

OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS DE BORDETELLA PERTUSSIS Y SU EVALUACIÓN COMO NOVEDOSAS FORMULACIONES ACELULARES MÁS COMPATIBLES CON EL ESCENARIO EPIDEMIOLÓGICO ACTUAL DE LA TOSFERINA

Autores Principales: Diógenes Quintana (CIGB), Anabel Álvarez (CIGB), Maite Delgado (CIGB), Gilda Lemos (CIGB), Edelgis Coizeau (CIGB), Gerardo Guillén (CIGB)

Otros Autores: Tania Cárdenas (CIGB), Glay Chinaea (CIGB), Rafael Fando (CNIC), Yasser Ramos (CIGB), Yanet Tambara (CIGB), Evelin Caballero (CIGB), Raul Rafael Espinosa (CIGB), Virgilio Bourg (BioCen), Arielis Rodríguez, (CIGB), Luis Javier, (CIGB), Karen Cobas (CIGB), Emilio Carpio (CIGB), Vladimir Besada (CIGB), Lidia Ines Novoa (CIGB). Mariela Vázquez (CIGB), Sonia González (CIGB), Tamara Menéndez (CIGB), Yoelys Cruz (CIGB), Jose Angel Silva (CIGB), Regla Caridad Estrada (CIGB), Hilda Elisa Garay (CIGB), Osvaldo Reyes (CIGB), Reynaldo Blanco (CIGB-SS), Enrique Perez (CIGB-SS), María Barceló (CIGB-SS), Onel Valdivia (CIGB-SS), Carlos Hernández (CIGB-SS), Mabel Izquierdo (CIGB), Lourdes Proenza-Alfonzo (CNIC), Ernesto Marcos-López (CNIC), Karen Marrero-Domínguez (CNIC), Edith Suzarte-Portal (CNIC), Yailín Bárbara de Armas (BioCen), Alain Morejón (BioCen), Antonia Leonela Huergo (BioCen), Christian Humberto Pérez (BioCen), Dioslaida Urquiza (CIGB), Enma Brown (CIGB), Yadira Rodríguez (CIGB), Ara-

celys Blanco (CIGB), Yordanka Soria (CIGB), Vicente García (CIGB)

Colaboradores: Alberto Tamayo, Joaquín R. Lorenzo, Isela Maria Garcia, Abel Paredes Estela Prieto, Yai Cruz, Yudeisy Rodriguez ,Yanela Aldao, Milagros Rodríguez, María de los Angeles Fernández, Maylin Pérez, Daymí Abreu.

Autor para la correspondencia:

Diógenes Quintana y Anabel Álvarez
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa. PO Box. 6162, Ciudad de la Habana
10600, Cuba.

E-mail: diogenes.quintana@cigb.edu.cu

anabel.alvarez@cigb.edu.cu

FAX: (53-7) 271-4764

1. Resumen

Antecedentes La tosferina ha reemergido en diferentes países. Constituye la quinta causa de muerte (300, 000 casos por año) entre las enfermedades prevenibles por vacunas. El escenario epidemiológico actual tosferina se caracteriza por el predominio de cepas de mayor virulencia que expresan mayores niveles de la toxina pertussis (PT), la presencia cepas Prn2 en América y Europa así como de cepas Prn1 y Prn2 en Asia. El presente trabajo tiene como objetivo el desarrollo de una nueva vacuna acelular contra la tosferina.

Resultados y novedad científica Por primera vez se diseñó y obtuvo una molécula híbrida de pertactina (PRN2-1) de los tipos Prn1 y Prn2, con la capacidad de inducir una respuesta inmune significativamente superior a las proteínas simples Prn1 y Prn2. De igual forma, a partir de una nueva cepa de Bordetella pertussis (BPCNIC0311) se obtuvieron la variante natural de pertactina Prn2, el toxoide genéticamente modificado de la toxina pertussis (PTg), reportada como más inmunogénica y eficaz que el toxoide PTq, inactivado químicamente, el cual está presente en todas las vacunas acelulares que se comercializan actualmente; de igual forma se obtuvo la hemaglutinina filamentososa (FHA), antígeno relevante presente en todas las vacunas acelulares de más de dos componentes. Los antígenos se obtuvieron con elevada pureza e integridad molecular. Al ser evaluados en formulaciones tricompuestas, PTg/FHA/PRN2-1 y PTg/FHA/Prn2 resultaron altamente inmunogénicos en diferentes líneas de ratón con la inducción equilibrada de las subclases IgG1, IgG2a e IgG2b. Similarmente, las formulaciones resultaron altamente protectoras en el modelo modificado de reto intracerebral (MICA) frente a la cepa virulenta de referencia internacional BP18323.

Conclusión Los resultados alcanzados convierten a las formulaciones tricompuestas PTg/FHA/PRN2-1 y PTg/FHA/Prn2 en novedosas combinaciones potencialmente más efectivas y versátiles contra la tosferina, donde la elección de una u otra combinación dependerá del costo de la inversión y volumen de mercado que justifique la inversión, así como de la competencia, demanda y territorios hacia donde se dirija la comercialización de la futura vacuna.

Avales Los resultados se han presentado en congresos científicos internacionales y están publicados en tres (3) revistas internacionales, además forman parte de una (1) patente concedida en varios países. Actualmente el trabajo se encuentra en la culminación del Desarrollo Tecnológico a escala de 30 L. Recientemente, se ha diseñado el escalado a 300L para la producción de antígenos para Estudios Clínicos en Humanos Fase I en Cuba, como parte de un

acuerdo para el Desarrollo, Producción, Registro y Comercialización de antígenos para Vacunas Acelulares de Pertussis, entre instituciones de Vietnam (AMVDAVAC) y Cuba (CIGB/Heber).

