

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



**CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA, EVALUACIÓN DE BIOPELÍCULA Y
FACTORES DE VIRULENCIA DE AISLAMIENTOS DE *Bordetella pertussis*
DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO**

Por

M.C. JESSICA LIZZETH GUTIÉRREZ FERMAN

Como requisito para obtener el grado de

DOCTORADO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

San Nicolás de los Garza, N. L., Marzo, 2020

**CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA, EVALUACIÓN DE BIOPELÍCULA Y
FACTORES DE VIRULENCIA DE AISLAMIENTOS DE *Bordetella pertussis*
DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO**

COMITÉ DE TESIS

**DRA. LICET VILLARREAL TREVIÑO
PRESIDENTE**

**DRA. ELVIRA GARZA GONZÁLEZ
SECRETARIO**

**DR. ADRIÁN CAMACHO ORTIZ
VOCAL**

**DR. CARLOS EDUARDO HERNÁNDEZ LUNA
VOCAL**

**DR. JUAN FRANCISCO CONTRERAS CORDERO
VOCAL**

AGRACIEMENTOS

A Dios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

A mis padres: **Georgina Ferman Galán** y **Gelasio Gutiérrez Maldonado**, por su amor incondicional.

A mis hermanos: **Ana** y **Alfredo Gutiérrez**.

A mis asesoras la **Dra. Licet Villarreal Treviño** y la **Dra. Elvira Garza González** por su formación tanto en la investigación como en la docencia.

Al **Dr. Rajendar Deora** por la oportunidad de realizar parte de mi investigación en su laboratorio.

A mi comité de tesis: **Dr. Juan Francisco Contreras Cordero**, **Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna** y **Dr. Adrián Camacho Ortiz**, por toda su ayuda brindada.

A Lucy Acevedo y a Denisse González por su apoyo en el laboratorio.

A mis grandes amigos: **Mizael Ortiz**, **Paola Bocanegra**, **Soraya Mendoza**, **Samantha Flores**, **Gregorio Bustos**, **Leslie Irigoyen**, **Verónica Villarreal**, **Eliud Rosas**, **Alan Tobías**, **Martin Loera**, **Jesús Galván**, **Adrián Martínez**, **Manolo Martínez**, **Angelina Cerda**, **Perla Garza**, **Natalia Cattelan**, **Kyle Caution**, **Audra Fullen**, **Kacy Yount**, **Manita Guragain**, **Michael Haught**, **Galen Silver**, **Jessica Brown**, **Oscar Rosas** y **Frank Robledo**, por tantas sonrisas, consejos y experiencias vividas. *Memories will last forever!*

DEDICATORIA

A mis padres, los amo

Jessica Lizzeth Gutiérrez Ferman

ÍNDICE

Título	Página
Agradecimientos	iii
Dedicatorias	iv
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	ix
Lista de símbolos y abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Tosferina o pertussis	3
2.2. Manifestaciones clínicas de la enfermedad	3
2.3. Descripción del agente causal	4
2.4. Factores de virulencia	4
2.4.1. Toxina de pertussis	5
2.4.2. Hemaglutinina filamentosa	6
2.4.3. Proteínas fimbriales	6
2.4.4. Toxina adenilato ciclasa	7
2.4.5. BPS polisacárido de <i>B. pertussis</i>	7
2.4.6. Proteína bipA	8
2.4.7. Biopelículas	9
2.5. Vacunación y reemergencia de la enfermedad	10
2.5.1. Vacunación contra la tosferina	10
2.5.2. Epidemiología de la tosferina	11
2.5.3. Causas de la reemergencia de la enfermedad	12
3. Justificación	14
4. Hipótesis	15
5. Objetivo del trabajo	16
5.1. Objetivos específicos	16

Título	Página
6. Materiales y métodos	17
6.1. Declaración de ética	17
6.2. Aislamientos clínicos y cepas seleccionadas en este estudio	17
6.3. Tipificación de secuencias <i>ptxP-ptxA1-prn-fim2-fim3</i>	18
6.3.1. Condiciones de cultivo	18
6.3.2. Extracción de ADN total	19
6.3.3. Amplificación de los genes <i>ptxP-ptxA1-prn-fim2-fim3</i>	19
6.3.4. Purificación de productos amplificados	21
6.3.5. Secuenciación de productos y análisis	21
6.4. Serotipificación de Fim2/Fim3	22
6.5. Evaluación y caracterización de la producción de biopelícula	23
6.5.1. Cepas clínicas y condiciones de cultivo	24
6.5.2. Ensayo de formación de biopelícula	24
6.5.3. Fijación, tinción y cuantificación de biopelícula	25
6.5.4. Determinación de la composición de las biopelículas	26
6.6. Transformación de aislamientos con el pGBSp1-GFP	27
6.6.1. Análisis de la arquitectura de las biopelículas	28
6.7. Autoagregación de los aislamientos	29
6.7.1. Ensayo de autoagregación	29
6.7.2. Evaluación de autoagregados mediante microscopía confocal	30
6.8. Análisis de crecimiento bacteriano	31
6.9. Evaluación de la expresión/producción de factores de virulencia	31
6.9.1. Evaluación de la expresión del gen <i>fhaB</i>	31
6.9.2. Evaluación de la producción de la FHA	33
6.9.3. Evaluación de la producción de la ACT	34
6.9.4. Evaluación de la producción de BPS polisacárido	35
6.9.5. Evaluación de la expresión del gen <i>bipA</i>	35
6.9.6. Evaluación de la producción de la proteína bipA	36
6.10. Ensayo de adhesión a células epiteliales	37
6.11. Ensayo de colonización en ratones	38

Título	Página
7. Resultados	40
7.1. Tipificación de las secuencias <i>ptxP-ptxA-prn-fim1-fim2</i>	40
7.2. Serotipificación de FIM2/FIM3	41
7.3. Evaluación de la producción de biopelícula	42
7.4. Composición de las biopelículas bacterianas de los aislamientos circulantes de <i>B. pertussis</i>	44
7.5. Evaluación de la arquitectura de las biopelículas por microscopía confocal	46
7.6. Evaluación de la autoagregación bacteriana	49
7.7. Evaluación de la autoagregación mediante microscopía confocal	50
7.8. Análisis de tasa de crecimiento bacteriano	52
7.9. Evaluación de la expresión/producción de factores de virulencia	53
7.9.1. Evaluación de la expresión/producción del gen <i>fhaB</i> /proteína	53
7.9.2. Evaluación de la producción de BPS polisacárido en aislamientos circulantes	54
7.9.3. Evaluación de la producción de la ACT en aislamientos circulantes	55
7.9.4. Evaluación de la expresión/producción del gen <i>bipA</i> /proteína BipA en aislamientos circulantes	57
7.10. Adhesión a células epiteliales A549	58
7.11. Ensayos de colonización en animales	59
8. Discusión	60
9. Conclusión	65
10. Literatura citada	66
11. Apéndice y anexos	76
11.1. Resumen biográfico	76
11.2. Publicaciones Indexadas	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.	Contenido	Página
1	Lista de oligonucleótidos para la amplificación de los genes <i>ptxP</i> - <i>ptxA1-prn-fim2-fim3</i> .	20
2	Aislamientos clínicos seleccionados y cepas control utilizadas para la evaluación y caracterización de la producción de biopelícula y análisis de factores de virulencia.	23
3	Genotipos detectados en los aislamientos circulantes de <i>B. pertussis</i> del estado de Nuevo León, México.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.	Contenido	Página
1	Nivel de expresión de los genes regulados por el sistema BvgAS en las distintas fases fenotípicas de <i>B. pertussis</i> (Melvin et al. 2014).	5
2	Esquema de vacunación inicial y actual en México dirigido a infantes y niños menores de cinco años de edad (SSNL, 2016).	11
3	Incidencia de los casos positivos de tosferina por año en el estado de Nuevo León, México, del 2003 al 2014 (Dirección General de Epidemiología 2018).	12
4	Estrategia experimental para la evaluación de composición de biopelícula de los aislamientos clínicos.	27
5	Análisis de secuencias del promotor <i>ptxP</i> en aislamientos circulantes de <i>B. pertussis</i> .	40
6	Frecuencias temporales de los serotipos Fim2 y Fim3 en aislamientos circulantes de <i>B. pertussis</i> del estado de Nuevo León, México, colectados del 2007 al 2014.	42
7	Formación de anillo bacteriano de los aislamientos circulantes de <i>B. pertussis</i> en la interfaz aire-líquido utilizando tubos de poliestireno.	43
8	Análisis de la producción de biopelícula en aislamientos circulantes de <i>B. pertussis</i> mediante el método de cristal violeta.	44
9	Composición de las biopelículas de los aislamientos de <i>B. pertussis</i> colectados en Nuevo León, México.	45
10	Análisis de las biopelículas por microscopía confocal laser de barrido (MCLB).	47
11	Análisis de las biopelículas mediante COMSTAT.	48
12	Cinética de autoagregación de los aislamientos de <i>B. pertussis</i> .	50
13	Análisis de autoagregación y adherencia bacteriana mediante microscopía confocal.	51
14	Cinética de crecimiento bacteriano.	52

Figura No.	Contenido	Página
15	Evaluación de la expresión del gen <i>fhaB</i> .	53
16	Evaluación de la producción de FHA de los aislamientos circulantes de <i>B. pertussis</i> .	54
17	Evaluación de los niveles de producción de Bps polisacárido por parte de los aislamientos de <i>B. pertussis</i> .	55
18	Evaluación de la producción de la ACT.	56
19	Evaluación de la expresión/producción del gen <i>bipA</i> y la proteína BipA.	57
20	Adhesión bacteriana a células epiteliales de pulmón de humano, A549.	58
21	Colonización del tracto respiratorio murino por la cepa Bp536 y el aislamiento circulante de México fuerte productor de biopelícula 385-9.	59

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolo/abreviatura	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
°C	Grados Celsius
dNTP's	Desoxirribonucleótidos
DO	Densidad óptica
DTT	1,4 ditiotreitól
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima
g	Gramos
h	Hora
Kv	KiloWatt
M	Concentración molar
min	Minutos
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
dpi	Días post-infección
p/v	Porcentaje peso-volumen
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
rpm	Revoluciones por minuto
Sm^r	Resistente a estreptomicina
TMB	3'3'5'5'-tetrametilbencidina
UFC	Unidades formadoras de colonia
v/v	Porcentaje volumen-volumen

RESUMEN

Introducción: *B. pertussis* es el agente causal de la tosferina, una enfermedad altamente contagiosa del tracto respiratorio humano. A pesar de la vacunación, continúa reemergiendo. Se han sugerido algunos factores para explicar su reemergencia, tales como: a) la introducción de la vacuna acelular, b) la circulación de genotipos emergentes que presentan una alta expresión de factores de virulencia y c) la circulación de aislamientos con alta producción de biopelícula. Con el objetivo de explicar la reemergencia de la enfermedad en México, se realizó una caracterización de de aislamientos circulantes de *B. pertussis* colectados en del 2008 al 2014. **Metodología:** La tipificación de los genes *ptxP*, *ptxA1*, *prn*, *fim2*, *fim3*, se realizó por PCR y secuenciación y la expresión de los genes *fimB* y *bipA* se evaluó por qPCR. Se analizó la producción de FIM2/FIM3, FHA, ACT, BPS y BipA por ELISA. La producción de biopelícula se evaluó por el método de cristal violeta y la arquitectura de la biopelícula y la autoagregación se determinó por microscopía confocal láser de barrido. Experimentos adicionales fueron realizados, se evaluó la adhesión bacteriana a células epiteliales A549 de pulmón de humano. Ensayos de colonización fueron realizados utilizando ratones C57BL/G Jackson. **Resultados y conclusiones:** Los aislamientos analizados pertenecen a dos genotipos hipervirulentos: *ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-2* y *ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-1*. El serotipo FIM3 fue desplazado en el 2011 por el FIM2. La mayor parte de los aislamientos son fuertes productores de biopelícula y su producción está asociada con la autoagregación bacteriana y la alta producción de la FHA y BPS. Se detectó un incremento en la producción de BPS, a través de los años. La FHA es necesaria para la adhesión a células epiteliales A549 y para formación de biopelícula. La alta producción de la FHA y BPS, en un efecto combinado, aumentan la adhesión bacteriana a células A549. La producción de BipA podría tener un efecto inhibitorio de la autoagregación bacteriana en *B. pertussis*.

ABSTRACT

Introduction: *Bordetella pertussis* is the causal agent of pertussis or whooping cough, a highly contagious disease of the human respiratory tract. Despite vaccination, pertussis is still resurging. Several factors has been suggested to try to explain the resurgence, such as: a) introduction of the acellular vaccine, b) the circulation of emerging genotypes which present high expression of virulence factors, and 3) the circulation of hyperbiofilm producer isolates. In order to explain the pertussis resurgence in Mexico, we performed the characterization of *B. pertussis* isolates collected from 2008 to 2014.

Methodology: genotyping of *ptxP*, *ptxA1*, *prn*, *fim2*, and *fim3* genes was performed by PCR and sequencing and the expression of the genes *fimB* and *bipA* was evaluated by qPCR. The production of FIM2/FIM3, FHA, ACT, BPS and BipA was determined by ELISA. The biofilm production was evaluated by the crystal violet method and the biofilm architecture and bacterial autoaggregation was determined by confocal microscopy. Additional experiments were performed: adhesion assays were assessed using A549 lung human epithelial cells and we used the rat strain C57BL/G Jackson for bacterial colonization.

Results and conclusion: The analyzed isolates belong to two different hypervirulent genotypes: *ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-2* y *ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-1*. Changes over time in serotype FIM2/FIM3 were detected. Most of the isolates are hyperbiofilm producers and its production is associated with bacterial autoaggregation and high FHA and BPS production. An increase in the BPS production was detected through the years. The FHA is necessary for adhesion to A549 epithelial cells and biofilm formation. The high FHA and BPS production, in a synergy, increase the bacterial adhesion to A549 epithelial cells. The production of BipA could have an inhibitory effect of bacterial autoaggregation in *B. pertussis*.

LUGAR DE TRABAJO

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Microbiología general de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Parte de este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad (LADIME) del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, de la misma universidad y en el Departamento de Infección Microbiana e Inmunidad de la torre de Investigación Biomédica, perteneciente a la Universidad Estatal de Ohio, Columbus, OH, EUA.

1. INTRODUCCIÓN

Bordetella pertussis es el agente etiológico de la tosferina, una enfermedad altamente contagiosa y prevenible por vacunación del tracto respiratorio humano (Mattoo *et al.* 2005).

La vacunación contra la tosferina se inició en México en 1954 con el uso de una vacuna de células completas inactivadas (wP), sin embargo, debido a los efectos secundarios, se introdujo una vacuna acelular (aP), que incluye los toxoides de la toxina de pertussis (PTX) y la hemaglutinina filamentosa (FHA) como antígenos protectores contra la enfermedad (Suárez *et al.* 2012).

A pesar de la cobertura de vacunación, la tosferina continúa reemergiendo y ha permanecido como la quinta causa de muerte de las enfermedades prevenibles por vacunación, en niños menores de cinco años de edad (Ulloa y Avila 2008). Particularmente en estado de Nuevo León, México se ha reportado un incremento en el número de casos de tosferina y dos brotes ocurridos, en el 2009 y 2012 (Dirección General de Epidemiología 2018).

Varias causas han sido sugeridas para tratar de explicar la reemergencia de la enfermedad en distintos países, tales como: a) baja cobertura de vacunación, b) disminución de la inmunidad generada por vacunación, c) implementación de métodos de diagnóstico de la enfermedad mucho más sensibles, d) introducción de vacuna acelular (Warfel *et al.* 2014), así como e) adaptación del patógeno (Mooi *et al.* 2014).

Se ha demostrado que los aislamientos circulantes actuales presentan variaciones alélicas en los genes de los principales factores de virulencia. Tal es el caso de los aislamientos *ptxP3*, los cuales presentan un polimorfismo de un solo nucleótido (psn) en el promotor de la PTX (Mooi *et al.* 2009). Estos aislamientos se han asociado con altos niveles de expresión de la misma, y se han diseminado en países de Europa, Norte y Sudamérica y Australia (de Gouw *et al.* 2014).

Interesantemente, se han detectado aislamientos que carecen de la expresión de alguno de los antígenos vacunales. Los aislamientos pertactina (PRN) negativos han emergido en países en donde la PRN es incluida en la vacunación acelular, tales como Estados Unidos de América (EUA) y Australia (Pawloski et al. 2014; Safarchi et al. 2016). De la misma manera, se han detectado aislamientos esporádicos que carecen de la expresión de la FHA (Xu et al. 2019). Por su parte, cambios temporales en el serotipo de fimbria (FIM) han sido reportados en la mayoría de países (Vorringer y Vaughan 2014). Esto ha llegado a sugerir que los aislamientos circulantes de *B. pertussis* se han adaptado rápidamente para tratar de escapar a la inmunidad generada por vacunación acelular.

Por otro lado, se ha demostrado que los aislamientos circulantes actuales de *B. pertussis* son fuertes productores de biopelícula. Este fenotipo se ha asociado fuertemente con una potenciada colonización en tracto respiratorio murino y se ha sugerido, podría contribuir a la persistencia, transmisión y continua circulación del microorganismo (Arnal et al. 2015; Cattelan et al. 2017).

Con el objetivo de tratar de explicar las posibles causas de la reemergencia de la tosferina en México, se realizó la caracterización genotípica y fenotípica de los aislamientos circulantes de *B. pertussis* colectados en un periodo de ocho años, tanto de casos positivos de tosferina como de contactos asintomáticos y se evaluó su posible impacto derivado de los cambios de vacunación.

