT 2014 3371 Noviembre 2014
- Revisora Científica del trabajo JVAC-D-14-01157 para la revista Vaccine Diciembre 2014.
- Revisora Científica del trabajo # HYG-OM-6098 para la revista Epidemiology and Infection. Diciembre 2014
- Revisora Científica del Manuscrito ID ERV-2014-0193R1 for Expert Review of Vaccines Diciembre 2014
- Revisora Científica del Manuscrito EID 14-1957 for Emerging infectious disease Diciembre 2014
- Revisora Científica del Manuscrito LifeSci 14 815 for Life Science journal Diciembre 2014
- Revisora Científica del manuscrito ID ERV-2015-0031 for Expert Review of Vaccines Abril 2015
- Evaluadora del proyecto del programme CE17 2015 de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR).
- Revisora Científica del manuscrito Manuscript Number INFECTIO-D-15-00052. Agosto 2015
- Revisora Científica del review PAD-15-07-0104. Agosto 2015
- Revisora Científica del manuscrito Manuscript Number JVAC-D-15-01294 Agosto 2015
- Revisora Científica del manuscrito Ref: JEGH\_2015\_84 Journal of Epidemiology and Global Health
- Evaluadora Proyecto PICT2015 2304. Noviembre 2015
- Evaluadora Becas UNLP 2015
- Evaluación PICT 2015 – 3667 ANPCYT
- Evaluación PICT 2015-1026 ANPCYT
- Revisora Científica del manuscrito Manuscript GBIF-2015-0338 – Biofouling
- Evaluadora de Proyecto presentado a la Comisión Nacional Salud Investiga del Ministerio de Salud de La Nación. Enero 2016.
- Evaluadora de Proyecto presentado a la Comisión Nacional Salud Investiga del Ministerio de Salud de La Nación. Febrero 2016.
- Revisora científica del manuscrito entitled "Surveillance of Pertussis in 2016" for Expert Review of Anti-infective Therapy. Febrero 2016

- Participación como ESPECIALISTA EXTERNO/A en la evaluación de la Convocatoria Solicitud de Ingreso a la Carrera del Investigador 2016 Temas Estratégicos
- Evaluador Ascenso Carrera de Investigador del CONICET 2016. Comisión Ciencias Médicas.
- Revisora Científica del manuscrito BMED-D-16-00263. Abril 2016
- Revisora Científica del manuscrito *Frontiers in Microbiology*, section Infectious Diseases. Abril 2016
  
- Editora Académica de la revista *Plos One* 2011-presente. Número de Artículos en los que he actuado como editora académica: 145

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

Cargo: Profesor Adjunto

Dedicación: Exclusiva

Cátedra: Área Química Biológica y Biología Molecular, Especialidad QB y M, FCE, UNLP. Asignaturas: Química Biológica para Farmacia.

Periodicidad: Julio 2004 – septiembre 2014 (Cargo interino por Ordenanza 127 desde 2005 por concurso ordinario)

Cargo: Profesor Titular

Dedicación Exclusiva

Cátedra: Área Química Biológica y Biología Molecular, Especialidad QB y M, FCE, UNLP. Asignaturas: Química Biológica para Farmacia.

Periodicidad: Septiembre 2014 – al presente (designación transitoria)

En el 2011 realicé una presentación en el Programa de Mejoras de la Enseñanza de la Facultad de Ciencias Exactas para el dictado de Bioquímica I. Este programa fue implementado desde el segundo semestre del 2011 hasta el primer semestre de 2016 en el marco de una solicitud realizada por los alumnos y acordada por las autoridades de nuestra Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. A partir del año 2016 estoy a cargo del curso de Química Biológica de la carrera de Farmacia (doble turno segundo semestre).

En el marco de aquel programa se aplicaron distintas herramientas de aprendizaje que buscan en todo momento hacer que los estudiantes sean los actores esenciales de la construcción de su aprendizaje. La propuesta, que implicó la instalación del re-dictado de la asignatura en el segundo semestre, intentó e intenta dar la posibilidad que en el transcurso de un año más estudiantes adquieran los conocimientos de Bioquímica I y la capacidad de asociarlos a través de un razonamiento crítico. El propósito de esta propuesta, que se repitió luego del 2011 en el primer semestre y en el segundo semestre de los siguientes años en las comisiones a mi cargo, fue alcanzar los siguientes objetivos particulares

Que al finalizar el curso, los estudiantes sean capaces de:

Aplicar la formación previa, adquirida en materias básicas de la carrera, para el análisis e interpretación de situaciones biológicas concretas

Explicar, resumir e interpretar los contenidos dados en Bioquímica I dando especial atención al desarrollo de la capacidad de razonamiento lógico y evaluación crítica.

Expresar resultados, interpretar y valorar los mismos analítica y cuantitativamente,

Elaborar conclusiones propias y proponer soluciones alternativas.

Desarrollar una actitud crítica hacia el conocimiento establecido

Desarrollar habilidad en el manejo experimental en el laboratorio y el conocimiento y aplicación de nuevas técnicas experimentales.

Comprender y analizar con criterios propios los principios que requiere su actividad profesional futura. Eso les permitirá desenvolverse en forma independiente en tareas de desarrollo, planificación o control de procesos productivos.

Valorar el trabajo cooperativo, en equipo y multidisciplinario.

Asumir actitudes éticas y responsables en el desempeño de su práctica, como componente de formación de un profesional íntegro

Las herramientas que resultaron exitosas para el aprendizaje por parte de los estudiantes de los conceptos de Bioquímica I las emplearé en la asignatura Química Biológica de la carrera de Farmacia que estará a mi cargo a partir del segundo semestre 2016.

Además he actuado como:

Disertante ciclo charlas con expertos. ANLIS Malbran Noviembre 2014.

Disertante Mesa redonda El Impacto de una estrategia integrada de abordaje en pertussis o coqueluche. Diez años de trayectoria en la Region Sanitaria II  
Tema: Panorama internacional y nacional. El diagnóstico de laboratorio en pertussis o coqueluche

6to congreso Argentino de Pediatría General Ambulatoria, El derecho a salud, el de la infancia y adolescencia. Un desafío para pensar y actuar.

19-21 de Noviembre de 2014. Buenos Aires Argentina.

Disertante en el curso de Actualización en vacunas en pediatría. Escuela de Educación médica Prof. Dr. Heraldo Tavella. Tem Vacunación Coqueluche. Junio 2015. La Plata

Disertante en la Rountable Meeting of the Global Pertussis Initiative (GPI) entitled The Challenge of pertussis: optimizing current and future strategies. 24-25 Julio 2015. en Amsterdam Holanda. Tema: The current pertussis situation across the globe and lessons learned from existing immunization and surveillance programs (Latin America).

Coordinadora y Docente del Taller sobre vacunas: Vacunología 2014

Coordinacion: Angel Cataldi, Graciela Glikman y Daniela Hozbor

Profesionales participantes en la organización: Daniela Bottero, Angel Cataldi, Emilia Gaillard, Graciela Glikman y Daniela Hozbor, 24-26 de septiembre 2014 en CCT La Plata

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

Este proyecto fue presentado en la convocatoria ANPCyT 2014 y en la actualidad está siendo financiado por dicha institución. Código del proyecto: PICT 2014 3617

TÍTULO DEL PROYECTO: Empleo de una formulación acelular contra pertussis de diseño nacional en la inmunización maternal y neonatal

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

Bordetella pertussis es el agente causal de una enfermedad respiratoria aguda inmunoprevenible conocida como tos convulsa o pertussis. B. parapertussis es una especie muy cercana a B. pertussis que también presenta la capacidad de infectar al hombre provocándole una sintomatología similar a la de pertussis. Desafortunadamente para esta especie sobre la que se estima produce el 16% de los casos de pertussis no existen vacunas específicas [6].

