

Carolina Salcedo Rivillas

Desenvolvimento de vacinas proteicas contra *Streptococcus pneumoniae*: caracterização dos componentes adjuvantes da vacina celular pertussis e análise de novas combinações vacinais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira

Versão original

São Paulo
2015

RESUMO

Rivillas CS. Desenvolvimento de vacinas proteicas contra *Streptococcus pneumoniae*: caracterização dos componentes adjuvantes da vacina celular pertussis e análise de novas combinações. [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Streptococcus pneumoniae (pneumococo) é uma bactéria gram positiva, responsável por doenças graves como pneumonia, meningite e septicemia que causam a morte de cerca de 1 milhão de crianças menores de 5 anos, a cada ano, no mundo todo. Diversos grupos de pesquisa têm buscado o desenvolvimento de vacinas baseadas em antígenos proteicos como alternativas às vacinas atuais, baseadas em polissacarídeos capsulares, que induzem proteção apenas contra sorotipos presentes nas formulações. Em trabalhos prévios, o nosso grupo demonstrou o potencial protetor de uma formulação vacinal composta pela proteína A da superfície de pneumococo (PspA), usando a vacina celular pertussis (wP, que é parte da vacina tríplice contra difteria, tétano e pertussis, DTPw) como adjuvante. Os resultados mostraram que a indução de altos níveis de anticorpos e a proteção de camundongos, submetidos a diferentes desafios com pneumococo, não é dependente da ação adjuvante do lipopolissacarídeo presente na wP. Neste trabalho, os componentes de *B. pertussis* envolvidos na atividade adjuvante em combinação a PspA do clado 5 (PspA5) foram avaliados através do uso de mutantes de *B. pertussis* com baixa expressão ou ausência de fatores de virulência, ou de alguns componentes purificados da bactéria. Os resultados mostraram que a imunização de camundongos com as formulações contendo a toxina pertussis (PT), tanto através da combinação de PspA5 a *B. pertussis* selvagens ou à PT purificada, induziram os níveis mais altos de anticorpos anti-PspA5 e proteção significativa contra o desafio letal com pneumococo. Através do uso do OligB, uma subunidade de PT que não apresenta atividade enzimática, foi possível observar que a ação adjuvante não depende desta atividade. O papel da IgG anti-PspA5 na proteção induzida pela vacina PspA5-wP foi avaliado através de diferentes experimentos. A imunização de camundongos “knockout”, defectivos para maturação de linfócitos B, com PspA5-wP, não conferiu proteção aos animais contra o desafio letal por pneumococo. Experimentos de imunização passiva com soro ou IgG purificada, derivados de animais imunizados com PspA5-wP, demonstraram o papel protetor da IgG anti-PspA5 neste modelo. Além disso, a imunização passiva de camundongos com o fragmento (Fab')² de IgG, responsável pelo reconhecimento dos antígenos, não foi capaz de proteger os animais contra o desafio por pneumococo. Este resultado indica a importância da porção Fc do anticorpo, responsável pela ligação a componentes do sistema complemento. Apesar dos altos níveis de IgG anti-PspA5 nos animais imunizados com PspA5-wP, a sobrevivência foi abolida após a depleção de proteínas de complemento durante o desafio. Por fim, a vacina BCG, testada como adjuvante em combinação a PspA5, não alterou

significativamente a resposta ao antígeno. Entretanto, experimentos de dose-reforço, utilizando BCG e DTPw combinados a PspA5, apresentaram resultados promissores, induzindo altos níveis de anticorpos anti-PspA5 e proteção contra o desafio invasivo por pneumococo. Os resultados deste trabalho confirmam o potencial uso de vacinas celulares, aprovadas para uso humano, como adjuvantes para PspA. Além disso, contribuem para a compreensão dos mecanismos adjuvantes de *B. pertussis* e dos mecanismos envolvidos na proteção de vacinas compostas pelo antígeno PspA.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*. PspA. *Bordetella pertussis*. Vacinas. Anticorpos. Sistema complemento.

ABSTRACT

Rivillas CS. Development of protein vaccines against *Streptococcus pneumoniae*: characterization of the adjuvant components of the cellular pertussis vaccine and analyze of new vaccine combinations. [Ph. D. thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Streptococcus pneumoniae (pneumococcus) is a gram-positive bacterium that causes serious diseases such as pneumonia, meningitis and septicemia and causes the death of about 1 million children under 5 years, every year, worldwide. Several research groups have sought to develop vaccines based on protein antigens as alternative to current vaccines, which are based in capsular polysaccharide, that induce protection only to serotypes present in the formulations. In previous works, our group demonstrated the protective effect of a vaccine composed by the pneumococcal surface protein A (PspA), using the cellular pertussis vaccine (wP, a part of the trivalent vaccine against diphtheria, tetanus and pertussis, DTPw) as adjuvant. The results showed that the induction of high levels of antibodies and the protection of mice, submitted to different challenges with pneumococci, were not dependent of the adjuvant effect of the lipopolysaccharide contained in wP. In this work, the *B. pertussis* components involved in the adjuvant activity when combined with PspA from clade 5 (PspA5) were evaluated through the use of mutants from *B. pertussis* with low expression or absence of virulence factors, or the use of purified components from the bacterium. The results showed that the immunization of mice with the formulations containing pertussis toxin (PT), by combination of both wild type *B. pertussis* or purified PT with PspA5, induced the highest levels of anti-PspA5 antibodies and significant protection against the pneumococcal lethal challenge. Through the use of OligB, the non-toxic PT subunit, it was possible to determine that the adjuvant activity is not dependent on the enzymatic activity of the toxin. The role of anti-PspA5 IgG on protection induced by the PspA5-wP vaccine was evaluated through different experiments. Immunization of knockout mice, defective for the maturation of B lymphocytes, with PspA5-wP, did not confer protection to mice against the pneumococcal lethal challenge. Experiments of passive immunization with sera or purified IgG, derived from animals immunized with PspA5-wP, demonstrated the protective activity of anti-PspA5 IgG in this model. In addition, passive immunization of mice with the IgG fragment responsible for the recognition of the antigen, (Fab)², did not protect the animals against the pneumococcal challenge.

This result indicates the importance of the Fc fragment, responsible by the binding to complement system components. Despite the high levels of anti-PspA5 IgG in mice immunized with the PspA5-wP vaccine, survival was abolished after the depletion of the complement proteins during the challenge. Finally, the BCG vaccine, tested as adjuvant in combination with PspA5, did not alter significantly the response to the antigen. However, prime-boost experiments, using BCG or DTPw combined to PspA5, presented promising results, inducing high levels of anti-PspA5 antibodies and protection against the pneumococcal invasive challenge. These results confirm the potential use of cell vaccines, approved for use in humans, as adjuvants for PspA. In addition, they contribute to the understanding of the adjuvant mechanisms of *B. pertussis* and the mechanisms involved in the protection stimulated by vaccines composed by the PspA antigen.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*. PspA. *Bordetella pertussis*. Vaccines. Antibodies. Complement system.