2. ANTECEDENTES

2.1. Tosferina o pertussis

La tosferina es una enfermedad respiratoria aguda y altamente contagiosa del tracto respiratorio humano que es causada exclusivamente por *B. pertussis* (Matoo y Cherry 2005). Se transmite fácilmente vía aerosol, al inhalar las partículas de tos y/o estornudos generadas por personas infectadas con el microorganismo (Melvin et al. 2014). El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), ha clasificado a la tosferina como una enfermedad reemergente, causando picos epidémicos en distintos países, cada 3 a 5 años (Mooi et al. 2000). Afecta principalmente a infantes y niños menores de cinco años de edad. Sin embargo en los últimos años, se ha detectado un aumento en el número de casos en adolescentes y adultos, quienes representan la principal fuente de transmisión hacia los menores no vacunados (Kilgore et al. 2016).

2.2. Manifestaciones clínicas de la enfermedad

La tosferina se manifiesta con presentaciones clínicas atípicas o variables en infantes y adultos. Por el contrario, la sintomatología clínica de la enfermedad es característica en niños de 1 a 9 años de edad, y puede estar dividida en tres etapas o fases: i) fase catarral, ii) paroxismal y iii) de convalecencia. La fase catarral es el periodo más contagioso de la enfermedad y tiene un tiempo de duración aproximado de 7 a 14 días. En esta fase se presentan manifestaciones clínicas semejantes a aquellas causada por el virus del resfriado común, incluyendo: rinorrea, lagrimeo, tos leve y febrícula. Por su parte, la etapa paroxismal tiene un periodo de duración variable de entre una a diez semanas y se caracteriza por tos continua y repetida con 5 a 10 episodios y una sola exhalación forzada, acompañada de un estridor. Entre otros síntomas de la fase se encuentran: cianosis, hemorragias conjuntivales, salivación, lagrimeo, apnea y distensión de las venas del cuello. Ocasionalmente puede presentarse la producción de expectoración purulenta y vómito post-tusivo. La fase paroxismal puede disminuir gradualmente y cesar, o bien, persistir durante más tiempo y entrar a una fase de

convalecencia. La enfermedad puede tomar un curso más serio en infantes, en donde las bacterias logran diseminarse a los pulmones causando bronquiolitis necrosante y hemorragias alveolares. Complicaciones comunes tras la tosferina incluyen: neumonía y otitis media por infecciones secundarias, convulsiones, encefalopatía (Matoo y Cherry 2005; Kilgore et al. 2016), sinusitis y pérdida de peso (de Serres et al. 2000).

2.3. Descripción del agente causal

B. pertussis, un patógeno estricto de humano, son cocobacilos que miden de 0.2 a 0.3 μm de ancho y de los 0.5 a los 0.8 μm de largo y al microscopio pueden observarse de forma aislada o en parejas. Son aerobios estrictos, Gram negativos e inmóviles con una temperatura óptima de crecimiento de entre 35 a 37 °C (Hegerle y Guiso 2014; Garrity et al. 2006). Las colonias de *B. pertussis* se pueden observar en agar carbón como pequeñas gotas color plateado, lisas, ligeramente convexas, con bordes regulares y olor característico de hipoclorito a los 3 días de crecimiento; raramente exceden los 3 mm de diámetro (Garrity 2006). Mientras que en agar Bordet-Gengou (BG) se observan como colonias blanquecinas, brillosas, lisas, ligeramente convexas, con bordes regulares y dependiendo la cepa, pueden observarse hemolíticas con un tamaño de aproximadamente 2-3 mm de diámetro. En un perfil bioquímico *B. pertussis* es oxidasa y catalasa positivos y da resultados negativos para crecimiento en agar MacConkey, citrato de Simmons, urea de Christensen, reducción de nitratos y no muestra pigmentación en agar soya tripticasa (TSA), características principales que ayudan a su diferenciación con otras especies de este género (Garrity 2006).

2.4. Factores de virulencia de *Bordetella pertussis*

La colonización exitosa del tracto respiratorio por parte de *B. pertussis* se logra gracias a una producción regulada de distintos factores de virulencia. La mayoría de estos factores pertenecen a cuatro grupos de genes, los cuales se encuentran regulados por un sistema de dos componentes (BvgAS), dando lugar a tres fases fenotípicas distintas: una fase no virulenta Bvg⁻, una intermedia Bvgⁱ y una virulenta Bvg⁺ (Deora et

al. 2001; Cummings et al. 2006; Decker et al. 2012; Melvin et al. 2014). La fase Bvg⁺ del microorganismo está caracterizada por la expresión de genes de clase I y II, que derivan en la producción de adhesinas y toxinas tales como: la PTX, FHA, las proteínas FIM2, FIM3, la PRN y la toxina adenilato ciclasa (ACT), principalmente (Melvin et al. 2014).

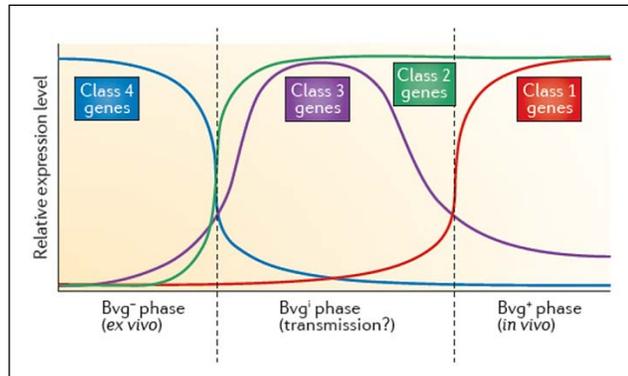


Figura 1. Nivel de expresión de los genes regulados por el sistema BvgAS en las distintas fases fenotípicas de *B. pertussis* (Melvin et al. 2014).

2.4.1. Toxina de pertussis

La PTX fue uno de los primeros factores de virulencia caracterizados en *B. pertussis*. A pesar de que cumple un papel importante en la patogénesis, se ha demostrado que la tosferina resulta de la producción coordinada de múltiples factores de virulencia (Locht et al. 2001). La PTX es una toxina tipo AB, ADP-ribosiladora de 106 kDa, también conocida como factor promotor de la linfocitosis, y es exclusivamente expresada por *B. pertussis*. Consta de cinco subunidades, de la S1 a la S5, las cuales son codificadas por los genes *ptxA-ptxE*, respectivamente. Dichos genes se encuentran regulados por el promotor *ptxP*. Se ha demostrado que la S1 presenta las funciones tóxicas y catalíticas y es encargada de generar la respuesta inmunológica (Sutherland et al. 2011; Melvin et al. 2014). Debido a esto, ha sido utilizada como antígeno principal para la elaboración de vacunas alrededor del mundo (Hegerle y Guiso, 2014).

2.4.2. Hemaglutinina filamentosa

La FHA es una de las principales adhesinas secretadas por *B. pertussis*. Es codificada y regulada por la expresión de los genes *fhaB-fhaC* principalmente, y consta de una masa molecular de 220 kDa (Tuomanen et al 1986; Smith et al. 2000). Su principal función es la de la adhesión inicial a las células epiteliales del tracto respiratorio humano, iniciando el ciclo patogénico de la enfermedad. Sin embargo también, promueve la fagocitosis de *B. pertussis* por macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares y suprime la liberación de IL-12 (Inatzuka et al 2005; Mazar et al. 2006). Estudios realizados han sugerido que la FHA promueve la adhesión célula-célula y la formación de biopelícula de *B. pertussis* mediante la formación de micro colonias (Serra et al. 2011). Recientemente, se ha sugerido una asociación entre la alta expresión de la FHA con el alto índice de autoagregación bacteriana y formación de biopelícula en aislamientos circulantes de *B. pertussis* (Cattelan et al. 2017).

2.4.3. Proteínas fimbriales

Las fimbrias también conocidas como pili o aglutinógenos en *B. pertussis*, son protrusiones en la superficie bacteriana con la principal función de adhesión (Smith et al. 2000). *B. pertussis* contiene en su genoma los genes que codifican para la expresión de dos principales proteínas fimbriales (*fim2* y *fim3*), sin embargo el microorganismo puede expresar la fimbria tipo 1 (FIM1), la fimbria tipo 2 (FIM2) o ambas, dando lugar un serotipo (Mooi et al. 2000). Su masa molecular es de 22 y 22.5 kDa, respectivamente (Heck et al. 1996). El serotipo expresado depende de una regulación a nivel transcripcional, la cual involucra el cambio de la activación del promotor entre los dos genes en un proceso conocido como fase de variación. Los promotores de los genes *fim2* y *fim3* presentan un tramo rico en citosinas. La inserción o delección de residuos de “C”, es la principal fuente de variación de la expresión de estas proteínas (Willems et al. 1990; Smith et al. 2000). Se ha demostrado que las proteínas FIM2 y FIM3 son componentes importantes que contribuyen a la colonización de la mucosa en las vías

respiratorias inferiores (Kilgore et al. 2016). Las proteínas fimbriales son altamente inmunogénicas (Frances et al. 2012) y han sido incluidas en la vacunación acelular en distintos países. Importantes cambios en el serotipo de fimbria han sido detectados en los aislamientos circulantes, como posible consecuencia de la adaptación del microorganismo al amplio uso de la vacuna acelular (Van Gent et al. 2015).

2.4.4. Toxina adenilato ciclasa

La ACT es una hemolisina formadora de poros, perteneciente a la familia de las proteínas RTX (**R**epeats-**i**n-**T**oxin) (Smith et al. 2000). Esta proteína es codificada por el gen *cyaA*, dando lugar alrededor de 1706 residuos de aa y una masa molecular de 175 a 220 kDa. Por otro lado, su secreción está regulada por la expresión de los genes *cyaB-cyaD* (Glaser et al. 1988). Entre las principales funciones atribuidas se encuentran la inhibición de la migración y activación de fagocitos, bloqueo de la inducción del óxido nítrico bactericida de los macrófagos así como la supresión del efecto citotóxico de los neutrófilos y monocitos (Sakamoto et al. 1992; Hewlett et al. 2006). Interesantemente en el 2017, se demostró que el dominio N-terminal catalítico de la ACT interactúa directamente con el dominio C-terminal de la FHA, llevando a la inhibición de la producción de biopelícula en *B. pertussis* (Hoffman et al. 2017). Resultados consistentes han sido encontrados recientemente. Se ha demostrado que los aislamientos circulantes productores fuertes de biopelícula presentan niveles significativamente menores de producción de ACT, comparados con aquellos no productores de biopelícula (Cattelan et al. 2017). Por lo anterior, la ACT ha sido considerada como uno de las proteínas inhibidoras de formación de biopelícula, en *B. pertussis* (Cattelan et al. 2015).

2.4.5. BPS polisacárido de *B. pertussis*

El polisacárido BPS de *B. pertussis* es una molécula antigénica y bioquímicamente similar a el poly-B-1,6-*N*-acetilglucosamina (PNAG o PGA) del grupo de los polisacáridos producidos por distintas especies bacterianas. El operón *bpsABCD* codifica la maquinaria para la síntesis del mismo. Se ha demostrado que el BPS

polisacárido en *B. pertussis* promueve la colonización y formación de biopelícula *in vitro*, así como en septo nasal funcionando como adhesina (Conover et al. 2010). Además incrementa la colonización en pulmón, confiriendo protección contra la muerte bacteriana mediada por el complemento del sistema inmunológico (Ganguly et al. 2014). Estudios recientes han demostrado que los aislamientos circulantes de *B. pertussis* expresan altos niveles del gen *bpsA* en células planctónicas y se ha asociado fuertemente con la autoagregación bacteriana y la fuerte formación de biopelícula (Cattelan et al. 2017).

2.4.6. Proteína BipA

La proteína bipA (**Bvg- Intermediate Phase protein A**), es una proteína codificada por el gen *bipA* y es máximamente expresada en la fase bvg^i (Stockbauer et al. 2001) y en bajos niveles en la fase bvg^+ de *B. pertussis* (Gouw et al. 2014). Su expresión da lugar a una proteína de alrededor de 1,308 aa y se localiza fuera de la membrana externa de la célula bacteriana. Su dominio C-terminal, el cual es diferente entre especies de *Bordetella*, está expuesto al medio ambiente, mientras que su dominio espaciador de membrana es seguido por varias repeticiones de alrededor de 90 aa. Se ha demostrado que la proteína bipA de *Bordetella bronchiseptica* (RB50) no es requerida para la colonización en el tracto respiratorio de conejo, así como también, no es necesaria para la autoagregación bacteriana (Stockbauer et al. 2001; Fuchslocher et al. 2003; Vergara-Irigaray et al. 2005). Por el contrario en *B. holmesii* se ha asociado previniendo a autoagregación bacteriana y promoviendo la formación de biopelícula (Hiramatsu et al. 2014). Por otro lado, estudios proteómicos han demostrado que durante el modo de biopelícula de *B. pertussis* se expresan hasta 3 veces más de 11 proteínas, en comparación con cultivos de células planctónicas. Interesantemente la proteína bipA, es una de las más abundantes durante esta fase fenotípica (de Gouw et al. 2014). A pesar de esto, no se ha demostrado el efecto de la proteína bipA en la autoagregación bacteriana y formación de biopelícula de *B. pertussis*.

2.4.7. Biopelículas

Las biopelículas se definen como poblaciones o comunidades de microorganismos que crecen adheridos a una superficie inerte o de tejido vivo y que presentan características distintas a aquellos que se encuentran de forma libre o planctónica (Doyle 2001). La formación de biopelículas representa una de las principales estrategias de crecimiento que permite a las células sobrevivir en ambientes hostiles, así como también dispersarse para colonizar nuevos nichos (Hall-Stoodley et al. 2004). En una biopelícula los microorganismos se encuentran protegidos por una matriz extracelular, la cual, está compuesta de una mezcla de macromoléculas que pueden incluir exopolisacáridos, proteínas y ADN, el cual puede provenir de células lisadas o bien de su liberación mediante vesículas de membrana externa (Whitchurch et al. 2002).

B. pertussis puede formar biopelículas *in vitro* y en el tracto respiratorio y se ha sugerido que este proceso contribuye al éxito de la infección (Sloan et al. 2007; Conover et al 2010). Existen pocos estudios acerca de la formación de biopelículas de *B. pertussis*. Sin embargo, se ha demostrado que la excreción de ADN es crucial para su formación en *B. pertussis* (Conover et al. 2011). Por otro lado se ha demostrado que el polisacárido Bps de este microorganismo promueve la colonización y formación de biopelículas en la nasofaringe (Conover et al. 2010). Interesantemente, un estudio reciente mostró que la proteína bipA, es potencialmente expresada en biopelículas de *B. pertussis* y se ha sugerido podría tener un papel muy importante en la formación de biopelículas durante la infección (de Gouw et al. 2014). Desde otra perspectiva, se demostró que aislamientos colectados de una población mostraron una alta producción de biopelícula en comparación con una cepa referencia de *B. pertussis*, Tohama I. Los análisis proteómicos revelaron la proteína bipA fue altamente expresada durante esta fase fenotípica (Arnal et al. 2015). Otro estudio realizado incluyó aislamientos circulantes recientes de *B. pertussis* colectados de EUA y Argentina. Interesantemente, todos los aislamientos presentaron una producción de biopelícula significativamente mayor que la cepa referencia Bp536 (derivada de Tohama I). Esto ha llegado a cuestionar si los aislamientos circulantes se han adaptado a la vacunación mostrando una

producción alta de biopelícula o bien, las cepas vacunales utilizadas como referencia han perdido la habilidad de producción de la misma.

2.5. Vacunación y reemergencia de la enfermedad

2.5.1. Vacunación contra la tosferina

En México la vacunación contra la tosferina se inició en 1954 con el uso de una vacuna de células completas inactivadas (wP) y fue usada en un esquema de cinco dosis por más de 50 años (Suárez et al. 2010). Su aplicación en infantes llevó a una disminución significativa en la incidencia de la enfermedad (Guiso 2009). Sin embargo, su alta reactogenicidad y eficacia variable llevaron al desarrollo e introducción de una vacuna de componentes acelulares (aP).

A pesar de que la primera aP se desarrolló en 1981 en china (Sato *et al.* 1981), no fue aplicada en México hasta el 2007. En la actualidad todas las vacunas acelulares autorizadas contra la tosferina contienen el toxoide de la PTX como antígeno principal en combinación con uno o más antígenos vacunales como la FHA, la PRN, y las proteínas FIM2 y FIM3 (Hegerle y Guiso 2014). En México el esquema de vacunación actual contra la tosferina está dirigido a infantes y niños preescolares y comprende de la aplicación de cinco dosis vacunales. Las primeras cuatro corresponden a una vacuna acelular pentavalente (DTaP/Hib/IPV) en donde se incluye la PTX y la FHA como antígenos protectores y debe ser aplicada a los 2, 4, 6 y 18 meses de edad. Esta vacuna protege además contra la difteria, tétanos, poliomielitis y *Haemophilus influenzae* tipo b. La quinta y última dosis corresponde a un refuerzo con una vacuna de células completas inactivadas, DPwT (difteria, tosferina y tétanos), en donde se incluyen las cepas vacunales Bp134, Bp509, Bp6224 y Bp25525 de *B. pertussis* y debe ser aplicada a los 4 años de edad (SSNL 2014). En el 2012, se incluyó un único refuerzo con la vacuna aP, para aquellas mujeres que se encuentran entre las 27 y 36 semanas de gestación, con la finalidad de proteger al infante los primeros dos meses de vida (figura 2).

