MILENA APETITO AKAMATSU

**“DESENVOLVIMENTO DA PRODUÇÃO INDUSTRIAL
DE UMA NOVA VACINA PERTUSSIS DE CÉLULAS
INTEIRAS COM BAIXA REATOGENICIDADE”**

Tese apresentada ao Programa
Interunidades em Biotecnologia da
Universidade de São Paulo, Instituto
Butantan e Instituto de Pesquisas
Tecnológicas para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia

São Paulo
2018

MILENA APETITO AKAMATSU

**“DESENVOLVIMENTO DA PRODUÇÃO INDUSTRIAL
DE UMA NOVA VACINA PERTUSSIS DE CÉLULAS
INTEIRAS COM BAIXA REATOGENICIDADE”**

Tese apresentada ao Programa Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Paulo Lee Ho

Versão PARCIAL corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Akamatsu, Milena Apetito

Desenvolvimento da produção industrial de uma
nova vacina pertussis de células inteiras com baixa
reatogenicidade / Milena Apetito Akamatsu;
orientador Paulo Lee Ho. -- São Paulo, 2018.
149 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Vacina Pertussis celular. 2. Genoma. 3.
Desenvolvimento industrial. 4. Coqueluche. 5.
Bordetella pertussis. I. Ho, Paulo Lee, orientador.
II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Folha de Aprovação da Banca

Candidato: Milena Apetito Akamatsu

Título: Desenvolvimento da produção industrial de uma nova Vacina Pertussis de células inteiras com baixa reatogenicidade.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Lee Ho

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em ____ / ____ / _____, considerou

()Aprovada ()Reprovada

Examinador(a) : Assinatura:

Nome

Instituição:

Examinador(a) : Assinatura:

Nome

Instituição:

Examinador(a) : Assinatura:

Nome

Instituição:

Examinador(a) : Assinatura:

Nome

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome

Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da potencia da vacina celular *pertussis low* após escalonamento", protocolo nº 1288/14, sob a responsabilidade de Paulo Lee Ho - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 18/6/2014.

This is to certify that the proposal "Evaluation of the potency of whole cell *pertussis low* vaccine after scale-up", protocol nº 1288/14, under the responsibility of Paulo Lee Ho - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 6/18/2014. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto: 07/2014 - 07/2015 Divisão de Desenvolvimento Industrial e Produção	Nº de animais/espécie 230 Camundongos Swiss 14-16g (Ambos)
--	---

São Paulo, 20 de junho de 2014

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da potência da vacina celular pertussis low após escalonamento", **protocolo nº 1288/14**, sob a responsabilidade de Paulo Lee Ho - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 15/10/2014.

This is to certify that the proposal "Evaluation of the potency of whole cell pertussis low vaccine after scale-up", **protocol nº 1288/14**, under the responsibility of Paulo Lee Ho - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 10/15/2014. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto: 07/2014 - 07/2015	Nº de animais/espécie	Observação
Divisão de Desenvolvimento Industrial e Produção	50 Camundongos Swiss 14-16g (Ambos)	Aditivo de animais

São Paulo, 17 de outubro de 2014

Dra. Wafa H. K. Cabrera
Coordenadora da CEUAIB

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIB)
INSTITUTO BUTANTAN

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da potencia da vacina celular pertussis low após escalonamento", **protocolo nº 1288/14**, sob a responsabilidade de Paulo Lee Ho - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 13/5/2015.

This is to certify that the proposal "Evaluation of the potency of whole cell pertussis low vaccine after scale-up", **protocol nº 1288/14**, under the responsibility of Paulo Lee Ho - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 5/13/2015. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie	Observação
07/2014 - 07/2016 Divisão de Desenvolvimento Industrial e Produção	Sem adição de animais	Prorrogação de vigência

São Paulo, 14 de maio de 2015

Dr. José Ricardo Jensen
Coordenador da CEUAIB

Dedico este trabalho aos meus pais,

Edna e Jorge, que me fizeram acreditar que tudo é possível e

dedicaram suas vidas na minha formação. Ainda pela paciência da minha mãe que me deixava aos 3 anos ficar o dia todo no jardim fazendo muita sujeira e simplesmente explicava a ela que estava fazendo “pesquisas”. Com muita atenção, ela ouvia as minhas observações e uma delas era sobre os mundos menores dentro dos mundos maiores e que assim como nós, que estávamos observando a formiga, deveria existir outros mundos menores que a formiga enxergava e assim por diante. Com muita paciência ela me falava que quando eu crescesse e fosse para a universidade, poderia escrever e defender essa teoria. Hoje isso tudo faz sentido e sem o incentivo dos meus pais esse trabalho não seria possível e eu nem ao menos existiria.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor **Paulo Lee Ho**, agradeço pela confiança, paciência, por todos os ensinamentos e conhecimentos compartilhados. Como costuma citar em suas apresentações: “O professor mediano apenas passa a matéria. O bom professor explica. O professor superior demonstra. O grande professor inspira.... E são esses que temos que procurar!”. Eu encontrei, e sou muito grata por ser sua aluna.

Ao professor **Isaias Raw**, agradeço pelas ideias, conversas e preocupações com este trabalho e fico muito grata por poder conviver e trocar ideias com uma pessoa de mente brilhante. Sem o professor Isaías este trabalho não teria existido.

À pesquisadora e amiga **Maria Aparecida Sakauchi** pelo incentivo, apoio nas etapas difíceis e contribuições para a realização deste trabalho. Agradeço também pela confiança em “passar seu bastão” para mim, além dos bons momentos que compartilhamos fora do ambiente de trabalho.

Aos Drs. e amigos **Milton Nishiyama, Eneas de Carvalho** e ao Dr. **João Paulo Kitajima Jr** pelas valiosas contribuições na montagem do genoma e à equipe do LETA, **Inácio Junqueira de Azevedo, Ursula e Mariana Morone**, pelo sequenciamento de DNA na plataforma Illumina.

À Dra. **Maria Leonor Sarno de Oliveira** pelos ensaios de imunização, manejo dos camundongos e pelo ensaio de desafio de colonização intranasal. E à pesquisadora Dra. **Cecília Abe** pelas imagens de microscopia eletrônica de transmissão da bactéria.

Aos colegas da Seção de Vacinas Aeróbicas **Bianca, Vitor, Chica, Miréia, Marisa, Tércio, Luciana, Adérito, Aleandro, Carla e Katia** agradeço por toda ajuda durante os processos industriais, pelos preparos de meios de cultura e soluções, preparo e esterilização de materiais, preparo, sanitização esterilização e limpeza dos tanques e da organização da área de fermentação do pertussis.

À amiga Dra. **Flávia Kubrusly** pelo incentivo e leitura crítica deste trabalho. E ainda pelo incentivo agradeço as pesquisadoras e amigas **Ivone Yamaguchi e Célia Takata** e também pelos momentos de descontração e do saudoso chá da tarde.

À Banca de qualificação formada pelo Dr. **Adalberto Pessoa Jr**, Dra. **Elizabeth Angélica Leme Martins** e Dr. **Marco Antônio Stephano** pelos comentários e sugestões para esta tese.

À minha orientadora de iniciação científica e amiga **Cleusa M. Mantonvanello** e ao meu orientador de mestrado e amigo **Ricardo Harakava** por me darem as bases científicas necessárias para meu crescimento profissional. E as pesquisadoras e amigas do I. Biológico **Alice Ikuno** e **Sylvia Dias** por sempre me incentivarem, agradeço muito, sempre.

Agradeço aos meus pais **Edna** e **Jorge** que me deram os primeiros ensinamentos na vida e ainda quando criança me apresentaram para a microbiologia, me pedindo para lavar bem as mãos pois estavam sujas com milhares de “bichinhos invisíveis”, e que quando eu fosse para escola poderia vê-los.... isso era tão incrível de se imaginar ... e despertou minha curiosidade

Ao meu irmão **Rodney Apetito Akamatsu**, simplesmente por existir em minha vida e tornar minha jornada mais leve e alegre. Aos irmãos de coração **Cauê, Allan, Márcio, Marcelo, Josi** e **Yumi**, agradeço pelos momentos de descontração, importantes para tomar “um folego” e continuar. Ao quarteto **Chloe, Cléo, Sunday** e **Suri** por estarem sempre ao meu lado.

Ao importante apoio financeiro da **Fundação Butantan, BNDES** (nº 11.2.0322.1) e **FAPESP** (nº 2012/10642-7), sem os quais esse trabalho não seria possível.

Por último, mas não menos importante agradeço aos **animais sacrificados** para este estudo, que doaram suas vidas para o conhecimento científico; todo o nosso respeito é o mínimo para com estes seres-vivos que não tiveram outra opção e para os quais este agradecimento não fará diferença, servindo apenas para aliviar a culpa do ser humano.

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar,
divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha
mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade
continua misterioso diante de meus olhos”.*

(Isaac Newton)

RESUMO

AKAMATSU, MA. **Desenvolvimento da produção industrial de uma nova Vacina Pertussis de células inteiras com baixa reatogenicidade**. 2018 149f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A coqueluche é uma doença respiratória contagiosa, causada pela bactéria *Bordetella pertussis*. Tendo um significativo impacto epidemiológico, esta doença sofreu uma expressiva redução após o uso disseminado de vacinas pertussis. Efeitos adversos na imunização com a Vacina de células inteiras – *Whole cell pertussis* (wP), atribuídos a presença de lipopolissacarídeos (LPS), levou ao desenvolvimento da Vacina pertussis acelular (aP). Contudo, a imunização com aP não tem demonstrada a mesma eficiência que a imunização com wP. Diante desse cenário o objetivo deste trabalho é desenvolver o processo de produção industrial de uma nova Vacina Pertussis de células inteiras com reduzida quantidade de LPS e baixa reatogenicidade, a Vacina Pertussis Low (wP_{low}). Para alcançar o objetivo, foram produzidos em escala industrial 25 lotes de cultivos inativados, concentrados e submetidos à extração de LPS com solvente orgânico. Para extração de LPS foram avaliadas 4 diferentes metodologias: filtração de fluxo tangencial (TFF); filtração de fluxo tangencial com lavagem com solução com solvente orgânico (TFFSW); centrifuga tubular (CT); centrifugação de fluxo contínuo de pratos (CFC). A wP_{low} produzida em centrifuga de bancada e a wP foram usadas para comparação. O processo de bancada resultou na redução de LPS (método Purpald) em média de 75% do conteúdo de LPS e a redução de 81% da atividade endotóxica (dosagem de LAL). Nos processos industriais, por TFF houve a redução de $\cong 21\%$ do conteúdo de LPS, porém com aumento de $\cong 52\%$ da atividade endotóxica; por TFFSW houve a redução de $\cong 46\%$ do conteúdo de LPS e uma redução endotóxica média de $\cong 24\%$; por CT ocorreu a redução de $\cong 66\%$ do conteúdo de LPS e de $\cong 73\%$ da atividade endotóxica; com a CFC houve a redução de $\cong 92\%$ do conteúdo de LPS e de $\cong 61\%$ da atividade endotóxica. Os rendimentos de processo foram $\cong 83\%$, 61% , 37% e 63% respectivamente para os processos de TFF, TFFSW, CT e CFC. Através de microscopia eletrônica, foi possível visualizar a integridade celular após o

processamento por CFC, e o principal antígeno vacinal, a toxina pertussis foi detectada na preparação, por western-blot. Quanto à imunogenicidade, anticorpos IgG anti-pertussis foram detectados por ELISA e resultados preliminares não mostraram diferença significativa de redução de colonização pulmonar de *B. pertussis* em camundongos imunizados com a wPlow ou wP. Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que os processos de TFF e TFFSW não foram eficientes na remoção da atividade endotóxica da wPlow, embora tenha ocorrido a redução do LPS. Com relação aos processos utilizando centrífugas industriais, eficientes tanto na remoção do LPS e na redução da atividade endotóxica, houve, contudo, um baixo rendimento no processo com CT. A wPlow produzida por CFC foi imunogênica, indicando a eficácia potencial desta vacina e que a produção em escala industrial é um processo viável. Como parte deste trabalho, a cepa vacinal de *Bordetella pertussis* foi também caracterizada pelo seu sequenciamento genômico completo (genbank – número CP010323).

Palavras-chave: Vacina pertussis celular, LPS, Genoma, *Bordetella pertussis*.

ABSTRACT

AKAMATSU, Milena Apetito. **Industrial production development of a new whole cell Pertussis Vaccine with low reatogenicity.** 2018 149p. Ph.D. Thesis (Biotechnology) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Whooping cough is a contagious respiratory disease caused by *Bordetella pertussis*. In the past this infection had a high epidemiological impact, only reduced after the use of pertussis vaccine. The association of adverse events in immunization with whole cell Pertussis vaccine (wP), attributed to the presence of lipopolysaccharides (LPS), has led to the development of acellular Pertussis vaccine (aP). However, it is known that immunization with aP does not have the same efficiency as compared to immunization with wP vaccine. In this scenario, the objective of this work is to develop the industrial production process of a new whole cell pertussis vaccine with reduced amount of LPS and low reatogenicity, the whole cell Pertussis low vaccine (wP_{low}). To achieve this aim, we produced 25 lots of inactivated and concentrated cultures prepared on an industrial scale and subjected to LPS extraction with organic solvent. We evaluated four industrial processes to extract the LPS from the cells: tangential flow filtration (TFF), TFF with organic solvent washing (TFFSW), tubular centrifugation (CT) and continuous flow centrifugation (CFC). These methodologies were compared with wP_{low} produced at bench scale obtained by centrifugation and with traditional wP. The bench process resulted in the reduction of 75% of LPS content (Purpald method) and 81% reduction in endotoxic activity (LAL dosage) on average. In the industrial processes, TFF reduced $\cong 21\%$ in LPS content, but with a $\cong 52\%$ increase in endotoxic activity; by TFFSW there was a reduction of $\cong 46\%$ of the LPS content and an average reduction of endotoxic activity of $\cong 24\%$; CT reduced $\cong 66\%$ of LPS content and $\cong 73\%$ of endotoxic activity; with CFC there was a reduction of $\cong 92\%$ in LPS content and $\cong 61\%$ in endotoxic activity. The process yields were $\cong 83\%$, 61% , 37% and 63% respectively for the TFF, TFFSW, CT and CFC processes. Through electron microscopy, it was possible to visualize cell integrity after CFC processing, and the major vaccine antigen, pertussis toxin, was detected in the preparation by western blot.