1 Introdução

Streptococcus pneumoniae (pneumococo) é uma bactéria gram-positiva encapsulada que em circunstâncias normais mantém um relacionamento comensal com o seu hospedeiro, mas, eventualmente, pode invadir sítios normalmente estéreis causando doenças como a pneumonia, meningite, bacteremia, otite média e sinusite (Klein, 1981; Weiser, 2010). O pneumococo é considerado como uma das bactérias de maior importância clínica que acomete principalmente crianças, idosos e pacientes em condições médicas crônicas ou imunossuprimidos (O'Brien, Wolfson, 2009). Uns dos motivos pelos quais é difícil estabelecer um tratamento efetivo contra a bactéria é o crescimento da resistência a diversos antibióticos, como penicilina, tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol e até mesmo às cefalosporinas de terceira geração (Kim, Song, 2012; Moyo, Steinbakk, 2012).

Mais de 90 sorotipos já foram classificados de acordo com as diferenças na composição química do polissacarídeo que compõe a capsula, e, entre eles, mais de 20 já foram associados a doenças (Dagan, 2009; O'Brien, Wolfson et al., 2009). A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência do pneumococo, auxiliando no escape à fagocitose por células do hospedeiro (Kadioglu, Weiser, 2008). Entretanto, pouca ou nenhuma reatividade cruzada é observada entre os polissacarídeos capsulares.

As vacinas comercialmente disponíveis, constituídas por polissacarídeos capsulares (PS), apresentam limitações como alto custo de produção, limitada cobertura de sorotipos ou baixa imunogenicidade nos grupos com mais alto risco de adquirir doenças pneumocócicas. A vacina Pneumovax 23 (Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ., Brasil), licenciada na década de 80, é composta por polissacarídeos capsulares de 23 sorotipos. A produção desta vacina é dispendiosa, pois envolve a fermentação das 23 cepas de pneumococo e purificação dos seus polissacarídeos. Além disso, por ser composta por polissacarídeos livres, que não são capazes de ativar respostas de células T, esta vacina não é eficaz em crianças menores de dois anos de idade e apresenta eficácia reduzida em idosos, dois grupos de risco para as doenças pneumocócicas. Em 2000, foi licenciada nos Estados Unidos a primeira vacina conjugada contra pneumococo (Prevnar-PCV7, Wyeth Pharmaceuticals, Philadelphia, PA), composta por PS de 7 sorotipos de pneumococo prevalentes nos Estados Unidos, conjugados ao toxóide

diftérico CRM197. Por ter um componente proteico, esta vacina induz imunidade em crianças menores de dois anos e em idosos, mas apresenta cobertura limitada que varia de acordo com sorotipos circulantes nas diferentes partes do mundo. A estimativa de cobertura desta vacina, feita em estudos com isolados dos anos 1977 – 1989 e 1990 – 2000, foi de aproximadamente 39% dos sorotipos patogênicos na África, 48% na Ásia e 53.4% na América Latina e o Caribe e 52% para o Brasil. (Brandileone, de Andrade, 2003; Webster, Theodoratou, 2011). Versões novas de vacinas conjugadas, contendo polissacarídeos de 10 ou 13 sorotipos foram recentemente licenciadas em diferentes partes do mundo e aumentam consideravelmente a cobertura contra os sorotipos causadores de doenças (PCV10, Glaxo Smithkline e PCV13, Wyeth Pharmaceuticals). Em 2010, a PCV10 foi introduzida no calendário Brasileiro de imunizações, sendo indicadas 4 doses para crianças a partir dos dois meses de idade. As estimativas de cobertura no Brasil variam entre aproximadamente 60% e 76%, de acordo com o tipo de amostra e faixa etária analisada (Franco, Andrade, 2010; de, Campos, 2011).

Uma vez que o alvo vacinal usado para o combate do pneumococo de forma sorotipo específica é a cápsula, existem dois importantes eventos possíveis de acontecer como efeito da vacinação: 1) troca capsular (do inglês, *capsularswitching*), ocorrendo quando são trocados os genes que codificam para um sorotipo, mediante os processos de transformação e recombinação, por um outro tipo capsular (Brueggemann, Pai, 2007). O aspecto mais preocupante na ocorrência deste evento é a troca de um sorotipo vacinal por um não vacinal, já que isto facilita a ocorrência de doenças causadas por sorotipos que “escapam” da vacina. 2) substituição de sorotipo (do inglês, *serotype replacement*), refere-se à diminuição na prevalência de sorotipos que são incluídos na vacina, acompanhada por um aumento correspondente de sorotipos não incluídos na vacina, que preenchem o nicho ecológico primeiramente ocupado pelos sorotipos vacinais (Brueggemann, Pai et al., 2007). Em concordância com isto, atualmente alguns estudos têm demonstrado que após a introdução da vacina PCV7 em diferentes países houve um aumento de doenças causadas por sorotipos não presentes nas vacinas (Weinberger, Malley, 2011; Falup-Pecurariu, 2012). Por este motivo, acredita-se que a substituição dos sorotipos pela pressão seletiva exercida pela imunização poderá ocorrer também com as vacinas compostas por 10 ou 13 polissacarídeos. Recentemente foi publicado um estudo conduzido no hospital universitário da Universidade de São Paulo que compara a incidência de doenças pneumocócicas invasivas, distribuição e

resistência a antibióticos antes (janeiro 2006 – junho 2010) e após (julho 2010 – setembro 2012) a introdução da vacina PCV10 no programa de imunização nacional brasileiro (Dos Santos, Passadore, 2013). A incidência de doenças pneumocócicas invasivas a cada 1000 crianças menores de dois anos apresentou uma redução significativa de 20.30 a 3.97 (80%). Para o grupo de crianças entre os 2 e 15 anos, a redução foi de 2.81 a 0.97 e para o grupo com mais de 15 anos a incidência foi inalterada, de 1.72 a 3.16 casos a cada 1000 indivíduos. Estes dados mostram um efeito significativo da vacinação na redução destas doenças. Entretanto, antes da inclusão da vacina os sorotipos mais frequentemente isolados foram o 14, 5, 6B, 12F e 1 e, após a introdução da vacina, os sorotipos mais frequentemente isolados foram o 7F, 8, 12F e 3. Assim, o trabalho sugere que a mudança da prevalência dos sorotipos pode ser um efeito observado também para a vacina PCV10. Novas alternativas que ajudem a contornar estes problemas não só no Brasil, como no mundo todo são necessárias. Entre elas, o desenvolvimento de vacinas baseadas em antígenos proteicos tem sido estudado por diversos grupos (Miyaji, Oliveira, 2013).