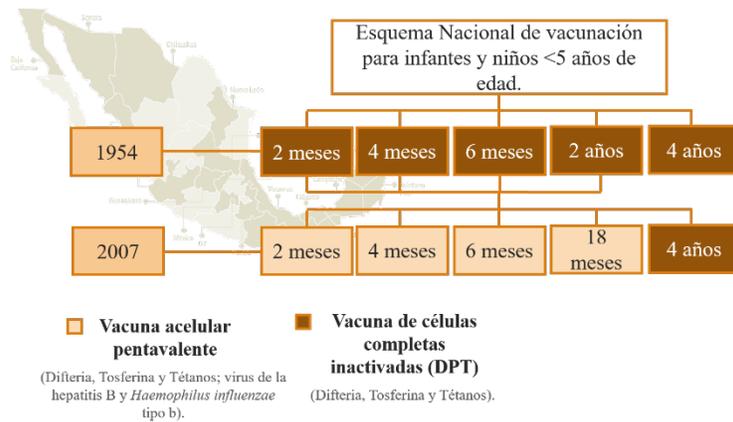
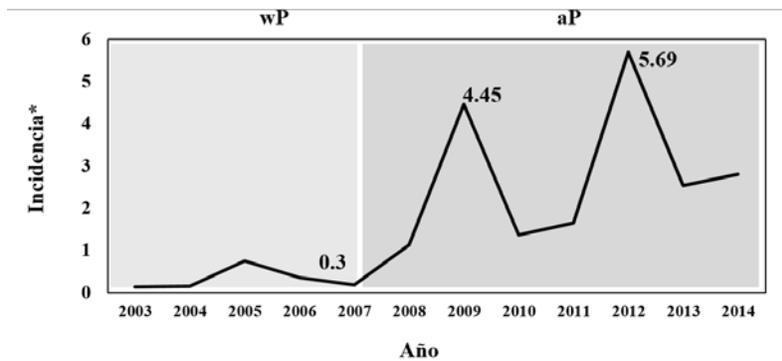


Figura 2. Esquema de vacunación inicial y actual en México dirigido a infantes y niños menores de cinco años de edad (SSNL, 2016).

2.5.2. Epidemiología de la tosferina

La tosferina es una enfermedad endémica de países tanto desarrollados como en desarrollo (Kilgore et al. 2016). A pesar de la vacunación, se estima que anualmente ocurren 50 millones de casos de tosferina alrededor del mundo y aproximadamente 300,000 muertes se encuentran asociadas a dicha enfermedad (Cattelan et al. 2016). Además, continua siendo la quinta causa de muerte de las enfermedades prevenibles por vacunación en niños menores de cinco años de edad (11%), seguido de muertes causadas por: *Streptococcus pneumoniae* (28%), sarampión (21%), rotavirus (16%) y *H. influenzae* tipo b (15%) (Ulloa y Ávila 2008).

Particularmente, en Nuevo León, México se ha detectado un aumento en el número de notificaciones de tosferina desde la introducción de la vacuna acelular al esquema de vacunación, con dos brotes ocurridos en el 2009 y 2012. La incidencia de la enfermedad aumentó de 0.18 en el 2007 a 4.45 para el 2009. Mientras que para el 2012 se alcanzó la tasa de incidencia estatal más alta, de hasta 5.59 (casos por cada 100,000 habitantes) (Suárez et al. 2012).



*Incidencia por cada 100,000 habitantes

Figura 3. Incidencia de los casos positivos de tosferina por año en el estado de Nuevo León, México, del 2003 al 2014 (Dirección General de Epidemiología 2018). La incidencia se encuentra reportada por cada 100,000 habitantes. wP: vacuna de células completas, aP: vacuna acelular.

2.5.3. Causas de la reemergencia de la enfermedad

Distintas causas han sido sugeridas para tratar de explicar el incremento en el número de casos de la enfermedad, a través de los años. Entre estas se encuentran la baja cobertura de vacunación (Esposito et al. 2019), así como la implementación de metodologías de diagnóstico de la enfermedad, que presentan mayor sensibilidad y especificidad para la diferenciación de las especies de *Bordetella* (Tatti et al. 2008; Tatti et al. 2011).

Datos de la epidemiología molecular sugieren que la vacunación con wP, ha llevado a la aparición de aislamientos que presentan variaciones alélicas en los genes de los principales factores de virulencia del microorganismo (Mooi et al 2014). Particularmente, los aislamientos *ptxP3*, presentan un psn en la posición -75 del promotor de la PTX, y se han asociado fuertemente con una alta expresión de la misma (Mooi et al 2009), así como con una enfermedad más severa (Clarke et al. 2016). En tan solo 10 años, las cepas *ptxP3* han remplazado casi completamente a las antes predominantes *ptxP1* en Europa. Además, se han diseminado globalmente y han emergido en países de Norte y Sudamérica y Australia (Mooi et al. 2009; Octavia et al.

2011; Miyaki et al. 2013) y fueron asociadas con los brotes ocurrido en Holanda y Australia (Daan de Gouw et al. 2014).

Diversos estudios han demostrado que los aislamientos circulantes expresan proteínas distintas a las utilizadas como antígenos vacunales, sugiriendo que pueden escapar a la inmunidad generada por vacunación (Van Gent et al. 2012; Miyaji et al. 2013). Se han encontrado variaciones alélicas en regiones genéticas de relevancia antigénica en la S1 de la Ptx. Hasta la fecha se han reportado 11 alelos distintos del gen *ptxA1* por genotipificación por secuenciación. Además, recientemente se han reportado aislamientos esporádicos que carecen de expresión de la Ptx y de otros antígenos, tales como la FHA y la PRN (Bouchez et al. 2009; Xu et al. 2019). Sugiriendo que esto pueda tener un impacto en la efectividad de la vacunación.

Interesantemente, en el 2014 fue demostrado que la vacunación acelular protege contra el desarrollo de la enfermedad, sin embargo no protege contra la colonización y transmisión del microorganismo (Warfel et al. 2014). Aunado a esto, tres años más tarde fue determinado que los aislamientos circulantes de *B. pertussis* son fuertes productores de biopelícula y por primera vez se ha sugerido esta propiedad fenotípica podría contribuir a una mayor colonización, transmisión y circulación del microorganismo en poblaciones vacunadas (Cattelan et al. 2017).

A pesar de la de la vacunación, la tosferina continúa reemergiendo en México, sin embargo, las causas no han sido determinadas. Por lo anterior, resulta de gran importancia caracterizar genotípica y fenotípicamente los aislamientos circulantes de *B. pertussis* de México y evaluar su impacto en la reemergencia de la enfermedad.

3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de la cobertura de vacunación en México, la tosferina continúa reemergiendo causando brotes epidémicos. Debido a esto, resulta de gran importancia conocer la epidemiología molecular de los aislamientos circulantes de *B. pertussis*, así como caracterizar su fenotipo de biopelícula, y evaluar su posible impacto con la reemergencia de la enfermedad.

4. HIPÓTESIS

Los aislamientos circulantes de *B. pertussis* de México presentan variaciones alélicas en los genes que codifican para los principales factores de virulencia y alta producción de biopelícula.

5. OBJETIVO ESPECÍFICO

Caracterizar genóticamente aislamientos circulantes de *B. pertussis* del estado de Nuevo León, México, evaluar la producción de biopelícula y la expresión de factores de virulencia asociados.

5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Genotipificar los genes *ptxP-ptxA1-prn-fim2/3* en aislamientos circulantes
2. Serotipificar las proteínas *fim2/3*
3. Evaluar y caracterizar la producción de biopelícula
4. Evaluar la expresión de factores de virulencia asociados a biopelícula

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Declaración de ética

Una colección de n=352 aislamientos de *B. pertussis*, así como su información epidemiológica, fueron donadas por del Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas y Pertussis del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nuevo León perteneciente a la Secretaría de Salud de Nuevo León (SSNL), México.

Este estudio se realizó en conformidad con los requisitos del Comité de Ética de Investigación y Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Aprobación GA17-00001). Datos epidemiológicos y demográficos de los pacientes fueron incluidos como parte de un diagnóstico de laboratorio de rutina. Por lo tanto, no se requirió consentimiento informado. La experimentación con animales se llevó a cabo de acuerdo a las pautas aprobadas por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Estatal de Ohio, Columbus, Ohio, Estados Unidos de América.

6.2. Aislamientos clínicos y cepas utilizadas en este estudio

Un total de 352 aislamientos circulantes de *B. pertussis* fueron colectados previamente a partir de casos positivos de tosferina y contactos asintomáticos en Nuevo León, México, de la semana epidemiológica (SE) 52 del 2006 a la SE 52 del 2014. Los aislamientos fueron identificados como *B. pertussis* siguiendo las recomendaciones establecidas para la identificación y diferenciación de especies de *Bordetella* establecidas por el CDC (Tatti et al. 2011). Se incluyó información epidemiológica de los pacientes tales como caso/contacto, género, edad, estado de vacunación y tratamiento prescrito.

Ciento trece aislamientos de *B. pertussis* previamente seleccionados para tipificación por Electroforesis en Gel por Campos Pulsados (EGCP) fueron

seleccionados para la tipificación de las secuencias *ptxP-ptxA* del gen de la PTX y para serotipificación de las proteínas FIM2/FIM3 (técnica de muestreo simple estratificado por años utilizando un segundo ciego, nivel de confianza = 99%, intervalo de confianza = 10). La selección incluyó un aislamiento del 2007, 11 del 2008, 23 del 2009, 4 del 2010, 13 del 2011, 24 del 2012, 16 del 2013 y 21 del 2014. Un aislamiento al azar, pertenecientes a cada una de las clonas (clona A) y subtipos (A1, A2 y A3) previamente detectados por EGCP, fueron seleccionados para tipificación de los genes *prn-fim2-fim3* que codifican para las proteínas PRN, FIM2, FIM3, respectivamente. Para llevar a cabo la evaluación y caracterización de biopelícula de los aislamientos de *B. pertussis*, se seleccionaron al azar dos aislamientos de cada año (2008-2014). Una cepa wild type Bp536, derivada de la cepa vacunal Tohama I, dos aislamientos clínicos de EUA: STO1-SEAT0004 y GMT1, así como seis cepas mutantes de *B. pertussis*: $\Delta bvgS$, $\Delta bpsABCD$, Δfha , $\Delta cyaA$, $\Delta bipA$, y una cepa mutante de *B. bronchiseptica*: RB50 Δ 5, fueron gentilmente donadas por el Laboratorio del Dr. Rajendar Deora del Departamento de Inmunología e Infección Microbiana de la Torre de Investigación Biomédica, perteneciente a la Universidad Estatal de Ohio, Columbus, OH, EUA. La información de cada una de las cepas se encuentra detallada en la tabla 2.

6.3. Tipificación de las secuencias *ptxP-ptxA1-prn-fim3-fim3*

6.3.1. Condiciones de cultivo

Para llevar a cabo la tipificación de las secuencias *ptxP-ptxA1-prn-fim3-fim3*, cada uno de los aislamientos clínicos seleccionados fueron cultivados en placas con agar carbón (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA) enriquecido con sangre de carnero desfibrinada (5%, v/v⁻¹, CTR Cat. no. 158731, SS100) y suplementado con cefalexina a una concentración final de 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Los aislamientos fueron incubados a 37 °C con alto grado de humedad, durante 96 h. Alrededor de 10 UFC de cada uno de los aislamientos fueron tomadas y resuspendidas en tubos tipo Eppendorf (capacidad de 1.5 mL), conteniendo 200 μL buffer TE 1X (Tris HCl 10 mM, y EDTA 1mM, pH 8) y fueron almacenadas de manera inmediata a -80 °C.

6.3.2. Extracción de ADN total

La extracción de ADN total se realizó en cada uno de los 113 aislamientos seleccionados mediante la técnica de fenol-cloroformo. Para ello, cada una de las suspensiones bacterianas fue descongelada a temperatura ambiente durante 10 min para posteriormente agregar 150 µg de lisozima (Sigma Aldrich, Cat. No. L2879) y dejar incubar a 37 °C por 2 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 200 µL de buffer TE 1X (Tris HCl 10 mM, y EDTA 1mM, pH 8) con SDS (1%, p/v⁻¹) y 6 µL de proteinasa K (10 mg/mL⁻¹ en buffer TE 1X, Bioline, USA Inc., Boston, MA. E.U.A., Cat. No. BIO-37037) y se dejaron incubar a 55 °C durante 2 h. Un total de 250 µL de fenol saturado, 250 µL de SEVAG (cloroformo y alcohol isoamílico, relación 24:1) y 100 µL de TE 1X fueron agregados a cada uno de los viales y se mezclaron vigorosamente por inversión durante 5 min. Posteriormente, los viales fueron centrifugados a 14,000 rpm durante 8 min. La fase acuosa fue transferida a un vial nuevo y estéril. Nuevamente, se agregaron Un total de 250 µL de fenol saturado, 250 µL de SEVAG y 100 µL de buffer TE 1X, se mezclaron durante 5 min y se centrifugaron a las mismas condiciones. La fase acuosa fue transferida a un vial nuevo y estéril, se añadieron 2.33 volúmenes de etanol absoluto y se mezclaron cuidadosamente hasta observar la formación de la hebra. El ADN se dejó precipitar a -20 °C durante 2 h. Finalmente, el pellet fue obtenido mediante centrifugación a 14,000 rpm por 5 min para después realizar dos lavados con etanol grado molecular al 70% (v/v⁻¹). El ADN de cada uno de los aislamientos se dejó secar durante toda la noche a temperatura ambiente. Al siguiente día, el pellet fue resuspendido en 100 µL de buffer TE 1X y cada una de las muestras fue almacenada a -80 °C para su uso posterior.

6.3.3. Amplificación de los genes *ptxP-ptxS1-prn-fim2-fim3*

La amplificación de los genes *ptxP-ptxA1-prn-fim2-fim3* fue llevada a cabo utilizando los oligonucleótidos enlistados en la tabla 1.

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos para la amplificación de los genes *ptxP-ptxA1-prn-fim2-fim3*.

Gen	Secuencia	Tamaño*	Referencia
<i>ptxP</i>	PPF (5'-AATCGTCCTGCTCAACCGCC-3')	554	Mooi et al. 2009
	PPR (5'-GGTATACGGTGGCGGGAGGA-3')		
<i>ptxA</i>	S1F (5'-TAGGCACCATCAAAACGCAG - 3')	857	Fry et al. 2001
	S1R (5'-TCAATTACCGGAGTTGGGCG - 3')		
<i>prn</i>	AF (5'-GCCAATGTCACGGTCCAA-3')	1,400	Mooi et al. 1998
	BR (5'-CGGATTCAGGCGCAACTC-3')		
<i>fim2</i>	fim2-F(5'-ACCCATGCAAATCCCTTTCCAACGC-3')	676	Zhang et al. 2010
	fim2-R(5'-GGGGGTTGGCGATTTCCAGTTTCTC-3')		
<i>fim3</i>	fim3-F(5'-ATGTCCAAGTTTTCATACCCTGCCT-3')	673	Zhang et al. 2010
	fim3-R(5'-TTCGTCTCCTGACGCCGCGTAGCGG-3')		

*: Tamaño en pares de bases (pb)

Para llevar a cabo las amplificaciones de cada uno de los genes, se utilizó una mezcla de reacción con dNTP's (0.2 mM), MgCl₂ (2.5 mM) y 1 U de Ampli Taq Polimerasa (Bioline USA, Inc EUA) y aproximadamente 200 ng de DNA total. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1) Para los genes *ptxP*, *ptxA*, *fim2* y *fim3*, un ciclo de desnaturalización a 95 °C por 3 min, 35 ciclos consistiendo de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 54 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min, con una extensión final de 72 °C por 5 min. Para el gen *prn*, un ciclo de desnaturalización a 95 °C por 5 min, 30 ciclos consistiendo de desnaturalización a 95 °C por 5 min, alineamiento a 54 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1.5 min, con una extensión final de 72 °C por 10 min.

Un total de 5 µL de cada uno de los productos fueron cargados en un gel de agarosa al 1% (p/v⁻¹). Los productos se dejaron correr a 120 V por 1 h y 30 min en una cámara electroforética (Thermo Maxicell Primo, Ec-340), utilizando TBE 0.5X (Tris-borato 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0) como buffer de corrida y un marcador de peso

molecular de 200 a 10,037 pb (HyperLadder™ I, Bioline, USA Inc., Boston MA, E.U.A. Cat. No. BIO-33025). Como control negativo de amplificación se utilizó la mezcla de reacción sin ADN y como control positivo, ADN genómico de la cepa wild type Bp536 de *B. pertussis*. Las bandas fueron observadas en un transiluminador empleando un fotodocumentador UVP BioImaging Systems, EpiChem 3 Darkroom; las imágenes se documentaron en formato digital mediante el software Labworks. Todos los productos que mostraron un tamaño esperado fueron purificados para su posterior secuenciación.

6.3.4. Purificación de los productos amplificados

Una vez que se confirmó la amplificación del producto esperado se procedió a realizar la purificación del material genético por el método de precipitación con etanol. Para ello, se transfirieron 50 µL de producto amplificado a un vial tipo Eppendorf (capacidad de 2 mL) el cual contenía 5 µL de acetato de sodio (3 mM, pH 4.6) y 100 µL de etanol al 95% (v/v⁻¹). La mezcla se homogenizó con un agitador tipo vortex y se mantuvo a -20 °C durante 40 min. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min y se descartó el sobrenadante. El pellet se dejó secar a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente se resuspendió en 50 µL de agua grado molecular estéril para su posterior secuenciación.

6.3.5. Secuenciación de productos y análisis

Los productos purificados fueron secuenciados en MACROGEN Korea. Una vez obtenidas, las secuencias fueron alineadas y analizadas utilizando el software Biological sequence alignment editor (Bioedit) v7.0.5. Las secuencias control de los genes amplificados fueron obtenidas a través del uso de Búsqueda y Alineamiento Local Básico (BLAST) que se encuentra disponible en la plataforma del NCBI.