As for immunogenicity, anti-pertussis IgG antibodies were detected by ELISA and preliminary results showed no differences in the *B. pertussis* colonization of lungs in mice immunized with wPlow or wP. We can conclude that the TFF and TFFSW processes were not efficient in removing the endotoxic activity of wPlow, although LPS reduction occurred. Although the processes using industrial centrifuges were efficacious in the removal of LPS and in the reduction of endotoxic activity, there was a low yield in the CT process. The wPlow produced by CFC was immunogenic indicating its potential as a vaccine and that this industrial scale production is a viable process. The characterization of the vaccine strain of *Bordetella pertussis* by complete genome sequencing was also presented here as part of this work (genbank - number CP010323).

Keywords: Whole cell pertussis vaccine, LPS, Genome, *Bordetella pertussis*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Coqueluche e seu agente causador: a bactéria *Bordetella pertussis*

A coqueluche (também conhecida como tosse comprida ou simplesmente como pertussis) é uma doença infecciosa aguda, altamente contagiosa, que atinge o trato respiratório humano. Relatos históricos do século XV descrevem quadros clínicos de coqueluche, embora, o agente etiológico tenha sido descoberto em 1906 por Bordet e Gengou (Bordet e Gengou, 1906; Souder e Long, 2015).

Dentre as atuais nove espécies descritas para o gênero *Bordetella*, somente cinco espécies (*B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. holmesii* e *B. hinzii*) são capazes de infectar ou foram detectadas em seres humanos, sendo que três destas espécies (*B. pertussis*, a linhagem *B. parapertussis* HU e *B. holmesii*) parecem ter os humanos como únicos hospedeiros possíveis (Parton, 1999; Guiso, 2009; Gross *et al.*, 2010; Mooi, 2010). Em termos epidemiológicos, as principais causadoras de infecção respiratória em humanos são as espécies *B. pertussis* e *B. parapertussis*, responsáveis por aproximadamente 95% e 5% dos casos, respectivamente (Heininger *et al.*, 1994), motivo pelo qual a *B. pertussis* é a bactéria de grande importância em saúde pública humana e a mais estudada deste gênero bacteriano.

A *B. pertussis* é um cocobacilo, gram-negativo, imóvel, estritamente aeróbica e fastidiosa, extremamente lábil e incapaz de sobreviver fora do organismo hospedeiro, de maneira que evoluiu para possuir uma alta capacidade de transmissão entre hospedeiros (Guiso, 2009; Hong, 2010; Atkinson *et al.*, 2011). A bactéria adere especificamente aos cílios do trato respiratório superior, colonizando este tecido, liberando diversas toxinas que causam danos locais e sistêmicos. Localmente, a ação das toxinas provoca lesões nas células ciliadas responsáveis pela remoção de substâncias estranhas que invadem o trato respiratório e assim, a tosse se torna a única forma de remoção dessas substâncias.

A principal característica da doença é a tosse paroxística, que pode ser agravada por episódios de vômito e perda de consciência, podendo ser fatal em bebês

com poucos meses de vida. Esta tosse pode durar semanas após o controle da infecção. Entre as manifestações sistêmicas estão leucocitose, alterações na secreção de insulina, alterações neurológicas, desidratação, febre, anorexia e letargia (Cherry, 1997b; Hong, 2010).

1.2 Fatores de virulência: ação e função

A *Bordetella pertussis* causa a doença mediada por diversos fatores de virulência, que contribuem para o quadro geral da doença, incluindo a toxina pertussis (PT), responsável por efeitos sistêmicos; as fímbrias (Fim), a hemaglutinina filamentosa (Fha) e a pertactina (Prn), com papéis na adesão da bactéria ao epitélio respiratório; as toxinas citotoxina traqueal (Ct) e adenilato ciclase (Cya) com efeitos citotóxicos e o lipopolissacarídeo (LPS) presente na superfície celular, que induz reações inflamatórias (Hewlett *et al.*, 2014).

Tipicamente os fatores de virulência são divididos em duas grandes categorias, as toxinas e as adesinas (Locht, 1999). **Adesinas** são proteínas de superfície que aderem nas células epiteliais das vias respiratórias e permite a fixação da bactéria no trato respiratório, mesmo com os movimentos expulsatórios dos cílios das vias respiratórias (De Gouw *et al.*, 2011). **Toxinas** são proteínas secretadas com ação tóxica que são requeridas para colonização e persistência no hospedeiro. Os fatores de virulência sofrem regulação ao nível transcricional em resposta a fatores ambientais e além disso, muitos desses fatores de virulência têm propriedades de imuno-evasão e imunoestimulatória (Mattoo e Cherry, 2005; Cummings *et al.*, 2006).

1.2.1 Adesinas

As duas principais adesinas que facilitam diretamente a ligação às células do epitélio respiratório humano são a hemaglutinina filamentosa (Fha) e as fímbrias (Fim) (De Gouw *et al.*, 2011).

A **Fha** é uma proteína crítica para a colonização inicial, altamente hidrofóbica, sintetizada como um precursor de 370 kDa codificada pelo gene *fhaB*, que é processada para proteína madura Fha de 220 kDa, com quatro domínios de ligação

que facilitam a ligação do glicolípido na superfície de células ciliadas e não ciliadas do epitélio respiratório (Alonso *et al.*, 2002; Mattoo e Cherry, 2005). É proposto que a forma processada (madura) de Fha desempenha um papel importante na adesão bacteriana e na invasão de células epiteliais do hospedeiro (Villarino Romero *et al.*, 2014; Melvin *et al.*, 2015; Scheller e Cotter, 2015).

Nas culturas de *B. pertussis*, a Fha está presente nas formas livre e associadas à superfície celular, que se apresenta como um filamento curto e muito fino. (2nm de diâmetro e 40-100nm de comprimento), não é tóxica e é facilmente isolada do sobrenadante de cultivo em altos níveis (Sato, 1996; Villarino Romero *et al.*, 2014) (Sato *et al.*, 1983; Imaizumi *et al.*, 1984; Rappuoli, 1994).

A secreção de Fha requer uma proteína acessória, FhaC localizada na membrana externa – *outer membrane* (OM). O gene *fhaC* está localizado a jusante ao gene *fhaB* e esses dois estão separados por três genes envolvidos na biogênese das fímbrias, indicando que a produção de Fha está intimamente coregulada à produção de fímbrias (Willems *et al.*, 1994; Loch, 1999).

Durante a infecção com *B. pertussis* tanto em humanos como em modelo animal, observa-se altos títulos de anticorpos anti-Fha, conferindo imunidade de mucosa e sistêmica (Thomas *et al.*, 1989; Loch, 1999). No entanto quando administrada sozinha, a Fha não protege os camundongos no desafio intracerebral, somente quando associada a PT promove aumento da proteção (Sato e Sato, 1984; Cherry, 1997a; Hewlett, 1997), ao contrário da proteção observada no desafio respiratório utilizando Fha purificado e imunização de mucosa (Kimura *et al.*, 1990; Poulain-Godefroy *et al.*, 2008; Melvin *et al.*, 2015).

Estudos recentes sugerem que além de sua função como adesina, a Fha também atua como supressor de resposta inflamatória nas vias aéreas. A atividade imunomodulatória de Fha pode ser um problema na eficácia das vacinas pertussis acelulares (Carbonetti, 2016). A Fha madura desencadeia a produção de IL-10 anti-inflamatória em camundongos infectados por *B. pertussis*, causando expansão de células Treg e diminuindo a resposta Th1 (McGuirk e Mills, 2000; McGuirk *et al.*, 2002). Foi proposto que a ligação de receptores de integrina na superfície da célula hospedeira pela molécula Fha pode resultar em sinalização imunomoduladora que reduziria as respostas imunes celulares polarizadas Th1 envolvidas na proteção contra infecções por *B. pertussis* (McGuirk *et al.*, 2002; Dirix *et al.*, 2014; Scheller e

Cotter, 2015).

Além disso, foi reportado que a Fha estimula respostas através do reconhecimento por receptores tipo Toll-like 2 (TLR2) (Carbonetti *et al.*, 2003; Dirix *et al.*, 2014; Villarino Romero *et al.*, 2016), sendo que não há estimulação por TLR 4 ou TLR5. No entanto, Sebo e colaboradores reportam que a indução das citocinas via estimulação de TLR2 pode estar relacionada a contaminação da preparação de Fha por endotoxinas e lipoproteínas, colocando as propriedades imunoestimulatórias em dúvida (Villarino Romero *et al.*, 2016).

As **Fim** são longos filamentos de proteínas de superfícies e provavelmente atuam na doença como adesinas auxiliares (Cherry, 1997b; Hewlett, 1997; Cherry e Paddock, 2014). São proteínas de alta massa molecular, que consiste de uma subunidade principal (Fim2 ou Fim3) de aproximadamente 22 kDa, que compõe a estrutura estendida e é coberta pela proteína de ponta FimD. A principal subunidade da fimbria é conhecida por ligar a açúcares tais como heparina/heparan-sulfato e a FimD facilita a ligação a monócitos (Hazenbos, Geuijen, *et al.*, 1995; Hazenbos, Van Den Berg, *et al.*, 1995; Geuijen *et al.*, 1996).

As Fim foram inicialmente denominadas aglutinógenos (Agg), pois haviam observações que os soros de crianças infectadas ou vacinas aglutinavam na presença da bactéria; posteriormente foi verificado que os Agg1, Agg2 e Agg3 correspondiam as fimbrias Fim1, Fim2 e Fim3 (Mooi *et al.*, 1987; Ashworth *et al.*, 1988).

As Fim2 e Fim3 são Agg que definem o sorotipo do patógeno, a Fim1 está presente em todo o gênero *Bordetella*. (Rappuoli, 1994; Sato, 1996). Além disso foi observada a correlação entre proteção e a presença de anticorpos aglutinantes. Camundongos imunizados com fimbrias purificadas sobrevivem ao desafio contra a *B. pertussis* virulenta em modelo aerosol (Oda *et al.*, 1985) e intracerebral (Eldering *et al.*, 1967; Eldering *et al.*, 1969). Estes dados levaram à inclusão de Fim2 e Fim 3 como antígenos em algumas novas formulações de vacinas acelulares (Locht, 1999). Nas vacinas pertussis celulares, Fim2 e Fim3 são componentes obrigatórios, sendo sua presença confirmada através de reações de aglutinações.

Uma outra classe de adesinas é composta pelos **autotransportadores** como a **pertactina (Prn)**, a proteína de ***Bordetella* sororesistente - *Bordetella resistance***

to killing (BrkA) e **fator de colonização traqueal (Tcf)**. Essas proteínas são produzidas como precursores. No entanto a sua biogênese não requer proteína acessória. Em vez disso, a sua localização extracelular é mediada pela sua própria região carboxi-terminal, que provavelmente forma um canal na membrana externa (OM) através da qual a porção amino-terminal é translocada. Estas proteínas possuem regiões ricas em prolina e sequências RGD (Arginina-Glicina-Aspartato), envolvidas provavelmente na ligação às integrinas (Finn *et al.*, 1995; Finn e Stevens, 1995; Locht *et al.*, 2001).

O primeiro autotransportador identificado e caracterizado em *Bordetella* foi a **Prn**. É uma proteína de membrana externa com massa molecular de 69 kDa, anteriormente denominada de proteína 69kDa (Emsley *et al.*, 1994; Cherry, 1997b; Hewlett, 1997). O gene estrutural *prn* codifica uma proteína de 94kDa e a deleção da sua região 3' inibe a sua exposição na superfície celular, apoiando o modelo de secreção de autotransportador (Charles *et al.*, 1994; Mattoo e Cherry, 2005). É uma adesina, imunogênica, não tóxica e seu efeito protetor foi demonstrado em modelo experimental de desafio por inalação de aerossóis da bactéria virulenta em camundongos (Charles *et al.*, 1989; Leininger *et al.*, 1991).

Tem sido relatado que a Prn possui polimorfismo substancial, especialmente em sua região imunodominante (Boursaux-Eude e Guiso, 2000). Ainda há relatos de isolados clínicos com ausência de pertactina, provavelmente uma seleção natural em função do uso de vacinas acelulares que contém esse antígeno purificado em sua composição (Otsuka *et al.*, 2012; Quinlan *et al.*, 2014; Tsang *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2015).

A **BrkA** é responsável pela resistência da *Bordetella* à ação letal do soro (Fernandez e Weiss, 1995). O mecanismo de resistência é desconhecido, contudo, como já mencionado, a BrkA apresenta várias características que sugerem que está envolvida na adesão à célula hospedeira. Possui dois motivos RGD e dois sítios potenciais de ligação para glicoproteínas sulfatadas. Mutantes que não expressam BrkA são prejudicados na ligação às células eucarióticas *in vitro* e em modelos murinos são menos virulentas do que a cepa selvagem. Os mecanismos de secreção de BrkA é similar ao da Prn. Assim, a molécula precursora de BrkA possui um domínio C-terminal autotranslocador com sinal de localização na OM (Locht, 1999).

O **Tcf** também possui estrutura similar a **Prn**, é produzida pela *B. pertussis* mas não é encontrada em *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*, e aparentemente está envolvida especificamente na colonização da bactéria na traqueia (Finn e Stevens, 1995). Como já mencionada, possui uma sequência com regiões ricas em prolina, assim como **Fha**, **Prn** e **BrkA**, também contém sequências **RGD**. Além disso, possui um domínio C-terminal autotransportador, com alta similaridade ao de **BrkA** e **Prn**, sugerindo o mesmo mecanismo de secreção. **Tcf** é encontrado em duas formas: na forma associada às células e na forma secretada independente de sequência sinal.