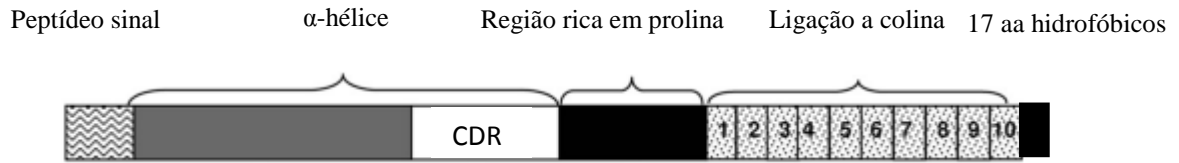
Estudos de possíveis candidatos a antígenos protetores contra o pneumococo têm identificado muitas proteínas que podem ser usadas como componentes vacinais (Tai, 2006; Kadioglu, Weiser et al., 2008; Miyaji, Oliveira et al., 2013). Entre eles, a Proteína A da Superfície de Pneumococo (PspA) é possivelmente a mais estudada.

1.1 Proteína A da superfície de pneumococo (PspA) como candidato vacinal

A PspA é constituída por 5 domínios: um peptídeo sinal, um domínio α -hélice, variável tanto no comprimento como na sequência de aminoácidos, uma região rica em prolina que se prolonga até a parede celular, um domínio de ligação a colina que ancora a proteína à superfície celular e, por último, a cauda C-terminal de 17 aminoácidos hidrofóbicos (Hollingshead, Becker, 2000) (Figura 1). A região N-terminal está exposta na superfície da bactéria e anticorpos produzidos contra esta porção são protetores (McDaniel, Ralph, 1994). Entretanto, esta região apresenta variabilidade antigênica e foi usada por Hollingshead e colaboradores para o agrupamento das moléculas. De acordo com a similaridade na sequência de aminoácidos da região CDR (do inglês “clade defining region”) presente no final da porção N-terminal, as PspAs foram agrupadas em

6 clados, os quais, por sua vez, foram agrupados em três famílias. A família 1 é composta pelos clados 1 e 2, a família 2 pelos clados 3, 4 e 5 e a família 3 pelo clado 6 (Hollingshead, Becker et al., 2000). A distribuição de PspA nos isolados de pneumococo de diferentes partes do mundo é similar, sendo que aproximadamente 50% dos isolados expressam PspAs da família 1 e 50% expressam PspAs da família 2. Os PspAs da família 3 estão raramente presentes (Vela Coral, Fonseca, 2001; Brandileone, Andrade, 2004; Hollingshead, Baril, 2006; Pimenta, Ribeiro-Dias, 2006). Em geral, anticorpos produzidos contra PspA são capazes de reconhecer moléculas da mesma família (Tart, McDaniel, 1996), sugerindo que composições vacinais compostas por um PspA da família 1 e um PspA da família 2 seriam potencialmente capazes de proteger contra a grande maioria de isolados de pneumococo. Mais recentemente, foram isoladas duas moléculas de PspA, uma do clado 4 e outra do clado 5, que foram capazes de induzir anticorpos com reatividade abrangente, que reconhecem PspAs de famílias heterólogas, expressos por diferentes isolados de pneumococo (Darrieux, Moreno, 2008; Moreno, Oliveira, 2010). Estas observações têm grande importância para o desenvolvimento de vacinas compostas por PspA, já que análises de sequenciamento de mais de 200 isolados mostraram a plasticidade do genoma da bactéria em resposta a pressões do sistema imune e intervenções clínicas, como o uso de antibióticos e vacinas. Estes estudos apontam o locus do *pspA* como uma região de altos índices de recombinação, sugerindo que mutações podem surgir após a introdução de vacinas baseadas neste antígeno (Croucher, Harris, 2011).

Um dos mecanismos pelo qual a PspA participa na virulência do pneumococo é a capacidade de se ligar à apolactoferrina presente nas secreções de mucosas, inibindo assim, sua atividade bactericida (Shaper, Hollingshead, 2004). Além disso, a expressão da PspA na superfície do pneumococo inibe a deposição do componente C3b na bactéria, facilitando o escape do sistema imune (Tu, Fulgham, 1999; Ren, McCrory, 2004). Anticorpos anti-PspA são capazes de reverter a inibição da deposição do complemento (Ren, Szalai, 2004), mediando, desta forma a opsonização e fagocitose (Ren, Li, 2012).



Adaptado de (Moreno, Oliveira et al., 2010)

Figura 1. Representação esquemática da proteína PspA de *Streptococcus pneumoniae* e seus domínios.

PspA tem sido amplamente estudada como candidato vacinal. Diferentes formulações vacinais baseadas em PspA se mostraram eficazes em modelos animais de infecção pneumocócica. Estas estratégias vacinais incluem sistemas de entrega e apresentação de antígenos, combinações com adjuvantes e diferentes vias de inoculação (Miyaji, Oliveira et al., 2013). Em um estudo recente, nanopartículas constituídas por polianidrido foram usadas para encapsular PspA. A proteína encapsulada preservou a capacidade de ligação à apolactoferrina e inibição de sua atividade bactericida. Este sistema, quando administrado em camundongos pela via subcutânea, foi capaz de estimular altos níveis de anticorpos anti-PspA com alta avidéz no reconhecimento do antígeno. (Haughney, Petersen, 2013). Em uma estratégia similar PspA foi encapsulado em nano-gel e administrado por via nasal em camundongos (Kong, Sato, 2013). A imunização foi capaz de induzir altos níveis de IgG anti-PspA circulantes e IgA anti-PspA no trato respiratório dos animais. Esta vacina conferiu proteção dos camundongos contra um desafio letal com *S. pneumoniae*.

Estudos com vacina de DNA e adjuvantes combinados a PspA recombinante foram importantes para determinar a qualidade da resposta imune efetora. Vacinas de DNA expressando PspA, apesar de não induzirem níveis de anticorpos tão altos quanto a PspA recombinante combinada ao adjuvante hidróxido de alumínio, são capazes de direcionar a resposta imune para o tipo Th1, com uma proporção equilibrada dos subtipos de IgG, IgG1 e IgG2a, além da secreção de IFN- γ . A presença de IgG2a no soro favorece a deposição de complemento na superfície da bactéria em ensaios *in vitro* e, esta resposta é mais eficaz na proteção contra modelos de desafio invasivos e de colonização por *S. pneumoniae* em camundongos (Ferreira, Darrieux, 2008; Ferreira,