6.4. Serotipificación de fim2/fim3

La serotipificación de las proteínas fimbriales (Fim2/Fim3) fue realizada mediante la técnica de ELISA con ensayos independientes para cada uno de los antígenos buscados. El ensayo fue evaluado en cada uno de los aislamientos previamente seleccionados para los ensayos de genotipificación. La cepa wild type Bp536 y el aislamiento clínico de EUA (STO1-SEAT0004), fueron utilizados como controles positivos para fim2 y fim3, respectivamente. Por otro lado, la mutante $\Delta bvgS$ fue utilizada como control negativo de producción. Para ello, un total de 1×10^8 UFC ajustados en PBS 1X, fueron cargados a cada uno de los pocillos de placas ELISA de alta unión (Corning, Cat. No. 9018) y se dejaron incubar a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, las suspensiones bacterianas fueron removidas y las placas fueron lavadas tres veces con buffer PBST (PBS-0,05% y Tween 20, v/v⁻¹). El bloqueo se realizó agregando 100 μ L de leche descremada al 5% (v/v⁻¹) en PBST a cada uno de los pocillos e incubando a 37 °C, durante 1 h. La solución de bloqueo fue removida y las placas fueron lavadas tres veces con PBST. Un volumen de 100 μ L del anticuerpo primario (mouse anti-fim2, y anti-fim3, MyBioSource, Cat. No. MBS1499657, MBS1490603, respectivamente), diluido (1:1000) en leche descremada al 5% (v/v⁻¹) en PBST fue agregado a cada uno de los pocillos. Las placas fueron nuevamente incubadas a 37 °C durante 2 h y lavadas tres veces con PBST. Un total de 100 μ L de una solución de anticuerpo secundario (goat anti-rabbit, ABCAM, Cat. No. ab6721, dilución 1:1000) conjugado con peroxidasa de rábano, fueron agregados a cada uno de los pocillos, dejando incubar las placas a temperatura ambiente, durante 1 h. Siete lavados fueron realizados utilizando buffer PBST y 100 μ L de TMB fueron agregados a cada uno de los pocillos. Las placas se dejaron incubar a temperatura ambiente, en la oscuridad, durante 5-10 min. La reacción se finalizó agregando 50 μ L de H₂SO₄ (2N). Finalmente la absorbancia fue medida a 450 nm en un lector de placas ELISA (SpectraMax® i3x, Molecular Devices). Dos ensayos independientes fueron realizados incluyendo tres replicas experimentales en cada uno. Tres pocillos con PBS 1X fueron incluidos como blanco. Diferencias estadísticas fueron obtenidas mediante one-way ANOVA y Tukey posttest para múltiples comparaciones en un paquete estadístico GraphPad Prism v8.

6.5. Evaluación y caracterización de la producción de biopelícula

6.5.1. Cepas clínicas y condiciones de cultivo

Dos aislamientos de *B. pertussis* fueron seleccionados por año (2008-2014) para la evaluación de la formación de biopelícula y análisis de factores de virulencia asociados. Los aislamientos clínicos así como las cepas control se enlistan en la tabla 2.

Tabla 2. Aislamientos clínicos seleccionados y cepas control utilizadas para la evaluación y caracterización de la producción de biopelícula y análisis de factores de virulencia.

Cepa o aislamiento circulante	Año/lugar de aislamiento	Descripción	Referencia
ST01-SEAT0004-USA	2012/EUA	Aislamiento circulante de EUA, fuerte productor de biopelícula	Cattelan et al. 2017
Bp536	-	Cepa referencia de laboratorio, Sm ^r , derivada de Bp Tohama I, productora normal de biopelícula, Sm ^r ,	Cattelan et al. 2017
$\Delta bpsABCD$	-	Cepa mutante, deleción del gen <i>bpsABCD</i> , defectiva para formación de biopelícula, Sm ^r	Conover et al. 2010
Bp369	-	Cepa mutante, avirulenta, deleción del gen <i>bvgS</i> , defectiva para formación de biopelícula y auto agregación, Sm ^r	Weiss et al. 1984
Δfha	-	Cepa mutante, derivada de Tohama I, deleción cromosomal del gen estructural <i>fhaB</i> , defectiva para la producción de FHA, adhesión a células epiteliales y autoagregación bacteriana	Serra et al. 2011
$\Delta cyaA$	-	Cepa mutante de <i>B. pertussis</i> , deleción del gen <i>cyaA</i> , defectiva de la producción de la ACT	Carbonetti et al. 2005
$\Delta bipA$	-	Cepa de <i>B. bronchiseptica</i> mutante, deleción de la región promotora +17 a +59 del promotor de <i>bipA</i> . Defectiva para la producción de bipA	Deora 2002
224-8	2008/México	Portador asintomático, 50 años, VND	Este estudio
440-8	2008/México	Portador asintomático, 17 años, VND	Este estudio
385-9	2009/México	Caso positivo de tosferina, 3 meses, 1 dosis aP	Este estudio

161-9	2009/México	Caso positivo de tosferina, 1 dosis aP	Este estudio
458-10	2010/México	Caso positivo de tosferina, 35 años, 1 dosis wP	Este estudio
809-10	2010/México	Portador asintomático, 21 años, VND	Este estudio
1500-11	2011/México	Caso positivo de tosferina, 3 meses, 1 dosis aP	Este estudio
425-11	2011/México	Caso positivo de tosferina, 3 meses, 1 dosis aP	Este estudio
400-12	2012/México	Caso positivo de tosferina, 2 meses, 0 dosis	Este estudio
770-12	2012/México	Caso positivo de tosferina, 7 meses, 0 dosis	Este estudio
888-13	2013/México	Caso positivo de tosferina, 1 mes, 0 dosis	Este estudio
879-13	2013/México	Caso positivo de tosferina, 7 meses, 3 dosis aP	Este estudio
19-14	2014/México	Caso positivo de tosferina, 2 meses, 0 dosis,	Este estudio
1364-14	2014/México	Caso positivo de tosferina, 3 meses, 1 dosis aP	Este estudio

Sm^r: resistente a estreptomycin, VND: vacunación no determinada.

Los aislamientos clínicos y cepas control fueron sembrados en agar Bordet-Gengou (BG) enriquecido con sangre de carnero desfibrinada al 10% (v/v⁻¹) y glicerol al 1% (v/v⁻¹) y fueron incubadas a 37 °C por 96 h, con alto grado de humedad. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron alrededor de 10 UFC de un cultivo puro y se inocularon en tubos de poliestireno estériles (capacidad de 15 mL) conteniendo 3 mL de caldo Stainer-Scholte (SS) suplementado con heptakis (2,6-bi-O-metil-β-ciclodextrina) a una concentración de 0.1 mg/mL⁻¹ y se dejaron incubar por 37 °C por 24 h en rotación constante (80 rpm), (Roller Drum Eppendorf, New Brunswick™, model: TC-2).

6.5.2. Ensayo de formación de biopelícula

Posterior al periodo de incubación, las células fueron centrifugadas a 3,600 g durante 10 min. El pellet bacteriano se resuspendió en medio SS sin heptakis ajustando a densidad óptica de 1.0 (DO₆₀₀= 1.0; ~1.0x10⁹ UFC/mL). Una vez realizado, se colocaron 100 μL (~1.0x10⁸ UFC/mL) de la suspensión bacteriana en una placa tipo ELISA de 96

pocillos con fondo plano y se dejó incubar a 37 °C por 4 h en condiciones estáticas, con la finalidad de permitir la adhesión bacteriana inicial. Transcurrido el tiempo de incubación, las células no adheridas fueron removidas cuidadosamente por pipeteo y se agregaron 100 µL de medio SS sin heptakis a cada uno de los pocillos. Las placas se dejaron incubar a 37 °C por 96 h en agitación constante (100 rpm). Cada 24 h el medio fue reemplazado cuidadosamente por medio SS fresco sin heptakis.

6.5.3. Fijación, tinción y cuantificación de la biopelícula

Las células adheridas fueron fijadas y teñidas siguiendo el protocolo previamente establecido por O'Toole y Kolter (O'Toole GA et al.1998). La biopelícula fue lavada cuidadosamente con 100 µL de PBS 1X (Gibco) estéril y se dejó secar durante 15 min. Un volumen de 200 µL de metanol absoluto fueron agregados a los pocillos dejándose incubar durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez finalizado, las placas se dejaron secar dentro de una campana de flujo laminar. Posteriormente, se agregaron 200 µL de tinción de cristal violeta a una concentración de 0.05% (p/v⁻¹) y dejó incubar a temperatura ambiente por 10 min en condiciones estáticas. El exceso de colorante fue removido realizando tres lavados con 100 µL de agua mili q estéril (libre de DNAsa). A fin de despegar la biomasa adherida, se agregaron 200 µL de ácido acético al 96% (v/v⁻¹) y se dejó incubar a temperatura ambiente, durante 10 min y en agitación constante (100 rpm). La cantidad de biopelícula fue medida en un lector de placas ELISA (SpectraMax® i3x, Molecular Devices) utilizando el software SoftMax Pro 7.0.2. a una DO de 590 nm. Las cepas mutantes $\Delta bpsABCD$ y $\Delta bvgS$ fueron utilizadas como controles negativos de producción de biopelícula. Por el contrario, la cepa wild type Bp536 (productora de biopelícula) y la cepa previamente caracterizada STO1-SEAT0004-USA (productora fuerte de biopelícula) fueron utilizadas como controles positivos de producción. Se realizaron tres ensayos independientes con 6 réplicas experimentales cada uno. Las diferencias estadísticas fueron calculadas a través de one-way ANOVA y Bonferroni posttest en un paquete estadístico GraphPad Prism v8.

6.5.4. Determinación de la composición de biopelícula

El ensayo fue llevado a cabo en placas de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano y tapas de baja evaporación siguiendo la metodología descrita por Cattelan N. y col. (2016). Para ello, las biopelículas maduras de 96 horas de incubación fueron lavadas con 100 μL de agua destilada estéril y libre de DNAsa. Posteriormente, se agregaron 200 μL de cada uno de los tratamientos: 1) NaIO_2 (40 mM) para la remoción de polisacárido (diluido en H_2O estéril, libre de DNAsas), 2) Proteinasa K (Invitrogen, No. Cat. No. 25530-031) para remoción de proteínas, a una concentración de 1 mg/mL^{-1} en buffer de Tris HCl (10 mM, pH 7.5), CaCl_2 (20 mM) y glicerol al 50% (v/v⁻¹), 3) DNAsa I (EC 3.1.21.1) (Sigma Aldrich, San Luis, MO, E.U.A., Cat. No. D5025) a una concentración de 40 U/mL^{-1} en buffer de Tris HCl (10 mM, pH 7.5), MgCl_2 (10 mM) y CaCl (0.5 mM), para remoción de DNA. Como controles, biopelículas maduras fueron tratadas con 200 μL de cada uno de los buffers (figura 4). Las placas se dejaron incubar a 37 °C por 2 h en condiciones estáticas. Posteriormente, las biopelículas fueron teñidas siguiendo la metodología de tinción con cristal violeta, previamente descrita. La biomasa adherida fue detectada en un lector de placas ELISA (SpectraMax® i3x, Molecular Devices) utilizando el software SoftMax Pro 7.0.2 a una DO de 590 nm. El porcentaje de desprendimiento de biopelícula fue calculado por diferencia con respecto a los controles utilizados. Dos ensayos independientes fueron realizados con 6 réplicas experimentales para cada uno de los tratamientos.

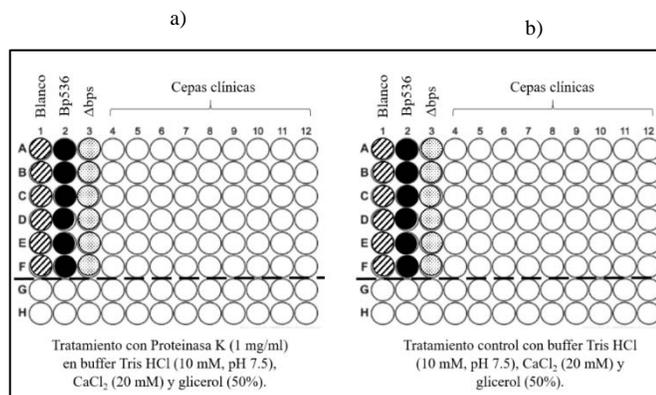


Figura 4. Estrategia experimental para la evaluación de composición de biopelícula de los aislamientos clínicos. a) Biopelícula con tratamiento enzimático (proteínasa K o DNAsa) o con NaIO_2 , b) biopelícula control tratada con el buffer/ H_2O . El ensayo fue realizado por sextuplicado para cada uno de los aislamientos. La cepa Bp536 y la mutante $\Delta bpsABCD$ fueron utilizadas como controles positivo y negativo de producción biopelícula, respectivamente. El blanco corresponde al medio de cultivo utilizado sin inóculo.

6.6. Transformación de aislamientos clínicos

Con la finalidad de analizar la arquitectura de las biopelículas de los aislamientos de *B. pertussis* mediante microscopía confocal, se seleccionaron tres aislamientos clínicos al azar (395-9, 425-11, 888-13) y se incluyó la cepa wild type Bp536 para la preparación de cepas electro competentes y transformación con el plásmido pGBSp1-GFP (Cattelan et al. 2017).

Se tomaron alrededor de 10 UFC de un cultivo joven en agar BG y se colocaron en 3 ml de caldo SS enriquecido con heptakis y se dejaron incubar a 37 °C por 24 h en rotación constante (80 rpm). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó un cultivo secundario en 50 mL de medio SS enriquecido con heptakis, ajustándose a una densidad óptica inicial de 0.2 (DO_{600}) y se dejaron incubar a 37 °C en agitación constante (100 rpm) hasta alcanzar una $\text{DO}_{600}=3$ (~30 h). Una vez realizado, los cultivos fueron colocados asépticamente en un tubo de vidrio estéril para centrifuga, con capacidad de 150 mL y se dejaron centrifugar a 8,000 g durante 20 min a 4 °C. El pellet fue homogenizado y lavado cuidadosamente con 50 mL de agua mili q estéril fría y se

centrifugó nuevamente a las mismas condiciones. El pellet fue lavado y centrifugado a las mismas condiciones una vez más. Finalmente, las células fueron homogenizadas en 500 μL de glicerol (10%, v/v) estéril y fueron congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Un total de 20 ng del plásmido pGBSp1-GFP fueron mezclados con 100 μl de una suspensión bacteriana electro competente y se dejaron incubar en hielo por aproximadamente 10 min. La mezcla fue agregada a una cubeta de electroporación estéril de 0.2 cm de espacio (Gene Pulser®/MicroPulser, BioRad, Catalog No. 165-2086) y se sometió a electroporación con pulso eléctrico de 2.5 Kv y 25 F. Rápidamente se agregó 1 mL de medio SS enriquecido con heptakis, con la finalidad de permitir la recuperación de las células y se dejaron incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h en rotación constante (80 rpm). Posteriormente, placas BG enriquecido con sangre de carnero y suplementadas con kanamicina ($25\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) fueron utilizadas para la recuperación de las células exitosamente transformadas. Las placas fueron incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 días. Todas aquellas UFC resistentes a kanamicina fueron seleccionadas para los ensayos de microscopía confocal.

6.6.1. Análisis de la arquitectura de las biopelículas

Alrededor de 10 UFC de un cultivo joven de cada uno de los aislamientos transformados, fueron tomadas e inoculadas en 3 ml de caldo SS enriquecido con heptakis y suplementado con kanamicina ($25\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) y se dejaron incubar a las condiciones previamente descritas. Cultivos secundarios fueron realizados con una densidad óptica inicial de 0.2 y fueron incubados a las mismas condiciones. Las biopelículas fueron realizadas en cubre objetos (22 x 22 cm) (Fisher Scientific, Fisherbrand™, catalog number: 12-542B), dentro de placas de poliestireno de seis pocillos (Costar® 6-well Clear, Life Sciences, Cat. No. 3736) siguiendo la metodología descrita por Cattelan N. y col. (2018), con ligeras modificaciones. Para esto, cultivos secundarios fueron ajustados a una $\text{DO}_{600}=1$ en medio SS sin heptakis y un volumen de 1 mL de la suspensión fue agregada a cada uno de los pocillos, tratando de cubrir por completo el cubre objetos de vidrio. Las placas fueron incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 h con el

objetivo de permitir la adhesión bacteriana a la superficie de vidrio. Posteriormente, las células no adheridas fueron removidas cuidadosamente por pipeteo y 1 mL de medio SS fresco sin heptakis, fue agregado a cada uno de los pocillos. Las placas fueron incubadas a 37 °C y en agitación constante (100 rpm), con una inclinación horizontal aproximada de 40-50°, con el objetivo de permitir la formación de biopelícula en la superficie de vidrio. Las biopelículas fueron evaluadas a las 24, 48, 72 y 96 h de incubación. El medio de cultivo fue reemplazado cada 24 h de incubación. Posteriormente, el medio fue removido y las células no adheridas fueron removidas con dos lavados de 500 µL de PBS 1X. Aproximadamente 50-60 µL de formalina neutral tamponada al 10% (Sigma Aldrich, Cat. No. HT50-1-1) fueron agregados hasta cubrir por completo los cubre objetos de vidrio y se dejó incubar a temperatura ambiente por 15 min, en la oscuridad. Dos lavados fueron realizados, cuidadosamente con 1 mL de PBS 1X. Los cubre objetos fueron tomados con unas pinzas y fueron montados en líquido de montaje (ProLong™ Gold Antifade Mountant, Thermo Fisher Scientific, Invitrogen™, Cat. No. P36934) e incubados a 4 °C por 24 h.

Finalmente, las biopelículas fueron visualizadas mediante microscopía de escaneo láser confocal (CLSM) utilizando un microscopio Nikon A1R en configuración de pila z, en las Instalaciones de microscopía e imágenes del campus (CMIF) de la Torre de Investigación Biomédica (BRT, Columbus, OH, EUA). Un ensayo independiente fue realizado y evaluado por triplicado. Las biopelículas fueron evaluadas de manera cuantitativa mediante el uso del software COMSTAT2 plug-in en ImageJ (Heydorn et al. 2000 y Schneider et al. 2012). Se midieron grosor de la biopelícula, biomasa y coeficiente de rugosidad para cada uno de los puntos de tiempo.