1.2.2 Toxinas

A *B. pertussis* possui inúmeras toxinas, incluindo Toxina Pertussis (**PT**), adenilato ciclase (**CyaA**), toxina dermonecrótica (**DNT**), a citotoxina tracheal (**CT**) e ainda possui toxinas de natureza não proteicas como o lipopolissacarídeo (**LPS**) (Locht, 1999; Mattoo e Cherry, 2005).

A **PT**, também referida como fator de promoção de linfocitose devida a sua habilidade de induzir linfocitose em mamíferos, é o principal fator de virulência, a mais complexa e a mais estudada toxina de *B. pertussis*. É secretada para o meio extracelular e também encontrada associada à célula. Possui estrutura hexamérica do tipo **AB₅**, com uma subunidade enzimática com atividade tóxica (**A**) e uma subunidade ligante pentamérica, não tóxica (**B**) (Babu *et al.*, 2001; Melvin *et al.*, 2014).

A subunidade enzimática (**PtxA** ou **S1**) tem massa molecular de 26,2 kDa e catalisa uma reação de ADP-ribosilação dependente de **NAD**. A subunidade de ligação, pentâmero **B**, é formada por cinco proteínas de ligação à membrana ou subunidade de transporte, composta por uma cópia de **S2** (21,9 kDa), **S3** (21,8 kDa), **S5** (11,7 kDa) e 2 cópias de **S4** (12,0 kDa) (Rappuoli, 1994; Cherry, 1997b; Hewlett, 1997), que são estruturados no periplasma e exportados através do sistema de secreção tipo **IV**, codificados pelo locus **ptl** (Melvin *et al.*, 2014).

No modelo de ligação de **PT** à célula hospedeira, **S2** e **S3** determinam a especificidade da ligação. **PT** pode se ligar a qualquer ácido siálico de glicoproteínas, e múltiplos receptores foram identificados *in vitro*. No entanto o alvo específico de **PT** *in vivo* é ainda desconhecido (Stein *et al.*, 1994; Melvin *et al.*, 2014).

Após a ligação inicial da toxina à superfície da célula, PT é internalizada por endocitose mediada pelo receptor e segue uma via de transporte retrógrada para o complexo de Golgi e, em seguida, para o retículo endoplasmático (RE). A subunidade A sai do RE possivelmente através da via de degradação associada ao RE que normalmente elimina as proteínas mal dobradas (El Baya *et al.*, 1999; Melvin *et al.*, 2014).

No citoplasma, PtxA catalisa a reação de transferência de NAD para o resíduo de cisteína próxima ao C-terminal da proteína Gi, localizada do lado interno da membrana plasmática celular, tornando-a inativa (Locht *et al.*, 2011; Melvin *et al.*, 2014). Essa modificação elimina a ação das proteínas Gi em inibir a atividade de adenilato ciclase, resultando no aumento do AMP cíclico nas células hospedeiras e bloqueando outras vias reguladas pelas proteínas Gi, incluindo uma desregulação da resposta imune (Graf *et al.*, 1992).

PT apresenta uma ampla gama de efeitos em cultura celular e modelo animal, o que confundiu os esforços destinados a identificar o seu papel preciso durante a infecção humana. Essas atividades biológicas de PT estão refletidas nas suas outras denominações: Fator de Promoção de Linfocitose - LPF, Fator de Sensibilidade à Histamina - HSF, Proteína Ativadora da Secreção de Insulina-IAP, e estariam envolvidas na linfocitose e hipoglicemia, observados com frequência em muitos dos enfermos (Pittman, 1979; Pittman *et al.*, 1979; Pittman, 1984; Robbins *et al.*, 1993) (Cherry, 1997b; Hewlett, 1997).

Sabe-se que PT inibe a migração de células que expressam receptores de quimiocinas acopladas a proteína Gi *in vitro*, como neutrófilos, monócitos e linfócitos (Spangrude, Araneo, *et al.*, 1985; Spangrude, Sacchi, *et al.*, 1985). Em camundongos, a produção de PT por *B. pertussis* correlaciona-se com a diminuição da produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, diminuição do recrutamento de neutrófilos para os pulmões e aumento das cargas bacterianas no início da infecção (Kirimanjeswara *et al.*, 2005; Andreassen e Carbonetti, 2008). Experimentos em que os macrófagos alveolares são depletados com lipossomas contendo clodronato sugerem que a PT inicialmente atinja essas células (Carbonetti *et al.*, 2007). A produção de PT no pico da infecção correlaciona-se com a inflamação exacerbada e patologia nas vias aéreas (Connelly *et al.*, 2012). Embora essas e outras observações em modelos

animais sugerem que a PT contribui para o estabelecimento da infecção pela supressão da inflamação precoce, inibindo a ação microbida das células inflamatórias e contribuindo para a patologia inflamatória no pico da infecção, não se sabe se a PT produz estes efeitos durante a infecção humana (Melvin *et al.*, 2014). No entanto, demonstrou-se que a produção de PT correlaciona-se positivamente com a linfocitose extrema que ocorre em casos de coqueluche humana primária (Mu *et al.*, 1994) e anticorpos contra PT protegem contra o quadro de doenças graves (Bruss *et al.*, 1999).

A **CyaA** é produzida por todas as subespécies de *Bordetella* que infectam mamíferos (Carbonetti, 2010), é secretada pelo sistema de secreção de tipo I codificado pelo operon *cyaBDE* e é palmitoilada pelo produto de *cyaC* (Glaser *et al.*, 1988; Hackett *et al.*, 1994).

CyaA é um membro da família de toxinas RTX (*Repeat Toxins*), caracterizadas por conter regiões ricas em repetições de glicina e aspartato. A toxina contém dois módulos funcionais distintos: o domínio C-terminal, que contém as repetições RTX que medeia a ligação a células alvo e forma poros cátions-seletivos nas membranas plasmáticas (Sakamoto *et al.*, 1992; El-Azami-El-Idrissi *et al.*, 2003) e o domínio N-terminal, que é uma adenilato ciclase dependente de calmodulina que converte ATP em AMP cíclico (cAMP) (Glaser *et al.*, 1989; Ladant *et al.*, 1989; Melvin *et al.*, 2014).

Estudos indicam que o CyaA pode adotar conformações múltiplas e que essas formas são distintas em sua capacidade de efetuar a formação de poros ou de translocar adenilato ciclase na célula hospedeira (Fiser *et al.*, 2012). Assim, os efeitos observados de CyaA em diferentes tipos de células são o resultado de uma combinação de permeabilidade iônica, níveis aumentados de cAMP (levando a perturbação de eventos de sinalização a jusante) e possivelmente, a diminuição de ATP intracelular na célula hospedeira, resultando no geral, em efeitos antinflamatórios e antifagocíticos (Carbonetti, 2010; Melvin *et al.*, 2014).

Estudos mais recentes mostraram que a CyaA bloqueia a fagocitose dependente do complemento por macrófagos e suprime a ativação e a quimiotaxia das células T (Kamanova *et al.*, 2008; Paccani *et al.*, 2008; Melvin *et al.*, 2014). Em camundongos, as bactérias deficientes em CyaA são eliminadas mais rapidamente do

que as bactérias que expressam CyaA e estudos com camundongos imunodeficientes e neutropênicos sugerem que a CyaA tem um papel crucial ao permitir que as bactérias resistam a ação de defesa mediada por neutrófilos (Harvill *et al.*, 1999; Henderson *et al.*, 2012; Melvin *et al.*, 2014).

Assim como a toxina pertussis, a CyaA é um importante fator de virulência e um antígeno com atividade protetora em camundongos (Guiso *et al.*, 1991). Sua utilização como componente de vacinas acelulares tem sido retardada devido à dificuldade de sua obtenção em escala industrial.

Ct é um dissacarídeo-tetrapeptídeo produto de quebra do peptídeoglicano. Possui baixa massa molecular e responsável pela morte das células ciliadas do epitélio respiratório (Rosenthal *et al.*, 1987; Goldman e Cookson, 1988; Cookson, Cho, *et al.*, 1989; Cookson, Tyler, *et al.*, 1989; Rappuoli, 1994; Edwards e Decker, 2013).

Na maioria das bactérias gram-negativas, esse produto é reciclado pela célula, sendo transportado de volta ao citoplasma. No entanto, *B. pertussis* faz isso de forma ineficiente e libera uma grande quantidade de Ct no ambiente extracelular. (Rosenthal *et al.*, 1987; Goldman e Cookson, 1988), sendo o único fator de virulência de *B. pertussis* conhecido que não é regulado pelo sistema BvgAS (Melvin *et al.*, 2014).

Em culturas de órgãos e células traqueais, Ct tem um efeito tóxico nas células e pode resultar em inchaço mitocondrial, ruptura de junções apertadas e danos a células ciliadas (Mattoo e Cherry, 2005; Fedele *et al.*, 2013). Há também evidências que sugerem que esta citopatologia é o resultado de aumento da produção de óxido nítrico pela citotoxina traqueal que difunde em células ciliadas, causando morte celular (Edwards e Decker, 2013). Nos anéis traqueais de hamster, o Ct funciona de forma sinérgica com o lipopolissacarídeo (LPS), estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β e IL-6) e iNOS, resultando em destruição e extrusão de células ciliadas da superfície epitelial (Flak e Goldman, 1999). Juntamente com o LPS produzido pela bactéria, pode contribuir para os sintomas da doença, facilitando as reações inflamatórias (Wilson *et al.*, 2011).

Embora tenha sido postulado que a citopatologia mediada por Ct contribua para a tosse característica da coqueluche, a falta de modelos animais relevantes

impediu o teste dessa hipótese. Assim, a contribuição da Ct para a patogênese de pertussis em seres humanos permanece obscura (Melvin *et al.*, 2014).

DNT é uma potente toxina, que quando injetada em camundongos em baixas concentrações, causa lesões na pele, e em concentrações mais elevadas, levam os animais à morte, provavelmente devido a um efeito vaso constritor (Rappuoli, 1994).

Em contraste com a maioria das toxinas de *B. pertussis* que são exotoxinas, a DNT é intracelular (Cowell *et al.*, 1979). Interessantemente, foi um dos primeiros fatores de virulência descritos e originalmente denominado como endotoxina (Bordet e Gengou, 1906), já refletindo a sua natureza intracelular. Na sequência, ela foi denominada de toxina termosensível – *Heat labile-toxin*, devida a sua completa inativação a 56°C por 60 min (Livey e Wardlaw, 1984). O termo toxina dermonecrótica – *Dermonecrotic toxin* (DNT) vem de sua característica de causar lesões em baixas concentrações na pele de camundongos, coelhos e cobaias (Bordet e Gengou, 1906).

O papel da DNT na patogênese ainda não está totalmente claro (Parton, 1999; Loch *et al.*, 2001; Kilgore *et al.*, 2016). *In vitro* tem atividade transglutaminase, pode ativar Rho GTPases que é catalisada pela porção C-terminal da proteína (Schmidt *et al.*, 1999; Loch *et al.*, 2001). Inibe a diferenciação celular osteogênica *in vitro*, sugerindo que a toxina atua diretamente nas células hospedeiras (Horiguchi *et al.*, 1991; Horiguchi *et al.*, 1995; Melvin *et al.*, 2014). No entanto, como DNT não possui uma sequência sinal para exportação e não é secretada de células bacterianas cultivadas, pode realmente funcionar dentro do citoplasma bacteriano durante a infecção, possivelmente facilitando a sobrevivência bacteriana dentro de um nicho de hospedeiro específico e, portanto, funcionando indiretamente na patogênese (Melvin *et al.*, 2014).

O **LPS** desempenha um importante papel na manutenção da integridade da OM e na interação patógeno-hospedeiro (Raetz e Whitfield, 2002; Hankins *et al.*, 2013; Needham *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2017). A molécula de LPS de *B. pertussis* é menor do que muitas outras estruturas de LPS bacterianas e, portanto, muitas vezes é referido como um lipooligossacarídeo (Preston *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2001). O LPS presente nas bactérias gram-negativas em geral possuem três domínios distintos, o Lipídio A, um core oligossacarídeo e uma longa cadeia polissacarídea, o antígeno O. O LPS de *B. pertussis* não possui o antígeno-O (Mattoo e Cherry, 2005). Na realidade,

o LPS de *B. pertussis* produz dois tipos de moléculas de LPS com diferenças na mobilidade eletroforética, designadas de banda A e banda B (Peppler, 1984; Caroff *et al.*, 1990). A banda B é formada pelo Lipídio A ligado, por uma molécula de Kdo, a estrutura do *core*, que contém heptose, glucose, ácido glucurônico, glucosamina e ácido galactosaminurônico (GalNAcA). Os açúcares carregados GalNAcA, ácido glucurônico e a glucosamina não são tão comuns em LPS de outras espécies (Caroff *et al.*, 1990; Mattoo e Cherry, 2005). A Banda A consiste na banda B mais um trissacarídeo constituído de N-acetil-N-metilfucosamina (FucNAcMe), ácido 2,3-deoxidi-N-acetilmanosaminurônico (2,3-diNAcManA), e N-acetilglucosamina (GlcNAc) (Caroff *et al.*, 1990; Mattoo e Cherry, 2005).

Os organismos com produção incompleta de endotoxina têm demonstrado diminuição da colonização do trato respiratório no modelo de camundongo e anticorpos monoclonais para lipopolissacarídeos são protetores neste mesmo modelo animal (Edwards e Decker, 2013). O LPS de *B. pertussis* exibe muitas das atividades *in vivo* produzidas por outras bactérias gram-negativas, mas seu papel na patogênese não é totalmente esclarecido (Edwards e Decker, 2013). Embora todas as espécies de *Bordetella* produzam LPS, sua estrutura difere entre as espécies, possivelmente refletindo diferenças na força da atividade biológica entre as espécies de *Bordetella* (Locht, 1999).