2. Comunicación Corta

2.1. Introducción

Antecedentes. La tosferina o pertussis es una enfermedad respiratoria aguda, altamente contagiosa, causada por el cocobacilus aerobio y Gram negativo *B. pertussis*. La tosferina ocupa el quinto lugar en las enfermedades mortales prevenibles por vacunas. Cada año mueren 300, 000 personas mayormente infantes (>90 %) menores de seis meses. En los países desarrollados, que aplican coberturas elevadas de vacunación con vacunas de pertussis acelulares (DTaP), la incidencia continúa en aumento. Dentro de los factores que juegan un rol en el incremento de la incidencia se pueden mencionar dos fundamentales: las vacunas DTaP inducen una inmunidad de menor duración en comparación con las vacunas celulares DTP y también su impacto en combatir la colonización y la transmisibilidad del patógeno *B. pertussis* pudiera ser comparablemente menor. Por otro lado, las vacunas DTP se basan en células enteras inactivadas por lo que son más reactogénicas y no se recomiendan para dosis de refuerzos de adolescentes, adultos ni madres gestantes.

Problema a resolver Los antígenos protectores presentes en las vacunas comercialmente disponibles difieren de los de las cepas circulantes. Se han observado variaciones principalmente en el componente pertactina. Las vacunas contienen la variante Prn1 mientras que en la mayoría de América y Europa se aíslan solo cepas que expresan Prn2 (Prn) y en otras regiones las cepas Prn2 predominan sobre cepas Prn1. Otro elemento muy importante es que el componente principal en la protección presente en todas las vacunas, la toxina pertussis (PT), es inactivada por métodos químicos que destruyen el 80 % de los epitopos neutralizantes. Se ha planteado que ambos factores pueden influir en la pérdida de la eficacia de las actuales vacunas DTaP principalmente en la fase de declive de la inmunidad.

El presente trabajo, al considerar las insuficiencias de las DTaP anteriormente descritas, se propuso como objetivo el desarrollo de una tecnología para la obtención de antígenos de *B. pertussis* que permita desarrollar formulaciones, de tres componentes, más acordes con el actual escenario epidemiológico,

el cual está caracterizado por la presencia de cepas más virulentas que expresan mayores niveles de toxina pertussis PT y que expresan mayormente el tipo de pertactina Prn2. Para mejorar y actualizar el prototipo de vacuna DTaP disponible, la estrategia se encaminó por una parte hacia la obtención de los antígenos toxina pertussis genéticamente inactivada (PTg), la variante pertactina tipo dos (Prn2) y la hemaglutinina filamentosa (FHA). Para ello se utilizó una nueva cepa recombinante de *B. pertussis* (BPCNIC0311) como productora de antígenos. Por otra parte, se exploró un nuevo concepto en el hospedero de *Escherichia coli* (*E.coli*), cuyo objetivo consistió en obtener una proteína híbrida de la pertactina Prn1 y Prn2. En relación con esto, la hipótesis a comprobar consistió en que las nuevas moléculas al ser combinadas en formulaciones de tres componentes fueran inmunogénicas así como efectivas en conferir protección en el modelo de reto intracraneal modificado al enfrentar la cepa virulenta de referencia BP18323.

2.2. Principales resultados y originalidad científica

Se obtuvo una nueva molécula híbrida de pertactina (PRN) del tipo 1 (Prn1) y tipo 2 (Prn2). Para obtener la variante híbrida PRN se realizó un análisis detallado de la literatura en relación con la proteína pertactina (Prn) y posteriormente se diseñó un modelo de proteína híbrida PRN con el auxilio de diferentes herramientas bioinformáticas. Las proteínas Prn1, Prn2 así como seis variantes híbridas se expresaron en *E. coli* a altos niveles (30 %), fusionadas a un hexapéptido de histidina, para facilitar, posteriormente, su purificación por cromatografía de quelatos metálicos (Níquel-NTA). Las variantes purificadas, cuya pureza resultó >90 %, fueron reconocidas por anticuerpos monoclonales conformacionales así como por sueros de voluntarios vacunados (humanos) reactivados con la vacuna DTaP comercial ADACEL (Sanofi Pasteur). Al ensayarse en ratones, las variantes híbridas PRN1-CL-2 y PRN2-1 resultaron estadísticamente más inmunogénicas ($p < 0,001$, Anova/Tukey) que Prn1, Prn2 y P.69 (Prn1) variante presente en las vacunas comerciales. De igual forma, indujeron entre otros subtipos IgG2a e IgG2b, los cuales juegan un papel crucial en la mediación de la inmunidad celular contra bacterias Gram negativas como lo es *B. pertussis*.

Las diferencias entre Prn1 y Prn2 residen únicamente a la región variable 1 (R1), la cual consiste en repeticiones GGXXP cuyo número varía entre los diferentes tipos de Prn. Se ha reportado que las variaciones en la región R1