6.7. Autoagregación de los aislamientos

6.7.1. Ensayo de autoagregación

Debido a que la autoagregación ha sido considerada como uno de los pasos iniciales para la formación de biopelícula, se realizaron ensayos adicionales de

autoagregación en los aislamientos seleccionados, a distintos puntos de tiempo. Para ello, cultivos primarios de cada uno de los aislamientos fueron preparados en tubos de plástico estériles (capacidad de 15 mL) conteniendo 3 ml de caldo SS suplementado dejándose incubar a las condiciones previamente descritas. Los pellets bacterianos fueron obtenidos por centrifugación (3,500 g por 15 min). Posteriormente, las células fueron homogenizadas en medio fresco SS sin heptakis y ajustadas a una densidad óptica de 1.0 ($DO_{600} = 1.0$; $\sim 1.0 \times 10^9$ UFC/mL). Los aislamientos fueron incubados a temperatura ambiente, de manera estática. Cada 2, 5 y 24 h de incubación, se tomaron 100 μ L de la parte superior de la suspensión bacteriana y se midieron por espectrofotometría a una DO_{600} . Tres ensayos independientes fueron realizados incluyendo tres réplicas experimentales. El índice de autoagregación (IA) fue calculado siguiendo la siguiente fórmula:

$$IA = \frac{OD_{t_0} - OD_t}{OD_{t_0}}$$

Dónde:

OD_{t_0} = absorbancia inicial

OD_t = absorbancia final en cada una de las horas establecidas

Las cepas Bp536 y $\Delta bvgS$ fueron utilizadas como controles positivo y negativo de autoagregación. Las diferencias estadísticas fueron calculadas utilizando one-way ANOVA y Tukey posttest para múltiples comparaciones en un paquete estadístico GraphPad Prism v8.

6.7.2. Evaluación de autoagregados bacterianos por microscopía confocal

Con la finalidad de detectar la adhesión y formación de auto agregados de manera visual, cada uno de los aislamientos seleccionados fueron sometidos a una tinción fluorescente *BacLight Green Stain* (ThermoFisher, Cat. No. B35000), siguiendo

las instrucciones del fabricante. Subcultivos bacterianos fueron ajustados a una $DO_{600}=1$ utilizando 1 mL PBS 1X. Las células fueron teñidas con 1 μ L de solución de trabajo *BacLight Green* y fueron incubados por 15 min, a temperatura ambiente, en rotación constante (Mini Lab Roller™ Dual Format Rotator, H5500-50) y en la obscuridad. El volumen total fue agregado en cubre objetos (22 x 22 cm) (Fisher Scientific, Fisherbrand™, catalog number: 12-542B), dentro de placas de poliestireno de seis pocillos (Costar® 6-well Clear, Life Sciences, Cat. No. 3736) y se dejaron adherir y auto agregar en condiciones estáticas a 37 °C durante 1 h, en la obscuridad. Finalmente, los autoagregados bacterianos fueron visualizados por microscopía confocal.

6.8. Análisis de crecimiento bacteriano

Con el objetivo de saber si la producción de biopelícula está influenciada por la tasa de crecimiento bacteriano, se realizaron cinéticas de crecimiento bacteriano, para cada uno de los aislamientos seleccionados. Para ello, cultivos secundarios fueron realizados utilizando 3 mL de SS sin heptakis y una densidad óptica (600 nm) de 0.2 y se dejaron incubar a condiciones anteriormente establecidas. Volúmenes de 100 μ L fueron tomados a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 y 24 h de crecimiento bacteriano. Tres ensayos independientes fueron realizados con dos replicas experimentales cada uno. Diferencias estadísticas fueron calculadas utilizando one-way ANOVA y Bonferroni posttest en un paquete estadístico GraphPad Prism v8.

6.9. Evaluación de la expresión/producción de factores de virulencia en aislamientos circulantes de *B. pertussis*

La evaluación de la expresión y/o producción de los factores de virulencia fue realizada en células planctónicas para cada uno de los aislamientos circulantes de *B. pertussis*.

6.9.1. Evaluación de la expresión de la FHA

La expresión de la FHA fue evaluada mediante PCR tiempo real (qPCR).

Cultivos secundarios de cada uno de los aislamientos fueron preparados con una DO_{600} inicial de 0.2 y se dejaron incubar a 37 °C en rotación constante (80 rpm), hasta alcanzar una $DO_{600}=1$. El ARN total fue extraído mediante un RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Cat. No. 74104), siguiendo las instrucciones del fabricante. Un total de 1 µg de RNA total fue mezclado con 1 µL DNAsa I (Invitrogen Cat. No. 18068015), 1 µL de buffer de reacción 10X y 10 µL de agua DEPC estéril. La mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente por 15 min. La desactivación de la DNAsa I se llevó a cabo incubando la muestra a 65 °C por 10 min. Posteriormente, la integridad del ARN total fue confirmada mediante un gel de agarosa al 1 % (p/v⁻¹) dejando correr a 80 V durante 15 min, utilizando TBE 0.5X (Tris-borato 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0) como buffer de corrida

La síntesis de DNAc se realizó utilizando el kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, Cat. No. 18080044). Para ello, fue preparada una mezcla de reacción incluyendo 0.6 µL de Random primers, 10 µL RNA total, 1 µL de dNTPs (10 mM) y 0.4 µL H₂O grado molecular y se dejó incubar a 65 °C por 5 min para después colocar inmediatamente en hielo. Gentilmente fueron agregados 4 µL de 5X First Strand Buffer, 2 µL de DTT (0.1 M) y 1 µL de RNase out a una concentración de 40U/µL⁻¹ para posteriormente incubar a temperatura ambiente por 2 min. Un volumen de 1 µL de Super Script II RT y 1 µL de H₂O grado molecular fue agregado a la mezcla de reacción y se dejó incubar a 42 °C por 50 min. La inactivación fue realizada incubando la mezcla de reacción a 70 °C durante 15 min. Se agregó 1 µL de RNAsa H y se dejó incubar a 37 °C por 20 min. Finalmente, la cantidad total de RNA (ng/µL) fue medida en un NanoDrop™ 2000/2000c (ThermoFisher Scientific).

Un total de 20 ng de ADNc fueron utilizados para realizar los ensayos de PCR tiempo real utilizando un método de cuantificación relativa y el gen *rpoD* como gen endógeno. Para ello, se buscó una eficiencia de amplificación del 95-100% para ambos genes. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes: *fhaB*-F (5'-GCCACGATTCACG GTGCA-3'), *fhaB*-R (5'-CAGCGTCGCGTCATGCT-3'), *rpoD*-F(5'-CTACAGCGAAACCCTCGAAC-3'), *rpoD*-R(5'-GCCACGGTTGGTGTACTTCT-3'). Para llevar a cabo las amplificaciones, un kit iQ™

SYBR Green SuperMix (*BIO-RAD*, Cat. No. 170-8880). Un total de 200 ng de DNAC fueron agregados a una mezcla de reacción conteniendo 1X de qPCR mix y oligonucleótidos a una concentración de 500 nM. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial y activación de la enzima a 95 °C por 2 min, desnaturalización a 95 °C por 20 s y alineamiento/extensión por 20 y 30 seg, respectivamente durante 35 ciclos. La curva melting fue realizada a las siguientes temperaturas 55-95 °C con 0.5 °C incrementos, por 10 y 30 s. Dos ensayos independientes fueron realizados por triplicado. Las diferencias de expresión fueron analizadas por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando las siguientes formulas:

$$\Delta Ct_{\text{aislamiento}} = Ct_{\text{blanco (bipA)}} - Ct_{\text{endógeno (rpoD)}}$$

$$\Delta Ct_{\text{calibrador (Wild type Bp536)}} = Ct_{\text{blanco (bipA)}} - Ct_{\text{endógeno (rpoD)}}$$

$$2^{-[\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tratamiento (aislamientos)}} - \Delta Ct_{\text{calibrador (Bp536)}}]}$$

6.9.2. Evaluación de la producción de la FHA

La producción de la FHA fue corroborada mediante la técnica de ELISA. Para ello, placas ELISA de alta unión (Corning, Cat. No. 9018) fueron sensibilizadas con 100 μL ($\sim 1.0 \times 10^8$ UFC/mL) de un cultivo joven, previamente ajustado en PBS 1X a una DO=1 ($\sim 1.0 \times 10^9$ UFC/mL) y se dejaron incubar a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, las suspensiones bacterianas fueron removidas y las placas fueron lavadas tres veces con buffer PBST (PBS-0,05% y Tween 20, v/v⁻¹). El bloqueo se realizó agregando 100 μL de leche descremada al 5% (v/v⁻¹) en PBST a cada uno de los pocillos e incubando a 37 °C, durante 1 h. La solución de bloqueo fue removida y las placas fueron lavadas tres veces con PBST. Un volumen de 100 μL del anticuerpo primario (mouse anti-FHA, NIBSC, Cat. No. JN1H-11, dilución 1:1000), diluido en leche descremada al 5% (v/v⁻¹) en PBST fue agregado a cada uno de los pocillos. Las placas fueron nuevamente incubadas a 37 °C durante 2 h y lavadas tres veces con PBST. Un total de 100 μL de una solución de anticuerpo secundario (goat anti-mouse IgG, Sigma Aldrich, Cat No. A-8924, dilución 1:1000) conjugado con peroxidasa de rábano, fueron

agregados a cada uno de los pocillos, dejando incubar las placas a temperatura ambiente, durante 1 h. Siete lavados fueron realizados utilizando buffer PBST y 100 μL de TMB fueron agregados a cada uno de los pocillos. Las placas se dejaron incubar a temperatura ambiente, en la obscuridad, durante 5-10 min. La reacción se finalizó agregando 50 μL de H_2SO_4 (2N). Finalmente la absorbancia fue medida a 450 nm en un lector de placas ELISA (SpectraMax® i3x, Molecular Devices). Dos ensayos independientes fueron realizados incluyendo tres replicas experimentales en cada uno. Una curva estándar fue incluida en cada uno de los ensayos para la determinación de μg totales de FHA. Las cepas mutantes Δfha y $\Delta bvgS$ fueron utilizadas como controles negativos. Tres pocillos con PBS 1X fueron incluidos como blanco. Diferencias estadísticas fueron obtenidas mediante one-way ANOVA y Tukey posttest para múltiples comparaciones en un paquete estadístico GraphPad Prism v8.

6.9.3. Evaluación de la producción de la ACT

La producción de ACT fue analizada mediante la técnica de ELISA. Para ello, las placas fueron sensibilizadas y bloqueadas como se describió anteriormente en la sesión 6.8.2. Tras tres lavados con PBST, 100 μL de una solución de anticuerpo primario (mouse anti-ACT, BEI resources, Cat. No. NR-34572) diluido en leche descremada al 5% (v/v^{-1}) en PBST, fueron agregados a cada uno de los pocillos. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 2 h y lavadas tres veces con PBST. Un total de 100 μL de una solución de anticuerpo secundario (goat anti-mouse IgG, Sigma Aldrich, Cat No. A-8924, dilución 1:1000) conjugado con peroxidasa de rábano, fueron agregados a cada uno de los pocillos, dejando incubar las placas a temperatura ambiente, durante 1 h. Siete lavados fueron realizados utilizando buffer PBST y 100 μL de TMB fueron agregados a cada uno de los pocillos. Las placas se dejaron incubar a temperatura ambiente, en la obscuridad, durante 5-10 min. La reacción se finalizó agregando 50 μL de H_2SO_4 (2N). Finalmente la absorbancia fue medida a 450 nm en un lector de placas ELISA (SpectraMax® i3x, Molecular Devices). La evaluación de la producción de la ACT fue realizada en tres ensayos independientes incluyendo tres replicas experimentales en cada uno. Las cepas mutantes $\Delta bvgS$ y $\Delta cyaA$ fueron utilizadas como

controles negativos. Tres pocillos con PBS 1X fueron incluidos como blanco. Las diferencias estadísticas fueron calculadas para cada uno de los ensayos independientes realizados por separado, mediante one-way ANOVA y Tukey posttest para múltiples comparaciones en un paquete estadístico GraphPad Prism v8.

6.9.4. Evaluación de la producción de BPS polisacárido

La evaluación de la producción de BPS polisacárido se evaluó mediante la técnica de ELISA. Las placas fueron sensibilizadas y bloqueadas como se describió anteriormente en la sesión 6.8.2. Tras tres lavados con PBST, 100 μ L de una solución de anticuerpo anti-WGA conjugado con peroxidasa de rábano (Biotium, Cat. No. 29073, 1:1000) y diluido en leche descremada al 5% (v/v⁻¹) en PBST, fueron agregados a cada uno de los pocillos. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 2 h. Siete lavados fueron realizados utilizando buffer PBST y 100 μ L de TMB fueron agregados a cada uno de los pocillos. Las placas se dejaron incubar a temperatura ambiente, en la oscuridad, durante 20 min. La reacción se finalizó agregando 50 μ L de H₂SO₄ (2N). Finalmente la absorbancia fue medida a 450 nm en un lector de placas ELISA (SpectraMax® i3x, Molecular Devices). La evaluación de la producción de la polisacárido BPS fue realizada en tres ensayos independientes incluyendo tres replicas experimentales en cada uno. La cepa mutante $\Delta bpsABCD$ fue utilizada como control negativo de producción. Tres pocillos con PBS 1X fueron incluidos como blanco. Las diferencias estadísticas fueron calculadas para cada uno de los ensayos independientes realizados por separado, mediante one-way ANOVA y Tukey posttest para múltiples comparaciones en un paquete estadístico GraphPad Prism v8.

6.9.5. Evaluación de la expresión del gen *bipA*

La evaluación de la expresión del gen *bipA* fue realizado mediante PCR tiempo real por cuantificación relativa, utilizando el método del $2^{-\Delta\Delta ct}$ y eficiencias de amplificación entre el 95-100% para cada uno de los genes. Nuevamente el gen *rpoD* fue utilizado como gen endógeno, utilizando los oligonucleótidos anteriormente

descritos. Para la amplificación del gen *bipA* se utilizaron los oligonucleótidos: *bipA-F* (5'- ACGTCCGACAACGACATTTT-3') y *bipA-R* (TACCGTTCCTCGAGTTGGTC). Las amplificaciones fueron realizadas utilizando el kit iQTM SYBR Green SuperMix (*BIO-RAD*, Cat. No. 170-8880). Un total de 200 ng de DNAc fueron agregados a una mezcla de reacción conteniendo 1X de qPCR mix y oligonucleótidos a una concentración de 400 nM. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial y activación de la enzima a 95 C por 2 min, desnaturalización a 95 °C por 20 s y alineamiento/extensión por 20 y 30 seg, respectivamente durante 35 ciclos. La curva melting fue realizada a las siguientes temperaturas: 55-95 °C con 0.5 °C de incremento, por 10 y 30 s. Dos ensayos independientes fueron realizados por triplicado.

6.9.6. Evaluación de la producción de la proteína bipA

La producción de la proteína bipA fue realizada mediante la técnica de ELISA y la utilización de un anticuerpo policlonal anti-bipA, CT4 (rat anti-bipA). Las placas fueron sensibilizadas y bloqueadas como se describió anteriormente en la sesión 6.8.2. Tras tres lavados con PBST, 100 µL de una solución de anticuerpo CT4 en dilución 1:1000 (Fuchslocher et al. 2003) fueron agregadas a cada pocillo. Las placas fueron lavadas nuevamente tres veces con PBST y 100 µL del anticuerpo secundario anti-rata IgG conjugado con peroxidasa de rábano, en dilución 1:1000, fueron agregados a cada pocillo (Sigma Aldrich, Cat. No. R5130). Las placas fueron lavadas nuevamente, siete veces. Finalmente se utilizó TMB y H₂SO₄ (2N) para terminar la reacción. La absorbancia fue medida a las condiciones anteriormente descritas. Dos ensayos independientes fueron realizados incluyendo tres replicas experimentales en cada uno. Las diferencias estadísticas fueron calculadas para cada uno de los ensayos independientes realizados por separado, mediante one-way ANOVA y Tukey posttest para múltiples comparaciones en un paquete estadístico GraphPad Prism v8.

6.10. Ensayo de adhesión a células epiteliales

Con el objetivo de conocer el rol de la producción de polisacárido BPS en la adhesión, en los aislamientos circulantes de México, se utilizaron células epiteliales de pulmón de humano A549 (ATCC®, CCL-185™). Dos productores (440-8 y 385-9) y tres fuertes productores (425-11, 888-13 1364-14) de BPS fueron seleccionados. Como control positivo de adhesión fue utilizada la cepa wild type Bp536 y como controles negativos, las cepas mutantes $\Delta bvgS$, Δfha y $\Delta bpsABCD$.