Oliveira, 2010). Da mesma forma, o uso de vetores vivos, como linhagens de *Salmonella* e de bactérias ácido-láticas, para a apresentação de PspA em ensaios de imunização em camundongos, podem direcionar a resposta imune para o tipo Th1, com secreção de IFN- γ . Estas estratégias têm ainda em comum a vantagem de induzirem resposta imune de mucosa (Kang, Srinivasan, 2002; Hanniffy, Carter, 2007; Ferreira, Darrieux, 2009; Li, Wang, 2009; Xin, Li, 2009). Em *Salmonella*, também foram expressas proteínas de fusão compostas por porções N-terminais de PspAs das famílias 1 e 2. Estas construções, quando utilizadas para imunização de camundongos BALB/c por via oral, foram capazes de gerar resposta imune contra PspAs heterólogos, estendendo a proteção dos animais contra desafios com diferentes linhagens de pneumococo (Xin, Li et al., 2009). Resultados semelhantes, com indução de altos níveis de anticorpos e resposta do tipo Th1, podem ser alcançados com o uso de adjuvantes específicos. A imunização de camundongos com PspA em combinação com a citocina IL-12 por via nasal, foi capaz de induzir níveis mais altos de IgG1, IgG2a e IgA anti-PspA do que a proteína sozinha. O soro dos animais imunizados com PspA combinado a IL-12 levou a um aumento da deposição de complemento na superfície da bactéria, *in vitro*, e fagocitose por macrófagos em cultura. A purificação dos componentes deste soro mostrou que este efeito é devido principalmente à presença de IgG2a anti-PspA (Arulanandam, Lynch, 2001). Diferentes agonistas de receptores de reconhecimento padrão (do inglês “*Toll-like receptors – TLR*”) também foram testados como adjuvantes em combinação a PspA. A imunização de camundongos por via nasal com estas formulações foi capaz de diminuir a colonização do trato respiratório superior e inferior dos animais por pneumococo (Arulanandam, Lynch et al., 2001; Oma, Zhao, 2009).

Assim, a indução de altos níveis de anticorpos e o direcionamento da resposta para o tipo Th1 são características que devem ser buscadas durante o desenvolvimento de vacinas baseadas em PspA. Vacinas bacterianas atenuadas ou inativadas, como a vacina celular pertussis (wP) ou a vacina BCG (*Bacillus Calmet-Guérin*) possuem atividades adjuvantes intrínsecas que podem direcionar a resposta imune a antígenos combinados.

1.2 Propostas de adjuvantes para PspA – Vacinas celulares

A pesquisa em adjuvantes é um elemento crucial no desenvolvimento de vacinas. Sais de alumínio (Alum) são eficazes em formulações com proteínas recombinantes a serem aplicadas em condições onde respostas Th2 são desejadas. Entretanto, vários grupos têm se concentrado em descrever novos adjuvantes para aplicações onde respostas mediadas por células são mais eficazes (Reed, Bertholet, 2009). Tais respostas são geralmente induzidas por vacinas celulares (Mahon, Ryan, 1996; Berstad, Andersen, 2000; McGuirk and Mills, 2000; Higgins, Jarnicki, 2006), como é o caso da vacina celular pertussis (wP). Esta vacina é administrada em crianças na composição da DTPw (vacina tríplice que contém toxóide diftérico, toxóide tetânico e *Bordetella pertussis* inativada (wP) em suspensão, tendo como adjuvante hidróxido de alumínio) no Brasil, e em países em desenvolvimento. Em muitos países desenvolvidos, devido a ocorrência de efeitos colaterais decorrentes da vacinação com wP, a DTP atualmente utilizada é composta pela vacina pertussis acelular (DTPa) que contém componentes proteicos da bactéria (Locht and Mielcarek, 2012).

Estudos em animais mostraram as propriedades adjuvantes da vacina DTPw quando combinada a outras vacinas, como por exemplo, a vacina contra influenza A (Potter, Tamizifar, 1995; Tamizifar, Jennings, 1997; Prikazsky and Bock, 2001). Em crianças, um estudo conduzido na Eslováquia, mostrou que a combinação da DTPw com a vacina contra Hepatite B (HBV) elevou os níveis de anticorpos anti-HBV em relação à administração da HBV sozinha, provavelmente pela ação adjuvante da wP (Prikazsky and Bock, 2001). Em um ensaio clínico conduzido em crianças de Israel, Dagan e colaboradores mostraram a diminuição dos níveis de anticorpos contra polissacarídeos de uma vacina pneumocócica conjugada 11-valente quando combinada a DTPa. Este prejuízo à resposta dos polissacarídeos da vacina pneumocócica não foi observado quando a DTPw foi utilizada na combinação (Dagan, Goldblatt, 2004).

O aumento dos casos de pertussis nos últimos anos, principalmente em países em desenvolvimento, têm levantado discussões sobre a eficácia das vacinas pertussis acelulares. As estratégias mais rápidas para contornar este problema constituem na vacinação de adolescentes ou adultos, que podem ser carreadores da bactéria e assim transmiti-las aos recém-nascidos ainda não protegidos pela vacina. Outra estratégia é a

vacinação de grávidas visando a transmissão de anticorpos maternos, garantindo a proteção de bebês que ainda não receberam as primeiras doses da vacina (Meade, Plotkin, 2014). Por outro lado, diversos grupos têm estudado propostas de novas vacinas ou vias de inoculação alternativas para as vacinas wP, como a via nasal. Em humanos voluntários, a inoculação de wP por via nasal, se mostrou eficaz para a indução de anticorpos e de resposta de células T específicas contra pertussis (Berstad, Holst, 2000; Berstad, Oftung, 2000). Em camundongos, foi demonstrada a atividade adjuvante da wP administrada por via nasal em combinação com uma vacina de influenza inativada. Esta combinação foi capaz de induzir níveis significativamente mais altos de anticorpos contra o vírus do que a vacina influenza sozinha (Berstad, Andersen et al., 2000).

Recentemente, nosso grupo testou a atividade adjuvante das vacinas wP e wP_{low} - uma vacina de nova geração, desenvolvida pelo Instituto Butantan, na qual o excesso de LPS foi removido e que foi testada em ensaios clínicos de fase 1 (Zorzeto, Higashi, 2009) - em combinação a PspA recombinante por via nasal em camundongos. As vacinas combinadas foram capazes de proteger camundongos contra desafios letais respiratórios e também contra desafios de colonização (Oliveira, Miyaji, 2010). Ambas as vacinas PspA-wP e PspA-wP_{low} induziram altos níveis de anticorpos anti-PspA sistêmicos e de mucosa e não foram observadas diferenças significativas na qualidade da resposta imune. Além disso, a proteção induzida pela vacina PspA-wP foi também observada em camundongos C3H/HeJ, que não possuem a sinalização por LPS, via receptor TLR4. Assim, o LPS não parece ser o componente chave da atividade adjuvante de *B. pertussis* neste modelo. Além da ação adjuvante observada pela via nasal neste modelo, foi testada também a ação adjuvante da DTP_{low} quando combinada a PspA pela via subcutânea em camundongos. A vacina PspA-DTP_{low} também foi capaz de induzir altos níveis de anticorpos anti-PspA e proteger contra desafios respiratórios invasivos com duas linhagens de pneumococo (Oliveira, Miyaji et al., 2010). Estes resultados sugerem que a inoculação da vacina não precisa ser necessariamente por via de mucosa para proteção contra o desafio respiratório invasivo por pneumococo.