As atividades biológicas exibidas pelo LPS de *B. pertussis* incluem propriedades antigênicas e imunomoduladoras (Amano *et al.*, 1990; Watanabe *et al.*, 1990). A ação mais comum associada ao LPS é uma potente atividade de endotoxina. O lipopolissacarídeo *B. pertussis* (LPS) pode atuar em sinergia com outras toxinas, como Ct ou toxina pertussis. É letal em camundongos sensibilizados com galactosamina, é pirogênico e mitogênico nas culturas de células de baço. Ativa macrófagos e induz a produção do fator de necrose tumoral (Watanabe *et al.*, 1990; Loch, 1999). É importante mencionar que o conteúdo de endotoxinas nas vacinas de células inteiras contribuem para as imediatas reações adversas sistêmicas e locais a elas (Baraff *et al.*, 1989; Edwards e Decker, 2013).

1.2.3 Regulação dos fatores de virulência

Desde a década de 60 é de conhecimento que a expressão dos fatores de virulência de *B. pertussis* pode ser modulada por mudanças no ambiente. Essa adaptação fisiológica reversível é denominada modulação. Ainda, embora raro, pode ocorrer dentro de uma população de células a perda irreversível da produção de fatores de virulência e esse fenômeno é denominado variação de fase (Lacey, 1960; Loch, 1999).

O responsável pela modulação fenotípica e pela variação de fase é o locus Bvg (*Bordetella virulence genes*) que regula a expressão dos principais fatores de virulência (Uhl e Miller, 1995; Loch, 1999; Cummings *et al.*, 2006).

O locus Bvg consiste em dois genes intimamente ligados, bvgA e bvgS, que codificam para um sistema de regulação de dois componentes BvgA/S, onde BvgS é a quinase sensora e BvgA, o regulador de resposta. A ativação de BvgS por sinais ambientais levam a autofosforilação de BvgS, que leva a fosforilação e ativação de BvgA. Ativado, o BvgA (BvgA-P) pode então se ligar a promotores específicos na região à jusante dos genes de virulência e ativar a transcrição desses *vir-activated genes* (vag)(Decker *et al.*, 2012). BvgA-P também ativa BvgR, uma proteína repressora que suprime a expressão de um subgrupo de genes (*vir-repressed genes*, vrg) que não são expressos durante a fase associada à virulência, denominada de fase Bvg⁺ (Merkel *et al.*, 2003). Em contraste, durante a fase Bvg⁻, BvgAS não é ativado, consequentemente não há expressão dos genes vag, e os genes vrg são expressos. Durante a fase intermediária (Bvgⁱ), alguns genes da fase Bvg⁺ são expressos, adicionalmente a um subgrupo de genes exclusivos da fase intermediária como o bipA (Melvin *et al.*, 2014).

Embora o (s) sinal (is) a que o BvgS responde na natureza seja desconhecido, o crescimento à baixa temperatura (~ 25 ° C) ou na presença de MgSO₄ ou ácido nicotínico (os chamados "moduladores químicos" de BvgS) inativa BvgS; assim, BvgA permanece não fosforilado e é incapaz de promover a transcrição de vag (Melvin *et al.*, 2014). Os genes regulados pelo BvgAS se dividem em quatro classes e sua regulação diferencial resulta em pelo menos três fases fenotípicas distintas (Figura 1).

Figura 1 - Sistema BvgAS. Controla quatro classes de genes e três fases fenotípicas distintas. A fase Bvg⁺ ocorre quando o BvgAS é totalmente ativo e é caracterizado pela expressão máxima de genes que codificam adesinas (classe 2 tais como fhaB, fim2 e fim3, níveis de expressão indicados por uma linha laranja) e toxinas (genes de classe 1, como o cyaA, ptx-ptl e bsc, níveis de expressão indicados por uma linha vermelha) e expressão mínima de genes de classe 3 e classe 4 (níveis de expressão indicados por linhas roxas e azuis, respectivamente). A fase Bvg⁺ é necessária e suficiente para causar infecção respiratória (*in vivo*). A fase Bvg⁻ ocorre quando BvgAS está inativo e é caracterizada pela expressão máxima de genes de classe 4 e expressão mínima de genes de classe 1, 2 e 3. O Bvg⁻ é necessária para uma fase de crescimento em condições de limitação de nutrientes, como pode ser encontrada no meio ambiente (isto é, *ex-vivo*). A fase de Bvgⁱ ocorre quando o BvgAS é parcialmente ativo e é caracterizado pela expressão máxima dos genes de classe 3 e expressão mínima dos genes de classe 1, 2 e 4. O único gene de classe 3 caracterizado até agora é bipA, que é ativado por BvgA sob condições de fase de Bvgⁱ e reprimido por BvgA em condições de fase Bvg⁺.

Fonte: Melvin, 2014.

Os genes de Classe 1 incluem o operon ptx-ptl (que codifica PT e seu sistema de transporte), cyaA-E (que codifica CyA) e o operon bsc (que codifica um sistema de secreção de tipo III (T3SS)). Esses genes são super expressos quando BvgAS está totalmente ativo (a chamada fase Bvg⁺). Os genes de Classe 2 são super expressos na fase Bvg-intermediária (Bvgⁱ) e Bvg⁺. A fase de Bvgⁱ ocorre quando as bactérias são cultivadas na presença de baixas concentrações de moduladores químicos ou nas primeiras horas após uma mudança das condições da fase Bvg⁻ para as condições da fase Bvg⁺. Os genes de classe 2 incluem fhaB (codificando hemaglutinina filamentosa (FHA)), fim (codificando fimbrias) e bvgAS em si; assim, o bvgAS é positivamente

autoregulado. Os genes da classe 3, dos quais apenas um (*bipA*, que codifica uma proteína da membrana externa de função desconhecida) foi caracterizado até agora (Stockbauer *et al.*, 2001), é super expresso na fase de Bvgi. A fase de Bvgi pode ser importante para transmissão entre hospedeiros, mas isso não foi totalmente elucidado. Os genes de Classe 4, que também são conhecidos como *vrgs* (genes reprimidos por virulência), são super expressos na fase Bvg⁻ e incluem os genes necessários para a síntese de flagelos e motilidade em *B. bronchiseptica* (Melvin *et al.*, 2014).

1.3 Sintomatologia, diagnóstico e tratamento da coqueluche

As manifestações clínicas típicas da coqueluche são divididas em 3 fases: catarral, paroxística e convalescente (Hong, 2010; Atkinson *et al.*, 2011).

A primeira fase da doença (fase catarral) é inespecífica e inicia após 3 a 12 dias do contato. Os sintomas são semelhantes aos de um resfriado, como coriza, conjuntivite, febre baixa ou ausente e tosse ocasional, sendo muito difícil o diagnóstico clínico neste período. À medida que a doença progride, após 10 a 15 dias, surge a tosse seca, que vai se tornando mais frequente, espasmódica e violenta, caracterizando a segunda fase, paroxística, normalmente com duração de 1 a 6 semanas, podendo persistir em até 10 semanas.

A tosse paroxística é acompanhada de um excesso de muco e geralmente seguida por vômitos, de severidade suficiente para resultar em perda de peso e subnutrição. A tosse pode se tornar extremamente severa, levando a convulsões e cianoses. Em alguns casos podem ocorrer edemas, hemorragias e até obstrução vascular cerebral, produzindo danos cerebrais irreversíveis. É durante esta fase que incidem os casos fatais.

As complicações clínicas que mais comumente levam à morte de indivíduos infectados são as pneumonias e as complicações relacionadas à apneia, embora encefalopatias e convulsões também possam ocorrer (Hong, 2010; Atkinson *et al.*, 2011). Notavelmente, a maior parte dos casos de óbito são concentradas em crianças com menos de 3 meses de idade (aproximadamente 83% dos casos) (Atkinson *et al.*, 2011). A expiração de ar entre os episódios de tosse numa crise soa como um ronco

forte, tão característico que originou o nome da doença em inglês (*whoop* = ronco, chiado e *whooping cough* = tosse com chiado).

Por fim, inicia-se a fase convalescente, que dura cerca de 2 a 3 semanas, e é caracterizado pela diminuição progressiva da tosse e dos demais sintomas.

Diversos métodos podem ser utilizados para o diagnóstico da coqueluche, que implicam na confirmação da infecção por *B. pertussis* (Hong, 2010). Entre estes métodos, pode-se citar: sorologia, cultura (o teste padrão mais aceito), detecção por anticorpos pertussis marcados com fluoróforo (*Direct fluorescent antibody* – DFA) e PCR. Estes métodos possuem diferenças e limitações em termos de sensibilidade, especificidade e praticidade, e devem ser escolhidos de acordo com a situação encontrada.

O tratamento da coqueluche tem por objetivo principal limitar o número, severidade e duração dos episódios de tosse espasmódicas e de suas complicações clínicas associadas (Hong, 2010). A hospitalização de crianças infectadas geralmente é necessária para cuidados básicos (hidratação, nutrição, acompanhamento e monitoramento de complicações) e casos de tosse severas e incontroladas podem mesmo exigir ventilação mecânica. Adicionalmente, o tratamento também inclui o uso de antibióticos, tais como azitromicina, claritromicina e eritromicina.

1.4 Vacinas Pertussis

A melhor forma de combate à coqueluche é a prevenção através da vacinação. Após o isolamento e a descrição da *Bordetella pertussis* no começo do século 20, bactérias inativadas começaram a ser utilizadas para compor as vacinas contra a coqueluche (Crowcroft e Pebody, 2006; Mooi, 2010; Atkinson *et al.*, 2011). Estas vacinas foram inicialmente desenvolvidas a partir da década de 30 e começaram a ser amplamente utilizadas a partir da década de 40 (Atkinson *et al.*, 2011).

A primeira indicação de proteção contra a coqueluche foi descrita por Madsen, em seu estudo de triagem clínica durante uma epidemia em 1923-24, nas Ilhas Faroe, no Atlântico Norte, comparando a taxa de infecção após a exposição, de crianças vacinadas ou não com suspensões de células de *B. pertussis* inativadas pelo calor.

Os resultados mostraram que essa vacina, embora reatogênica, era capaz de amenizar a severidade da doença. Um segundo estudo do mesmo autor, em 1929, verificou que 98% dos não vacinados contraíram a doença, enquanto 75% dos vacinados foram protegidos, confirmando o conceito de que uma Vacina Pertussis poderia controlar a coqueluche. Em 1932-34, Kendrick e colaboradores demonstraram definitivamente a eficácia clínica da vacina, utilizando suspensões de *B. pertussis* inativadas e estocadas a baixas temperaturas (Kendrick e Eldering, 1936; Shapiro-Shapin, 2010).

Em 1940, a Vacina Pertussis celular - *whole cell pertussis* (wP) foi licenciada para vacinação rotineira sendo que em 1948 foram associadas as anatoxinas tetânicas e diftéricas, compondo a vacina DTP (vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis). Estudo de campo realizado com essa vacina tríplice, mostrou eficácia de 70% a 90% na prevenção da coqueluche, utilizando 4 doses como esquema de imunização, reduzindo drasticamente a incidência de coqueluche nos países onde foram implementadas, tanto por efeito direto, evitando o estabelecimento da doença em indivíduos vacinados, como por efeito indireto, também chamado de “efeito rebanho”, quando os indivíduos vacinados quebram o ciclo de transmissão da doença, impedindo que a bactéria se difunda pela população e ataque indivíduos não imunizados.

Antes do desenvolvimento de vacinas, eram registrados aproximadamente 270.000 casos de pertussis por ano nos Estados Unidos, com 10.000 mortes anuais, predominantemente em bebês. A vacinação de crianças a partir dos 2 meses de idade com wP combinada a anatoxina diftérica e anatoxina tetânica (DTwP) reduziu drasticamente o número de casos, chegando aproximadamente a 1000 casos anuais nos Estados Unidos (Klein *et al.*, 2012; Edwards e Decker, 2013). Entretanto, ocorrências de reações adversas sérias, possivelmente associadas à vacinação, diminuiu a confiança na wP em diversos países como o Japão, Estados Unidos e países da Europa, levando ao desenvolvimento das primeiras formulações de vacinas acelulares (“acellular pertussis” – aP) na década de 80, compostas por antígenos proteicos purificados. Desde então, diversos países adotaram o uso das vacinas DTaP, que são compostas por PT inativado e Fha mas podendo conter mais antígenos de *B. pertussis*, dependendo do fabricante, e que são associadas a efeitos adversos

mais leves (Locht, 2008). Apesar da introdução da DTaP em países desenvolvidos, a DTwP continua sendo a vacina de escolha em países em desenvolvimento, o que faz dela a vacina pertussis utilizada atualmente na maior parte da população mundial (Locht, 2008).

Apesar da alta cobertura vacinal, a pertussis se apresenta como uma doença endêmica com picos epidêmicos em diferentes países a cada 2 a 5 anos. A vacinação reduziu o número de casos nos Estados Unidos, sem redução dos intervalos entre os picos, sugerindo a circulação endêmica da bactéria (Fine e Clarkson, 1982; Edwards e Decker, 2013). Foi observado o aumento do número de casos a cada ciclo epidêmico ocorrido nos Estados Unidos, sendo registrados mais de 25.000 casos em 2004, mais de 16.000 casos em 2008 e em 2010 só no estado da Califórnia foram reportados mais de 9 mil casos, sendo esse o maior número observado em 63 anos. Em 2012, o número de casos registrados nos Estados Unidos atingiu 48.000 (Edwards e Decker, 2013). Países da Europa, Austrália e Canadá, também têm registrado o ressurgimento de casos de pertussis nos últimos anos (Chiappini *et al.*, 2013; Edwards e Decker, 2013; Chiappini *et al.*, 2016).

Dados da Organização Mundial de Saúde estimaram a ocorrência de 16 milhões de casos no mundo no ano de 2008, sendo 95% em países em desenvolvimento, com 195.000 mortes de crianças (World Health Organization, 2010). Enquanto nos países em desenvolvimento a ocorrência está principalmente associada à cobertura vacinal subótima, o ressurgimento da pertussis em países desenvolvidos apresenta causas multifatoriais, dentre as quais, a utilização das vacinas acelulares é a principal (Plotkin, 2014).