Para ello, Células epiteliales A549 se dejaron crecer en frascos de 75 cm² (Corning®, T-75 flasks Cat. No. 430641) hasta alcanzar una confluencia del 85-90%. Posteriormente, el medio fue retirado y la monocapa celular fue lavada con 10 mL de PBS 1X estéril frío, con el objetivo de remover todo resto de suero del medio y evitar la inactivación de la tripsina. Un volumen de 3 mL de una solución conteniendo tripsina (0.25%) y EDTA (0.53 mM) fue agregado y las células se dejaron incubar a 37 °C por 5 min en una atmósfera enriquecida con 5% de CO₂. Para llevar a cabo la inactivación de la tripsina, se agregaron 10 mL de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, ThermoFisher Scientific, Cat. No. 11995065) suplementado con 10% (v/v⁻¹) de FBS (Corning, Cat. No. 35-015-CV). Las células despegadas fueron homogenizadas cuidadosamente con una pipeta serológica estéril (capacidad de 10 mL) y el volumen total fue centrifugado a 2,500 rpm durante 10 min a 4 °C. El pellet celular fue resuspendido en medio fresco DMEM suplementado con 10% de FBS (v/v⁻¹) y mezclado hasta obtener una solución homogénea. Para obtener el número total de células/mL, un total 20 µL de la mezcla de células epiteliales fueron mezcladas con 20 µL de colorante azul de tripano a una concentración del 0.4% (p/v⁻¹) (Sigma Aldrich, Cat. No. T8154) y se mezclaron cuidadosamente por pipeteo. Las células fueron contadas y se calculó el número total de células por mL, siguiendo la siguiente formula:

$$\text{No. de células} \times 5 \times 2 \times 10 \times 10^3 = \text{células/mL}$$

En donde 5, es el número de cuadrantes contados en el hematocitómetro Neubauer, 2, es debido a la dilución 1:2 realizado con el colorante azul de tripano, 10, una

constante, y 10^3 , para expresar el número de células por mL de medio. Un total de 2×10^5 células epiteliales fueron agregadas a placas de poliestireno para cultivo celular de seis pocillos (Costar® 6-well Clear, Life Sciences, Cat. No. 3736) y fueron incubadas a 37 °C durante 24 h en una atmosfera enriquecida con 5% de CO₂, con el objetivo de permitir la adhesión celular. Al día siguiente, el medio de cultivo fue removido cuidadosamente por aspiración por vacío. Las células fueron infectadas con cada uno de los aislamientos seleccionados utilizando una MOI=10 (4×10^6 UFC) ajustadas en medio DMEM suplementado con 10% de FBS (v/v⁻¹). Con la finalidad de favorecer el contacto bacteriano con las células epiteliales, las placas fueron centrifugadas a 2000 rpm por 5 min. La adhesión bacteriana se llevó a cabo por 15 min incubando cada una de las placas a 37 °C durante 15 min, en una atmosfera enriquecida con 5% de CO₂. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células bacterianas no adheridas fueron removidas por aspiración. Las células epiteliales fueron lavadas cuidadosamente 4 veces, agregando 1 mL de PBS 1X en cada uno de los lavados. Posteriormente, 500 µL de una solución de tritón X-100 (Sigma Aldrich, Cat. No. T9284) a una concentración de 0.1% (v/v⁻¹) para permitir la lisis de las células epiteliales y así mismo, la liberación de las células bacterianas adheridas. Diluciones seriadas fueron realizadas para llevar a cabo la determinación total de UFC. El porcentaje de adhesión fue determinado con la siguiente formula:

$$\text{Total de UFC recuperadas/Total de UFC del inóculo inicial} \times 100$$

Tres ensayos independientes fueron realizados incluyendo tres replicas experimentales en cada uno. Los valores fueron promediados y las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante one-way ANOVA y Tukey posttest para múltiples comparaciones en un paquete estadístico GraphPad Prism v8.

6.11. Ensayo de colonización en animales

Para los ensayos de colonización se utilizaron ratones de la cepa C57BL/G Jackson de entre 6 y 8 semanas de edad. Para ello, se prepararon cultivos primarios de

cada uno de los aislamientos clínicos productores de biopelícula (Bp536 y 385-9), dejándose incubar a 37 °C en rotación constante (80 rpm), hasta alcanzar una $DO_{600}=1$. Cultivos secundarios fueron preparados con una DO_{600} inicial de 0.2 y se dejaron incubar a 37 °C en rotación constante (80 rpm), hasta alcanzar nuevamente una $DO_{600}=1$. Una vez realizado, los aislamientos fueron centrifugados a 3600 g por 15 min, a temperatura ambiente. El pellet bacteriano fue homogenizado en PBS 1X estéril y fueron ajustados a una $OD_{600}=1$ ($\sim 1.0 \times 10^9$ UFC/mL). Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas hasta obtener aproximadamente 1.0×10^7 UFC. Un volumen de 50 μ l (5×10^5 UFC) de cada una de los aislamientos clínicos fueron inoculados intranasalmente a grupos ocho ratones. Los ratones fueron monitoreados diariamente y fueron sacrificados a los siete días post-inoculación. Para ello, los ratones fueron expuestos 5% de isoflurano. Una vez realizado se realizó la dislocación cervical y se colectaron los pulmones, la tráquea y el septo nasal. Los órganos fueron macerados y diluciones seriadas fueron realizadas para la determinación de UFC totales utilizando una solución de PBS 1X adicionado con caseína al 1% (p/v⁻¹).

7. RESULTADOS

7.1. Tipificación de las secuencias *ptxP-ptxA-prn-fim1-fim3*

El 100% de los aislamientos tipificados por secuenciación mostraron la secuencia del promotor de la PTX tipo 3 (*ptxP3*) (figura 5) y el alelo del gen *ptxA* de tipo wild type, o tipo 1 (*ptxA1*).

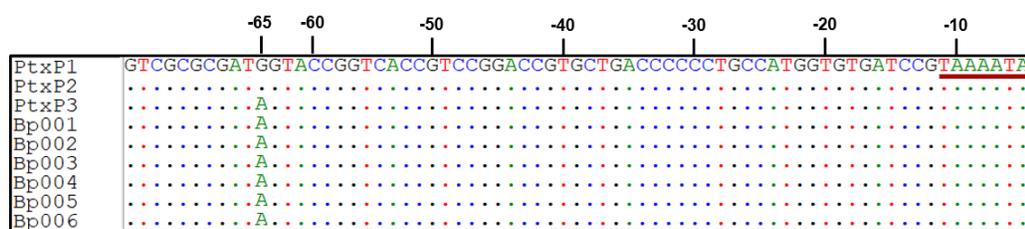


Figura 5. Análisis de secuencias del promotor *ptxP* en aislamientos circulantes de *B. pertussis*. Los puntos indican similitud con la secuencia *ptxP1* de la cepa wild type Tohama I de *B. pertussis* (número de acceso en GenBank: BX470248.1). Mutación detectada en los aislamientos circulantes en la posición -65 del gen que codifica para la toxina de pertussis.

Cuatro aislamientos al azar, fueron tipificados por secuenciación para los genes *prn*, *fim2* y *fim3*. Como se muestra en la tabla, los aislamientos circulantes de Nuevo León, México, pertenecen a dos distintos genotipos emergentes, con un cambio temporal importante en el tipo del gen que codifica para la FIM3. Aquellos aislamientos colectados en el 2008 y 2009, presentan la combinación alélica *ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-2*, mientras que los que fueron colectados en el 2012 y 2014 presentan la combinación *ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-1*. Estos genotipos han sido previamente designados como MT27a y MT27d y se han asociado fuertemente a brotes de tosferina ocurridos en otros países en donde las proteínas fimbriales han sido incluidas en la vacunación acelular (Miyaji et al. 2013).

Tabla 3. Genotipos detectados en los aislamientos circulantes de *B. pertussis* del estado de Nuevo León, México.

Clona predominante y subtipos	Año*	Genotipo	Designación	Referencia
A1	2008	<i>ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-2</i>	MT27a	
A2	2009	<i>ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-2</i>	MT27a	Miyaji et al.
A	2012	<i>ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-1</i>	MT27d	2013
A3	2014	<i>ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-1</i>	MT27d	

*: Año de colección del aislamiento circulante.

7.2. Serotipificación de FIM2/FIM3

La serotipificación de los aislamientos fue realizada mediante la técnica de ELISA utilizando anticuerpos anti-Fim2 y anti-Fim3 en ensayos independientes. Todos aquellos aislamientos que presentaron una producción significativamente mayor que el aislamiento STO1-SEAT0004USA y sin diferencias significativas con respecto a la cepa wild type Bp536, fueron considerados como productores de Fim2. Mientras que todos los aislamientos con una producción significativamente mayor que la cepa wild type Bp536 y sin diferencias significativas con el aislamiento STO1-SEAT0004USA, fueron considerados como productores de Fim3. Aquellos aislamientos sin diferencias significativas con respecto a ambas cepas y con diferencias significativas respecto la mutante $\Delta bvgS$, fueron consideradas como productoras de ambas proteínas Fim2 y Fim3. Por el contrario, todos los que presentaron diferencias significativas con la cepa Bp536 y el aislamiento STO1-SEAT0004USA, y sin diferencias significativas con la cepa mutante $\Delta bvgS$, fueron considerados como aislamientos no productores de FIM.

La figura 6 muestra la distribución de los serotipos de fimbria detectados en los aislamientos de *B. pertussis* circulantes en el estado de Nuevo León, México, del 2007 al 2014. Se detectó un cambio temporal importante en el tipo de producción de fimbria a través de los años. Aquellos que circulaban del 2007 al 2010 (30%, 34/113) expresan

únicamente el tipo de Fim3, mientras que aquellos que circulaban del 2011 al 2014 (70%, 79/113) expresan solo el tipo de Fim2.

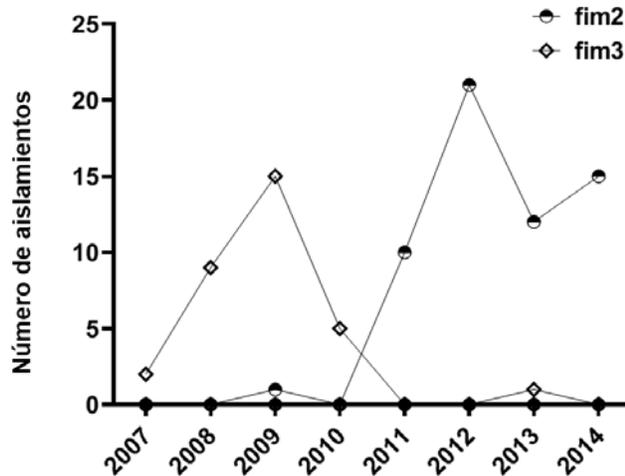


Figura 6. Frecuencias temporales de los serotipos Fim2 y Fim3 en aislamientos circulantes de *B. pertussis* del estado de Nuevo León, México, colectados del 2007 al 2014. La determinación del serotipo de fimbria fue realizada mediante la técnica de ELISA. La cepa wild type Bp536 y el aislamiento STO1-SEAT0004USA, fueron utilizados como controles positivos de producción de Fim2 y Fim3, respectivamente. La mutante $\Delta bvgS$ fue utilizada como control negativo de producción. Diferencias significativas fueron determinadas mediante one-way ANOVA y Tukey posttest ($P \leq 0.05$).

7.3. Evaluación de la producción de biopelícula

Como anteriormente fue descrito, para evaluar la producción de biopelícula se prepararon cultivos primarios en medio SS suplementado con heptakis. Tras 24 h de incubación en rotación constante, utilizando tubos de poliestireno, se detectó la formación de un anillo bacteriano en la interfaz aire-líquido. La mayoría de los aislamientos mostró la formación de anillos bacterianos gruesos y a niveles comparables con el aislamiento STO1-SEAT0004USA, anteriormente reportado como fuerte productora de biopelícula. De manera interesante, el aislamiento 888-13 no presentó la formación del anillo bacteriano, mostrando un crecimiento similar a las cepas mutantes no productoras de biopelícula, las cepas $\Delta bpsABCD$ y $\Delta bvgS$ de *B. pertussis* (figura 7).

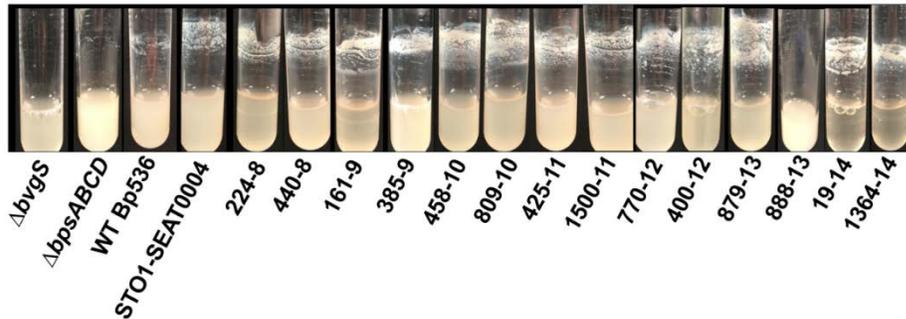


Figura 7. Formación de anillo bacteriano de los aislamientos circulantes de *B. pertussis* en la interfaz aire-líquido utilizando tubos de poliestireno.

La determinación de la producción de biopelícula fue evaluada mediante el método de cristal violeta. Como se muestra en la figura 8, la mayoría de los aislamientos presentó una producción significativamente mayor en comparación con la cepa productora Bp536. Interesantemente, muchos de estos también presentaron una producción significativamente mayor al aislamiento STO1-SEAT0004USA, considerado anteriormente como fuerte productor de biopelícula. El aislamiento incapaz de formar el anillo bacteriano en la interfaz aire-líquido no presentó diferencias significativas con el aislamiento GMT1 y cepas mutantes $\Delta bpsABCD$ y $\Delta bvgS$, por tanto, fue considerado como no productor de biopelícula. No se encontró ninguna correlación entre la producción de biopelícula y los datos epidemiológicos recolectados, tales como año, edad, estado de vacunación.

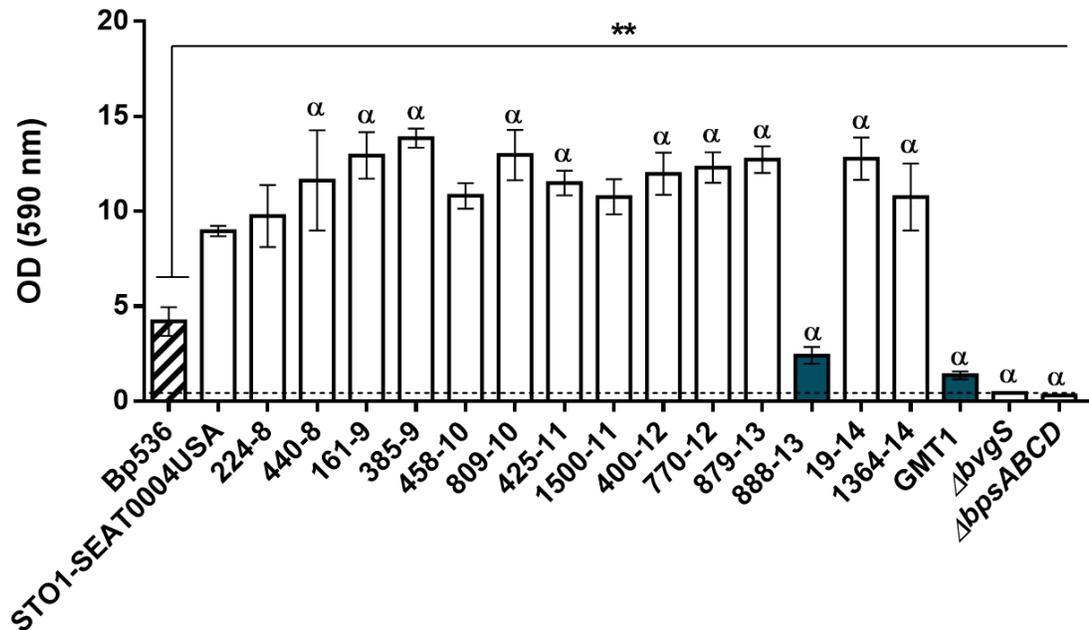


Figura 8. Análisis de la producción de biopelícula en aislamientos circulantes de *B. pertussis* mediante el método de cristal violeta. El análisis de biopelícula fue realizado en placas de 96 pocillos, a 37 °C por 96 h. Las barras representan el promedio y la DS de dos ensayos independientes realizados por sextuplicado. Todos aquellos aislamientos con una producción significativamente mayor que la cepa Bp536 fueron considerados como fuertes productores de biopelícula. La significancia estadística fue calculada utilizando one-way ANOVA y Bonferroni posttest. **: $P < 0.01$ con respecto a la cepa wild type Bp536; α: $P < 0.01$ con respecto al aislamiento fuerte productor de biopelícula, STO1-SEAT0004USA.

7.4. Composición de las biopelículas bacterianas de los aislamientos circulantes de *B. pertussis*

Con el objetivo de conocer si las diferencias en la producción de biopelícula entre los aislamientos circulantes de *B. pertussis* y las cepas control, están determinadas por la composición de la misma, se realizaron ensayos de desprendimiento utilizando distintos tratamientos (figura 9).

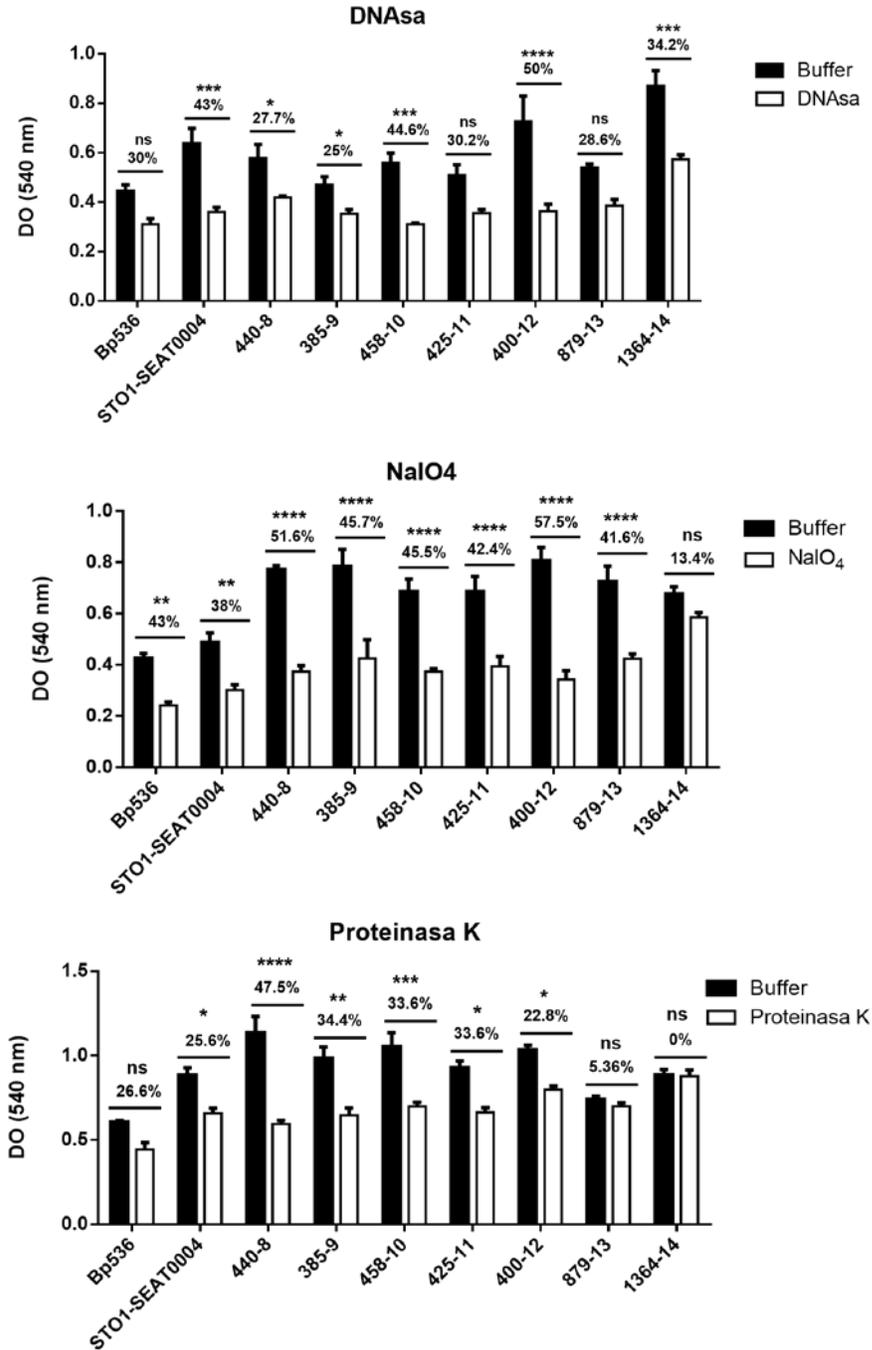


Figura 9. Composición de las biopelículas de los aislamientos de *B. pertussis* colectados en Nuevo León, México. Biopelículas maduras de 96 h fueron tratadas con a) DNase, b) NaIO₄ y c) proteinasa K a 37 °C durante 2 h. Las barras representan el promedio y la DS de dos ensayos independientes realizados por triplicado. El desprendimiento de biopelícula fue calculado por diferencia entre la biopelícula madura (96 h) y su buffer control y se encuentra expresado en porcentaje. Diferencias significativas fueron calculadas mediante two-way ANOVA, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$.