Entre os componentes de *B. pertussis*, as toxinas pertussis (PT) e adenilato ciclase (ACT) e a hemaglutinina filamentosa (FHA) são alguns dos possíveis candidatos a adjuvantes em combinação a PspA no modelo avaliado pelo nosso grupo. A PT é uma exotoxina e importante fator de virulência produzida exclusivamente por *B. pertussis*.

Esta exotoxina é constituída por 5 subunidades (S1-S5) com uma configuração AB₅. A subunidade tóxica da PT, também chamada de protômero A, é composta pela S1, enquanto que a subunidade B ou oligômero B (OligB), que forma um anel em pentâmero, é composta pelas subunidades S2, S3, S4 (duas moléculas) e S5. O mecanismo de ação da toxina consiste na sua ligação inicial, mediante a subunidade B pentamérica, às glicoproteínas contendo ácido siálico que se encontram na superfície da célula alvo, seguida pela internalização da proteína. Na porção intracelular, a subunidade A se dissocia do oligômero B. Esta subunidade tem atividade de ADP-ribosilase e leva à transferência de um grupo ADP-ribose do NAD⁺ para um resíduo de cisteína da proteína G inibitória (Gi). Isto resulta na permanência da proteína Gi na forma inativa, sendo incapaz de inibir a atividade da enzima adenilato ciclase. Como consequência, há o aumento do segundo mensageiro AMP cíclico (AMPC) e a alteração de vias de sinalização celular. Um dos efeitos conhecidos desta ação de PT é a inibição da resposta imune contra a bactéria. (Locht, Coutte, 2011; Melvin, Scheller, 2014).

As propriedades adjuvantes de PT e de derivados geneticamente inativados já foram demonstradas contra diferentes antígenos, como, por exemplo, FHA e a hemocianina KLH (do inglês Keyhole limpet hemocyanin” comumente usada também como carreador de antígenos). Os estudos demonstram que ambas as formas enzimaticamente ativas ou inativadas de PT são capazes de potencializar respostas Th1 e Th2 contra os antígenos associados. Estes estudos demonstram a estimulação de secreção de IFN- γ e IL-2 por células T e IL-1 por macrófagos. Além disso a PT foi capaz de aumentar a expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície de células B, macrófagos e linfócitos T (Ryan, McCarthy, 1998). Estudos mais recentes mostram que a ação adjuvante de PT envolve estimulação e maturação de células apresentadoras de antígenos (APC) e ativação de linfócitos T CD8⁺ (Murphey, Chang, 2011).

A ACT codificada pelo gene *cyaA*, é considerada também como um importante fator de virulência da *B. pertussis* e consiste em dois domínios. O primeiro, presente na porção N-terminal da molécula, é o domínio de adenilato ciclase dependente de calmodulina, responsável pela conversão de ATP em AMP cíclico. O segundo é um domínio RTX (do inglês “repeat in toxin”) que medeia a ligação a células alvo e forma poros nas membranas, provocando lise das células. Apesar da ACT poder agir em diferentes tipos celulares, ela apresenta alta afinidade pelo receptor de complemento 3

(CR3) que está presente em neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, modulando as suas atividades (Melvin, Scheller et al., 2014). Assim como demonstrado para PT, ambas as formas ativas e inativas de ACT (em relação à atividade de adenilato ciclase) apresentam atividade adjuvante, induzindo a produção de anticorpos contra antígenos associados como Ovalbumina (Ova), PT, FHA ou pertactina (PRN), quando inoculados pelas vias intraperitoneal ou nasal em modelo murino (Macdonald-Fyall, Xing, 2004; Orr, Douce, 2007). Em ambos os estudos, a forma enzimaticamente inativa apresentou atividade adjuvante superior.

A proteína mais abundante de *B. pertussis*, FHA, que está presente na superfície da bactéria, podendo também ser secretada, é uma proteína monomérica com uma estrutura filamentosa que participa na adesão da bactéria às células eucarióticas. FHA contém três diferentes domínios: um domínio de ligação a carboidratos, outro de ligação a glicosaminoglicanos e um domínio RGD (arginina-glicina-aspartato) que está envolvido na ligação a receptores tipo integrina presentes em leucócitos (Melvin, Scheller et al., 2014). Um estudo recente mostra que FHA tem a capacidade de induzir maturação de células dendríticas humanas *in vitro* e secreção de citocinas como IL-10, IL-12, IL-6 e IL-23 (Dirix, Mielcarek, 2014). As propriedades adjuvantes de FHA contra antígenos associados já foram demonstradas pela combinação com a glutathione S-transferase (GST) de *Schistosoma mansoni* (Sm28GST) ou com a hemocianina KLH, quando inoculadas por via nasal, oral, ou subcutânea, em sistemas incorporados a lipossomas ou livres. Em todos os casos, foi observada a indução aumentada de anticorpos sistêmicos e de mucosa contra os antígenos, na presença de FHA (Poulain-Godefroy, Mielcarek, 1998; Poulain-Godefroy, Menozzi, 2003).

A vacina BCG (Bacillus Calmette-Guérin), usada no combate à tuberculose, é uma vacina composta pela bactéria *Mycobacterium bovis* atenuada através de sucessivas passagens em cultura. Apesar de ser composta por uma bactéria inteira, como a wP, a BCG é administrada na forma viva. Esta vacina é, provavelmente, a mais usada no mundo todo, sendo recomendada para uso humano a partir do nascimento (Locht, 2008). No Brasil, a BCG é administrada nas crianças em dose única no momento do nascimento. Pelas propriedades adjuvantes e segurança, várias estratégias de combinação de antígenos a BCG têm sido testadas com sucesso. Em recém-nascidos brasileiros, a vacina BCG combinada ao antígeno do vírus da Hepatite B (HBsAg) foi

avaliada em ensaios clínicos de imunogenicidade e segurança, com bons resultados (Carniel, Morcillo, 2008).

Em modelos animais, a administração concomitante de BCG a uma vacina conjugada contra *Neisseria meningitidis*, (MenC-CRM197) em camundongos neonatos pela via subcutânea, estimulou uma maior produção de anticorpos IgG contra o polissacarídeo C de *N. meningitidis*. Além disso, foi observado um aumento na atividade bactericida do soro dos animais que receberam as duas vacinas. (Brynjolfsson, Bjarnarson, 2011). Em outro estudo, a administração de BCG em combinação a uma vacina inativada contra *Leishmania* (KLV), em camundongos BALB/c, diminuiu tanto o tamanho das lesões da pele como a média do número de amastigotos encontrados nos macrófagos, com relação às lesões e a proliferação de amastigotos observada nos animais tratados com KLV ou BCG. (Nahrevanian, Jafary, 2013).

Este trabalho é uma continuação dos estudos do grupo, através da caracterização dos componentes de *B. pertussis* que exercem a função adjuvante quando combinados a PspA e a caracterização da resposta imune efetora induzida pela formulação PspA5-wP. Além disso, os estudos foram estendidos para a análise da atividade adjuvante da vacina BCG quando combinada a PspA.