En las últimas dos décadas las tasas de incidencia de la enfermedad se han incrementado llegando a producirse en el mundo y por año alrededor de 16 millones de casos con aproximadamente 200.000 muertes según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [7]. La mayoría de estos casos se reportan en los países en desarrollo, aunque en los últimos años también se han registrado brotes de gran envergadura en los países desarrollados incluso en aquellos con altas tasas de vacunación [7-9]. En la región de las Américas, el número de casos varía entre 1.500 a 49.000, [10, 11], siendo Argentina, Brazil, Mexico, Chile, Colombia, Paraguay, Perú, y los Estados Unidos los países con más casos reportados. En Argentina el último brote se registró en el 2011 cuando se notificaron 76 fallecimientos en niños menores de 6 meses [12]. En general la población más afectada por la enfermedad son los lactantes menores de 1 año de edad y en particular los neonatos y los menores de 6 meses, para quienes la hospitalización y la muerte son frecuentes [9]. En Estados Unidos en el año 2012 se reportaron 48.778 casos—más que lo reportado para cualquier año desde el 1959. Las tasas de incidencia en los lactantes pero también en la población de niños (7-10 años) y de adolescentes (13-14 años) han sido muy elevadas [7].

Esta situación epidemiológica surgida en los últimos años y por demás preocupante ha obligado a los sistemas de salud a revisar sus estrategias de control para fortalecer y/o implementar medidas que en el corto plazo mejoren la situación de, al menos, la población más vulnerable representada por los lactantes. Los esquemas de inmunización que se aplicaban antes del resurgimiento de la enfermedad consistían, en una serie primaria de 3 dosis durante el primer año de vida, pudiéndose aplicar la primera dosis a las 6 semanas de vida y un refuerzo entre el año y 6 años de edad, preferentemente durante el segundo año de vida. Con el resurgimiento de la enfermedad y gracias a la disponibilidad de las vacunas acelulares que pueden aplicarse sin riesgo de reactogenicidad aumentada a la población adolescente y adulta, en muchos países incluido Argentina se adicionaron refuerzos siguiendo recomendaciones de organismos internacionales [13-17]. Dentro de estas recomendaciones se encuentra la aplicación de refuerzos sobre los grupos poblacionales que presentan las mayores tasas de incidencia (refuerzo en adolescentes y en adultos) y/o sobre los grupos poblacionales descriptos como las principales fuentes

de infección para los lactantes (personal de salud en contacto con los niños, miembros de familia en contacto con el menor y/o madres embarazadas) [13-17]. El número de refuerzos se incrementa año a año lo que conlleva a la necesidad de superar desafíos de costos y de implementación. El por qué de la necesidad de tantos refuerzos parece residir en las debilidades de las vacunas acelulares: la muy corta duración de la inmunidad que confieren [18, 19], deficiencias en la protección contra la infección y la transmisión [20] [21] y mayor presión de selección sobre aislamientos bacterianos que evadirían más fácilmente a la respuesta inmune inducida por las vacunas [22, 23].

Todos estos datos marcan que es urgente contar con mejores formulaciones que superen las debilidades de las actuales vacunas. Así, nuestro laboratorio ha desarrollado una nueva vacuna acelular en el marco del Proyecto PAE VacSal (ANPCyT) y PICT2012. Esta nueva formulación acelular se ha obtenido a partir de componentes de membrana de *B. pertussis* y de *B. parapertussis*. Específicamente nuestra formulación consiste en una mezcla de vesículas de membrana externa (OMVs) derivadas de *B. pertussis* y de *B. parapertussis*. Los resultados alcanzados que han sido presentados en una patente nacional y otra internacional y en varias publicaciones han mostrado que nuestra formulación resulta ser no sólo inmunogénica sino también protectora y biosegura en el modelo de desafío intranasal en ratones aceptado [1, 2, 24-26]. Nuestra formulación parece ser superadora de las actuales vacunas acelulares en términos de protección ya que es capaz de proteger no sólo contra distintos genotipos de *B. pertussis* sino también contra *B. parapertussis* contra la cual las actuales vacunas son completamente ineficientes. También es superadora respecto del tipo de respuesta inmune que induce que es tipo mixto Th1/Th2, mientras que la vacuna acelular induce una respuesta que es mayormente del tipo Th2. Se suma también el hecho que nuestra formulación contiene un número de inmunógenos mayor que las vacunas acelulares actuales y en conformaciones más próximas a las encontradas en la bacteria, favoreciendo el poder protector de las mismas.

Dado todas estas características por demás beneficiosas de nuestro candidato vacunal y teniendo en cuenta que la premisa urgente es la de proteger de las infecciones por *B. pertussis* y *B. parapertussis* a los neonatos y a los lactantes, en esta presentación proponemos evaluar el uso de nuestra formulación en la inmunización maternal y neonatal. Estas estrategias serán analizadas en el modelo de ratón con desafío intranasal aceptado. Para ambas estrategias evaluaremos los posibles mecanismos de acción que conlleven a la protección. Evaluaremos también el posible impacto que pueda tener la inmunidad transferida/adquirida a partir de las madres vacunadas en el desarrollo de la respuesta inmune desencadenada por la cría, como consecuencia de una nueva inmunización.

Estos estudios esperamos posicionen aún más a nuestra formulación como alternativa válida de vacunación contra pertussis en distintos grupos poblacionales pero con impacto en los más vulnerables.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.

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

Hipótesis de trabajo: La utilización de una formulación vacunal basadas de OMVs derivadas de *B. pertussis* y de *B. parapertussis* en la inmunización maternal y/o neonatal, permitirá mejorar la eficacia contra ambas especies, *B. pertussis* y *B. parapertussis*, y contra la población bacteriana circulante en el grupo de neonatos y lactantes más susceptible de contraer la enfermedad, con potencialidad de mejorar la situación epidemiológica de pertussis.

Las vacunas basadas en las OMVs derivadas de las dos especies de impacto epidemiológico en el hombre están resultando ser una alternativa interesante que puede reemplazar a las actuales vacunas acelulares e inclusive a las clásicas vacunas celulares. En este punto es importante recordar que la primera vacuna antipertussis que todavía sigue en uso para las dosis primarias y los primeros refuerzos consiste en una suspensión del agente causal muerto por calor y detoxificada. Gracias al uso masivo de esta vacuna que se formula combinada al menos con los toxoides tetánico y diftérico (DTP), la morbilidad y la mortalidad asociada a la enfermedad se redujo drásticamente. Estos resultados por demás positivos en los años 70s se vieron algo opacados por los reportes sobre reacciones adversas asociadas a la vacunación contra pertussis. En algunos países incluso se llegaron a reportar casos de muerte. La publicidad de estos casos sin pruebas contundentes motivó a que muchas poblaciones y países rechazaran el uso de esta vacuna. Así, en el año 1981 se licencia la primera vacuna acelular o de componentes constituida por un único inmunógeno purificado, la toxina pertussis. A partir de ese año se fueron adicionando más componentes y así hay vacunas acelulares con 2, 3 y hasta 5 componentes. En la actualidad en el mercado mayormente se encuentran disponibles las de 3 (Glaxo Smith Kline) y 5 componentes (Sanofi Pasteur). Estas formulaciones destinadas a la población pediátrica se designan DTaP para indicar que el componente pertussis es acelular. En el año 2005, se licenció una nueva vacuna acelular que contenía menor cantidad de la toxina pertussis y toxoide diftérico para poder ser aplicadas a la población adolescentes y adultos. A estas formulaciones se las designa Tdap. Así, coexisten 3 tipos de vacunas: vacunas celulares solo recomendadas para la población pediátrica (menor de 7 años), vacunas acelulares DTaP recomendadas para la población pediátrica y vacunas acelulares Tdap para la población adolescente y adulta. No hay consenso a nivel mundial sobre qué vacuna utilizar ni que esquema seguir. Cada país decide qué usar y cómo, así en Argentina el calendario para pertussis consiste en 3 dosis primarias a los 2, 4 y 6 meses con dos refuerzos a los 18 meses y al ingreso escolar. Todas estas dosis son cubiertas con vacunas celulares. A partir del año 2009 (efectivo en el 2010) dada la situación epidemiológica, se incorpora a nuestro calendario de vacunación 1 refuerzo con Tdap para los adolescentes de 11 años, otro también con Tdap para el personal de salud que trabaja en contacto con los niños y más recientemente (2012) un refuerzo más durante el embarazo recomendado después de la semana 20 de gestación.