Nuestros resultados mostraron que los aislamientos de *B. pertussis* presentan un porcentaje de desprendimiento significativo cuando son tratados con NaIO₄ (40 mM), de hasta el 57.5%, a excepción del aislamiento colectado en el 2014 (1364-14).

Contrario a la cepa wild type Bp536, se encontraron diferencias significativas de desprendimiento de biopelícula con el tratamiento de DNAsa (40 U/mL⁻¹) y proteinasa K (1 mg/mL⁻¹), para la mayoría de los aislamientos, colectados del 2008 al 2012. Estos resultados sugieren que las principales diferencias en la producción de biopelícula de los aislamientos circulantes de *B. pertussis* de México, con respecto a la cepa Bp536, podrían deberse a una mayor composición de proteínas y DNA. A pesar de esto, el aislamiento colectado en el 2013 (879-13), no presentó diferencias, por lo que su biopelícula podría estar compuesta principalmente por carbohidratos. De la misma manera, el aislamiento 1364-14 no mostró desprendimiento significativo tras los tratamientos con NaIO₄ y proteinasa K, por lo que su biopelícula podría estar compuesta principalmente de DNA y en menor cantidad por carbohidratos y proteínas.

7.5. Evaluación de la arquitectura de las biopelículas por microscopía confocal

Para evaluar las diferencias en la arquitectura de las biopelículas, aislamientos seleccionados (Bp536, 385-9, 425-11, 888-13) y etiquetados con el pGBSp1-GFP se dejaron crecer en modo de biopelícula a distintos puntos de tiempo. Como se muestra en la figura 10, los aislamientos circulantes productores de biopelícula (385-9 y 425-11) mostraron formación de la misma desde las 24 h de incubación, en comparación con la cepa wild type Bp536, quien mostró solamente adherencia a la superficie de vidrio y formación de micro colonias bacterianas. De la misma manera, los aislamientos presentaron una mayor altura de biopelícula en todos los puntos de tiempo evaluados, así como biopelículas mucho más homogéneas. Por el contrario, la cepa Bp536 mostró biopelículas más heterogéneas, con la formación de más canales de agua en su matriz.

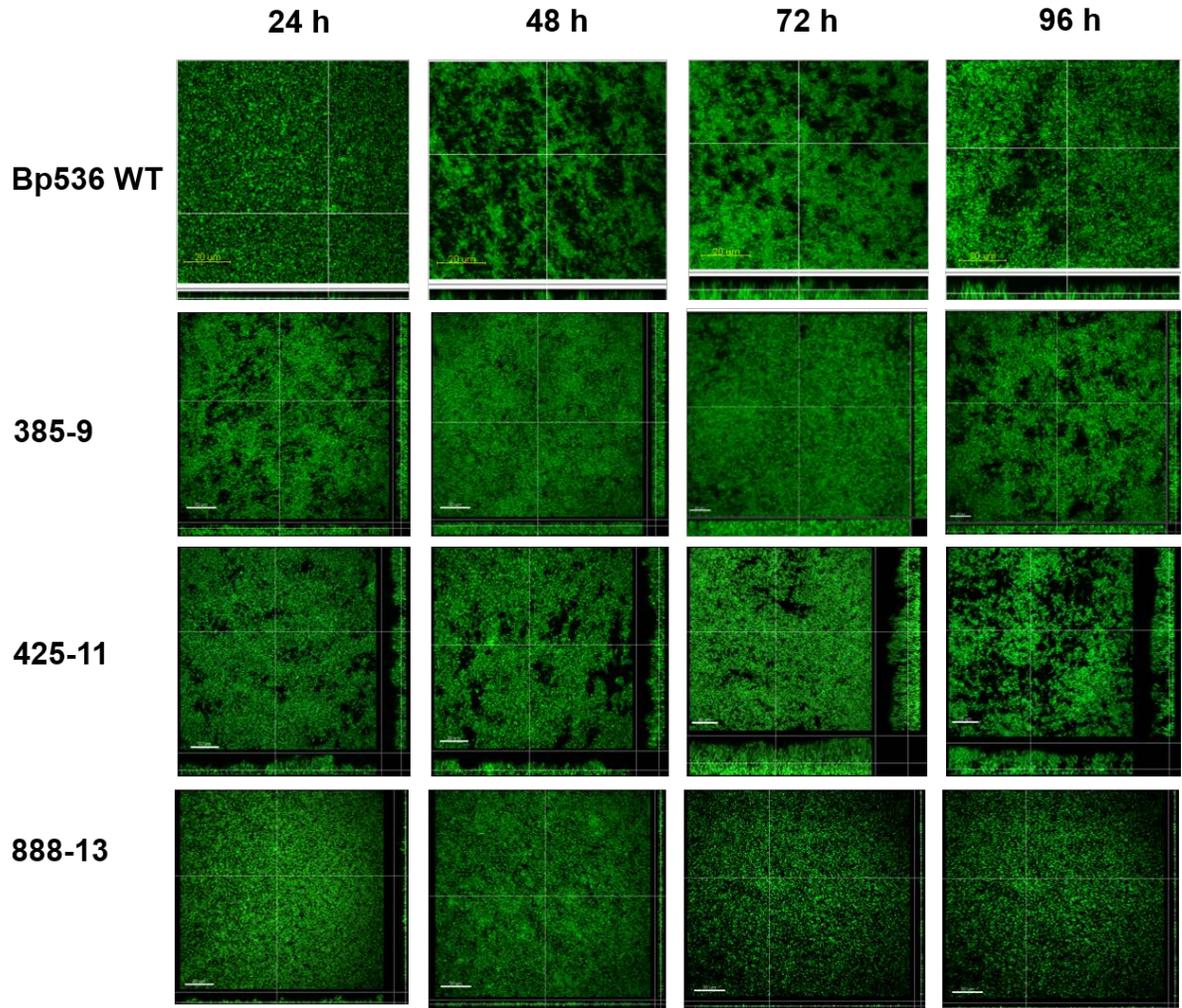


Figura 10. Análisis de las biopelículas por microscopía confocal laser de barrido (MCLB). Aislamientos seleccionados fueron etiquetados con el plásmido pGBSp1-GFP y fueron utilizados para evaluar la arquitectura de las biopelículas mediante MCLB, a distintos puntos de tiempo (24, 48, 72 y 96 h). Las micrografías fueron adquiridas a 0.9 μm y z -intervalos. Se muestran los planes focales representativos xy y xz .

Por otro lado, el aislamiento 888-13, incapaz de formar el anillo bacteriano en tubos de poliestireno y clasificado como no productor de biopelícula por el método de cristal violeta, mostró una baja adhesión bacteriana a la superficie de vidrio, sin formación de biopelícula, en todos los puntos de tiempo. El análisis de las micrografías mediante el software COMSTAT2, demostró que los aislamientos circulantes productores de biopelícula (385-9 y 425-11) presentan niveles significativamente mayores de biomasa y máximo grosor con respecto a la cepa Bp536 (figura 11).

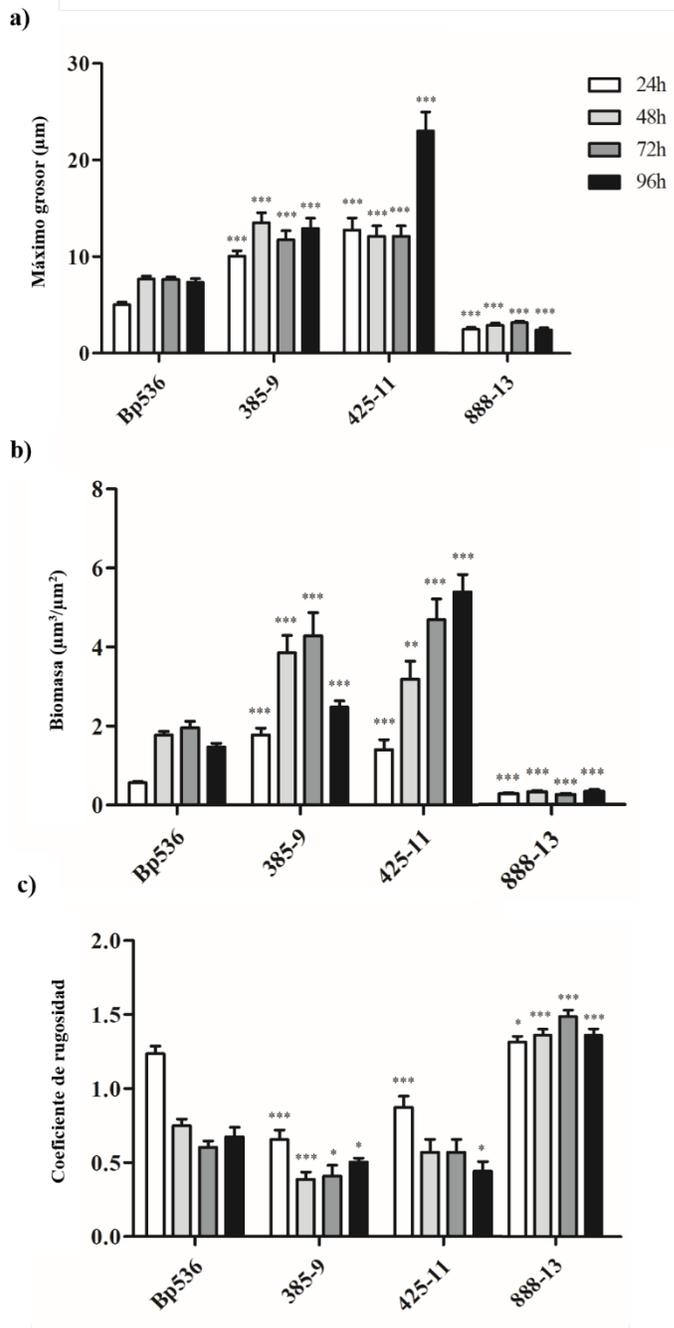


Figura 11. Análisis de las biopelículas mediante COMSTAT. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal fueron analizadas mediante el software COMSTAT2. Para cada uno de los aislamientos se determinó a) máximo grosor (μm), b) biomasa ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) y c) coeficiente de rugosidad. Cada una de las barras representa el promedio y DS de un ensayo independiente realizado por triplicado. Los valores P fueron determinados mediante two-way ANOVA. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$.

Consistente con las imágenes obtenidas por MCLB, los niveles de biomasa bacteriana y máximo grosor del aislamiento no productor de biopelícula (888-13) fueron significativamente menores con respecto a la cepa wild type Bp536.

Por otro lado, se determinó el coeficiente de variabilidad de las biopelículas en cada uno de los aislamientos seleccionados, la cual es una medida indicativa del grado de variabilidad/heterogeneidad de las biopelículas. Como puede observarse: 1) la cepa Bp536 presenta mayor grado de variabilidad, en niveles significativos con respecto a los aislamientos circulantes productores de biopelícula. Nuevamente, estos resultados son consistentes con lo observado por MCLB, en donde la cepa Bp536 forma biopelículas más heterogéneas con mayor cantidad de canales en la matriz; 2) el aislamiento 888-13, no productor de biopelícula, presenta niveles de heterogeneidad significativamente mayores que la cepa Bp536 y que los aislamientos circulantes evaluados.

7.6. Evaluación de la autoagregación bacteriana

Se realizó cinéticas de autoagregación bacteriana en aislamientos seleccionados, con el objetivo de conocer si el fenotipo de biopelícula está positivamente correlacionado con la autoagregación inicial. A pesar de que a las 12 h de incubación, todos los aislamientos circulantes mostraron un índice de autoagregación en niveles significativamente mayores que la cepa Bp536, solamente los aislamientos colectados del 2008 al 2014, presentaron una autoagregación temprana en niveles significativos con respecto a la cepa fuerte productora de biopelícula, STO1-SEAT0004USA. Interesantemente, el aislamiento no productor de biopelícula, presentó una autoagregación significativamente menor que la cepa Bp536 y sin diferencias estadísticas con la cepa mutante $\Delta bvgS$ (figura 12). Nuestros resultados sugieren fuertemente que la autoagregación bacteriana en aislamientos de *B. pertussis* circulantes de México está fuertemente correlacionada con el fenotipo de producción de biopelícula.

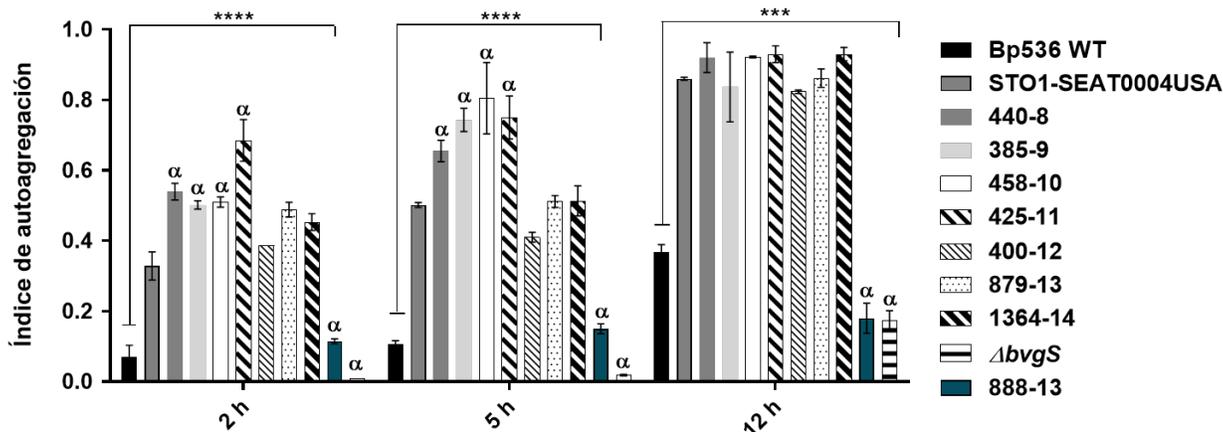


Figura 12. Cinética de autoagregación de los aislamientos de *B. pertussis*. La autoagregación fue realizada a las 2, 5 y 12 h de incubación tanto para aislamientos productores y como para no productores de biopelícula (888-13). Cada barra indica el promedio y la DS de tres ensayos independientes realizados por triplicado. Las significancias estadísticas fueron determinadas utilizando one-way ANOVA y Tukey posttest, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.001$ con respecto a la cepa wild type Bp536; α : $P < 0.01$ con respecto al aislamiento fuerte productor de biopelícula STO1-SEAT0004USA.

7.7. Evaluación de la autoagregación mediante microscopía confocal

Se realizó una evaluación microscópica cualitativa de los autoagregados bacterianos, esto con el objetivo de: 1) conocer la capacidad de adhesión bacteriana, por parte de los aislamientos a las superficies y, 2) confirmar la capacidad de autoagregación de los mismos. En la figura 13 se puede observar que tras la incubación en condiciones estáticas, los aislamientos fuertes productores de biopelícula (440-8, 385-9, 458-10, 425-11, 400-12, 879-13 y 1364-14), muestran adhesión a la superficie con la formación de autoagregados grandes y micro colonias bacterianas en comparación con la cepa Bp536, la cual solamente muestra adhesión a la superficie de vidrio, sin capacidad autoagregativa. Interesantemente, el aislamiento circulante 888-13, no productor de biopelícula, es incapaz de adherirse y de autoagregar. Por el contrario, el aislamiento no productor de biopelícula colectado en EUA, GMT1, es capaz de adherirse a la superficie pero no de autoagregar. Debido a que la FHA es una de las principales adhesinas involucradas en la autoagregación de *B. pertussis*, nuestros resultados sugieren fuertemente que el aislamiento no productor de biopelícula (888-13) podría presentar una baja o nula expresión de la FHA.