6 Conclusões

A toxina pertussis (PT) é um componente importante na propriedade adjuvante da wP e de composições compostas por *B. pertussis* inativadas.

Neste modelo, PT e o domínio de ligação a glicoproteínas OligB apresentaram atividade adjuvante similar à observada para wP, sugerindo que a atividade enzimática de PT não é essencial.

A proteção é dependente da indução de altos níveis de IgG anti-PspA5 e anticorpos induzidos pela vacina PspA5-wP são capazes de aumentar significativamente a sobrevivência dos animais.

A proteção é dependente do fragmento cristalizável (Fc) da IgG, responsável pela fixação do complemento.

Na ausência de complemento, os altos níveis de IgG não são capazes de conferir proteção.

A combinação de PspA5 a BCG não altera significativamente a resposta imune e proteção conferida pela proteína sozinha, contra o desafio respiratório invasivo. Entretanto, esquemas de dose reforço, utilizando a combinação PspA5-DTPw se mostraram altamente eficazes.

Os resultados deste trabalho confirmam o potencial uso de vacinas celulares, aprovadas para uso humano, como adjuvantes para PspA.

REFERÊNCIAS*

Aida Y, Pabst MJ. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J Immunol Methods*. 1990;132(2):191-5.

Alfano M, Grivel JC, Ghezzi S, Corti D, Trimarchi M, Poli G, et al. Pertussis toxin B-oligomer dissociates T cell activation and HIV replication in CD4 T cells released from infected lymphoid tissue. *AIDS*. 2005;19(10):1007-14.

Alonso S, Pethe K, Mielcarek N, Raze D, Locht C. Role of ADP-ribosyltransferase activity of pertussis toxin in toxin-adhesin redundancy with filamentous hemagglutinin during *Bordetella pertussis* infection. *Infect Immun*. 2001;69(10):6038-43.

Antoine R, Alonso S, Raze D, Coutte L, Lesjean S, Willery E, et al. New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol*. 2000;182(20):5902-5.

Antoine R, Locht C. Roles of the disulfide bond and the carboxy-terminal region of the S1 subunit in the assembly and biosynthesis of pertussis toxin. *Infect Immun*. 1990;58(6):1518-26.

Arulanandam BP, Lynch JM, Briles DE, Hollingshead S, Metzger DW. Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A and interleukin-12 augments antibody-mediated opsonization and protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun*. 2001;69(11):6718-24.

Berstad AK, Andersen SR, Dalseg R, Dromtorp S, Holst J, Namork E, et al. Inactivated meningococci and pertussis bacteria are immunogenic and act as mucosal adjuvants for a nasal inactivated influenza virus vaccine. *Vaccine*. 2000;18(18):1910-9.

Berstad AK, Holst J, Froholm LO, Haugen IL, Wedege E, Oftung F, et al. A nasal whole-cell pertussis vaccine induces specific systemic and cross-reactive mucosal antibody responses in human volunteers. *J Med Microbiol*. 2000;49(2):157-63.

Berstad AK, Oftung F, Korsvold GE, Haugen IL, Froholm LO, Holst J, et al. Induction of antigen-specific T cell responses in human volunteers after intranasal immunization with a whole-cell pertussis vaccine. *Vaccine*. 2000;18(22):2323-30.

Brandileone MC, Andrade AL, Teles EM, Zanella RC, Yara TI, Di Fabio JL, et al. Typing of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Streptococcus pneumoniae* isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines. *Vaccine*. 2004;22(29-30):3890-6.

*De acordo com:
international Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from:
http://nml.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Brandileone MC, de Andrade AL, Di Fabio JL, Guerra ML, Austrian R. Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. *J Infect Dis.* 2003;187(8):1206-12.

Briles DE, Hollingshead SK, King J, Swift A, Braun PA, Park MK, et al. Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. *J Infect Dis.* 2000;182(6):1694-701.

Brueggemann AB, Pai R, Crook DW, Beall B. Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog.* 2007;3(11):e168.

Brynjolfsson SF, Bjarnarson SP, Mori E, Del Giudice G, Jonsdottir I. Concomitant administration of *Mycobacterium bovis* BCG with the meningococcal C conjugate vaccine to neonatal mice enhances antibody response and protective efficacy. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(11):1936-42.

Carbonetti NH. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol.* 2010;5(3):455-69.

Carniel EF, Morcillo AM, Blotta MH, Da Silva MT, Mazzola TN, Antonio MA, et al. Immunogenicity and safety of combined intradermal recombinant Hepatitis B with BCG vaccines at birth. *Vaccine.* 2008;26(5):647-52.

Croucher NJ, Harris SR, Fraser C, Quail MA, Burton J, van der Linden M, et al. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science.* 2011;331(6016):430-4.

Dagan R. New insights on pneumococcal disease: what we have learned over the past decade. *Vaccine.* 2009;27 Suppl 3:C3-5.

Dagan R, Goldblatt D, Maleckar JR, Yaich M, Eskola J. Reduction of antibody response to an 11-valent pneumococcal vaccine coadministered with a vaccine containing acellular pertussis components. *Infect Immun.* 2004;72(9):5383-91.

Darrieux M, Moreno AT, Ferreira DM, Pimenta FC, de Andrade AL, Lopes AP, et al. Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. *J Med Microbiol.* 2008;57(Pt 3):273-8.

de OMAP, Campos LC, dos Santos MS, Azevedo J, Dos Santos RC, Carvalho Mda G, et al. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000-2007. *Vaccine.* 2011;29(6):1139-44.

Dirix V, Mielcarek N, Debrue AS, Willery E, Alonso S, Versheure V, et al. Human dendritic cell maturation and cytokine secretion upon stimulation with Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin. *Microbes Infect.* 2014;16(7):562-70.

Dos Santos SR, Passadore LF, Takagi EH, Fujii CM, Yoshioka CR, Gilio AE, et al. Serotype distribution of Streptococcus pneumoniae isolated from patients with invasive pneumococcal disease in Brazil before and after ten-pneumococcal conjugate vaccine implementation. *Vaccine.* 2013.

Falup-Pecurariu O. Lessons learnt after the introduction of the seven valent-pneumococcal conjugate vaccine toward broader spectrum conjugate vaccines. *Biomed J.* 2012;35(6):450-6.

Ferreira DM, Darrieux M, Oliveira ML, Leite LC, Miyaji EN. Optimized immune response elicited by a DNA vaccine expressing pneumococcal surface protein a is characterized by a balanced immunoglobulin G1 (IgG1)/IgG2a ratio and proinflammatory cytokine production. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15(3):499-505.

Ferreira DM, Darrieux M, Silva DA, Leite LC, Ferreira JM, Jr., Ho PL, et al. Characterization of protective mucosal and systemic immune responses elicited by pneumococcal surface protein PspA and PspC nasal vaccines against a respiratory pneumococcal challenge in mice. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(5):636-45.