Nuestra formulación basada en las OMVs de probada capacidad protectora en el modelo animal aceptado [1, 2, 24-26] podría utilizarse tanto en la población pediátrica, reemplazando a la vacuna celular o acelular DTaP según el país como en la población adolescente y adulta reemplazando a las Tdap. Las vacunas a OMVs superan a las vacunas celulares en términos de bioseguridad ya que tienen 1000 veces menos endotoxina (LPS) y en términos del espectro de protección ya que la formulación basada en OMVs además de proteger contra B. pertussis protege contra B. parapertussis. Respecto de las vacunas acelulares además de ofrecer un espectro más amplio de protección, nuestra formulación las supera en el número de inmunógenos y en las conformaciones de los mismos que son más próximas a las encontradas en los agentes causales, favoreciendo el poder protector de la misma. Más aún nuestra formulación induce una respuesta mixta Th1/Th2 y una robusta respuesta de anticuerpos, a diferencia de las vacunas acelulares que inducen mayormente una respuesta del tipo Th2 [27, 28].

Con estos antecedentes en esta presentación proponemos continuar nuestro trabajo con el candidato vacunal basado en OMVs evaluando su capacidad protectora en la población más vulnerable de neonatos y lactantes a través de su uso en la inmunización maternal y /o neonatal. Para ello proponemos trabajar en los siguientes objetivos específicos:

1-Evaluación de la capacidad de nuestra formulación que de aquí en más designaremos TdapOMVsBpBpp para proteger a los neonatos y lactantes a través de la inmunización maternal. Para ello trabajaremos en el modelo animal de ratones aceptado y puesto a punto en nuestro laboratorio. Sobre hembras Balb/c de 3 -4 semanas realizaremos un esquema convencional de 2 inmunizaciones TdapOMVsBpBpp por vía sistémica pero trabajaremos en dos situaciones: una en la que la segunda dosis sea recibida antes de la preñez y otra durante la preñez. De esta forma podremos evaluar el impacto de la preñez en el desarrollo de la respuesta inmune en la madre y en su transferencia a la cría. Así, a un grupo de hembras se les aplicará la primera dosis de vacuna e inmediatamente después las pondremos en contacto con los machos para que queden preñadas. Una vez que presenten los primeros signos de preñez, este grupo de hembras recibirán la segunda dosis de vacuna. A otro grupo de hembras se le aplicarán las dos dosis de vacuna y luego de la segunda dosis se pondrán en contacto con los machos para que queden preñadas. Las hembras preñadas luego serán separadas de los machos para que den a luz a las crías las cuales serán estudiadas en cuanto a la inmunidad recibida en términos cualitativos, cuantitativos y funcionales, y a su duración en el tiempo. Para ello tomaremos muestras de sangre a distintos tiempos post nacimiento y evaluaremos en suero el título de anticuerpo anti OMVs, tipo e isotipos de inmunoglobulinas, identificaremos los componentes más relevantes de las OMVs responsables de esa respuesta y la capacidad de los mismos de provocar una acción bactericida mediada por el complemento sobre el agente causal. Estos resultados serán analizados en forma comparativa con los provenientes de las madres de forma de analizar la eficiencia en el traspaso de la inmunidad. En base a los resultados que obtengamos en cuanto a título de anticuerpos realizaremos un ensayo de protección sobre las crías en al menos 2 tiempos, uno en el que la inmunidad está alta y otro en el que haya bajado al menos a la mitad del máximo valor alcanzado. Para ello realizaremos desafíos con dosis subletales de *B. pertussis*.

Analizaremos también la inmunidad en las madres en las dos situaciones planteadas y la capacidad protectora de nuestra formulación sobre ellas.

Todos estos datos los analizaremos de manera comparativa con crías provenientes de madres inmunizadas con la Tdap comercial.

2- Evaluación de la capacidad de la formulación TdapOMVsBpBpp para generar una respuesta protectora transferible por leche materna. Para evaluar este aspecto trabajaremos sobre hembras Balb/c sobre las que aplicaremos dos dosis según el esquema clásico para que luego de la segunda inmunización con TdapOMVsBpBpp sean puestas en contacto con los machos para quedar preñadas. En forma paralela se trabajará un con grupo de hembras que solo recibirán placebo y que también se pondrán en contacto con los machos para que queden preñadas. Las hembras preñadas serán separadas para que den a luz. Una vez nacidas las crías serán intercambiadas de modo que las aquellas provenientes de las madres no inmunizadas se pondrán en las jaulas de las madres inmunizadas y las crías de las madres inmunizadas se pondrán en las jaulas de las madres no inmunizadas. Las crías se dejarán 3 semanas hasta el destete. Durante ese periodo se sacará muestras de sangre de la madre y de las crías para evaluar título de anticuerpos, tipo e isotipo de inmunoglobulina, reactividad del suero frente a las OMVs para identificar componentes que inducen la respuesta, funcionalidad bactericida del suero. Una vez destetadas las crías serán desafiadas con dosis subletales de *B. pertussis*.

Incluiremos grupos de ratones hembras inmunizados con la Tdap comercial de forma de poder analizar también nuestros resultados con los que se obtengan con las formulaciones comerciales en uso.

3- Evaluación de la posible interferencia con la respuesta inmune a la primera dosis de vacuna en los lactantes que han recibido inmunidad por vía materna. Se ha que la inmunidad transferida de la madre a los neonatos podría interferir en el desarrollo de la

respuesta inmune cuando el lactante reciba la primera dosis de vacuna. Este aspecto que no está estudiado en detalle para las vacunas acelulares vigentes será analizado en el desarrollo de esta presentación. Para ello trabajaremos con las crías provenientes de madres inmunizadas con TdapOMVsBpBpp, Tdap comercial y tratadas con placebo. Una vez destetadas las crías serán inmunizadas con la misma formulación que había recibido la madre. Se tomará muestra de sangre antes de recibir la primera dosis, a la semana después de la inmunización e inmediatamente antes del desafío con la dosis subletal de *B. pertussis*. Realizaremos el recuento de bacterias recuperadas en los pulmones como medida de protección. Además a partir de estas muestras realizaremos la evaluación de la respuesta inmune como en el caso anterior. Todos estos datos serán relevantes no solo para nuestra formulación sino para la vacuna Tdap en uso.

4- Evaluación de la capacidad de la formulación TdapOMVsBpBpp de generar una respuesta protectora los neonatos. Trabajaremos con ratones de 1 semana de edad sobre los que aplicaremos 2 dosis siguiendo el esquema tradicional. A distintos tiempos previo al desafío con *B. pertussis* tomaremos muestras de sangre para evaluar la respuesta inducida según detallamos antes. A los 10 días de la última dosis las crías serán desafiadas con una suspensión subletal de *B. pertussis*. Realizaremos luego el recuento de colonias en pulmón para evaluar la capacidad protectora sobre los neonatos.

5- Todos los estudios antes propuestos también serán realizados para evaluar su alcance frente a las infección por *B. paraptussis*.

Con el desarrollo de esta propuesta esperamos avanzar en la caracterización de nuestra formulación en términos de su aplicabilidad en madres y neonatos de forma de poder posicionarla cada vez con cara a los ensayos clínicos en humanos. Más aún el desarrollo de nuestra propuesta proveerá datos de sumo interés para las formulaciones acelulares comerciales.

**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 -.

Pertussis, tos convulsa o coqueluche es una enfermedad respiratoria aguda que si bien afecta a toda la población independientemente de su edad, el grupo de los recién nacidos y los lactantes menores de 6 meses de edad constituyen la población más vulnerable con los mayores registros de hospitalización, internación y muerte [29, 30]. Para el control de esta enfermedad se emplean vacunas que están incluidos en los calendarios nacionales de vacunación. La introducción de la vacunación en forma masiva en los años cincuenta redujo drásticamente la morbilidad y la mortalidad asociada a la enfermedad [7]. Sin embargo en los últimos años la enfermedad ha resurgido en varios países incluidos aquellos con altas tasas de vacunación [11, 31, 32]. En Estados Unidos por ejemplo el número de casos anuales notificados durante el periodo 1990 y 1999 varió entre 4.570 y 7.298 pero ya en el año 2005 se registraron 25.619 casos y en el 2012, 48.277 casos. En ese año ocurrieron por pertussis 20 fallecimientos de bebés de menos de 3 meses. La tasa de incidencia de la enfermedad en bebés superó la de todos los otros grupos de edad. La segunda tasa más alta de la enfermedad se observó en niños de 7 a 10 años. Las tasas aumentaron también en adolescentes de 13 y 14 años (<http://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting/cases-by-year.html>). En el año 2013 los casos notificados para el total país se redujeron prácticamente a la mitad (24.231), pero en varios estados como en Washington, D.C.

se reportó un aumento con respecto a los del año 2012. En lo que va del 2014 se registró un aumento del 24 % en comparación con el mismo periodo en el 2013.