afectan la unión a anticuerpos, la eficacia de la vacuna DTP (celular) así como también la eficacia de vacunas acelulares DTaP. En el presente trabajo se pudo comprobar que los sueros generados contra las proteínas híbridas PRN1-CL-2 y PRN2-1 así como la variante Prn2, reconocieron significativamente las regiones variables R1 de Prn1 y R1 de Prn2. Posteriormente, las proteínas PRN2-1, PRN1-CL-2 y Prn2 se evaluaron en el modelo de reto intracerebral modificado (MICA) en ratones OF1. Se ensayaron dos niveles de dosis: Dosis A (25 μ g) y Dosis B (5 μ g). Para las tres proteínas, en los grupos inmunizados con la Dosis A se observaron diferencias estadísticas ($p < 0.01$) respecto al grupo que recibió la preparación placebo. Sin embargo, al ensayarse la Dosis B solo el grupo inmunizado con la proteína PRN2-1 mostró diferencias significativas respecto al grupo placebo ($p < 0,05$), por lo que esta variante híbrida fue seleccionada para ser evaluada posteriormente en combinación con los antígenos PTg y FHA. Los resultados hasta aquí reseñados están publicados en *Biología Aplicada* 2014;31:33-42. Las proteínas PTg, FHA y Prn2 se obtuvieron a partir de una nueva cepa de *B. pertussis* (BPCNIC0311) con un alto nivel de pureza ($>95\%$), característica que pudo evidenciarse por la ausencia de bandas de contaminantes por SDS-PAGE. De igual forma, los niveles detectados de endotoxinas determinados por LAL resultaron inferiores 2 UE para una dosis de que contenga los tres componentes. Se ha informado que las vacunas DTaP contienen menos de 100 UE/Dosis (Brito and Singh 2011). Los rendimientos totales de las proteínas puras fueron similares para las tres proteínas, con valores promedios totales de 5 mg por fermentación de tres litros. Los tres antígenos puros se inmunoidentificaron por los ensayos de western blotting y ELISA de captura con la ayuda de anticuerpos monoclonales específicos para cada proteína. Las proteínas PTg, FHA, Prn2 y PRN2-1 se evaluaron por separado en dos formulaciones de tres componentes: PTg/FHA/Prn2 y PTg/FHA/PRN2-1. En ambas formulaciones los cuatro antígenos resultaron altamente inmunogénicos y se observó la inducción de los subtipos IgG1, IgG2a e IgG2b a niveles similares para cada uno de ellos. De igual forma se pudo comprobar la actividad protectora ($p < 0.001$) de ambas formulaciones a dos niveles diferentes de dosis (Figura 20. . . Info Tec Detallada). Los resultados hasta aquí reseñados están descritos pormenorizadamente en la información técnica detallada y están publicados en *Journal of Infectious Diseases and Therapeutics*, 2015, 3, 8 -20. Así como en la revista *Biología Aplicada* 2015;418-01-15.

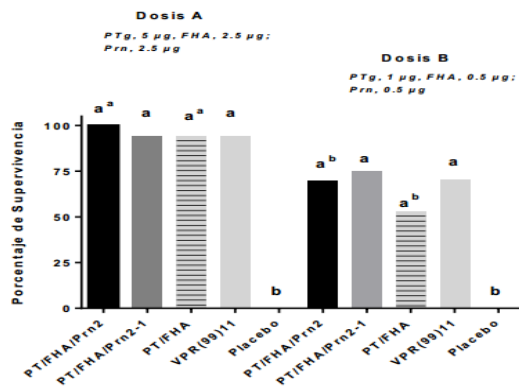


Figura 1: Protección en el modelo de reto intracerebral modificado en ratones OF1.

El eje de las abscisas muestra los inmunógenos inoculados a los diferentes grupos (N=17). Cada inmunógeno se preparó en alúmina con tres niveles de dosis: Dosis A) PTg 5 µg, FHA 2.5 µg y Prn (Prn2 o PRN2-1) 2.5 µg. La Dosis B y C (C no mostrada) son diluciones 1 en 5 y 1 en 25 de la Dosis A respectivamente. VPR(99)11 es una vacuna celular de Referencia. El gráfico muestra el porcentaje de supervivencia observado en el día 14. La significación estadística se evaluó a través de la prueba de Log-rank. Las letras diferentes a y b indican las diferencias significativas ($p < 0,0001$) encontradas entre cada uno de grupos muestrales respecto al grupo placebo para una Dosis A o B dada. Las letras diferentes a y b como superíndices indican diferencias estadísticas al comparar las Dosis A y B para un inmunógeno dado. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

La siguiente tabla muestra las ventajas de las formulaciones experimentales obtenidas en el presente trabajo respecto a las vacunas comerciales de tres componentes.

	Presente trabajo /Propuesta a Premio		DTaP Comercial
	PTg/FHA/Prn2	PTg/FHA/PRN2-1	
Toxina pertussis (PT)	Genéticamente modificada, conserva epitopos protectores y en humanos es más inmunogénica que PTq (Seubert 2014)		Inactivada via química, se afectan el 80% de los epitopos protectores (Poolman 2014) Necesidad emplear dosis 5 veces superiores.
Pertactina (Prn)	Variante Prn2 natural	PRN2-1, molécula recombinante híbrida de Prn1 y Prn2 obtenida en <i>E.coli</i> .	Variante P.69 (Prn1), menos inmunogénica que Prn2 y PRN2-1, este componente se afecta colateralmente por la inactivación química de PT residual en las preparaciones purificadas de P.69 (Prn1).
Hemaglutinina Filamentosa (FHA)	FHA natural		FHA natural, este componente se afecta colateralmente por la inactivación química de PT residual en las preparaciones purificadas de FHA.
Versatilidad	++	+++	+
	Circulación exclusiva de cepas Prn2, por ejemplo EE.UU, Canadá, América Latina y Europa. Al ser Prn2 más inmunogénica que Prn1 puede emplearse con éxito también en regiones donde coexistan ambas cepas.	Puede emplearse en todas las regiones del mundo. Posibilidad de obtener más antígenos por campaña productiva (*). Por tanto, Alta capacidad de producir para territorios de alta demanda.	Menos efectiva, fundamentalmente durante el declive de la inmunidad, ya que Prn2 predomina mundialmente. Se plantea actualmente aumentar las dosis de todos los componentes.
Nivel Inversión	+	++	+
<p>Notas: Los signos +, ++, +++ indican una magnitud arbitraria creciente para la comparación del nivel de versatilidad así como de inversiones.</p> <p>(*) La formulación PTg/FHA/PRN2-1 permite obtener mayor número de dosis por campaña productiva, debido a que PRN2-1 es recombinante y se obtiene en cantidades 10 veces superiores en una planta de producción alternativa, por tanto, la producción de PTg y FHA se concentra en la obtención de Aqs del sobrenadante, lo que permite duplicar la producción de lotes PTg/FHA al no ejecutarse el proceso de producción de Prn natural, a partir de la biomasa celular, en la planta dedicada a pertussis.</p>			

2.3. Conclusión

Los resultados alcanzados convierten a las formulaciones tricomponentes PTg/FHA/PRN2 -1 y PTg/FHA/Prn2 en novedosas combinaciones potencialmente más efectivas y versátiles contra la tosferina, donde la elección de una u otra combinación dependerá del costo de la inversión y volumen de mercado que justifique la inversión, así como de la competencia, demanda y territorios hacia donde se dirija la comercialización de la futura vacuna.