Diversos países têm reportado o surgimento de cepas com diversidade antigênica como possível consequência de pressão do sistema imune e do uso das vacinas acelulares. Enquanto a resposta imune induzida por vacinas celulares é direcionada a uma gama de antígenos presentes, as formulações acelulares induzem resposta a um número limitado de antígenos, podendo facilitar a variação antigênica. Isolados que apresentam variação antigênica de Prn (pertactina), ou mesmo ausência desta proteína tem sido reportados em diferentes partes do mundo. O surgimento de cepas com alteração alélica no promotor da PT, levando a um aumento da expressão desta toxina tem sido também relacionado ao aumento do número de casos no mundo

(Mooi *et al.*, 2009).

Por outro lado, estudos recentes têm demonstrado que o principal fator que contribui para o aumento de casos de pertussis no mundo é a diminuição da imunidade em adolescentes e adultos jovens, levando a um aumento de indivíduos colonizados nesta faixa etária. Enquanto que a doença apresenta sintomas leves nesta população, ela constitui o principal reservatório do patógeno, sendo responsável pela transmissão aos bebês que não receberam as primeiras 3 doses da vacina, principal grupo de risco para pertussis (Sheridan, McCall, *et al.*, 2014). Um estudo com adolescentes da Califórnia que receberam 5 doses de DTap mostrou que a proteção induzida pela vacina é curta, levando a um aumento do risco de contrair pertussis em 42% a cada ano após a última dose (Klein *et al.*, 2012). Por outro lado, a vacinação com DTwP produz imunidade protetora por um tempo significativamente maior que a vacinação com DTap. Além disso, indivíduos que receberam a primeira dose com DTwP e os reforços com DTap, durante a fase de transição da introdução da vacina acelular nos Estados Unidos e na Austrália, apresentaram risco significativamente menor de infecção (Liko *et al.*, 2013; Sheridan, Frith, *et al.*, 2014).

A mudança de prevalência de pertussis para a faixa etária de adolescentes e adultos jovens em países que adotaram a DTap estimulou estudos comparativos da resposta imune induzida por formulações contendo wP ou aP. Um estudo em pré-adolescentes belgas, que receberam aP ou wP como primeiras doses e aP como reforço, mostrou a presença de células T de memória específicas para antígenos de pertussis em ambas as populações. Entretanto a magnitude da resposta foi superior nos indivíduos que receberam wP, assim como o número de respondedores. A qualidade da resposta, com relação às populações celulares e secreção de citocinas, também diferiu nos dois grupos (Smits *et al.*, 2013).

Estudos em camundongos mostraram que a resposta imune induzida pela wP apresenta um caráter Th1/Th17, semelhante à infecção por pertussis. A imunização com aP induz resposta Th2/Th17 que não se mostrou adequada para o controle da infecção pulmonar nos animais. Estes estudos sugerem a utilização de diferentes adjuvantes para aP, de forma a modular a resposta para Th1 (Ross *et al.*, 2013).

Mais recentemente, um modelo de infecção desenvolvido em babuínos mostrou que a vacina aP não protege contra colonização ou infecção. Animais

imunizados com DTaP e desafiados com *B. pertussis*, apesar de não desenvolver a doença, levam um tempo equivalente aos animais não vacinados para eliminar as bactérias dos pulmões. Além disso, estes animais são capazes de serem infectados e transmitir a bactéria em modelos de transmissão. A imunidade induzida pela wP nestes animais, se mostrou mais eficaz para eliminação das bactérias no trato respiratório, com características mais semelhantes à imunidade induzida pela infecção. A presença de células T de memória Th1 e Th17 foram novamente relacionadas com a melhor eficácia de wP contra colonização pulmonar (Warfel e Merkel, 2014; Warfel *et al.*, 2014). Estes dados tem um impacto importante nas estratégias para diminuir a transmissão da bactéria em populações, já que a vacina DTaP não apresentou dados promissores em modelos animais.

1.5 Situação de Pertussis no Brasil

Desde 1973 a vacina pertussis utilizada no Brasil é a wP, distribuída através do Programa Nacional de Imunização a toda a população. A produção de DTwP para o Ministério da Saúde é feita pelo Instituto Butantan desde 1984, suprimindo a demanda de aproximadamente 3 milhões de crianças nascidas anualmente (Ho *et al.*, 2011). A recomendação para vacinação são 3 doses aos 2, 4 e 6 meses de idade, com reforço aos 15 meses e quatro anos. Esta vacina é altamente eficaz contra pertussis e levou à diminuição drástica do número de casos desde a década de 90 (Ministério Da Saúde, 2009). A avaliação ao longo dos anos de efeitos adversos após a vacinação mostra que os casos graves são bastante raros (Ministério Da Saúde, 2014). Estes dados, em conjunto com os dados recentes dos países que adotaram a vacinação com DTaP, suportam a manutenção da vacinação com wP no País.

A maioria dos casos de pertussis no Brasil ocorre em crianças que não receberam a primeira dose da vacina, seguidas de crianças com o esquema incompleto de vacinação (Ministério Da Saúde, 2015). Entretanto, alguns estudos apontam para a detecção de infecção em pré-adolescentes (Ulloa-Gutierrez e Avila-Aguero, 2008). Dados do Ministério da Saúde e do Estado de São Paulo indicam um aumento na incidência de casos confirmados no Brasil nos anos de 2012, 2013 e 2014 é interessante notar no ano de 2012 houve uma queda na cobertura vacinal (Figura 2). Entretanto, é preciso levar em conta o aumento da atenção dos profissionais de

saúde para a detecção de pertussis e de confirmação dos casos pela implementação da técnica de PCR em tempo real para diagnóstico (Daniela *et al.*, 2013). Porém, cabe ressaltar que houve um aumento nos casos de óbitos (Figura 3) com prevalência em crianças menores de 2 meses em sua grande maioria (Figura 4). Ainda, os dados do Ministério da Saúde apontam uma queda nos anos de 2015 e 2016 e é importante indicar que em novembro de 2014, o Ministério da Saúde do Brasil iniciou a vacinação de grávidas com a vacina Tdap (Boostrix, GlaxoSmithKline), o que pode estar relacionado com o declínio dos casos confirmados.

Figura 2 - Casos confirmados de coqueluche entre os anos de 1990 à 2016 no Brasil. A seta amarela (PCR) indica a introdução da metodologia de PCR para confirmação dos casos. A seta verde (DTPa) indica a introdução da vacina pertussis acelular para grávidas.

Fonte dos dados dos números de casos: Sinan/SVS/MS - atualizado em 08/06/17. Fonte de dados de cobertura vacinal: Organização Mundial de Saúde - WHO em: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/data/en/ (consultado em 13/12/18).

Figura 3 - Número de óbitos por coqueluche por ano no Brasil.

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net, consultado em 05/01/2018.

*Dados de 2015 e 2016 sujeitos a revisão.

Figura 4 - Óbitos por coqueluche segundo faixa etária no Brasil, nos anos de 2010 a 2014^a.

Fonte: Sinan (atualizado em 03/03/2015). Em Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde – Brasil

^aDados sujeitos à alteração.

A recomendação da Tdap é para as gestantes a partir da 27ª semana de gestação, podendo ser administrada até 20 dias antes do parto. Deve-se ressaltar a importância de um acompanhamento da resposta imune das crianças após o início da vacinação infantil com DTwP, já que alguns estudos apontaram para interferência de anticorpos maternos na resposta a vacinação com wP em camundongos (Feunou *et al.*, 2016).

Além dos problemas de imunogenicidade, as vacinas acelulares têm um custo mais alto de produção quando comparadas com as vacinas de células inteiras, em virtude das etapas cromatográficas necessárias para a purificação dos antígenos que compõe as vacinas acelulares. Desta forma, a Organização Mundial de Saúde - OMS recomenda que os países que utilizam a wP não alterem para o uso da aP, apesar das possíveis reações adversas da wP (World Health Organization, 2015).

A coqueluche desafia este cenário atual de ambiente vacinado, persistindo como uma doença com um significativo impacto em saúde pública. Diante disto e com o intuito de aprimorar a vacina wP, o Instituto Butantan vem desenvolvendo nos últimos anos a vacina pertussis Low (wPlow). O processo consiste basicamente no tratamento da vacina wP para remover grande parte do LPS presente na superfície celular. Desta forma, a vacina wPlow deve apresentar menor reatogenicidade que a vacina tradicional, diminuindo a possibilidade de ocorrência de efeitos adversos. Além disso, a vacina DTwPlow poderá ser produzida a um custo semelhante ao da vacina DTwP e o LPS resultante do processo poderá ser utilizado para produção do adjuvante monofosforil lipídio A (MPLA). Os resultados com a wPlow produzida em escala de bancada foram promissores (Zorzeto *et al.*, 2009; Dias *et al.*, 2013), porém para finalizar o desenvolvimento desta vacina é necessário escalonar a produção para processos industriais. Está é uma etapa crucial, pois a metodologia aplicada em escala industrial nem sempre reproduz os resultados inicialmente obtidos em bancada.

2 CONCLUSÃO

1 - Podemos concluir que os processos de TFF e TFFSW não foram eficientes na remoção da atividade endotóxica da wPlow, embora tenha ocorrido a remoção do conteúdo de LPS. Ao contrário, dos processos utilizando centrífugas industriais, além da remoção do conteúdo de LPS, a atividade endotóxica foi reduzida (60-75%) quando comparada com a wP, indicando que o processo de produção em escala industrial com centrífugas é um processo viável e mais robusto e eficiente. Desta forma, será possível adaptar a produção de nova Vacina Pertussis de células inteiras com baixa reatogenicidade (wPlow) dentro das condições do processo produtivo industrial existente, com características imunogênicas semelhantes a wP com reduzido teor de LPS e menor reatogenicidade.

2 - O genoma completo da cepa *B. pertussis* 137 foi sequenciado e encontra-se disponível no Genbank sob o número de acesso CP010323. Sendo caracterizado por conter um único cromossomo de 4.134.593 bp, com conteúdo GC de 67,7%, composto por 3462 sequencias codificantes de proteína, 51 tRNA, 9 genes de rRNA genes e ainda 223 cópias do elemento de inserção IS481. A cepa de *B. pertussis* 137 pertence ao MLST complexo clonal II e quanto aos fatores de virulência possui o perfil PrnA(7), PtxA(3), PtxB(2), PtxC(1), ptxP(2), Fim1(1), Fim2(2), Fim3(1), TcfA(2), CyaA(2), OmpQ(2), and Vag8(2). As informações genômicas poderão ser utilizadas para um melhor entendimento da sua biologia, do sistema produtivo e de controle pelo Instituto Butantan e comunidade científica, produtora de vacinas e dos órgãos que acompanham os casos de pertussis no Brasil e em nível global.

3 ARTIGO PUBLICADO

O sequenciamento do genoma da cepa de produção de *B. pertussis* 137 foi publicado e o genoma foi depositado no Genbank sob o número de acesso CP010323. AKAMATSU MA, NISHIYAMA MY JR, MORONE M, OLIVEIRA UC, BEZERRA MF, SAKAUCHI MA, RAW I, JUNQUEIRA DE AZEVEDO IL, KITAJIMA JP, CARVALHO E, HO PL. Whole-Genome Sequence of a *Bordetella pertussis* Brazilian Vaccine Strain. **Genome Announc.** 2015 Feb 19;3(1). pii: e01570-14. doi: 10.1128/genomeA.01570-14. PubMed PMID: 25700409; PubMed Central PMCID: PMC4335333.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AD HOC GROUP FOR THE STUDY OF PERTUSSIS VACCINES. Placebo-controlled trial of two acellular pertussis vaccines in Sweden--protective efficacy and adverse events. **Lancet**, v. 1, n. 8592, p. 955-60, Apr 30 1988.

ADVANI, A.; DONNELLY, D.; HALLANDER, H. Reference system for characterization of Bordetella pertussis pulsed-field gel electrophoresis profiles. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 7, p. 2890-7, Jul 2004.

AKAMATSU, M. A. et al. Whole-Genome Sequence of a Bordetella pertussis Brazilian Vaccine Strain. **Genome Announc**, v. 3, n. 1, 2015.

ALLEN, A.; MASKELL, D. The identification, cloning and mutagenesis of a genetic locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in Bordetella pertussis. **Mol Microbiol**, v. 19, n. 1, p. 37-52, Jan 1996.

ALLEN, A. G. et al. Molecular and functional analysis of the lipopolysaccharide biosynthesis locus wlb from Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica. **Mol Microbiol**, v. 29, n. 1, p. 27-38, Jul 1998.

ALONSO, S. et al. Eighty-kilodalton N-terminal moiety of Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin: adherence, immunogenicity, and protective role. **Infect Immun**, v. 70, n. 8, p. 4142-7, Aug 2002.

AMANO, K.; FUKUSHI, K.; WATANABE, M. Biochemical and immunological comparison of lipopolysaccharides from Bordetella species. **J Gen Microbiol**, v. 136, n. 3, p. 481-7, Mar 1990.

AMIRTHALINGAM, G.; GUPTA, S.; CAMPBELL, H. Pertussis immunisation and control in England and Wales, 1957 to 2012: a historical review. **Euro Surveill**, v. 18, n. 38, Sep 19 2013.

ANDREASEN, C.; CARBONETTI, N. H. Pertussis toxin inhibits early chemokine production to delay neutrophil recruitment in response to Bordetella pertussis respiratory tract infection in mice. **Infect Immun**, v. 76, n. 11, p. 5139-48, Nov 2008.

ASHWORTH, L. A. et al. Agglutinogens and fimbriae of Bordetella pertussis. **Tokai J Exp Clin Med**, v. 13 Suppl, p. 203-10, 1988.