Argentina por su parte presentó una disminución de casos hasta el año 2002, pero a partir del año 2003 se detectó un aumento de casos sostenido.

Los datos mostraron que la mayor tasa se registró en el años 2011: 16/100.000 habitantes. En dicho año también se registró el mayor número de fallecimientos asociados a la enfermedad (76 fallecimientos). Todas las muertes ocurrieron en el grupo de menores de 1 año, excepto cinco casos que ocurrieron en el grupo de 1-4 años (3), 25 a 34 años (1) y mayor de 75 años (1). Entre 2002-2011, las coberturas de vacunación anti-pertussis a nivel nacional de la 3ra dosis de la serie primaria y del ingreso escolar estuvieron por encima del 90%, mientras que el refuerzo de los 18 meses presentó coberturas entre 80 y 90%. El refuerzo de los 11 años, incluido en el Calendario desde 2009, tuvo una cobertura del 54,6% y 72,8% en los años 2010 y 2011 respectivamente.

La situación epidemiológica de la enfermedad en estos países y otros ha mostrado que hoy la enfermedad representa un problema grave para la salud pública. Las causas de esta situación se están debatiendo acaloradamente de forma de que en base al conocimiento epidemiológico se pueda dar una respuesta efectiva contra la enfermedad. Las posibles causas hasta ahora esgrimidas hacen referencia a debilidades en las vacunas tanto de las vacunas clásicas celulares como de las vacunas acelulares más modernas: relativa baja efectividad, necesidad de muchas dosis con coberturas del 95% para lograr protección, pérdida de la inmunidad y adaptación del patógeno a la inmunidad conferida por las vacunas. En el caso de las vacunas acelulares el fenómeno de pérdida de la inmunidad y la presión de selección ejercida por ellas sobre la población bacteriana circulante parecen ser más acusantes ya que los últimos años se ha demostrado que la pérdida de la inmunidad ocurre más temprano (2 años) que en poblaciones en las que se emplean esquemas con vacuna celular [18] y en los países con más tradición en el uso de las vacunas acelulares se han recuperado asilamientos de *B. pertussis* que no expresan el antígeno vacunal pertactina [22, 33]. Pareciera que el cambio de la vacuna celular wP a las vacunas acelulares aP ha complicado la situación de la enfermedad, debido probablemente a que la respuesta inmune inducida por las vacunas aP es menos robusta que la de las vacunas wP. Esto pudo evidenciarse en el modelo no-humano de primates recientemente desarrollado en donde se observó que las vacunas aP protegen contra la enfermedad, pero no son capaces de prevenir ni la infección ni la transmisión [21]. Más aún, un estudio clínico de caso y control, diseñado para evaluar el riesgo de contraer pertussis entre los jóvenes de 10 – 17 años durante el brote de California 2010 reveló que los adolescentes que habían recibido cuatro dosis de wP presentaron una probabilidad de contraer la enfermedad 6 veces menor que los que habían recibido todas las dosis con aP y casi cuatro veces menos probabilidad de contraerla que de los jóvenes que habían recibido una combinación de vacunas (algunas dosis con wP y otras con aP) [20]. En otro estudio también se evidenció que el riesgo de contraer la enfermedad se ve incrementado en escolares y adolescentes cuyas dosis vacunales sólo habían sido con aP en comparación con los sujetos que recibieron igual número de dosis pero con vacuna wP [34]. Estos hallazgos son consistentes con el conocimiento de que las vacunas aP inducen una respuesta Th2 y también Th17 que es menos eficaz que la fuerte respuesta Th1 inducida por la infección natural o por wP [35]. Esta observación ha sido confirmada en el modelo de los monos babuinos [36].

Además de la disminución de la inmunidad inducida por la vacunación, se están describiendo como posible causal de la resurgencia a los cambios en las características antigénicas y genotípicas de las cepas de *B. pertussis* circulantes: los alelos de los antígenos que se incluyen en las vacunas y que son expresadas por bacterias circulantes difieren en gran medida de los propios de las cepas utilizadas en la

producción de las vacunas [37]. La aparición de estos aislamientos bacterianos divergentes a los contenidos en las vacunas parece reflejar el efecto de la presión selectiva ejercida por la vacunación. En algunos pero no todos los países, la aparición de variantes alélicas coincide con el resurgimiento de la enfermedad. Más recientemente, han aparecido aislamientos bacterianos que no expresan uno o más componentes inmunógenos que están contenidos en las formulaciones vacunales contra pertussis, en particular pertactina [22, 33]. La aparición de aislamientos deficientes en pertactina exclusivamente en las regiones donde las vacunas aP son las únicas utilizadas, sugiere que la vacunación con vacuna aP resultó en la expansión de cepas que tienen una ventaja selectiva en las poblaciones humanas vacunadas.

Otros factores que también contribuyen al resurgimiento de pertussis es el aumento del número de casos causados por *B. parapertussis* para la que no hay vacunas disponibles.

En todo este contexto, es evidente que se necesita una nueva generación de vacunas capaces de superar las deficiencias asociadas con las vacunas actuales para mejorar el control de la enfermedad. Varias son las alternativas que pueden explorarse. Una posibilidad consiste en promover el desarrollo y el uso de nuevas vacunas de células enteras que sean menos reactógenas y mejoradas en términos de las condiciones de producción. Sin embargo, retornar al uso de la vacuna de células enteras parecería ser difícil para aquellos países que cambiaron a las vacunas aP debido a las reacciones adversas asociadas a las vacunas de células enteras.

Otra posibilidad es la de mejorar la vacuna aP a través de la inclusión de nuevos factores de virulencia de *B. pertussis* tales como adenilato ciclasa toxina o las proteínas reguladas por hierro [38, 39] y / o un adyuvante capaz de conducir una fuerte respuesta de Th1, como por ejemplo la utilización de agonistas de los receptores de tipo Toll, como se ha propuesto recientemente en el ámbito de la vacunología [28].

Hay varias vacunas nuevas propuestas que pueden contribuir a resolver el problema de la reaparición de pertussis. Una de ellas consiste en una cepa de *B. pertussis* atenuada administrable por vía intranasal [40]. Los resultados alcanzados con esta vacuna han sido exitosos en modelos animales y por ello los investigadores que la desarrollaron ya han realizado los ensayos clínicos correspondientes a fase I [41-43]. Aunque esta es una aplicación prometedora que ha mostrado algunas ventajas, comparte los potenciales problemas de seguridad relacionados con el uso de patógenos atenuados.

Una alternativa interesante que combina algunas de las estrategias mencionadas anteriormente es el uso de vesículas de membrana externa, también llamadas nanopartículas, ya que contienen los antígenos de la superficie bacteriana. Existen dos vacunas contra la meningitis que contienen componentes derivados de la membrana externa y periplasma de *Neisseria meningitidis* serogrupo B [44]. Los datos sobre seguridad y eficacia de estas vacunas y el conocimiento de que la mayoría de las bacterias Gram-negativas secretan vesículas pueden hacer que la estrategia de vacunación con vesículas o nanopartículas sea factible para otras enfermedades [45].

En este contexto, hemos diseñado una vacuna acelular basada en nanopartículas derivadas de *B. pertussis* y *B. parapertussis*, con excelente capacidad protectora observada en el modelo aceptado de desafío intranasal en ratones con diferentes genotipos de *B. pertussis* y *B. parapertussis* [1, 2, 24-26]. Esta formulación de la vacuna tiene un perfil de seguridad en ratones que es comparable a la de la vacuna aP comercial y mucho mayor que la de la wP. Además, nuestra formulación induce una respuesta inmune protectora con un perfil de Th1/Th2 mixto y también induce una respuesta de anticuerpos robusta. Hemos caracterizado la composición de las nanopartículas y hemos identificado a más de 40 componentes proteicos que en su mayoría están referidas a proteínas unidas a membrana. La presencia de un alto número de inmunógenos en la formulación vacunal es por demás importante, ya que esto puede evitar la excesiva presión selectiva conferida por uno solo o muy poco

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

En resumen, las pruebas de que las vacunas actuales aP no están proporcionando un control óptimo contra pertussis ha aumentado el interés en las mejoras de las vacunas actuales y en el desarrollo de nuevas vacunas. Las distintas opciones que se manejan, tales como la inclusión de nuevos antígenos o el cambio del adyuvante en la actual vacuna aP para cambiar el perfil Th son objeto de debate. Dentro de los desarrollos ya realizados, la cepa viva atenuada es una opción potencial. En esta categoría, la formulación a base de nanopartículas de *B. pertussis* y *B. parapertussis* parece ser una buena alternativa a las formulaciones actuales ya que contienen un mayor número de inmunógenos que las vacunas acelulares actuales y en conformaciones cercanas a las encontrados en las bacterias, hechos que favorecerían la capacidad de protección otorgada por las vesículas. Estas formulaciones también proporcionan protección contra *B. pertussis* y *B. parapertussis*, ampliando el espectro de protección por sobre las vacunas actuales, lo que contribuiría a un mejor control de la enfermedad.