2.4. La novedad científica

Por primera vez se diseña y obtiene una molécula híbrida de pertactina de los tipos Prn1 y Prn2 (PRN2-1) más inmunogénica que las variantes simples Prn1 y Prn2, capaz de inducir supervivencia significativa en ratones en el modelo modificado de reto intracerebral (MICA). De igual forma, por primera vez se obtienen dos preparaciones tricomponentes que combinan las proteínas PTg/FHA/PRN2-1(híbrida) y PTg/FHA/Prn2 (natural). Las mismas

mostraron la capacidad de inducir protección a dos niveles de dosis en el modelo modificado de reto intracerebral (MICA). Ambas combinaciones constituyen opciones vacunales mejoradas y contextualizadas con el actual escenario epidemiológico de la tosferina.

La importancia práctica del presente trabajo radica en la necesidad nacional y mundial de obtener una vacuna acelular contextualizada con el escenario epidemiológico actual de la tosferina, a partir de incorporar el tipo de pertactina que predomina en el mundo (Prn2) ya sea como moléculas híbridas o en la variante natural, así como incorporar el toxoide PTg del cual se ha informado que es más inmunogénico y protector que el toxoide PTq, inactivado químicamente. La incorporación de estos elementos renovaría el prototipo de vacuna acelular comercialmente disponible, el cual se basa en el toxoide pertúsico químicamente inactivado PTq menos efectivo y la variante de pertactina (Prn1) de menor circulación mundial y menos inmunogénica que PRN2-1 o Prn2 en relación a la región variable protectora R1. El presente trabajo establece una tecnología para la obtención de una formulación potencialmente más efectiva contra la tosferina y es además compatible con otros desarrollos enfocados a la incorporación de nuevos antígenos y adyuvantes dirigidos a potenciar la respuesta inmune específica contra *B. pertussis*. El aporte práctico está dado por el impacto científico técnico de una plataforma tecnológica que permite obtener componentes mejorados y purificados de *B. pertussis* para su inclusión en vacunas triples y pentavalentes, para la inmunización de niños menores de un año; así como de embarazadas, adolescentes y adultos, acciones estas encaminadas a reducir la transmisibilidad del patógeno en todas las edades y no recomendables de acometer con vacunas celulares DTP. De igual forma, permitirá mantener los mercados actuales de la industria biotecnológica y farmacéutica cubana, al poder potencialmente sustituir el producto celular DTP por otro acelular DTaP menos reactogénico. Permitiría además acceder a nuevos mercados en países con economías emergentes dispuestas a adquirir un producto de mayor calidad y de similar inocuidad que las vacunas DTaP comerciales.

Nivel de introducción y generalización Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron avalar que las formulaciones desarrolladas son protectoras en el modelo de reto intracerebral modificado (MICA) frente a la cepa de referencia BP18323, ensayo utilizado y recomendado internacionalmente para la evaluación de las vacunas DTaP durante la liberación de los

lotes productivos. Actualmente el proceso productivo para los antígenos PTg, FHA y Prn2 a partir de la cepa BPCNIC0311, se encuentran en la culminación de la fase de Desarrollo Tecnológico a escala de 30 L con vistas a realizar próximamente el escalado a 300 L para la producción de antígenos para Estudios Clínicos en Humanos Fase I como parte de un acuerdo entre instituciones de Vietnam (DAVAC) y Cuba (CIGB/Heber) para el Desarrollo, Producción, Registro y Comercialización de antígenos para Vacunas Acelulares de Pertussis. **Correspondencia con las prioridades establecidas en los lineamientos de la política económica del país y en la VI conferencia del PCC** Tema que da respuesta: Política de Ciencia, Tecnología, Innovación y Medio Ambiente. En particular el lineamiento 131: "Sostener y desarrollar los resultados alcanzados en el campo de la biotecnología, la producción médico-farmacéutica, la industria del software y el proceso de informatización de la sociedad, las ciencias básicas, las ciencias naturales, los estudios y el empleo de las fuentes de energía renovables, las tecnologías sociales y educativas, la transferencia tecnológica industrial, la producción de equipos de tecnología avanzada, la nanotecnología y los servicios científicos y tecnológicos de alto valor agregado".

Referencias

- [1] Andrade, B. G., M. F. Marin, D. D. Cambuy, E. L. Fonseca, N. F. Souza and A. C. Vicente (2014). Complete genome sequence of a clinical *Bordetella pertussis* isolate from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109(7): 972-974.
- [2] Asokanathan, C., M. Corbel and D. Xing (2013). A CpG-containing oligodeoxynucleotide adjuvant for acellular pertussis vaccine improves the protective response against *Bordetella pertussis*. *Hum Vaccin Immunother* 9(2): 325-331.
- [3] Bordet, J. and O. Gengou (1906). "Le microbe de la coqueluche." *Ann Inst Pasteur (Paris)* 20: 731-741.
- [4] Bowden, K. E., M. M. Williams, P. K. Cassidy, A. Milton, L. Pawloski, M. Harrison, S. W. Martin, S. Meyer, X. Qin, C. DeBolt, A. Tasslimi, N. Syed, R. Sorrell, M. Tran, B. Hiatt and M. L. Tondella (2014). "Molecular epidemiology of the pertussis epidemic in Washington State in 2012." *J Clin Microbiol* 52(10): 3549-3557.