Ferreira DM, Oliveira ML, Moreno AT, Ho PL, Briles DE, Miyaji EN. Protection against nasal colonization with Streptococcus pneumoniae by parenteral immunization with a DNA vaccine encoding PspA (Pneumococcal surface protein A). *Microb Pathog.* 2010;48(6):205-13.

Ferreira PC, Campos IB, Abe CM, Trabulsi LR, Elias WP, Ho PL, et al. Immunization of mice with Lactobacillus casei expressing intimin fragments produces antibodies able to inhibit the adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to cultivated epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;54(2):245-54.

Fowler S, Xing DK, Bolgiano B, Yuen CT, Corbel MJ. Modifications of the catalytic and binding subunits of pertussis toxin by formaldehyde: effects on toxicity and immunogenicity. *Vaccine.* 2003;21(19-20):2329-37.

Franco CM, Andrade AL, Andrade JG, Almeida e Silva S, Oliveira CR, Pimenta FC, et al. Survey of nonsusceptible nasopharyngeal Streptococcus pneumoniae isolates in children attending day-care centers in Brazil. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(1):77-9.

Hanniffy SB, Carter AT, Hitchin E, Wells JM. Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using Lactococcus lactis affords protection against respiratory infection. *J Infect Dis.* 2007;195(2):185-93.

Haughney SL, Petersen LK, Schoofs AD, Ramer-Tait AE, King JD, Briles DE, et al. Retention of structure, antigenicity, and biological function of pneumococcal surface protein A (PspA) released from polyanhydride nanoparticles. *Acta Biomater.* 2013;9(9):8262-71.

Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KH. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol*. 2006;177(11):7980-9.

Hollingshead SK, Baril L, Ferro S, King J, Coan P, Briles DE. Pneumococcal surface protein A (PspA) family distribution among clinical isolates from adults over 50 years of age collected in seven countries. *J Med Microbiol*. 2006;55(Pt 2):215-21.

Hollingshead SK, Becker R, Briles DE. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2000;68(10):5889-900.

Holmgren J, Adamsson J, Anjuere F, Clemens J, Czerkinsky C, Eriksson K, et al. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Immunol Lett*. 2005;97(2):181-8.

Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(4):288-301.

Kang HY, Srinivasan J, Curtiss R, 3rd. Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine. *Infect Immun*. 2002;70(4):1739-49.

Kim SH, Song JH, Chung DR, Thamlikitkul V, Yang Y, Wang H, et al. Changing trends in antimicrobial resistance and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asian countries: an Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(3):1418-26.

Klein JO. The epidemiology of pneumococcal disease in infants and children. *Rev Infect Dis*. 1981;3(2):246-53.

Kong IG, Sato A, Yuki Y, Nochi T, Takahashi H, Sawada S, et al. Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2013;81(5):1625-34.

Lambert-Buisine C, Willery E, Locht C, Jacob-Dubuisson F. N-terminal characterization of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol*. 1998;28(6):1283-93.

Langermann S, Palaszynski SR, Burlein JE, Koenig S, Hanson MS, Briles DE, et al. Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant bacille Calmette-Guerin vaccines expressing pneumococcal surface protein A. *J Exp Med*. 1994;180(6):2277-86.

Leusch MS, Paulaitis S, Friedman RL. Adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*: production, purification, and partial characterization. *Infect Immun*. 1990;58(11):3621-6.

Li Y, Wang S, Scarpellini G, Gunn B, Xin W, Wanda SY, et al. Evaluation of new generation *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccines with regulated delayed attenuation to induce immune responses against PspA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(2):593-8.

Lima FA, Ferreira DM, Moreno AT, Ferreira PC, Palma GM, Ferreira JM, Jr., et al. Controlled Inflammatory Responses in the Lungs Are Associated with Protection Elicited by a Pneumococcal Surface Protein A-Based Vaccine against a Lethal Respiratory Challenge with *Streptococcus pneumoniae* in Mice. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19(9):1382-92.

Lima FA, Miyaji EN, Quintilio W, Raw I, Ho PL, Oliveira ML. Pneumococcal Surface Protein A does not affect the immune responses to a combined diphtheria tetanus and pertussis vaccine in mice. *Vaccine*. 2013;31(20):2465-70.

Lobet Y, Feron C, Dequesne G, Simoen E, Hauser P, Loch C. Site-specific alterations in the B oligomer that affect receptor-binding activities and mitogenicity of pertussis toxin. *J Exp Med*. 1993;177(1):79-87.

Locht C. A common vaccination strategy to solve unsolved problems of tuberculosis and pertussis? *Microbes Infect*. 2008;10(9):1051-6.

Locht C, Coutte L, Mielcarek N. The ins and outs of pertussis toxin. *FEBS J*. 2011;278(23):4668-82.

Locht C, Mielcarek N. New pertussis vaccination approaches: en route to protect newborns? *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;66(2):121-33.

Macdonald-Fyall J, Xing D, Corbel M, Baillie S, Parton R, Coote J. Adjuvanticity of native and detoxified adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* towards co-administered antigens. *Vaccine*. 2004;22(31-32):4270-81.

Mahon BP, Ryan MS, Griffin F, Mills KH. Interleukin-12 is produced by macrophages in response to live or killed *Bordetella pertussis* and enhances the efficacy of an acellular pertussis vaccine by promoting induction of Th1 cells. *Infect Immun*. 1996;64(12):5295-301.

Mangmool S, Kurose H. G(i/o) protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins (Basel)*. 2011;3(7):884-99.

McDaniel LS, Ralph BA, McDaniel DO, Briles DE. Localization of protection-eliciting epitopes on PspA of *Streptococcus pneumoniae* between amino acid residues 192 and 260. *Microb Pathog*. 1994;17(5):323-37.

McGuirk P, Mills KH. 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.* 2000;68(3):1383-90.

Meade BD, Plotkin SA, Locht C. Possible options for new pertussis vaccines. *J Infect Dis.* 2014;209 Suppl 1:S24-7.

Melvin JA, Scheller EV, Miller JF, Cotter PA. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(4):274-88.

Menozzi FD, Mutombo R, Renauld G, Gantiez C, Hannah JH, Leininger E, et al. Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1994;62(3):769-78.

Miyaji EN, Oliveira ML, Carvalho E, Ho PL. Serotype-independent pneumococcal vaccines. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(18):3303-26.

Moreno AT, Oliveira ML, Ferreira DM, Ho PL, Darrieux M, Leite LC, et al. Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and cross-protection. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(3):439-46.

Moyo SJ, Steinbakk M, Aboud S, Mkopi N, Kasubi M, Blomberg B, et al. Penicillin resistance and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal carrier children under 5 years of age in Dar es Salaam, Tanzania. *J Med Microbiol.* 2012;61(Pt 7):952-9.

Mukerji R, Mirza S, Roche AM, Widener RW, Crony CM, Rhee DK, et al. Pneumococcal surface protein A inhibits complement deposition on the pneumococcal surface by competing with the binding of C-reactive protein to cell-surface phosphocholine. *J Immunol.* 2012;189(11):5327-35.