ATKINSON, W.; WOLFE, C.; HAMBORSKY, J. **Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases**. 12^a. Centers for Disease Control and Prevention, 2011.

BABU, M. M. et al. Virulence factors of Bordetella pertussis. **Current Science**, v. 80, n. 12, p. 1512-1522, 2001.

BALDRIDGE, J. R. et al. Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. **Expert Opin Biol Ther**, v. 4, n. 7, p. 1129-38, Jul 2004. ISSN 1471-2598.

BARAFF, L. J. et al. Analyses of adverse reactions to diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine by vaccine lot, endotoxin content, pertussis vaccine potency and percentage of mouse weight gain. **Pediatr Infect Dis J**, v. 8, n. 8, p. 502-7, Aug 1989.

BART, M. J. et al. Global population structure and evolution of Bordetella pertussis and their relationship with vaccination. **MBio**, v. 5, n. 2, p. e01074, Apr 22 2014.

_____. Comparative genomics of prevaccination and modern Bordetella pertussis strains. **BMC Genomics**, v. 11, p. 627, 2010.

_____. Complete Genome Sequences of Bordetella pertussis Isolates B1917 and B1920, Representing Two Predominant Global Lineages. **Genome Announc**, v. 2, n. 6, Dec 24 2014.

BORDET, J.; GENGOU, O. Le microbe de la coqueluche. **Ann Inst Pasteur**, v. 20, p. 731-741, 1906.

BOTTERO, D. et al. Genotypic and phenotypic characterization of Bordetella pertussis strains used in different vaccine formulations in Latin America. **J Appl Microbiol**, v. 112, n. 6, p. 1266-76, Jun 2012.

BOUCHEZ, V. et al. Genomic content of Bordetella pertussis clinical isolates circulating in areas of intensive children vaccination. **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. e2437, 2008.

BOURSAUX-EUDE, C.; GUIZO, N. Polymorphism of repeated regions of pertactin in Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis, and Bordetella bronchiseptica. **Infect Immun**, v. 68, n. 8, p. 4815-7, Aug 2000.

BRUSS, J. B. et al. Treatment of severe pertussis: a study of the safety and pharmacology of intravenous pertussis immunoglobulin. **Pediatr Infect Dis J**, v. 18, n. 6, p. 505-11, Jun 1999.

CARBONETTI, N. H. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. **Future Microbiol**, v. 5, n. 3, p. 455-69, Mar 2010.

_____. *Bordetella pertussis*: new concepts in pathogenesis and treatment. **Curr Opin Infect Dis**, v. 29, n. 3, p. 287-94, Jun 2016. ISSN 0951-7375.

CARBONETTI, N. H. et al. Pertussis toxin plays an early role in respiratory tract colonization by *Bordetella pertussis*. **Infect Immun**, v. 71, n. 11, p. 6358-66, Nov 2003.

_____. Pertussis toxin targets airway macrophages to promote *Bordetella pertussis* infection of the respiratory tract. **Infect Immun**, v. 75, n. 4, p. 1713-20, Apr 2007.

_____. Highlights of the 11th International *Bordetella* Symposium: from Basic Biology to Vaccine Development. In: (Ed.). **Clin Vaccine Immunol**. United States: American Society for Microbiology. All Rights Reserved., v.23, 2016. p.842-850. ISBN 1556-679X (Electronic) 1556-679X (Linking).

CAROFF, M. et al. Structure of the *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. **FEBS Lett**, v. 477, n. 1-2, p. 8-14, Jul 14 2000.

_____. Variations in the carbohydrate regions of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides: electrophoretic, serological, and structural features. **J Bacteriol**, v. 172, n. 2, p. 1121-8, Feb 1990.

_____. Structural characterization of the lipid A of *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. **J Bacteriol**, v. 176, n. 16, p. 5156-9, Aug 1994.

CASSIDAY, P. et al. Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935-1999. **J Infect Dis**, v. 182, n. 5, p. 1402-8, Nov 2000.

CHARLES, I. et al. Expression of the *Bordetella pertussis* P.69 pertactin adhesin in *Escherichia coli*: fate of the carboxy-terminal domain. **Microbiology**, v. 140 (Pt 12), p. 3301-8, Dec 1994.

CHARLES, I. G. et al. Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from Bordetella pertussis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 10, p. 3554-8, May 1989.

CHERRY, J. D. Comparative efficacy of acellular pertussis vaccines: an analysis of recent trials. **Pediatr Infect Dis J**, v. 16, n. 4 Suppl, p. S90-6, Apr 1997a.

_____. The role of Bordetella pertussis infections in adults in the epidemiology of pertussis. **Dev Biol Stand**, v. 89, p. 181-6, 1997b.

_____. Epidemic pertussis in 2012--the resurgence of a vaccine-preventable disease. **N Engl J Med**, v. 367, n. 9, p. 785-7, Aug 30 2012.

CHERRY, J. D.; PADDOCK, C. D. Pathogenesis and histopathology of pertussis: implications for immunization. **Expert Rev Vaccines**, v. 13, n. 9, p. 1115-23, Sep 2014.

CHIAPPINI, E. et al. Dramatic Pertussis Resurgence in Tuscan Infants in 2014. **Pediatr Infect Dis J**, v. 35, n. 8, p. 930-1, Aug 2016.

_____. Pertussis re-emergence in the post-vaccination era. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 151, Mar 26 2013.

CLEMENTZ, T.; ZHOU, Z.; RAETZ, C. R. Function of the Escherichia coli msbB gene, a multicopy suppressor of htrB knockouts, in the acylation of lipid A. Acylation by MsbB follows laurate incorporation by HtrB. **J Biol Chem**, v. 272, n. 16, p. 10353-60, Apr 18 1997.

COGNET, I. et al. Expression of recombinant proteins in a lipid A mutant of Escherichia coli BL21 with a strongly reduced capacity to induce dendritic cell activation and maturation. **J Immunol Methods**, v. 272, n. 1-2, p. 199-210, Jan 15 2003.

CONNELLY, C. E.; SUN, Y.; CARBONETTI, N. H. Pertussis toxin exacerbates and prolongs airway inflammatory responses during Bordetella pertussis infection. **Infect Immun**, v. 80, n. 12, p. 4317-32, Dec 2012.

COOKSON, B. T. et al. Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of Bordetella pertussis. **Infect Immun**, v. 57, n. 7, p. 2223-9, Jul 1989.

COOKSON, B. T.; TYLER, A. N.; GOLDMAN, W. E. Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. **Biochemistry**, v. 28, n. 4, p. 1744-9, Feb 21 1989.

COWELL, J. L.; HEWLETT, E. L.; MANCLARK, C. R. Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. **Infect Immun**, v. 25, n. 3, p. 896-901, Sep 1979.

CROWCROFT, N. S.; PEBODY, R. G. Recent developments in pertussis. **Lancet**, v. 367, n. 9526, p. 1926-36, 2006.

CUMMINGS, C. A. et al. Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by *Bordetella BvgAS*. **J Bacteriol**, v. 188, n. 5, p. 1775-85, Mar 2006.

DANIELA, L. et al. IMPLEMENTATION AND ASSESSMENT OF THE USE OF REAL-TIME PCR IN ROUTINE DIAGNOSIS FOR BORDETELLA PERTUSSIS DETECTION IN BRAZIL. v. 1, n. 5, p. 196-202, 2013.

DE GOUW, D. et al. Pertussis: a matter of immune modulation. **FEMS Microbiol Rev**, v. 35, n. 3, p. 441-74, May 2011.

DECKER, K. B. et al. The *Bordetella pertussis* model of exquisite gene control by the global transcription factor BvgA. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 7, p. 1665-76, Jul 2012.

DIAS, W. O. et al. An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin. **Hum Vaccin Immunother**, v. 9, n. 2, p. 339-48, Feb 2013.

DIRIX, V. et al. Human dendritic cell maturation and cytokine secretion upon stimulation with *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. **Microbes Infect**, v. 16, n. 7, p. 562-70, Jul 2014.

EDWARDS, K. M.; DECKER, M. D. Pertussis vaccines. In: PLOTKIN, S. A.; ORENSTEIN, W. A., et al (Ed.). **Vaccines (Sixth Edition)**. London: W.B. Saunders, 2013. p.447-492. ISBN 978-1-4557-0090-5.

EL BAYA, A.; BRUCKENER, K.; SCHMIDT, M. A. Nonrestricted differential intoxication of cells by pertussis toxin. **Infect Immun**, v. 67, n. 1, p. 433-5, Jan 1999.

EL-AZAMI-EL-IDRISSI, M. et al. Interaction of Bordetella pertussis adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. **J Biol Chem**, v. 278, n. 40, p. 38514-21, Oct 3 2003.

ELDERING, G.; HOLWERDA, J.; BAKER, J. Mouse-protective properties of Bordetella pertussis serotypes in passive tests. **J Bacteriol**, v. 93, n. 6, p. 1758-61, Jun 1967.

ELDERING, G. et al. Bordetella pertussis serotypes in the United States. **Appl Microbiol**, v. 18, n. 4, p. 618-21, Oct 1969.

EMSLEY, P. et al. Crystallographic characterization of pertactin, a membrane-associated protein from Bordetella pertussis. **J Mol Biol**, v. 235, n. 2, p. 772-3, Jan 14 1994.

FEDELE, G.; BIANCO, M.; AUSIELLO, C. M. The virulence factors of Bordetella pertussis: talented modulators of host immune response. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 61, n. 6, p. 445-57, Dec 2013.

FERNANDEZ, R. C.; WEISS, A. A. Cloning and sequencing of the Bordetella pertussis cpn10/cpn60 (groESL) homolog. **Gene**, v. 158, n. 1, p. 151-2, May 26 1995.

FEUNOU, P. F.; MIELCAREK, N.; LOCHT, C. Reciprocal interference of maternal and infant immunization in protection against pertussis. **Vaccine**, v. 34, n. 8, p. 1062-9, Feb 17 2016.

FINE, P. E.; CLARKSON, J. A. The recurrence of whooping cough: possible implications for assessment of vaccine efficacy. **Lancet**, v. 1, n. 8273, p. 666-9, Mar 20 1982.

_____. Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. **Rev Infect Dis**, v. 9, n. 5, p. 866-83, Sep-Oct 1987.

FINN, T. M.; LI, Z.; KOCSIS, E. Identification of a Bordetella pertussis bvg-regulated porin-like protein. **J Bacteriol**, v. 177, n. 3, p. 805-9, Feb 1995.

FINN, T. M.; STEVENS, L. A. Tracheal colonization factor: a Bordetella pertussis secreted virulence determinant. **Mol Microbiol**, v. 16, n. 4, p. 625-34, May 1995.

FISER, R. et al. Calcium influx rescues adenylate cyclase-hemolysin from rapid cell membrane removal and enables phagocyte permeabilization by toxin pores. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, p. e1002580, 2012.

FLAK, T. A.; GOLDMAN, W. E. Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. **Cell Microbiol**, v. 1, n. 1, p. 51-60, Jul 1999.

GARÇON, N.; CHOMEZ, P.; VAN MECHELEN, M. GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. **Expert Rev Vaccines**, v. 6, n. 5, p. 723-39, Oct 2007.

GEUIJEN, C. A.; WILLEMS, R. J.; MOOI, F. R. The major fimbrial subunit of Bordetella pertussis binds to sulfated sugars. **Infect Immun**, v. 64, n. 7, p. 2657-65, Jul 1996.

GEURTSSEN, J. et al. Lipopolysaccharide analogs improve efficacy of acellular pertussis vaccine and reduce type I hypersensitivity in mice. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 7, p. 821-9, Jul 2007.

_____. Identification of a Novel Lipopolysaccharide Core Biosynthesis Gene Cluster in Bordetella pertussis, and Influence of Core Structure and Lipid A Glucosamine Substitution on Endotoxic Activity ▽. In: (Ed.). **Infect Immun**, v.77, 2009. p.2602-11.

_____. Expression of the lipopolysaccharide-modifying enzymes PagP and PagL modulates the endotoxic activity of Bordetella pertussis. **Infect Immun**, v. 74, n. 10, p. 5574-85, Oct 2006.

_____. Consequences of the expression of lipopolysaccharide-modifying enzymes for the efficacy and reactogenicity of whole-cell pertussis vaccines. **Microbes Infect**, v. 9, n. 9, p. 1096-103, Jul 2007.

GLASER, P. et al. Bordetella pertussis adenylate cyclase: the gene and the protein. **Tokai J Exp Clin Med**, v. 13 Suppl, p. 239-52, 1988.

_____. Identification of residues essential for catalysis and binding of calmodulin in Bordetella pertussis adenylate cyclase by site-directed mutagenesis. **Embo j**, v. 8, n. 3, p. 967-72, Mar 1989.

GOLDMAN, W. E.; COOKSON, B. T. Structure and functions of the Bordetella tracheal cytotoxin. **Tokai J Exp Clin Med**, v. 13 Suppl, p. 187-91, 1988.

GRAF, R.; CODINA, J.; BIRNBAUMER, L. Peptide inhibitors of ADP-ribosylation by pertussis toxin are substrates with affinities comparable to those of the trimeric GTP-binding proteins. **Mol Pharmacol**, v. 42, n. 5, p. 760-4, Nov 1992.

GRODOWSKA, K.; PARCZEWSKI, A. Organic solvents in the pharmaceutical industry. **Acta Pol Pharm**, v. 67, n. 1, p. 3-12, Jan-Feb 2010.

GROSS, R.; KEIDEL, K.; SCHMITT, K. Resemblance and divergence: the "new" members of the genus *Bordetella*. **Med Microbiol Immunol**, v. 199, n. 3, p. 155-63, Aug 2010.

GUIZO, N. *Bordetella pertussis* and pertussis vaccines. **Clin Infect Dis**, v. 49, n. 10, p. 1565-9, Nov 15 2009.

GUIZO, N.; SZATANIK, M.; ROCANCOURT, M. Protective activity of *Bordetella* adenylate cyclase-hemolysin against bacterial colonization. **Microb Pathog**, v. 11, n. 6, p. 423-31, Dec 1991.