- [5] Brennan, M. J., Z. M. Li, J. L. Cowell, M. E. Bisher, A. C. Steven, P. Novotny and C. R. Manclark (1988). Identification of a 69-kilodalton nonfimbrial protein as an agglutinogen of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 56(12): 3189-3195.
- [6] Brito, L. A. and M. Singh (2011). Acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research. *J Pharm Sci* 100(1): 34-37.
- [7] Bruhns, P. (2012). Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* 119(24): 5640-5649.
- [8] Burns, D. L., B. D. Meade and N. E. Messonnier (2014). Pertussis resurgence: perspectives from the Working Group Meeting on pertussis on the causes, possible paths forward, and gaps in our knowledge. *J Infect Dis* 209 Suppl 1: S32-35.
- [9] Carbonetti, N. H. (2010). Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol* 5(3): 455-469.
- [10] Cheong, C., I. Matos, J. H. Choi, D. B. Dandamudi, E. Shrestha, M. P. Longhi, K. L. Jeffrey, R. M. Anthony, C. Kluger, G. Nchinda, H. Koh, A. Rodriguez, J. Idoyaga, M. Pack, K. Velinzon, C. G. Park and R. M. Steinman (2010). Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 143(3): 416-429.
- [11] Cherry, J. D. (2012). Why do pertussis vaccines fail? *Pediatrics* 129(5): 968-970.
- [12] Cherry, J. D., J. Gornbein, U. Heininger and K. Stehr (1998). A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine* 16(20): 1901-1906.
- [13] Cherry, J. D. and U. Heininger (2004). Pertussis and other *Bordetella* infections. In R. D. Feigin, J. D. Cherry, G. J. Demmler, and S. Kaplan (ed.), *Textbook of pediatric infectious diseases*, 5th ed. The W. B. Saunders Co, Philadelphia, Pa.: 1588–1608.

- [14] Cherry, J. D. and C. D. Paddock (2014). "Pathogenesis and histopathology of pertussis: implications for immunization.." *Expert Rev Vaccines* 13(9): 1115-1123.
- [15] Decker, M. D., K. M. Edwards, M. C. Steinhoff, M. B. Rennels, M. E. Pichichero, J. A. Englund, E. L. Anderson, M. A. Deloria and G. F. Reed (1995). Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: adverse reactions." *Pediatrics* 96(3 Pt 2): 557-566.
- [16] Diavatopoulos, D. A., M. Hijnen and F. R. Mooi (2006). Adaptive evolution of the *Bordetella* autotransporter pertactin." *J Evol Biol* 19(6): 1931-1938.
- [17] Edwards, K. M. and D. M. D. (2008). "Pertussis vaccines." *Vaccines* 21(5th ed. Philadelphia: Saunders). Edwards, K. M., B. D. Meade, M. D. Decker, G. F. Reed, M. B. Rennels, M. C. Steinhoff, E. L. Anderson, J. A. Englund, M. E. Pichichero and M. A. Deloria (1995). Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: overview and serologic response." *Pediatrics* 96(3 Pt 2): 548-557.
- [18] Emsley, P., I. G. Charles, N. F. Fairweather and N. W. Isaacs (1996). "Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin." *Nature* 381(6577): 90-92.
- [19] Fedele, G., M. Bianco and C. M. Ausiello (2013). "The virulence factors of *Bordetella pertussis*: talented modulators of host immune response.." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 61(6): 445-457.
- [20] Feunou, P. F., H. Kammoun, A. S. Debie and C. Locht (2014). "Heterologous prime-boost immunization with live attenuated *B. pertussis* BPZE1 followed by acellular pertussis vaccine in mice." *Vaccine* 32(34): 4281-4288.
- [21] Galit, S. R., N. Otsuka, Y. Furuse, D. J. Almonia, L. T. Sombrero, R. Z. Capeding, S. P. Lupisan, M. Saito, H. Oshitani, Y. Hiramatsu, K. Shibayama and K. Kamachi (2015). "Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* in the Philippines in 2012-2014." *Int J Infect Dis* 35: 24-26.
- [22] Garlapati, S., N. F. Eng, T. G. Kiros, J. Kindrachuk, G. K. Mutwiri, R. E. Hancock, S. A. Halperin, A. A. Potter, L. A. Babiuk and V. Gerdt (2011). Immunization with PCEP microparticles containing pertussis toxoid, CpG ODN and a synthetic innate defense regulator peptide induces protective immunity against pertussis." *Vaccine* 29(38): 6540-6548.

- [23] Geurtsen, J., K. C. Fae and G. P. van den Dobbelsteen (2014). Importance of (antibody-dependent) complement-mediated serum killing in protection against *Bordetella pertussis*. *Expert Rev Vaccines* 13(10): 1229-1240.
- [24] Gracia, A., M. Polewicz, S. A. Halperin, R. E. Hancock, A. A. Potter, L. A. Babiuk and V. Gerdtz (2011). Antibody responses in adult and neonatal BALB/c mice to immunization with novel *Bordetella pertussis* vaccine formulations. *Vaccine* 29(8): 1595-1604.
- [25] Guiso, N. (2015). "Molecular Medical Microbiology. Second Edition. Chapter 85. *Bordetella pertussis*." 3: 1507-1527.
- [26] Gustafsson, L., L. Hessel, J. Storsaeter and P. Olin (2006). "Long-term follow-up of Swedish children vaccinated with acellular pertussis vaccines at 3, 5, and 12 months of age indicates the need for a booster dose at 5 to 7 years of age." *Pediatrics* 118(3): 978-984.
- [27] Hara, M., M. Fukuoka, K. Tashiro, I. Ozaki, S. Ohfuji, K. Okada, T. Nakano, W. Fukushima and Y. Hirota (2015). "Pertussis outbreak in university students and evaluation of acellular pertussis vaccine effectiveness in Japan." *BMC Infect Dis* 15(1): 45.
- [28] He, Q., J. Makinen, G. Berbers, F. R. Mooi, M. K. Viljanen, H. Arvilommi and J. Mertsola (2003). "Bordetella pertussis protein pertactin induces type-specific antibodies: one possible explanation for the emergence of antigenic variants?" *J Infect Dis* 187(8): 1200-1205.
- [29] Hellwig, S. M., M. E. Rodriguez, G. A. Berbers, J. G. van de Winkel and F. R. Mooi (2003). Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity. *J Infect Dis* 188(5): 738-742.
- [30] Hijnen, M., R. de Voer, F. R. Mooi, R. Schepp, E. E. Moret, P. van Gageldonk, G. Smits and G. A. Berbers (2007). "The role of peptide loops of the *Bordetella pertussis* protein P.69 pertactin in antibody recognition." *Vaccine* 25(31): 5902-5914.
- [31] Hijnen, M., Q. He, R. Schepp, P. Van Gageldonk, J. Mertsola, F. R. Mooi and G. A. Berbers (2008). Antibody responses to defined regions of the *Bordetella pertussis* virulence factor pertactin. *Scand J Infect Dis* 40(2): 94-104.