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

Nuestra propuesta está basada en las siguientes observaciones fundamentales que ya fueron descritas en las secciones precedentes: pertussis es más grave en neonatos y en menores de 6 meses de edad, la 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 la aparición de aislamientos que presentan divergencias inmunogénicas con las cepas vacunales en uso como consecuencia de la presión de selección de las vacunas en particular aquellas constituídas por pocos inmunógenos. En consecuencia, nuestra hipótesis de trabajo plantea que la histórica relativa baja eficacia de las vacunas, preparadas en base a una única especie se ve agravada en las formulaciones acelulares compuesta por bajo número de inmunógenos. Así, la eficacia de las vacunas podría incrementarse si en su formulación se incluyeran múltiples inmunógenos no solo de *B. pertussis* sino de *B. parapertussis*. Esta propuesta se realiza en base al conocimiento epidemiológico hasta ahora alcanzado de pertussis en nuestra población que refleja no sólo la circulación de *B. pertussis* y *B. parapertussis* sino el aumento de casos en neonatos y lactantes menores de 6 meses en el tiempo y sobre los resultados alcanzados con las formulaciones basadas en las OMVs tanto de *B. pertussis* como de *B. parapertussis*. Los resultados que se obtengan no sólo nos permitirán seguir avanzando en la caracterización de nuestra formulación sino en la extensión de su aplicación en la población más vulnerable respecto de pertussis.

A continuación exponemos los lineamientos generales de las metodologías propuestas. Proponemos trabajar a partir de una formulación basada en las OMVs de *B. pertussis* y de *B. parapertussis* (OMVsBpBpp). con la que profundizaremos el conocimiento de su mecanismo de protección a través de la evaluación del rol de los anticuerpos por un lado y de la respuesta celular por otro. Ya con la formulación caracterizada analizaremos su capacidad de proteger a los neonatos mediante su inmunización directa o la

inmunización de las madres durante la preñez. En base al conocimiento previo sobre la inducción de respuesta mixta Th1 y Th2 esperamos la inmunización de las madres resulte exitosa. Respecto de esta estrategia y en caso de obtener resultados efectivamente positivos evaluaremos si los anticuerpos transferidos por la leche materna tienen algún rol en dicha protección. Evaluaremos también si la inmunidad transferida a las crías tiene algún impacto sobre la inducción de la respuesta cuando los mismos sean inmunizados con nuevas dosis. Estos aspectos que serán evaluados en forma comparativa con los arrojados en las inmunizaciones con las vacunas acelulares comerciales en uso, son claves ya que la estrategia de inmunización en las madres es de uso reciente y potencialmente se piensa en el empleo de esta vacuna para la población de los neonatos. Esto nos permitirá avanzar no solo sobre el conocimiento de las capacidades de nuestra formulación sino que dejará evidencia sobre la acción de la vacuna acelular comercial en uso.

#### DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS (Máx. 9 pág.)

1-Evaluación de la capacidad de nuestra formulación TdapOMVsBpBpp para proteger a los neonatos y lactantes a través de la inmunización maternal.

Para el desarrollo de este objetivo trabajaremos con el modelo de desafío intranasal en ratones ya puesto a punto en nuestro laboratorio. Brevemente el mismo consiste en aplicar por vía sistémica (ip) dos dosis de la vacuna a ensayar con intervalo de 2 semanas entre la primera y la segunda dosis. Luego, a las 2 semanas de la última dosis se realiza el desafío intranasal con una suspensión bacteriana en dosis subletales del agente causal de la enfermedad. Para evaluar el poder protector, a los 7 días post desafío se realiza el recuento de bacterias en los pulmones de los ratones inmunizados y se los compara con los obtenidos de ratones tratados con una solución salina o buffer fosfato.

En este caso emplearemos como vacuna la formulada a partir de las OMVs derivadas de *B. pertussis* Tohama fase I CIP8132 y de *B. parapertussis* AR729. La formulación se realizará a partir del conocimiento del contenido de proteínas en las vesículas estimado por el método de Bradford utilizando BSA como estándar. Las vesículas se emulsificarán con hidróxido de aluminio como adyuvante (0.2 mg/ml) y se detoxificarán con formalina (0.37 % a 37 °C overnight). Las preparaciones se formularán junto a los toxoides tetánico y diftérico en una dosis que equivale a 1/10 de la dosis empleada en humanos, para obtener la vacuna TdapOMVsBpBpp.

Para la inmunización activa se emplearán ratones BALB/c hembras de 4 semanas de edad libres de patógenos (Biol SAIC, Argentina o de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP según disponibilidad). Los ensayos se realizarán en forma comparativa con la vacuna acelular comercial en uso.

Trabajaremos con el siguiente esquema: a grupos de 30 hembras BALB c se las inmunizará con la primera dosis de vacuna TdapOMVsBpBpp, o Tdap comercial o se las tratará con PBS, 15 de ellas de cada grupo recibirán la segunda dosis de vacuna a las dos semana y luego se pondrán en contacto con machos naive. El otro grupo de 15 hembras de cada tratamiento luego de la primera dosis de vacuna será puesto en contacto con machos naive y solo luego de comprobarse la preñez se completará el plan de inmunización con la 2° dosis. Las crías nacidas de ambos grupos de cada tratamiento serán desafiados por vía intranasal en dos momentos diferentes: 1 en que los títulos de anticuerpos transferidos específicos contra pertussis sean altos y otro cuando el título de anticuerpo se reduzca a la mitad. El desafío se realizará con una suspensión bacteriana de la cepa *B. pertussis* Tohama fase I CIP8132 (dosis 107- 108 CFU en 40 µl). La evaluación del poder protector de las formulaciones se determinará

mediante el recuento de colonias en pulmón. Para ello los pulmones serán removidos de manera aséptica siguiendo normas adecuadas para el manejo de animales. Los pulmones serán homogeneizados en bufer fosfato estéril y luego de realizar diluciones seriadas las mismas se plaquearán en BGAS (Agar Bordet Gengou Suplementado con sangre de carnero al 10%) para determinar el número de bacterias recuperadas de los pulmones de los ratones.

Las madres provenientes de cada grupo también serán desafiadas con una dosis subletal del agente causal de forma de poder evaluar sobre ellas el poder protector de nuestra formulación aplicada en distintos momentos respecto de la preñez. Estos ensayos comenzarán a dar luz sobre la inducción y transferencia de la inmunidad sobre el estado de preñez.

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

Análisis de la respuesta humoral en las crías y madres: a las madres y a las crías después del nacimiento, se tomarán muestras de sangre a los 7, 14, 21 y 28 días después de ocurrido el alumbramiento y se seguirá la respuesta humoral midiendo por ELISA títulos de IgG sérica específica para las OMVs. Se analizará el perfil de subclases de IgG específica a fin de correlacionarlo con el perfil de respuesta Th1/Th2. Para ello placas (Nunc MaxiSorp® flat-bottom 96 well plate) multipocillo serán sensibilizadas con  $1\mu\text{g}/200\mu\text{L}$  de OMVs en un buffer carbonato 0.05 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 9.6. en incubación toda la noche a  $4^\circ\text{C}$ . Las placas multipocillo luego serán bloqueadas con PBS 5% leche descremada durante 1h a  $37^\circ\text{C}$ , luego se realizarán incubaciones con diferentes diluciones de los sueros durante 1h a  $37^\circ\text{C}$ . La IgG unida se detectará luego de 2 h de incubación con un anticuerpo de cabra anti- IgG de ratón (Jackson ImmunoResearch Baltimore) conjugada con HRP. Para la cuantificación de los isotipos de IgG la detección del anticuerpo unido se determinará usando una subclase de anticuerpo específico anti IgG1 de ratón (1:2000) o IgG2a (1:3000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Analizaremos también IgG3 e IgG4.