HACKETT, M. et al. Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. **Science**, v. 266, n. 5184, p. 433-5, Oct 21 1994. ISSN 0036-8075

HANKINS, J. V. et al. The outer membrane of Gram-negative bacteria: lipid A isolation and characterization. **Methods Mol Biol**, v. 966, p. 239-258, 2013.

HARVILL, E. T. et al. Probing the function of *Bordetella bronchiseptica* adenylate cyclase toxin by manipulating host immunity. **Infect Immun**, v. 67, n. 3, p. 1493-500, Mar 1999.

HAZENBOS, W. L. et al. *Bordetella pertussis* fimbriae bind to human monocytes via the minor fimbrial subunit FimD. **J Infect Dis**, v. 171, n. 4, p. 924-9, Apr 1995.

_____. Binding of FimD on *Bordetella pertussis* to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases. **J Immunol**, v. 155, n. 8, p. 3972-8, Oct 15 1995.

HEININGER, U. et al. Clinical characteristics of illness caused by *Bordetella parapertussis* compared with illness caused by *Bordetella pertussis*. **Pediatr Infect Dis J**, v. 13, n. 4, p. 306-9, Apr 1994.

HENDERSON, M. W. et al. Contribution of Bordetella filamentous hemagglutinin and adenylate cyclase toxin to suppression and evasion of interleukin-17-mediated inflammation. **Infect Immun**, v. 80, n. 6, p. 2061-75, Jun 2012.

HEWLETT, E. L. Pertussis: current concepts of pathogenesis and prevention. **Pediatr Infect Dis J**, v. 16, n. 4 Suppl, p. S78-84, Apr 1997.

HEWLETT, E. L. et al. Pertussis pathogenesis--what we know and what we don't know. **J Infect Dis**, v. 209, n. 7, p. 982-5, Apr 1 2014.

HO, P. L. et al. Economical value of vaccines for the developing countries--the case of Instituto Butantan, a public institution in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 11, p. e1300, Nov 2011.

HONG, J. Y. Update on pertussis and pertussis immunization. **Korean J Pediatr**, v. 53, n. 5, p. 629-33, May 2010. I

HORIGUCHI, Y.; NAKAI, T.; KUME, K. Effects of Bordetella bronchiseptica dermonecrotic toxin on the structure and function of osteoblastic clone MC3T3-e1 cells. **Infect Immun**, v. 59, n. 3, p. 1112-6, Mar 1991.

HORIGUCHI, Y. et al. Effects of Bordetella bronchiseptica dermonecrotizing toxin on bone formation in calvaria of neonatal rats. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 12, n. 1, p. 29-32, Sep 1995.

IMAIZUMI, A.; SUZUKI, Y.; SATO, Y. [Protective effects of human gamma globulin preparations against experimental aerosol infections of mice with Bordetella pertussis]. **Kansenshogaku Zasshi**, v. 58, n. 6, p. 518-24, Jun 1984.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, E. **Impurities: Guideline for Residual Solvents : ICH. ICH HARMONISED GUIDELINE**. AGENCY, E.-E. M. 2018.

ISOBE, T. et al. Bordetella pertussis waaA encodes a monofunctional 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase that can complement an Escherichia coli waaA mutation. **J Bacteriol**, v. 181, n. 8, p. 2648-51, Apr 1999.

JOLLEY, K. A.; MAIDEN, M. C. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 595, Dec 10 2010.

JUNG, S. O. et al. Multilocus Sequence Analysis of Housekeeping Genes and Antigenic Determinant Genes in *Bordetella pertussis* Strains Isolated in Korea. **Osong Public Health Res Perspect**, v. 2, n. 2, p. 115-26, Sep 2011.

KAMANOVA, J. et al. Adenylate cyclase toxin subverts phagocyte function by RhoA inhibition and unproductive ruffling. **J Immunol**, v. 181, n. 8, p. 5587-97, Oct 15 2008.

KENDRICK, P.; ELDERING, G. Progress Report on Pertussis Immunization *. **Am J Public Health Nations Health**, v. 26, n. 1, p. 8-12, Jan 1936.

KILGORE, P. E. et al. Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. **Clin Microbiol Rev**, v. 29, n. 3, p. 449-86, Jul 2016.

KIM, S. H. et al. An msbB Homologue Carried in Plasmid pO157 Encodes an Acyltransferase Involved in Lipid A Biosynthesis in *Escherichia coli* O157:H7. In: (Ed.). **Infect Immun**, v.72, 2004. p.1174-80. ISBN 0019-9567 (Print)1098-5522 (Electronic).

KIMURA, A. et al. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. **Infect Immun**, v. 58, n. 1, p. 7-16, Jan 1990.

KIRIMANJESWARA, G. S. et al. Pertussis toxin inhibits neutrophil recruitment to delay antibody-mediated clearance of *Bordetella pertussis*. **J Clin Invest**, v. 115, n. 12, p. 3594-601, Dec 2005.

KLEIN, N. P. et al. Waning protection after fifth dose of acellular pertussis vaccine in children. **N Engl J Med**, v. 367, n. 11, p. 1012-9, Sep 13 2012.

LACEY, B. W. Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. **J Hyg (Lond)**, v. 58, p. 57-93, Mar 1960.

LADANT, D. et al. Characterization of the calmodulin-binding and of the catalytic domains of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. **J Biol Chem**, v. 264, n. 7, p. 4015-20, Mar 5 1989.

LEE, C. H.; TSAI, C. M. Quantification of bacterial lipopolysaccharides by the purpald assay: measuring formaldehyde generated from 2-keto-3-deoxyoctonate and heptose at the inner core by periodate oxidation. **Anal Biochem**, v. 267, n. 1, p. 161-8, Feb 1 1999.

LEININGER, E. et al. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing Bordetella pertussis surface protein that promotes adherence of mammalian cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 2, p. 345-9, Jan 15 1991.

LI, Y. et al. LPS remodeling is an evolved survival strategy for bacteria. 2012-05-29 2012.

LIKO, J.; ROBISON, S. G.; CIESLAK, P. R. Priming with whole-cell versus acellular pertussis vaccine. **N Engl J Med**, v. 368, n. 6, p. 581-2, Feb 2013.

LIVEY, I.; WARDLAW, A. C. Production and properties of Bordetella pertussis heat-labile toxin. **J Med Microbiol**, v. 17, n. 1, p. 91-103, Feb 1984.

LOCHT, C. Molecular aspects of Bordetella pertussis pathogenesis. **Int Microbiol**, v. 2, n. 3, p. 137-44, Sep 1999.

_____. A common vaccination strategy to solve unsolved problems of tuberculosis and pertussis? **Microbes Infect**, v. 10, n. 9, p. 1051-6, Jul 2008.

_____. Will we have new pertussis vaccines? **Vaccine**, Nov 24 2017.

LOCHT, C.; ANTOINE, R.; JACOB-DUBUISSON, F. Bordetella pertussis, molecular pathogenesis under multiple aspects. **Curr Opin Microbiol**, v. 4, n. 1, p. 82-9, Feb 2001.

LOCHT, C.; COUTTE, L.; MIELCAREK, N. The ins and outs of pertussis toxin. **FEBS J**, v. 278, n. 23, p. 4668-82, Dec 2011.

MA, H. et al. Modeling Diversity in Structures of Bacterial Outer Membrane Lipids. **J Chem Theory Comput**, v. 13, n. 2, p. 811-824, Feb 2017.

MACARTHUR, I. et al. IEIIS Meeting minireview: Bordetella evolution: lipid A and Toll-like receptor 4. **J Endotoxin Res**, v. 13, n. 4, p. 243-7, 2007.

MAESHIMA, N.; FERNANDEZ, R. C. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 3, p. 3, 2013.

MAIDEN, M. C. Multilocus sequence typing of bacteria. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 561-88, 2006.

MAIDEN, M. C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 6, p. 3140-5, Mar 1998.

MARR, N. et al. Substitution of the Bordetella pertussis Lipid A Phosphate Groups with Glucosamine Is Required for Robust NF- κ B Activation and Release of Proinflammatory Cytokines in Cells Expressing Human but Not Murine Toll-Like Receptor 4-MD-2-CD14 γ . In: (Ed.). **Infect Immun**, v.78, 2010.

_____. Variability in the lipooligosaccharide structure and endotoxicity among Bordetella pertussis strains. **J Infect Dis**, v. 202, n. 12, p. 1897-906, Dec 15 2010.

MARTIN, S. W. et al. Pertactin-negative Bordetella pertussis strains: evidence for a possible selective advantage. **Clin Infect Dis**, v. 60, n. 2, p. 223-7, Jan 15 2015.

MATOS, D. C. S. et al. Comparative analysis of the intracerebral mouse protection test and serological method for potency assays of pertussis component in DTP vaccine. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 429-431, 06/2012

MATTOO, S.; CHERRY, J. D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to Bordetella pertussis and other Bordetella subspecies. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 2, p. 326-82, Apr 2005.

MCGUIRK, P.; MCCANN, C.; MILLS, K. H. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by Bordetella pertussis. **J Exp Med**, v. 195, n. 2, p. 221-31, Jan 21 2002.

MCGUIRK, P.; MILLS, K. H. A regulatory role for interleukin 4 in differential inflammatory responses in the lung following infection of mice primed with Th1- or Th2-inducing pertussis vaccines. **Infect Immun**, v. 68, n. 3, p. 1383-90, Mar 2000.

MCLAFFERTY, M. A.; HARCUS, D. R.; HEWLETT, E. L. Nucleotide sequence and characterization of a repetitive DNA element from the genome of Bordetella pertussis with characteristics of an insertion sequence. **J Gen Microbiol**, v. 134, n. 8, p. 2297-306, Aug 1988.

MELVIN, J. A. et al. Bordetella pertussis pathogenesis: current and future challenges. **Nat Rev Microbiol**, v. 12, n. 4, p. 274-88, Apr 2014. ISSN 1740-1526.

_____. New Insight into Filamentous Hemagglutinin Secretion Reveals a Role for Full-Length FhaB in Bordetella Virulence. **MBio**, v. 6, n. 4, Aug 18 2015.

MERKEL, T. J. et al. Analysis of bvgR expression in Bordetella pertussis. **J Bacteriol**, v. 185, n. 23, p. 6902-12, Dec 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. D. V. E. S. caderno 3 - Pertussis - Difteria e Parotidite infecciosa. In: SAÚDE., M. D. (Ed.). **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasil, 2009.

_____. **Manual de Vigilância Epidemiológica de Eventos Adversos Pós-Vacinação**. Brasil, p.249. 2014

_____. **Coqueluche no Brasil: análise da situação epidemiológica de 2010 a 2014**. Brasil. 2015

MOOI, F. R. Bordetella pertussis and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. **Infect Genet Evol**, v. 10, n. 1, p. 36-49, 2010.

MOOI, F. R. et al. Characterization of fimbrial subunits from Bordetella species. **Microb Pathog**, v. 2, n. 6, p. 473-84, Jun 1987.

MOOI, F. R.; VAN LOO, I. H.; KING, A. J. Adaptation of Bordetella pertussis to vaccination: a cause for its reemergence? **Emerg Infect Dis**, v. 7, n. 3 Suppl, p. 526-8, 2001.

MOOI, F. R. et al. Bordetella pertussis strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 8, p. 1206-13, Aug 2009.

_____. Polymorphism in the Bordetella pertussis virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. **Infect Immun**, v. 66, n. 2, p. 670-5, Feb 1998.

MU, H. H.; COOLEY, M. A.; SEWELL, W. A. Studies on the lymphocytosis induced by pertussis toxin. **Immunol Cell Biol**, v. 72, n. 3, p. 267-70, Jun 1994.

MUELLER, M. et al. Aggregates are the biologically active units of endotoxin. **J Biol Chem**, v. 279, n. 25, p. 26307-13, Jun 18 2004.

MUNFORD, R. S. Sensing Gram-Negative Bacterial Lipopolysaccharides: a Human Disease Determinant? ▽ . **Infect Immun**, v. 76, n. 2, p. 454-65, 2008.

MUNOZ, J. J.; PEACOCK, M. G. Role of pertussigen (pertussis toxin) on the mouse protective activity of vaccines made from Bordetella species. **Microbiol Immunol**, v. 33, n. 4, p. 341-55, 1989.

NEEDHAM, B. D. et al. Modulating the innate immune response by combinatorial engineering of endotoxin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 4, p. 1464-9, Jan 22 2013.

ODA, M. et al. Antibodies to Bordetella pertussis in human colostrum and their protective activity against aerosol infection of mice. **Infect Immun**, v. 47, n. 2, p. 441-5, Feb 1985.

OTSUKA, N. et al. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient Bordetella pertussis in Japan. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31985, 2012. ISSN 1932-6203.

PACCANI, S. R. et al. Suppression of T-lymphocyte activation and chemotaxis by the adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis. **Infect Immun**, v. 76, n. 7, p. 2822-32, Jul 2008.

PACKARD, E. R. et al. Sequence variation and conservation in virulence-related genes of Bordetella pertussis isolates from the UK. **J Med Microbiol**, v. 53, n. Pt 5, p. 355-65, May 2004.

PARKHILL, J. et al. Comparative analysis of the genome sequences of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica. **Nat Genet**, v. 35, n. 1, p. 32-40, Sep 2003.

PARTON, R. Review of the biology of Bordetella pertussis. **Biologicals**, v. 27, n. 2, p. 71-6, 1999.

PEPPLER, M. S. Two physically and serologically distinct lipopolysaccharide profiles in strains of Bordetella pertussis and their phenotype variants. **Infect Immun**, v. 43, n. 1, p. 224-32, Jan 1984.

PITTMAN, M. Pertussis toxin: the cause of the harmful effects and prolonged immunity of whooping cough. A hypothesis. **Rev Infect Dis**, v. 1, n. 3, p. 401-12, May-Jun 1979.

_____. The concept of pertussis as a toxin-mediated disease. **Pediatr Infect Dis**, v. 3, n. 5, p. 467-86, Sep-Oct 1984.