- [32] Hijnen, M., F. R. Mooi, P. G. van Gageldonk, P. Hoogerhout, A. J. King and G. A. Berbers (2004). "Epitope structure of the Bordetella pertussis protein P.69 pertactin, a major vaccine component and protective antigen." *Infect Immun* 72(7): 3716-3723.
- [33] Hijnen, M., P. G. van Gageldonk, G. A. Berbers, T. van Woerkom and F. R. Mooi (2005). "The Bordetella pertussis virulence factor P.69 pertactin retains its immunological properties after overproduction in Escherichia coli." *Protein Expr Purif* 41(1): 106-112.
- [34] Imai, Y., Y. Matsushima, T. Sugimura and M. Terada (1991). "A simple and rapid method for generating a deletion by PCR." *Nucleic Acids Res* 19(10): 2785.
- [35] Jefferson, T., M. Rudin and C. DiPietrantonj (2003). "Systematic review of the effects of pertussis vaccines in children." *Vaccine* 21(17-18): 2003-2014.
- [36] Kallonen, T., K. Grondahl-Yli-Hannuksela, A. Elomaa, A. Lutynska, N. K. Fry, J. Mertsola and Q. He (2011). "Differences in the genomic content of Bordetella pertussis isolates before and after introduction of pertussis vaccines in four European countries." *Infect Genet Evol* 11(8): 2034-2042.
- [37] Kallonen, T. and Q. He (2009). "Bordetella pertussis strain variation and evolution postvaccination." *Expert Rev Vaccines* 8(7): 863-875.
- [38] Kendrick, P. L., G. Eldering, M. K. Dixon and J. Misner (1947). "Mouse Protection Tests in the Study of Pertussis Vaccine: A Comparative Series Using the Intracerebral Route for Challenge." *Am J Public Health Nations Health* 37(7): 803-810.
- [39] Kimura, M. and N. Hikino (1985). "Results with a new DTP vaccine in Japan." *Dev Biol Stand* 61: 545-561.
- [40] King, A. J., G. Berbers, H. F. van Oirschot, P. Hoogerhout, K. Knipping and F. R. Mooi (2001). "Role of the polymorphic region 1 of the Bordetella pertussis protein pertactin in immunity." *Microbiology* 147(Pt 11): 2885-2895.
- [41] Komatsu, E., F. Yamaguchi, A. Abe, A. A. Weiss and M. Watanabe (2010). "Synergic effect of genotype changes in pertussis toxin and pertactin on

adaptation to an acellular pertussis vaccine in the murine intranasal challenge model. *Clin Vaccine Immunol* 17(5): 807-812.

- [42] MacArthur, M. W. and J. M. Thornton (1991). Influence of proline residues on protein conformation. *J Mol Biol* 218(2): 397-412.
- [43] Martin, S. W., L. Pawloski, M. Williams, K. Weening, C. DeBolt, X. Qin, L. Reynolds, C. Kenyon, G. Giambrone, K. Kudish, L. Miller, D. Selvage, A. Lee, T. H. Skoff, H. Kamiya, P. K. Cassidy, M. L. Tondella and T. A. Clark (2015). "Pertactin-Negative *Bordetella pertussis* Strains: Evidence for a Possible Selective Advantage. *Clin Infect Dis* 60(2): 223-227.
- [44] Mattoo, S. and J. D. Cherry (2005). "Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* 18(2): 326-382.
- [45] McCormick, C. M. and J. S. Czachor (2013). "Pertussis infections and vaccinations in Bolivia, Brazil and Mexico from 1980 to 2009." *Travel Med Infect Dis* 11(3): 146-151.
- [46] Michaelsen, T. E., J. Kolberg, A. Aase, T. K. Herstad and E. A. Hoiby (2004). "The four mouse IgG isotypes differ extensively in bactericidal and opsonophagocytic activity when reacting with the P1.16 epitope on the outer membrane PorA protein of *Neisseria meningitidis*." *Scand J Immunol* 59(1): 34-39.
- [47] Monack, D., J. J. Munoz, M. G. Peacock, W. J. Black and S. Falkow (1989). "Expression of pertussis toxin correlates with pathogenesis in *Bordetella* species." *J Infect Dis* 159(2): 205-210.
- [48] Mooi, F. R. (2010). "Bordetella pertussis and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol* 10(1): 36-49.
- [49] Mooi, F. R., Q. He, H. van Oirschot and J. Mertsola (1999). "Variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertussis toxin and pertactin in vaccine strains and clinical isolates in Finland. *Infect Immun* 67(6): 3133-3134.