Murphey C, Chang S, Zhang X, Arulanandam B, Forsthuber TG. Induction of polyclonal CD8+ T cell activation and effector function by Pertussis toxin. *Cell Immunol.* 2011;267(1):50-5.

Nabors GS, Braun PA, Herrmann DJ, Heise ML, Pyle DJ, Gravenstein S, et al. Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies to heterologous PspA molecules. *Vaccine.* 2000;18(17):1743-54.

Nahrevanian H, Jafary SP, Nemati S, Farahmand M, Omidinia E. Evaluation of anti-leishmanial effects of killed *Leishmania* vaccine with BCG adjuvant in BALB/c mice infected with *Leishmania major* MRHO/IR/75/ER. *Folia Parasitol (Praha).* 2013;60(1):1-6.

O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009;374(9693):893-902.

Oh H, Kim BG, Nam KT, Hong SH, Ahn DH, Choi GS, et al. Characterization of the carbohydrate binding and ADP-ribosyltransferase activities of chemically detoxified pertussis toxins. *Vaccine*. 2013;31(29):2988-2993.

Oliveira ML, Miyaji EN, Ferreira DM, Moreno AT, Ferreira PC, Lima FA, et al. Combination of pneumococcal surface protein A (PspA) with whole cell pertussis vaccine increases protection against pneumococcal challenge in mice. *PLoS One*. 2010;5(5):e10863.

Oma K, Zhao J, Ezoe H, Akeda Y, Koyama S, Ishii KJ, et al. Intranasal immunization with a mixture of PspA and a Toll-like receptor agonist induces specific antibodies and enhances bacterial clearance in the airways of mice. *Vaccine*. 2009;27(24):3181-8.

Orr B, Douce G, Baillie S, Parton R, Coote J. Adjuvant effects of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* after intranasal immunisation of mice. *Vaccine*. 2007;25(1):64-71.

Pimenta FC, Ribeiro-Dias F, Brandileone MC, Miyaji EN, Leite LC, Sgambatti de Andrade AL. Genetic diversity of PspA types among nasopharyngeal isolates collected during an ongoing surveillance study of children in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2838-43.

Potter CW, Tamizifar H, Jennings R. Immune response of mice to immunization with subunit influenza A vaccine in DTP vaccine. *Vaccine*. 1995;13(3):253-60.

Poulain-Godefroy O, Menozzi FD, Alonso S, Vendeville C, Capron A, Loch C, et al. Adjuvant activity of free *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin delivered by mucosal routes. *Scand J Immunol*. 2003;58(5):503-10.

Poulain-Godefroy O, Mielcarek N, Ivanoff N, Remoue F, Schacht AM, Phillips N, et al. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin enhances the immunogenicity of liposome-delivered antigen administered intranasally. *Infect Immun*. 1998;66(4):1764-7.

Pourahmadi A, Esmaili, F., Hosseini, Z., Rezaee, A., Akhavizadegan, M., Mirjalili, A. Proliferate response to purified *Bordetella pertussis* toxin on murine spleen lymphocytes. *Arch. Razi Ins*. 2004;58:8.

Prikazsky V, Bock HL. Higher anti-hepatitis B response with combined DTPw-HBV vaccine compared with separate administration in healthy infants at 3, 4 and 5 months of age in Slovakia. *Int J Clin Pract*. 2001;55(3):156-61.

Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, Ho PL. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(8):1103-9.

Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.* 2009;30(1):23-32.

Ren B, Li J, Genschmer K, Hollingshead SK, Briles DE. The absence of PspA or presence of antibody to PspA facilitates the complement-dependent phagocytosis of pneumococci in vitro. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19(10):1574-82.

Ren B, McCrory MA, Pass C, Bullard DC, Ballantyne CM, Xu Y, et al. The virulence function of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A involves inhibition of complement activation and impairment of complement receptor-mediated protection. *J Immunol.* 2004;173(12):7506-12.

Ren B, Szalai AJ, Hollingshead SK, Briles DE. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. *Infect Immun.* 2004;72(1):114-22.

Roberts M, Bacon A, Rappuoli R, Pizza M, Cropley I, Douce G, et al. A mutant pertussis toxin molecule that lacks ADP-ribosyltransferase activity, PT-9K/129G, is an effective mucosal adjuvant for intranasally delivered proteins. *Infect Immun.* 1995;63(6):2100-8.

Ryan M, McCarthy L, Rappuoli R, Mahon BP, Mills KH. Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. *Int Immunol.* 1998;10(5):651-62.

Shaper M, Hollingshead SK, Benjamin WH, Jr., Briles DE. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]. *Infect Immun.* 2004;72(9):5031-40.

Stainer DWS, M. J. A simple chemically defined médium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *Journal of General Microbiology.* 1971;63:211-220.

Tai SS. *Streptococcus pneumoniae* protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies. *Crit Rev Microbiol.* 2006;32(3):139-53.

Tamizifar H, Jennings R, Ali SA, Potter CW. Induction of IL-2 and IFN-gamma in BALB/c mice immunised with subunit influenza A vaccine in combination with whole cell or acellular DTP vaccine. *J Med Microbiol.* 1997;46(1):61-6.

Tart RC, McDaniel LS, Ralph BA, Briles DE. Truncated *Streptococcus pneumoniae* PspA molecules elicit cross-protective immunity against pneumococcal challenge in mice. *J Infect Dis.* 1996;173(2):380-6.

Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA, Briles DE, Szalai AJ. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 1999;67(9):4720-4.

Vela Coral MC, Fonseca N, Castaneda E, Di Fabio JL, Hollingshead JK, Briles DE. Pneumococcal surface protein A of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Colombian children. *Emerg Infect Dis*. . 2001;7(5):832-6.

Wang ZY, Yang D, Chen Q, Leifer CA, Segal DM, Su SB, et al. Induction of dendritic cell maturation by pertussis toxin and its B subunit differentially initiate Toll-like receptor 4-dependent signal transduction pathways. *Exp Hematol*. 2006;34(8):1115-24.

Webster J, Theodoratou E, Nair H, Seong AC, Zgaga L, Huda T, et al. An evaluation of emerging vaccines for childhood pneumococcal pneumonia. *BMC Public Health*. 2011;11 Suppl 3:S26.

Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet*. 2011;378(9807):1962-73.

Weiser JN. The pneumococcus: why a commensal misbehaves. *J Mol Med (Berl)*. 2010;88(2):97-102.

Xin W, Li Y, Mo H, Roland KL, Curtiss R, 3rd. PspA family fusion proteins delivered by attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium extend and enhance protection against *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2009;77(10):4518-28.

Yother J, Briles DE. Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analysis. *J Bacteriol*. 1992;174(2):601-9.

Zorzeto TQ, Higashi HG, da Silva MT, Carniel Ede F, Dias WO, Ramalho VD, et al. Immunogenicity of a whole-cell pertussis vaccine with low lipopolysaccharide content in infants. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16(4):544-50.