Realizaremos comparaciones madres vs madres y crías vs crías teniendo en cuenta el tratamiento y el esquema de vacunación seguido equematizado como panel A y panel B. Esto nos dará un dato adicional sobre la relación entre respuesta inmune inducida, respuesta inmune transferida vs el momento respecto de la preñez en que se aplicaron las dosis de vacunas. Estos datos no solo son de relevancia para nuestra formulación sino también para la Tdap comercial en uso.

Ensayo de anticuerpos bactericidas. A partir de los sueros obtenidos de madres y crías realizaremos ensayos para evaluar el poder bactericida de los mismos. Para ello se prepararán suspensiones bacterianas en placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano y se mezclarán con diluciones de los sueros de ratones inmunes. Se colocarán  $50\mu\text{l}$  de suero previamente inactivado por calor ( $56^\circ\text{C}$  por 30 min) y  $50\mu\text{l}$  de una suspensión de *B. pertussis* o *B. parapertussis* ( $1 \times 10^4$  UFC/ml) en

PBS con  $MgCl_2$  0.5 mM y  $CaCl_2$  0.15 mM. Las mezclas se agitarán a 150 rpm durante 90 min a  $37^\circ C$  para permitir que ocurra la interacción entre los anticuerpos y las bacterias. Como fuente de complemento exógeno se agregarán 10  $\mu l$  de suero de cobayo o de conejo. Como controles incluiremos las siguientes mezclas: (i) suero de los animales inmunizados, suspensión bacteriana y suero de cobayo inactivado por calor, (ii) suero murino previo a la inmunización, suspensión bacteriana y suero de cobayo, y (iii) suero de cobayo con suspensión bacteriana (sin suero murino). Finalmente, 25  $\mu l$  de cada pocillo se sembrarán (por duplicado) en placas de BGAS a fin de determinar la cantidad de UFC/ml.

El título del suero bactericida lo definimos como la dilución de suero más alto rendimiento  $\geq 50\%$  de destrucción de las bacterias después de la reacción de incubación.

Al igual que en punto anterior realizaremos comparaciones entre los distintos tratamientos en madres y crías.

Análisis de los antisueros mediante ensayos de inmunoblot: Para identificar los componentes más relevantes de las OMVs que inducen la respuesta humoral se utilizará la técnica del Inmunoblot. Para ello enfrentaremos a las proteínas contenidas en las OMVs y separadas en geles SDS-PAGE 12.5% contra los sueros inmunes obtenidos de los ratones inmunizados (madres y crías). Como controles usaremos factores de virulencia que sabemos se encuentran en las OMVs y de su poder inmunogénico. Las proteínas que resulten reactivas se identificarán mediante la técnica de espectrometría de masa del tipo MALDI-TOF-TOF. Para ello sobre el gel realizaremos un triptica de proteínas. Se cortarán los spots de los geles, los cuales se lavarán con 100  $\mu l$  de 25 mM de bicarbonato de amonio durante 10 min. Luego se incubarán durante 30 min a  $60^\circ C$  en 20  $\mu l$  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  $\mu l$  55mM iodoacetamida en 25mM bicarbonato de amonio. Luego de dos lavados más, uno con 25mM bicarbonato de amonio y otro 100  $\mu l$  acetonitrilo, los spots se someterán a deshidratación y cuando queden blancos, el acetónitro se eliminará por evaporación. Los spots se rehidratarán con un volumen pequeño de 50mM de bicarbonato de amonio conteniendo tripsina (20 $\mu g/ml$ ). Se realizarán incubaciones de 45 min a  $4^\circ C$  y luego a  $37^\circ C$  durante toda una noche. Después de la digestión los spots se lavarán dos veces con 20  $\mu l$  acetonitrilo: 0.1% ácido trifluoroacético (TFA) 33:66 durante 10 min y se recogerán los sobrenadantes. Se procederá luego a la concentración de las muestras en un Speedvac.

Determinación de huella peptídica. 0.4  $\mu l$  de una mezcla de matriz ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxy cinnamic acid (0.2 g/l) en 50% acetonitrilo y 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/>).

Todos estos ensayos esperamos nos den información no solo sobre la capacidad protectora de nuestra formulación TdapOMVs en los neonatos y lactantes a través de la inmunización materna sino también del rol de los anticuerpos en dicha respuesta. Comenzaremos a vislumbrar cómo el estado de preñez puede afectar la respuesta

inmune en la madre y su transferencia a la cría. Esperamos también obtener información sobre la vacuna acelular en uso sobre la que se carece de datos en lo que respecta a la inmunización maternal.

2- Evaluación de la capacidad de la formulación TdapOMVsBpBpp para generar una respuesta protectora transferible por leche materna. Para evaluar este punto se aplicará un esquema de inmunización consistente en 2 dosis con un intervalo de 2 semanas entre la primera y la segunda dosis sobre 15 hembras BALB/c las cuales sera puestas en apareamiento luego de la segunda dosis. Otro grupo de 15 hembras será inmunizado con la Tdap comercial y otro sera tratado con PBS. Cada uno de estos grupos luego de recibir el segundo tratamiento, será colocado con los machos para el apareamiento. Una vez nacidas las crías de cada tratamiento, transferiremos las provenientes de madres inmunizadas a madres tratadas con PBS. Por su parte las crías provenientes de las madres tratadas con PBS se transferirán a las madres inmunizadas. Así los grupos de crías nacidas de madres inmunizadas o no inmunizadas serán amamantadas por una madre del otro grupo.

Un grupo de crías quedará con las madres correspondientes, es decir no se realizará cambio de jaulas de forma de que se constituyan en grupos control de tratamiento.

A partir de las crías y las madres se tomará muestras de sangre en el momento de nacimiento y durante la lactancia hasta el desafío con dosis subletales de B. pertussis Tohama fase I. Sobre estas muestras siguiendo la metodología descrita más arriba determinaremos títulos de anticuerpos IgG, isotipos e IgA en suero de las crías nacidas a distintos tiempos, la funcionalidad de los anticuerpos transferidos por dosaje de bactericida mediada por complemento y análisis mediante inmunoblot. Se realizarán análisis comparativos crías y sus madres a los distintos tiempos.

Luego cuando las crías cumplan las 3 semanas de vida se evaluará la protección conferida por ambas vías mediante el ensayo de desafío intranasal. Se evaluará en estas crías la capacidad protectora transferida por vía transplacentaria (crías nacidas de madre inmunizada con TdapOMVsBpBpp pero amamantadas por una madre no inmunizada) o durante la lactancia (crías nacidas de madre no inmunizada y amamantadas por madre inmunizada) exclusivamente o por ambas (crías de madres inmunizadas, amamantadas por madre inmunizada).

Todos datos que se obtengan correspondientes a la media y desviaciones estándar de los recuentos de UFC/pulmón de ratón, correspondientes a los distintos tratamientos, serán transformados a  $\text{Log}_{10}(1+\text{UFC})$ . Para los recuentos de viables por debajo del límite de detección ( $<100$  UFC/pulmón) se utilizará un valor correspondiente al  $\text{Log}_{10}$  de 50 UFC. Se utilizará el mismo tipo de análisis que hemos descripto más arriba.

Todos estos ensayos nos permitirán evaluar la importancia tanto de la vía transplacentaria como la de la leche materna en la protección neonatal y de los lactantes cuando la inmunización se realiza por vía materna. El desarrollo de este punto como en el caso anterior será de relevancia no solo para nuestra formulación sino la de la vacuna acelular en uso.