- [50] Mooi, F. R., N. A. Van Der Maas and H. E. De Melker (2014). "Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin..*Epidemiol Infect* 142(4): 685-694.
- [51] Mooi, F. R., I. H. van Loo, M. van Gent, Q. He, M. J. Bart, K. J. Heuvelman, S. C. de Greeff, D. Diavatopoulos, P. Teunis, N. Nagelkerke and J. Mertsola (2009). "Bordetella pertussis strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence..*Emerg Infect Dis* 15(8): 1206-1213.
- [52] Mosiej, E., M. Zawadka, K. Krysztopa-Grzybowska, M. Polak, E. Augustynowicz, K. Piekarska and A. Lutynska (2015). "Sequence variation in virulence-related genes of Bordetella pertussis isolates from Poland in the period 1959-2013..*Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34(1): 147-152.
- [53] Nencioni, L., M. Pizza, M. Bugnoli, T. De Magistris, A. Di Tommaso, F. Giovannoni, R. Manetti, I. Marsili, G. Matteucci, D. Nucci and et al. (1990). Characterization of genetically inactivated pertussis toxin mutants: candidates for a new vaccine against whooping cough..*Infect Immun* 58(5): 1308-1315.
- [54] Nencioni, L., G. Volpini, S. Peppoloni, M. Bugnoli, T. De Magistris, I. Marsili and R. Rappuoli (1991). "Properties of pertussis toxin mutant PT-9K/129G after formaldehyde treatment..*Infect Immun* 59(2): 625-630.
- [55] Octavia, S., V. Sintchenko, G. L. Gilbert, A. Lawrence, A. D. Keil, G. Hogg and R. Lan (2012). "Newly emerging clones of Bordetella pertussis carrying prn2 and ptxP3 alleles implicated in Australian pertussis epidemic in 2008-2010..*J Infect Dis* 205(8): 1220-1224.
- [56] Olin, P., L. Gustafsson, L. Barreto, L. Hessel, T. C. Mast, A. V. Rie, H. Bogaerts and J. Storsaeter (2003). "Declining pertussis incidence in Sweden following the introduction of acellular pertussis vaccine..*Vaccine* 21(17-18): 2015-2021.
- [57] Oliver, D. C., G. Huang, E. Nodel, S. Pleasance and R. C. Fernandez (2003). "A conserved region within the Bordetella pertussis autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain..*Mol Microbiol* 47(5): 1367-1383.

- [58] Ozcengiz, E., K. Kilinc, O. Buyuktanir and A. Gunalp (2004). Rapid purification of pertussis toxin (PT) and filamentous hemagglutinin (FHA) by cation-exchange chromatography."Vaccine 22(11-12): 1570-1575. Pittman, M. (1984). "The concept of pertussis as a toxin-mediated disease."Pediatr Infect Dis 3(5): 467-486.
- [59] Plotkin, S. A. (2014). "The pertussis problem."Clin Infect Dis 58(6): 830-833. Polak, M., M. Zawadka, E. Mosiej, D. Rabczenko, E. Augustynowicz, N. Guiso and A. Lutynska (2014). Colonization of Bordetella pertussis Clinical Isolates that Differ by Pulsed Field Gel Electrophoresis Types in the Lungs of Naive Mice or Mice Immunized with the Whole-Cell Pertussis Vaccine Used in Poland..Arch Immunol Ther Exp (Warsz). Polak, M., M. Zawadka, E. Mosiej, D. Rabczenko, E. Augustynowicz and A. Lutynska (2014). Effectiveness of experimental whole-cell pertussis vaccines in murine model."Med Dosw Mikrobiol 66(2): 79-87.
- [60] Poolman, J. T. (2014). "Shortcomings of pertussis vaccines: why we need a third generation vaccine.."Expert Rev Vaccines 13(10): 1159-1162.
- [61] Poolman, J. T. and H. O. Hallander (2007). Acellular pertussis vaccines and the role of pertactin and fimbriae.."Expert Rev Vaccines 6(1): 47-56.
- [62] Quinlan, T., K. A. Musser, S. A. Currenti, S. M. Zansky and T. A. Halse (2014). "Pertactin-negative variants of Bordetella pertussis in New York State: a retrospective analysis, 2004-2013."Mol Cell Probes 28(4): 138-140.
- [63] Redd, S. C., H. S. Rumschlag, R. J. Biellik, G. N. Sanden, C. B. Reimer and M. L. Cohen (1988). Immunoblot analysis of humoral immune responses following infection with Bordetella pertussis or immunization with diphtheria-tetanus-pertussis vaccine."J Clin Microbiol 26(7): 1373-1377.
- [64] Rodriguez, M. E., A. L. Samo, D. F. Hozbor and O. M. Yantorno (1993). Effect of hydromechanical forces on the production of filamentous haemagglutinin and pertussis toxin of Bordetella pertussis."J Ind Microbiol 12(2): 103-108.
- [65] Roush, S. W. and T. V. Murphy (2007). "Historical comparisons of morbidity and mortality for vaccinepreventable diseases in the United States."Jama 298(18): 2155-2163.

- [66] Ryan, M., L. McCarthy, R. Rappuoli, B. P. Mahon and K. H. Mills (1998). "Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28." *Int Immunol* 10(5): 651-662.
- [67] Ryan, M. S., F. Griffin, B. Mahon and K. H. Mills (1997). "The role of the S-1 and B-oligomer components of pertussis toxin in its adjuvant properties for Th1 and Th2 cells." *Biochem Soc Trans* 25(1): 126s.
- [68] Salem, M., Y. Mauguen and T. Prange (2010). Revisiting glutaraldehyde cross-linking: the case of the Arg-Lys intermolecular doublet. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 66(Pt 3): 225-228.
- [69] Sato, Y., M. Kimura and H. Fukumi (1984). "Development of a pertussis component vaccine in Japan." *Lancet* 1(8369): 122-126.
- [70] Seubert, A., U. D'Oro, M. Scarselli and M. Pizza (2014). "Genetically detoxified pertussis toxin (PT-9K/129G): implications for immunization and vaccines." *Expert Rev Vaccines* 13(10): 1191-1204.
- [71] Shuel, M., F. B. Jamieson, P. Tang, S. Brown, D. Farrell, I. Martin, J. Stoltz and R. S. Tsang (2013). "Genetic analysis of *Bordetella pertussis* in Ontario, Canada reveals one predominant clone." *Int J Infect Dis* 17(6): e413-417.
- [72] Skelton, S. K. and K. H. Wong (1990). "Simple, efficient purification of filamentous hemagglutinin and pertussis toxin from *Bordetella pertussis* by hydrophobic and affinity interaction." *J Clin Microbiol* 28(5): 1062-1065.
- [73] Skerry, C. M. and B. P. Mahon (2011). "A live, attenuated *Bordetella pertussis* vaccine provides longterm protection against virulent challenge in a murine model." *Clin Vaccine Immunol* 18(2): 187-193.
- [74] Stainer, D. W. and M. J. Scholte (1970). "A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*." *J Gen Microbiol* 63(2): 211-220.
- [75] Stenger, R. M., M. C. Poelen, E. E. Moret, B. Kuipers, S. C. Bruijns, P. Hoogerhout, M. Hijnen, A. J. King, F. R. Mooi, C. J. Boog and C. A. van Els (2009). "Immunodominance in mouse and human CD4+ T-cell responses