PITTMAN, M.; GARDNER, R. A.; MARSHALL, J. F. Evaluation of the potency of antipertussis serum products. **J Biol Stand**, v. 7, n. 3, p. 263-273, Jul 1979.

Placebo-controlled trial of two acellular pertussis vaccines in Sweden--protective efficacy and adverse events. Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines. **Lancet**, v. 1, n. 8592, p. 955-60, Apr 30 1988.

PLOTKIN, S. A. The pertussis problem. **Clin Infect Dis**, v. 58, n. 6, p. 830-3, Mar 2014.

POULAIN-GODEFROY, O. et al. Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin delivered by mucosal routes enhances immunoglobulin levels in serum and mucosal fluids. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 54, n. 1, p. 129-36, Oct 2008.

PRESTON, A. et al. Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in bordetellae. **Infect Immun**, v. 67, n. 8, p. 3763-7, Aug 1999.

PRESTON, A.; MASKELL, D. The molecular genetics and role in infection of lipopolysaccharide biosynthesis in the Bordetellae. **J Endotoxin Res**, v. 7, n. 4, p. 251-61, 2001.

PRESTON, A. et al. Bordetella bronchiseptica PagP is a Bvg-regulated lipid A palmitoyl transferase that is required for persistent colonization of the mouse respiratory tract. **Mol Microbiol**, v. 48, n. 3, p. 725-36, May 2003.

PRESTON, A.; THOMAS, R.; MASKELL, D. J. Mutational analysis of the Bordetella pertussis wlb LPS biosynthesis locus. **Microb Pathog**, v. 33, n. 3, p. 91-5, Sep 2002.

QUEENAN, A. M. et al. The mouse intranasal challenge model for potency testing of whole-cell pertussis vaccines. **Expert Rev Vaccines**, v. 13, n. 10, p. 1265-70, Oct 2014.

QUINLAN, T. et al. Pertactin-negative variants of *Bordetella pertussis* in New York State: a retrospective analysis, 2004-2013. **Mol Cell Probes**, v. 28, n. 4, p. 138-40, Aug 2014.

RAETZ, C. R. et al. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. **Annu Rev Biochem**, v. 76, p. 295-329, 2007.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 635-700, 2002.

RAPPUOLI, R. Pathogenicity mechanisms of *Bordetella*. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 192, p. 319-36, 1994.

ROBBINS, J. B. et al. Primum non nocere: a pharmacologically inert pertussis toxoid alone should be the next pertussis vaccine. **Pediatr Infect Dis J**, v. 12, n. 10, p. 795-807, Oct 1993.

ROBINSON, A.; FUNNELL, S. G. Potency testing of acellular pertussis vaccines. **Vaccine**, v. 10, n. 3, p. 139-41, 1992.

ROMANUS, V.; JONSELL, R.; BERGQUIST, S. O. Pertussis in Sweden after the cessation of general immunization in 1979. **Pediatr Infect Dis J**, v. 6, n. 4, p. 364-71, Apr 1987.

ROSENTHAL, R. S. et al. Major fragment of soluble peptidoglycan released from growing *Bordetella pertussis* is tracheal cytotoxin. **Infect Immun**, v. 55, n. 9, p. 2117-20, Sep 1987.

ROSS, P. J. et al. Relative Contribution of Th1 and Th17 Cells in Adaptive Immunity to *Bordetella pertussis*: Towards the Rational Design of an Improved Acellular Pertussis Vaccine. In: (Ed.). **PLoS Pathog**, v.9, 2013. ISBN 1553-7366 (Print)1553-7374 (Electronic).

SAKAMOTO, H. et al. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. **J Biol Chem**, v. 267, n. 19, p. 13598-602, Jul 5 1992.

SATO, H. [Virulence factors of *Bordetella pertussis*]. **Nihon Saikingaku Zasshi**, v. 51, n. 3, p. 737-44, Aug 1996.

SATO, H.; SATO, Y. Bordetella pertussis infection in mice: correlation of specific antibodies against two antigens, pertussis toxin, and filamentous hemagglutinin with mouse protectivity in an intracerebral or aerosol challenge system. **Infect Immun**, v. 46, n. 2, p. 415-21, Nov 1984. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567.

_____. Japanese acellular pertussis vaccine. **Ann Sclavo Collana Monogr**, v. 3, n. 1-2, p. 191-7, 1986.

SATO, Y. et al. Separation and purification of the hemagglutinins from Bordetella pertussis. **Infect Immun**, v. 41, n. 1, p. 313-20, Jul 1983.

SATO, Y.; SATO, H. Development of acellular pertussis vaccines. **Biologicals**, v. 27, n. 2, p. 61-9, Jun 1999.

SHELLER, E. V.; COTTER, P. A. Bordetella filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential. **Pathog Dis**, v. 73, n. 8, p. ftv079, Nov 2015.

SCHMIDT, G. et al. Identification of the C-terminal part of Bordetella dermonecrotic toxin as a transglutaminase for rho GTPases. **J Biol Chem**, v. 274, n. 45, p. 31875-81, Nov 5 1999.

SEKURA, R. D. et al. Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. **J Biol Chem**, v. 258, n. 23, p. 14647-51, Dec 10 1983.

SHAH, N. R. et al. Minor modifications to the phosphate groups and the C3' acyl chain length of lipid A in two Bordetella pertussis strains, BP338 and 18-323, independently affect Toll-like receptor 4 protein activation. **J Biol Chem**, v. 288, n. 17, p. 11751-60, Apr 26 2013.

SHAPIRO-SHAPIN, C. G. Pearl Kendrick, Grace Eldering, and the pertussis vaccine. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 8, p. 1273-8, Aug 2010.

SHERIDAN, S. L. et al. Waning vaccine immunity in teenagers primed with whole cell and acellular pertussis vaccine: recent epidemiology. **Expert Rev Vaccines**, v. 13, n. 9, p. 1081-106, Sep 2014.

_____. Acellular pertussis vaccine effectiveness for children during the 2009-2010 pertussis epidemic in Queensland. **Med J Aust**, v. 200, n. 6, p. 334-8, Apr 7 2014. ISSN 0025-729x.

SISTI, F. et al. In vitro and in vivo characterization of a Bordetella bronchiseptica mutant strain with a deep rough lipopolysaccharide structure. **Infect Immun**, v. 70, n. 4, p. 1791-8, Apr 2002.

SIZAIRE, V. et al. Increase of pertussis incidence in 2010 to 2012 after 12 years of low circulation in Spain. **Euro Surveill**, v. 19, n. 32, 2014.

SMITH, A. M.; GUZMAN, C. A.; WALKER, M. J. The virulence factors of Bordetella pertussis: a matter of control. **FEMS Microbiol Rev**, v. 25, n. 3, p. 309-33, May 2001.

SMITS, K. et al. Different T cell memory in preadolescents after whole-cell or acellular pertussis vaccination. **Vaccine**, v. 32, n. 1, p. 111-8, Dec 17 2013.

SOUDER, E.; LONG, S. S. Pertussis in the Era of New Strains of Bordetella pertussis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 29, n. 4, p. 699-713, Dec 2015.

SPANGRUDE, G. J.; ARANEO, B. A.; DAYNES, R. A. Site-selective homing of antigen-primed lymphocyte populations can play a crucial role in the efferent limb of cell-mediated immune responses in vivo. **J Immunol**, v. 134, n. 5, p. 2900-7, May 1985.

SPANGRUDE, G. J. et al. Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. **J Immunol**, v. 135, n. 6, p. 4135-43, Dec 1985.

STEIN, P. E. et al. Structure of a pertussis toxin-sugar complex as a model for receptor binding. **Nat Struct Biol**, v. 1, n. 9, p. 591-6, Sep 1994.

STOCKBAUER, K. E. et al. Identification and characterization of BipA, a Bordetella Bvg-intermediate phase protein. **Mol Microbiol**, v. 39, n. 1, p. 65-78, Jan 2001.

TAMURA, M. et al. Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. **Biochemistry**, v. 21, n. 22, p. 5516-22, Oct 26 1982.

TAPPING, R. I. et al. Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for Escherichia and Salmonella lipopolysaccharides. **J Immunol**, v. 165, n. 10, p. 5780-7, Nov 15 2000.

THOMAS, M. G. et al. Serum IgG, IgA, and IgM responses to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and agglutinogens 2 and 3 after infection with Bordetella pertussis and immunization with whole-cell pertussis vaccine. **J Infect Dis**, v. 160, n. 5, p. 838-45, Nov 1989.

TROLLFORS, B. et al. A placebo-controlled trial of a pertussis-toxoid vaccine. **N Engl J Med**, v. 333, n. 16, p. 1045-50, Oct 19 1995.

TSANG, R. S. et al. 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. **Int J Infect Dis**, v. 28, p. 65-9, Nov 2014.

TSUNEYOSHI, N. et al. Penta-acylated lipopolisaccharide binds to murine MD-2 but does not induce the oligomerization of TLR4 required for signal transduction. **Cell Immunol**, v. 244, n. 1, p. 57-64, Nov 2006.

UHL, M. A.; MILLER, J. F. BvgAS is sufficient for activation of the Bordetella pertussis ptx locus in Escherichia coli. **J Bacteriol**, v. 177, n. 22, p. 6477-85, Nov 1995.

ULLOA-GUTIERREZ, R.; AVILA-AGUERO, M. L. Pertussis in Latin America: current situation and future vaccination challenges. **Expert Rev Vaccines**, v. 7, n. 10, p. 1569-80, Dec 2008.

VAN AMERSFOORTH, S. C. et al. Analysis of Bordetella pertussis populations in European countries with different vaccination policies. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 6, p. 2837-43, Jun 2005.

VAN DER ARK, A. et al. Development of pertussis serological potency test. Serological assessment of antibody response induced by whole cell vaccine as an alternative to mouse protection in an intracerebral challenge model. **Biologicals**, v. 22, n. 3, p. 233-42, Sep 1994.

_____. Pertussis serological potency test as an alternatively to the intracerebral mouse protection test. **Dev Biol Stand**, v. 86, p. 271-81, 1996.

VAN DER ARK, A.; VON STRAATEN-VAN DE KAPPELLE, I. I.; HENDRIKSEN, C. F. Pertussis Serological Potency Test as an Alternative to the Intracerebral Mouse Protection Test: Development, Evaluation and Validation. **Altex**, v. 15, n. 5, p. 33-36, 1998.

VAN DER LEY, P.; STEEGHS, L. Construction of LPS mutants. **Methods Mol Med**, v. 66, p. 155-65, 2001.

VAN LOO, I. H. et al. Multilocus sequence typing of Bordetella pertussis based on surface protein genes. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 6, p. 1994-2001, Jun 2002.

VAN STRAATEN-VAN DE KAPPELLE, I. et al. Collaborative study on test systems to assess toxicity of whole cell pertussis vaccine. **Biologicals**, v. 25, n. 1, p. 41-57, Mar 1997.

VILLARINO ROMERO, R. et al. Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin itself does not trigger anti-inflammatory interleukin-10 production by human dendritic cells. **Int J Med Microbiol**, v. 306, n. 1, p. 38-47, Jan 2016. ISSN 1438-4221.

VILLARINO ROMERO, R.; OSICKA, R.; SEBO, P. Filamentous hemagglutinin of Bordetella pertussis: a key adhesin with immunomodulatory properties? **Future Microbiol**, v. 9, n. 12, p. 1339-60, 2014.

VON HUNOLSTEIN, C. et al. Evaluation of two serological methods for potency testing of whole cell pertussis vaccines. **Pharmeuropa Bio**, v. 2008, n. 1, p. 7-18, Dec 2008.

WARFEL, J. M.; MERKEL, T. J. The baboon model of pertussis: effective use and lessons for pertussis vaccines. **Expert Rev Vaccines**, v. 13, n. 10, p. 1241-52, Oct 2014.

WARFEL, J. M.; ZIMMERMAN, L. I.; MERKEL, T. J. 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**, v. 111, n. 2, p. 787-92, Jan 14 2014. I

WATANABE, M. et al. Biological properties of lipopolysaccharides from Bordetella species. **J Gen Microbiol**, v. 136, n. 3, p. 489-93, Mar 1990.

WEIGAND, M. R. et al. The History of Bordetella pertussis Genome Evolution Includes Structural Rearrangement. **J Bacteriol**, v. 199, n. 8, Apr 15 2017.

_____. Complete Genome Sequences of Bordetella pertussis Vaccine Reference Strains 134 and 10536. **Genome Announc**, v. 4, n. 5, Sep 15 2016.

WILLEMS, R. J. et al. Mutational analysis of the Bordetella pertussis fim/fha gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA. **Mol Microbiol**, v. 11, n. 2, p. 337-47, Jan 1994.

WILSON, B. A. et al. **Bacterial Pathogenesis**. American Society of Microbiology, 2011. Disponível em: <
<http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555816162>>.

WITT, M. A.; KATZ, P. H.; WITT, D. J. Unexpectedly limited durability of immunity following acellular pertussis vaccination in preadolescents in a North American outbreak. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 12, p. 1730-5, Jun 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. The immunological basis for immunization series: module 4: pertussis - Update 2009. 2010 2010. Disponível em: <
<http://apps.who.int/iris/handle/10665/44311?mode=simple>>.

_____. **Pertussis vaccines: WHO position paper**. p. 433–460. 2015

XING, D. et al. Developments in reduction and replacement of in vivo toxicity and potency tests for pertussis vaccines. **Dev Biol (Basel)**, v. 111, p. 57-68, 2002.

ZHANG, S. et al. Complete genome sequence of Bordetella pertussis CS, a Chinese pertussis vaccine strain. **J Bacteriol**, v. 193, n. 15, p. 4017-8, Aug 2011.

ZORZETO, T. Q. et al. Immunogenicity of a whole-cell pertussis vaccine with low lipopolysaccharide content in infants. **Clin Vaccine Immunol**, v. 16, n. 4, p. 544-50, Apr 2009.