3- Evaluación de la posible interferencia con la respuesta inmune a la primera dosis de vacuna en los lactantes que han recibido inmunidad por vía materna. Se realizarán esquemas de vacunación completos es decir de 2 dosis separados 14 días con TdapOMVsBpBpp, o vacuna acelular comercial Tdap (dosis 1/10 de la dosis utilizada en humanos) o con PBS, a grupos de 10 hembras BALB c de 3 semanas de edad. Luego las hembras se aparearán con machos naive. Las crías nacidas de cada grupo de madres serán inmunizadas luego de 7 días de nacidas con una dosis de vacuna igual al que recibió su madre. Como controles se utilizaran crías a las que no se las vacunará. Se determinarán, tal como fue descripto anteriormente, títulos de anticuerpos IgG, isotipos en suero de las crías nacidas antes y 7 días después de recibir la dosis de vacuna y al cumplir las 3 semanas de vida; la funcionalidad de los anticuerpos transferidos por dosaje de bactericida mediada por complemento en los sueros

obtenidos y finalmente cuando las crías cumplan las 3 semanas de vida se evaluará la protección si la protección conferida por la madre actúa negativamente cuando la cría recibe una dosis de vacuna mediante el ensayo de desafío intranasal.

Varios estudios sugieren que los anticuerpos transferidos por las madres podrían interferir en la respuesta del lactante cuando recibe su primera dosis. Este contexto marca sin duda la relevancia de los resultados que se obtengan con el desarrollo de este punto.

4- Evaluación la capacidad de la formulación TdapOMVsBpBpp de generar una respuesta protectora los neonatos. Para evaluar este aspecto proponemos trabajar en ratones de 1 semana de edad nacidos de madres no inmunizadas. Sobre estos neonatos aplicaremos 2 dosis de vacuna TdapOMVsBpBpp, vacuna acelular comercial Tdap (dosis 1/10 de la dosis utilizada en humanos) o PBS siguiendo el esquema clásico que venimos aplicando es decir que a los 21 días de nacidos recibirán la 2ª dosis de vacuna por vía intraperitoneal. A los 7, 14, 21 y antes del desafío tomaremos muestras de sangre para evaluar la respuesta inducida según detallamos antes anteriores. A los 10 días de la última dosis las crías serán desafiados con una suspensión bacteriana de la cepa *B. pertussis* Tohama fase I CIP8132 (dosis 107-108 CFU en 40 µl). La evaluación del poder protector de las formulaciones se determinará mediante según detallamos más arriba A los 7 días post desafío se evaluará el número de unidades formadoras de colonias en pulmón por recuento en placas de BGAS siguiendo el protocolo más arriba detallado.

Además del efecto protector, analizaremos la respuesta inmune desencadenada por la inmunización en los neonatos:

La respuesta humoral la evaluaremos como en los casos anteriores midiendo a partir de las muestras de sangre y 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. Se analizarán los niveles de IgA específica en lavado broncoalveolar mediante técnicas descriptas previamente.

Respecto de la respuesta celular evaluaremos:

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 nuestro candidato vacunal y agonistas y se realizará un ensayo de proliferación frente a APC obtenidas de bazo en presencia de los antígenos seleccionados. 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 beta, IL-17.

Todos estos resultados los compararemos con los obtenidos en animales jóvenes. También compararemos con los resultados que obtengamos de las inmunizaciones con la vacuna acelular comercial

5- Evaluación de la capacidad de nuestra formulación de generar respuesta protectora frente a las infección por *B. parapertussis* en la inmunización maternal y neonatal. Para ello realizaremos cada uno de los ensayos anteriores (puntos 1-4) siguiendo el mismo esquema pero haciendo el desafío con una suspensión en dosis subletales de *B. parapertussis*. Evaluaremos títulos de anticuerpos específicos IgG, IgA e isotipos específicos contra *B. parapertussis*. La funcionalidad de los sueros por medida del poder bactericida mediado por complemento se determinará con el procedimiento antes descripto, también frente a suspensiones bacterianas de *B. parapertussis*. Por otra parte

los ensayos de protección en el modelo murino de infección se realizarán también con suspensiones en dosis subletales de *B. parapertussis* (dosis 107-108 CFU en 40  $\mu$ l) siguiendo los procedimientos y detallados.

#### CRONOGRAMA DE TRABAJO (Máx. 1 pág.)

Se presentará una tabla de doble entrada con las tareas desagregadas y los tiempos estimados que consumirán.

- | Primer Año                                                                                                                            | Segundo Año | Tercer Año |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------|
| Evaluación de la capacidad protectora en neonatos y lactantes a través de la inmunización materna                                     |             |            |
| Caracterización de la respuesta humoral inducida por la inmunización materna                                                          |             |            |
| Evaluación de la vía transplacentaria y leche materna en la transmisibilidad de la respuesta inmune protectora                        |             |            |
| Caracterización de la respuesta inmune transferida por vía transplacentaria y por leche materna                                       |             |            |
| Evaluación de la posible interferencia de la inmunidad materna en la inducción de la respuesta inmune por la aplicación primera dosis |             |            |
| Evaluación de la capacidad protectora en neonatos                                                                                     |             |            |
| Caracterización de la respuesta inmune inducida por nuestra formulación y la vacuna acelular en neonatos                              |             |            |
| Evaluación de los puntos anteriores frente a infecciones causadas por <i>B. parapertussis</i>                                         |             |            |

#### FACILIDADES

El Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) CCT La Plata donde desarrollamos nuestras actividades se encuentra instalado en la planta baja del edificio Bosque Oeste de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Dentro de las instalaciones pertinentes al proyecto, presentes en este Instituto, se encuentran, bioterio, cuarto para electroforesis de agarosa con bromuro de etidio, cuarto de bioseguridad con flujo de bioseguridad biológica tipo IIA, laboratorios, cuarto de esterilización con autoclaves. El IBBM posee diversos equipos mayores, a saber: centrifugas sorvall, ultracentrífuga, freezers de -80° C y -20° C, agitadores orbitales con control de temperatura, estufas de 60° C y 37° C, estufas con CO<sub>2</sub>, horno de hibridación, cámaras de flujo horizontal, equipo de PCR en tiempo real (Bio.Rad), adquisidor de imágenes. A su vez, el grupo forma parte del consorcio de un PME adjudicado para un equipo de MALDI-TOF ubicado en la Facultad de Ciencias Exactas, UBA.

A través de este proyecto PAE VacSal del que soy la IR logramos la adquisición de un lector de ELISA (fluorescencia, luminiscencia, UV-Visible), criótomo, centrifugas, un equipo de purificación automática de proteínas (AKTA de GE), un equipo de isoelectrofoque (IGPForce de GE), microscopio invertido de fluorescencia Nikon Modelo Eclipse Ti-U y microscopio de disección laser de la marca Leica Modelo LMD

6000 por laser de diodos y otros equipamientos menores. En el transcurso del corriente año se procederá a la inauguración de un nuevo bioterio, de mayor capacidad y calidad. Recursos humanos: el Instituto cuenta con dos técnicos, personal no-docente de la Facultad de Ciencias Exactas, Sr. Rubén Bustos y Sra Catalina López. Además se cuenta con Personal de Apoyo de CONICET, Sra Gisela Verdecana, secretaria, Sr Bernabé Castillo, Ing. Abel Bortolameotti, Sr. Juan Guzmán; Lic. Paula Giménez y Silvana Tongiani.