specific for the *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Infect Immun* 77(2): 896-903.

- [76] Thalen, M., I. J. van den, W. Jiskoot, B. Zomer, P. Roholl, C. de Gooijer, C. Beuvery and J. Tramper (1999). Rational medium design for *Bordetella pertussis*: basic metabolism. *J Biotechnol* 75(2-3): 147-159.
- [77] Thalen, M., A. van der Ark, J. van den Ijssel, I. van Straaten, D. Jansen, C. Beuvery, D. Martens and J. Tramper (2008). Improving the cellular pertussis vaccine: increased potency and consistency. *Vaccine* 26(5): 653-663.
- [78] Thalen, M., M. Venema, I. J. van den, L. Berwald, C. Beuvery, D. Martens and J. Tramper (2006). Effect of relevant culture parameters on Pertussis Toxin expression by *Bordetella pertussis*. *Biologicals* 34(3): 213-220.
- [79] Thomas, M. G., K. Redhead and H. P. Lambert (1989). "Human serum antibody responses to *Bordetella pertussis* infection and pertussis vaccination." *J Infect Dis* 159(2): 211-218.
- [80] Tsang, R. S., M. Shuel, F. B. Jamieson, S. Drews, L. Hoang, G. Horsman, B. Lefebvre, S. Desai and M. StLaurent (2014). "Pertactin-negative *Bordetella pertussis* strains in Canada: characterization of a dozen isolates based on a survey of 224 samples collected in different parts of the country over the last 20 years." *J Korean Med Sci* 28: 65-69.
- [81] van Gent, M., C. J. Heuvelman, H. G. van der Heide, H. O. Hallander, A. Advani, N. Guiso, C. H. Wirsing von Konig, D. F. Vestrheim, T. Dalby, N. K. Fry, D. Pierard, L. Detemmerman, J. Zavadilova, K. Fabianova, C. Logan, A. Habington, M. Byrne, A. Lutynska, E. Mosiej, C. Pelaz, K. Grondahl-Yli-Hannuksela, A. M. Barkoff, J. Mertsola, A. Economopoulou, Q. He and F. R. Mooi (2015). Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998-2012. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34(4): 821-830.
- [82] van Gent, M., I. H. van Loo, K. J. Heuvelman, A. J. de Neeling, P. Teunis and F. R. Mooi (2011). "Studies on Prn variation in the mouse model and comparison with epidemiological data." *PLoS One* 6(3): e18014. Warfel, J. M. and T. J. Merkel (2014). "The baboon model of pertussis: effective use and lessons for pertussis vaccines." *Expert Rev Vaccines* 13(10): 1241-1252.

- [83] Warfel, J. M., L. I. Zimmerman and T. J. Merkel (2014). "Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(2): 787-792.
- [84] Watanabe, M., E. Komatsu, K. Abe, S. Iyama, T. Sato and M. Nagai (2002). "Efficacy of pertussis components in an acellular vaccine, as assessed in a murine model of respiratory infection and a murine intracerebral challenge model." *Vaccine* 20(9-10): 1429-1434.
- [85] WHO (2015). "Pertussis vaccines: WHO position paper - September 2015." *Wkly Epidemiol Rec* 90(35): 433-458.
- [86] Wolff, G., M. Bell, J. Escobar and S. Ruiz (2015). "Estimates of pertussis vaccine effectiveness in United States air force pediatric dependents." *Vaccine*. Xing, D., C. Asokanathan, Y. H. Xu, B. Bolgiano, A. Douglas-Bardsley, S. Zhang, J. Wang and M. Corbel (2014). "Relationship of immunogenicity to protective potency in acellular pertussis vaccines." *Hum Vaccin Immunother* 10(7): 2066-2073.
- [87] Xing, D., R. Gaines Das, A. Douglas-Bardsley, C. Asokanathan and M. Corbel (2014). "An international collaborative study of the effect of active pertussis toxin on the modified Kendrick test for acellular pertussis vaccines." *Biologicals* 42(2): 101-108.
- [88] Xu, Y., Y. Wang, Y. Tan, H. Zhang, L. Wu, L. Wang, Q. Hou and S. Zhang (2009). "Production and characterization of recombinant pertactin, fimbriae 2 and fimbriae 3 from *Bordetella pertussis*." *BMC Microbiol* 9: 274.
- [89] Zhang, L., S. O. Prietsch, I. Axelsson and S. A. Halperin (2014). "Acellular vaccines for preventing whooping cough in children." *Cochrane Database Syst Rev* 9: Cd001478.
- [90] Zhang, L., Y. Xu, J. Zhao, T. Kallonen, S. Cui, Y. Xu, Q. Hou, F. Li, J. Wang, Q. He and S. Zhang (2010). "Effect of vaccination on *Bordetella pertussis* strains, China." *Emerg Infect Dis* 16(11): 1695-1701.
- [91] Zhang, Y. (2009). "I-TASSER: fully automated protein structure prediction in CASP8." *Proteins* 77 Suppl 9: 100-113