## REFERENCIAS

1. Hozbor D, Rodriguez ME, Fernandez J, Lagares A, Guiso N, Yantorno O: Release of outer membrane vesicles from Bordetella pertussis. Current microbiology 1999, 38(5):273-278.
2. Roberts R, Moreno G, Bottero D, Gaillard ME, Fingerhann M, Graieb A, Rumbo M, Hozbor D: Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. Vaccine 2008, 26(36):4639-4646.
3. Stoddard MB, Pinto V, Keiser PB, Zollinger W: Evaluation of a whole-blood cytokine release assay for use in measuring endotoxin activity of group B Neisseria meningitidis vaccines made from lipid A acylation mutants. Clinical and vaccine immunology : CVI 2010, 17(1):98-107.
4. Komatsu E, Yamaguchi F, Eguchi M, Watanabe M: Protective effects of vaccines against Bordetella parapertussis in a mouse intranasal challenge model. Vaccine 2010, 28(27):4362-4368.
5. Feunou PF, Bertout J, Loch C: T- and B-cell-mediated protection induced by novel, live attenuated pertussis vaccine in mice. Cross protection against parapertussis. PloS one 2010, 5(4):e10178.
6. Cherry JD: Why do pertussis vaccines fail? Pediatrics 2012, 129(5):968-970.
7. Pertussis vaccines: WHO position paper. Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations 2010, 85(40):385-400.
8. He Q, Mertsola J: Factors contributing to pertussis resurgence. Future microbiology 2008, 3(3):329-339.
9. Clark TA: Changing pertussis epidemiology: everything old is new again. The Journal of infectious diseases 2014, 209(7):978-981.
10. Clark TA: Responding to pertussis. The Journal of pediatrics 2012, 161(6):980-982.
11. Hozbor D, Mooi F, Flores D, Weltman G, Bottero D, Fossati S, Lara C, Gaillard ME, Pianciola L, Zurita E et al: Pertussis epidemiology in Argentina: trends over 2004-2007. The Journal of infection 2009, 59(4):225-231.
12. Argentina MdSdIN: Integrated Surveillance Bulletin. Sanitary and Promotion Secretary. Argentina Available at: <http://www.msal.gov.ar/index.php/home/boletin-integrado-de-vigilancia>.
13. Kuehn BM: ACIP: Give pertussis vaccine during every pregnancy. JAMA : the journal of the American Medical Association 2012, 308(19):1960.
14. ACIP: Updated Recommendations for Use of Tetanus Toxoid, Reduced Diphtheria Toxoid, and Acellular Pertussis Vaccine (Tdap) in Pregnant Women - Advisory Committee on Immunization Practices. [http://www.immunize.org/acip/aciptopic\\_pregasp](http://www.immunize.org/acip/aciptopic_pregasp) 2013.
15. Updated recommendations for use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, and acellular pertussis (Tdap) vaccine in adults aged 65 years and older -

Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2012. MMWR Morbidity and mortality weekly report 2012, 61(25):468-470.

16. Updated recommendations for use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis (Tdap) vaccine from the Advisory Committee on Immunization Practices, 2010. MMWR Morbidity and mortality weekly report 2011, 60(1):13-15.

17. Forsyth KD, Wirsing von Konig CH, Tan T, Caro J, Plotkin S: Prevention of pertussis: recommendations derived from the second Global Pertussis Initiative roundtable meeting. *Vaccine* 2007, 25(14):2634-2642.

18. Koepke R, Eickhoff JC, Ayele RA, Petit AB, Schauer SL, Hopfensperger DJ, Conway JH, Davis JP: Estimating the Effectiveness of Tdap Vaccine for Preventing Pertussis: Evidence of Rapidly Waning Immunity and Differences in Effectiveness by Tdap Brand. *The Journal of infectious diseases* 2014.

19. Witt MA, Katz PH, Witt DJ: Unexpectedly limited durability of immunity following acellular pertussis vaccination in preadolescents in a North American outbreak. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012, 54(12):1730-1735.

20. Klein NP, Bartlett J, Fireman B, Rowhani-Rahbar A, Baxter R: Comparative effectiveness of acellular versus whole-cell pertussis vaccines in teenagers. *Pediatrics* 2013, 131(6):e1716-1722.

21. Warfel JM, Zimmerman LI, Merkel TJ: Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014, 111(2):787-792.

22. Pawloski LC, Queenan AM, Cassidy PK, Lynch AS, Harrison MJ, Shang W, Williams MM, Bowden KE, Burgos-Rivera B, Qin X et al: Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2014, 21(2):119-125.

23. Barkoff AM, Mertsola J, Guillot S, Guiso N, Berbers G, He Q: Appearance of *Bordetella pertussis* strains not expressing the vaccine antigen pertactin in Finland. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2012, 19(10):1703-1704.

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

25. Bottero D, Gaillard ME, Errea A, Moreno G, Zurita E, Pianciola L, Rumbo M, Hozbor D: Outer membrane vesicles derived from *Bordetella parapertussis* as an acellular vaccine against *Bordetella parapertussis* and *Bordetella pertussis* infection. *Vaccine* 2013, 31(45):5262-5268.

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

27. Higgs R, Higgins SC, Ross PJ, Mills KH: Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal immunology* 2012, 5(5):485-500.

28. Mills KH, Ross PJ, Allen AC, Wilk MM: Do we need a new vaccine to control the re-emergence of pertussis? *Trends in microbiology* 2014, 22(2):49-52.

29. Vranken P, Pogue M, Romalewski C, Ratard R: Outbreak of pertussis in a neonatal intensive care unit--Louisiana, 2004. *American journal of infection control* 2006, 34(9):550-554.

30. Christie CD, Baltimore RS: Pertussis in neonates. *Am J Dis Child* 1989, 143(10):1199-1202.

31. Raguckas SE, VandenBussche HL, Jacobs C, Klepser ME: Pertussis resurgence: diagnosis, treatment, prevention, and beyond. *Pharmacotherapy* 2007, 27(1):41-52.
32. Celentano LP, Massari M, Paramatti D, Salmaso S, Tozzi AE: Resurgence of pertussis in Europe. *The Pediatric infectious disease journal* 2005, 24(9):761-765.
33. Lam C, Octavia S, Ricafort L, Sintchenko V, Gilbert GL, Wood N, McIntyre P, Marshall H, Guiso N, Keil AD et al: Rapid Increase in Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* Isolates, Australia. *Emerging infectious diseases* 2014, 20(4):626-633.
34. Witt MA, Arias L, Katz PH, Truong ET, Witt DJ: Reduced risk of pertussis among persons ever vaccinated with whole cell pertussis vaccine compared to recipients of acellular pertussis vaccines in a large US cohort. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2013, 56(9):1248-1254.
35. Ross PJ, Sutton CE, Higgins S, Allen AC, Walsh K, Misiak A, Lavelle EC, McLoughlin RM, Mills KH: Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to *Bordetella pertussis*: towards the rational design of an improved acellular pertussis vaccine. *PLoS pathogens* 2013, 9(4):e1003264.
36. Warfel JM, Merkel TJ: *Bordetella pertussis* infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates. *Mucosal immunology* 2013, 6(4):787-796.
37. Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, Cassidy PK, Chiang CS, Dalby T, Fry NK et al: Global Population Structure and Evolution of *Bordetella pertussis* and Their Relationship with Vaccination. *mBio* 2014, 5(2).
38. Dunne A, Ross PJ, Pospisilova E, Masin J, Meaney A, Sutton CE, Iwakura Y, Tschopp J, Sebo P, Mills KH: Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against *Bordetella pertussis*. *J Immunol* 2010, 185(3):1711-1719.
39. Alvarez Hayes J, Erben E, Lamberti Y, Ayala M, Maschi F, Carbone C, Gatti B, Parisi G, Rodriguez ME: Identification of a new protective antigen of *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 2011, 29(47):8731-8739.
40. Mielcarek N, Debie AS, Raze D, Bertout J, Rouanet C, Younes AB, Creusy C, Engle J, Goldman WE, Locht C: Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS pathogens* 2006, 2(7):e65.
41. Kammoun H, Roux X, Raze D, Debie AS, De Filette M, Ysenbaert T, Mielcarek N, Saelens X, Fiers W, Locht C: Immunogenicity of live attenuated *B. pertussis* BPZE1 producing the universal influenza vaccine candidate M2e. *PloS one* 2013, 8(3):e59198.
42. Mielcarek N, Debie AS, Mahieux S, Locht C: Dose response of attenuated *Bordetella pertussis* BPZE1-induced protection in mice. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2010, 17(3):317-324.
43. Thorstensson R, Trollfors B, Al-Tawil N, Jahnmatz M, Bergstrom J, Ljungman M, Torner A, Wehlin L, Van Broekhoven A, Bosman F et al: A phase I clinical study of a live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine--BPZE1; a single centre, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of BPZE1 given intranasally to healthy adult male volunteers. *PloS one* 2014, 9(1):e83449.
44. Holst J, Martin D, Arnold R, Huergo CC, Oster P, O'Hallahan J, Rosenqvist E: Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 2009, 27 Suppl 2:B3-12.
45. Holst J, Oster P, Arnold R, Tatley MV, Naess LM, Aaberge IS, Galloway Y, McNicholas A, O'Hallahan J, Rosenqvist E et al: Vaccines against meningococcal serogroup B disease containing outer membrane vesicles (OMV): lessons from past programs and implications for the future. *Human vaccines & immunotherapeutics* 2013, 9(6):1241-1253.

---

**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:
- Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 21).
  - 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 .....".
  - Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
- Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: [infinvest@cic.gba.gov.ar](mailto:infinvest@cic.gba.gov.ar) (puntos 1 al 21), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
  - 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.