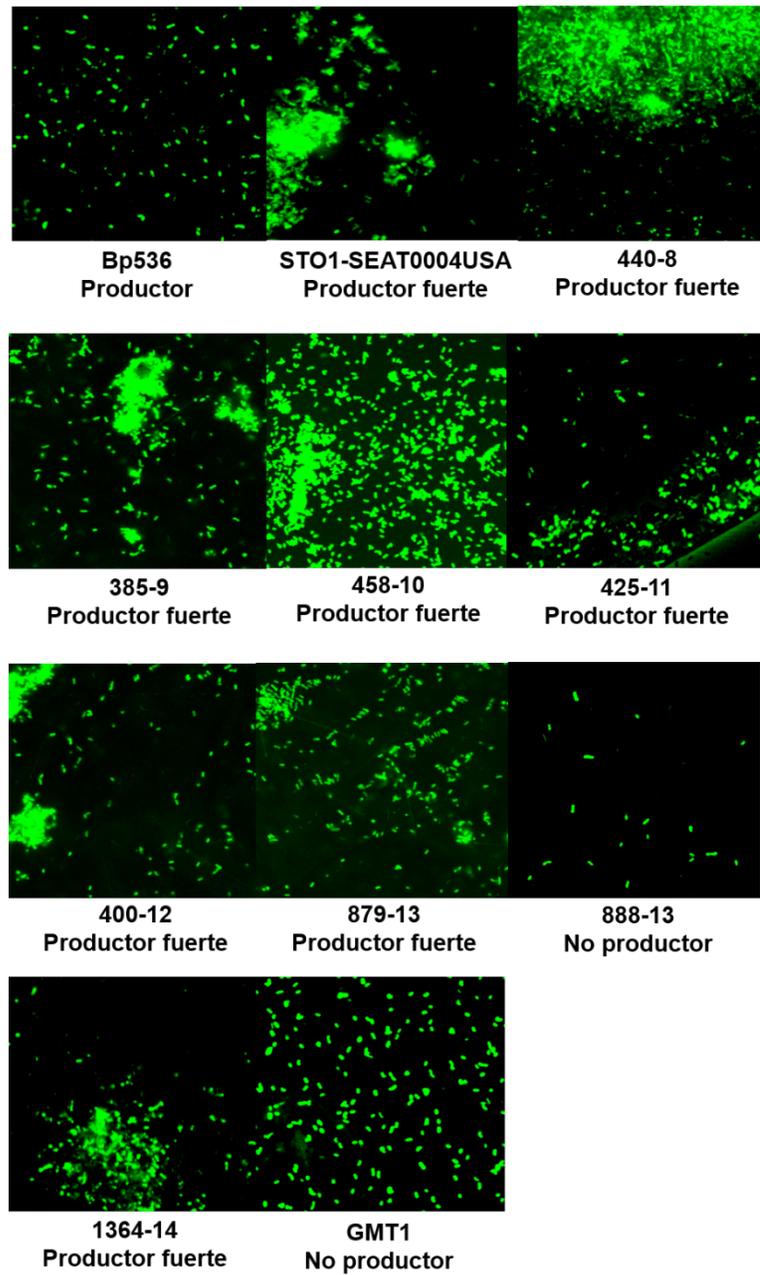


Figura 13. Análisis de autoagregación y adherencia bacteriana mediante microscopía confocal. La adhesión y autoagregación bacteriana fue observada a través del objetivo 60X mediante microscopía confocal.

7.8. Análisis de tasa de crecimiento bacteriano

Se realizaron cinéticas bacterianas para conocer si la fuerte producción de biopelícula de los aislamientos circulantes de México está influenciada por la tasa de crecimiento bacteriano. Como se observa en la figura 14, no se encontraron diferencias significativas entre los aislamientos clínicos en los distintos puntos de tiempo. Por el contrario, se detectó un crecimiento significativamente mayor en la cepa Bp536 (productora de biopelícula) a las 24 h de incubación. Nuestros resultados sugieren que la alta producción de biopelícula por parte de los aislamientos circulantes, no se encuentra influenciada por una mayor tasa de crecimiento bacteriano. Por tanto, el alto índice de autoagregación y la fuerte producción de biopelícula podría deberse a una mayor expresión de factores de virulencia asociados a la misma.

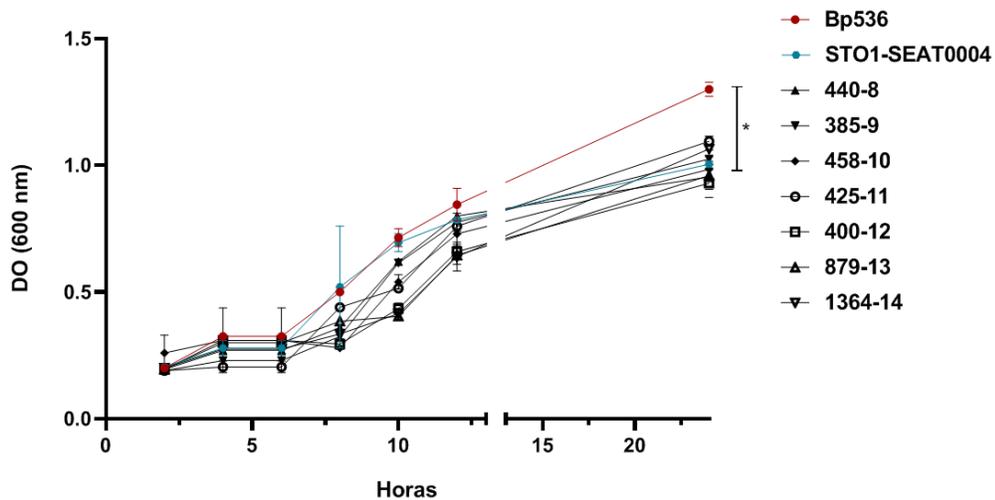


Figura 14. Cinética de crecimiento bacteriano. Las cinéticas bacterianas fueron realizadas en caldo SS con heptakis a 37 °C en rotación constante. La DO fue determinada a las 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 h. Cada punto de tiempo representa el promedio y DS de dos ensayos independientes realizados por triplicado. Diferencias estadísticas fueron calculados mediante ANOVA one-way y Tukey posttest, *: $P < 0.05$.

7.9. Evaluación de la expresión/producción de factores de virulencia

7.9.1. Evaluación de la expresión/producción del gen *fhaB*/proteína FHA en aislamientos circulantes

Los aislamientos con alto índice de autoagregación y fuerte producción de biopelícula mostraron una alta expresión del gen *fhaB* con respecto a la cepa Bp536. Por el contrario, el aislamiento no productor de biopelícula, 888-13, presentó niveles bajos de producción del mismo (figura 15).

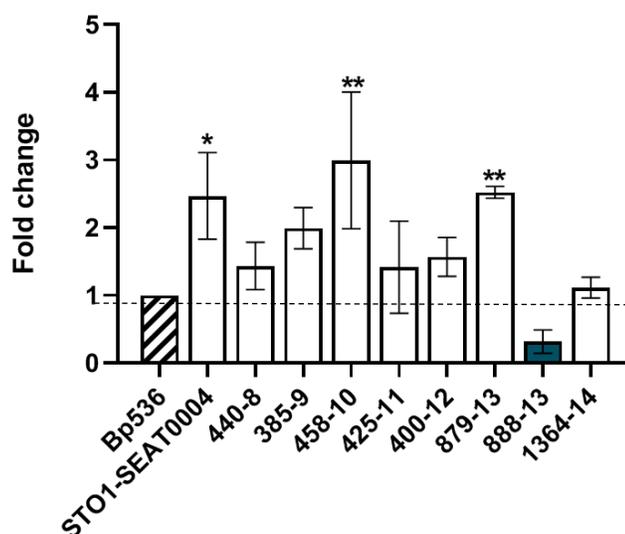


Figura 15. Evaluación de la expresión del gen *fhaB*. Los niveles de expresión del gen *fhaB* fueron determinados mediante qPCR a partir de células planctónicas, utilizando un método de cuantificación relativa y el método $2^{-\Delta\Delta ct}$. Cada una de las barras muestra el promedio y la DS de dos ensayos independientes realizados por triplicado y normalizados con respecto a la cepa Bp536; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$.

Con el objetivo de confirmar nuestros resultados de expresión, se realizó la evaluación de la producción de la proteína FHA mediante ELISA. Como se observa en la figura 16. Todos los aislamientos presentaron una producción alta de FHA comparado con la cepa Bp536, la mayoría en niveles significativos. Consistente con los resultados de expresión obtenidos, el aislamiento 888-13, presentó una baja producción (figura 16).

Nuestros resultados sugieren que la alta producción de FHA podría estar involucrada en la rápida autoagregación bacteriana y la formación de biopelícula en aislamientos circulantes de *B. pertussis* colectados de México.

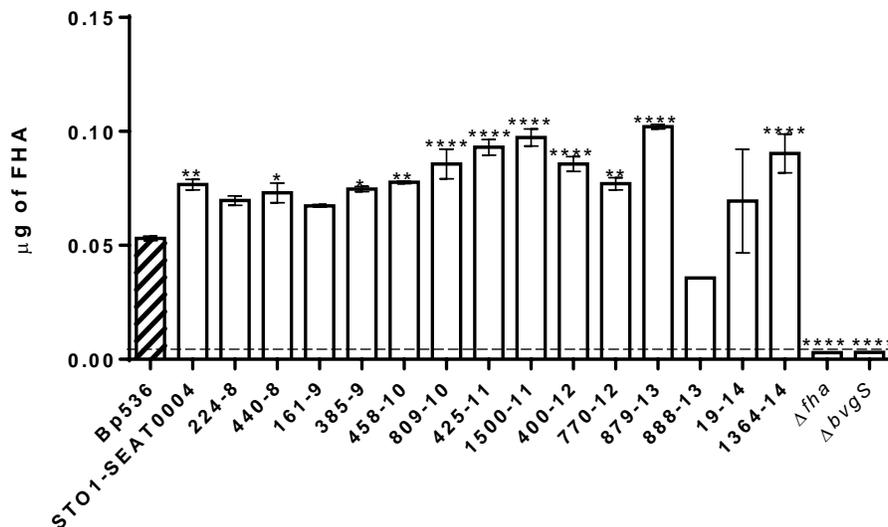


Figura 16. Evaluación de la producción de FHA de los aislamientos circulantes de *B. pertussis*. La producción de la FHA fue determinada mediante ELISA utilizando FHA purificada para la determinación de la concentración (μg). Las barras muestran el promedio y DS de dos ensayos independientes realizados por triplicado. Las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante one-way ANOVA y Tukey posttest; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$.

7.9.2. Evaluación de la producción de BPS polisacárido en aislamientos circulantes

La evaluación de la producción de BPS en células planctónicas mostró que todos los aislamientos circulantes, tanto productores como no productores de biopelícula, presentan niveles de producción significativamente más altos y con una tendencia incrementada a través de los años. Aquellos aislamientos que circulaban del 2011 al 2014 presentaron una producción mucho mayor a aquellos que lo hicieron del 2008 al 2010 como se muestra en la figura 17.

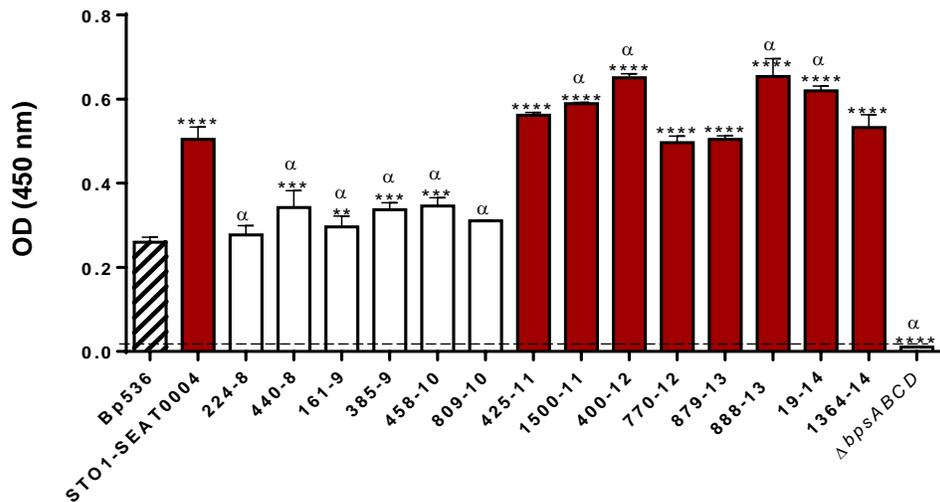


Figura 17. Evaluación de los niveles de producción de Bps polisacárido por parte de los aislamientos de *B. pertussis*. La evaluación de la producción de BPS fue realizada mediante ELISA utilizando un anticuerpo WGA-HRP. Tres ensayos independientes fueron realizados. Las barras muestran el promedio y DS de un ensayo independiente realizado por triplicado. Las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante one-way ANOVA y Tukey posttest; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ con respecto a la cepa wild type Bp536.

7.9.3. Evaluación de la producción de la ACT en aislamientos circulantes

Se ha demostrado que la ACT, es una hemolisina que actúa directamente inhibiendo la autoagregación y por tanto la formación de biopelícula de *B. pertussis*. Por lo anterior, nos preguntamos si el fenotipo de biopelícula en los aislamientos colectados de México está directamente relacionada con su producción.

Tras crecer los aislamientos de manera convencional en medio BG enriquecido con sangre de carnero, observamos que la mayoría de los aislamientos circulantes presentan un halo pequeño de B-hemólisis alrededor de las colonias, mientras que la cepa Bp536 y el aislamiento GMT1, no productor de biopelícula, presentaban halos grandes. Consistente con el fenotipo morfológico observado, los resultados de la prueba

de ELISA demostraron que todos los aislamientos circulantes de México producen niveles significativamente más bajos que las cepas control, como se muestra en la figura 18. Interesantemente, la producción de la ACT fue independiente del fenotipo de biopelícula, ya que el aislamiento no productor, 888-13, presentó niveles bajos de la misma. Esto sugiere, que la falta de producción de biopelícula en el aislamiento colectado en el 2013, podría ser efecto de a la baja expresión de la FHA y no una alta producción de la ACT, como lo es para el aislamiento no productor, GMT1.

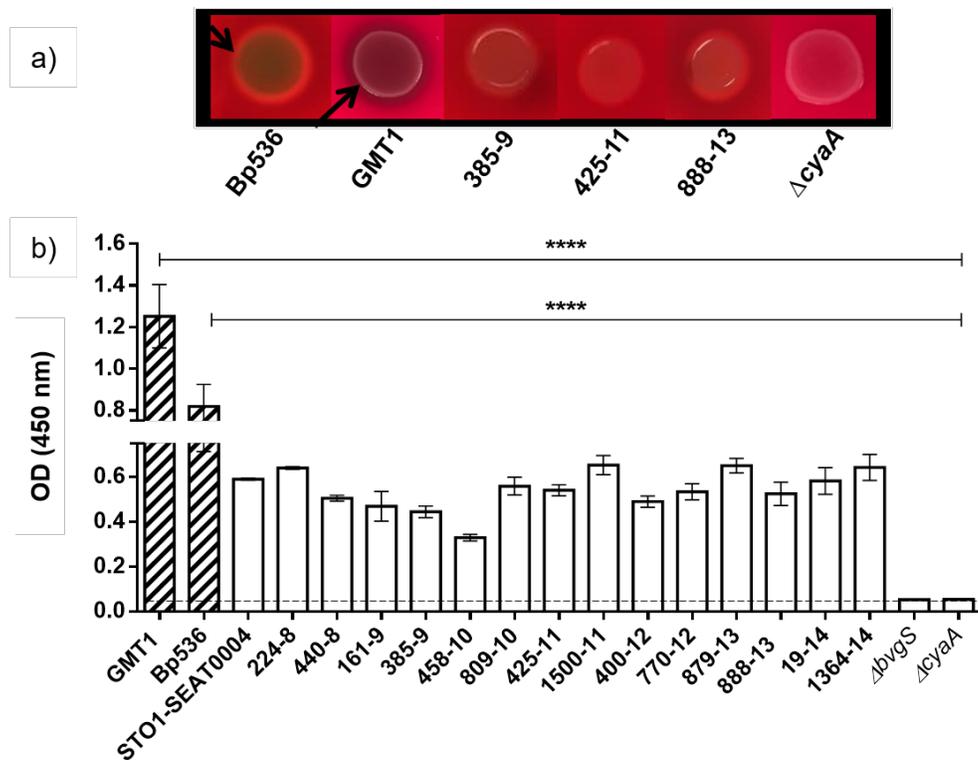


Figura 18. Evaluación de la producción de la ACT. a) hemolisis generada por las cepas clínicas control y aislamientos circulantes de *B. pertussis* de México, en agar BG enriquecido con sangre de carnero. b) Evaluación de la producción de la ACT mediante la técnica de ELISA. Tres ensayos independientes fueron realizados incluyendo tres réplicas experimentales en cada uno. Las barras muestran el promedio y DS de un ensayo independiente. Las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante one-way ANOVA y Tukey posttest; ****: $P < 0.0001$ con respecto a la cepa productora baja de biopelícula, Bp536 y el aislamiento clínico no productor de biopelícula, GMT1-USA.

7.9.4. Evaluación de la expresión/producción del gen *bipA*/proteína BipA en aislamientos circulantes

Como ha sido mencionado anteriormente, la proteína BipA es una de las principales producidas en el modo biopelícula en *B. pertussis*. Y mientras en *B. holmesii* actúa inhibiendo la autoagregación, no se ha demostrado el efecto de su producción en *B. pertussis*. Por esta razón, evaluamos la expresión del gen *bipA*, y confirmamos los niveles de producción de la proteína por la técnica de ELISA en células planctónicas. Como se puede observar en la fig, los aislamientos circulantes fuertes productores de biopelícula presentaron niveles significativamente menores de expresión/producción del gen *bipA* y de la proteína BipA. Por el contrario la cepa Bp536, la cual presenta niveles bajos de producción de biopelícula, presenta altos niveles de producción de la proteína BipA (figura 19). Nuestros resultados sugieren que la proteína BipA podría tener un efecto inhibitor en la autoagregación de *B. pertussis*. Sin embargo, análisis detallados son necesarios.

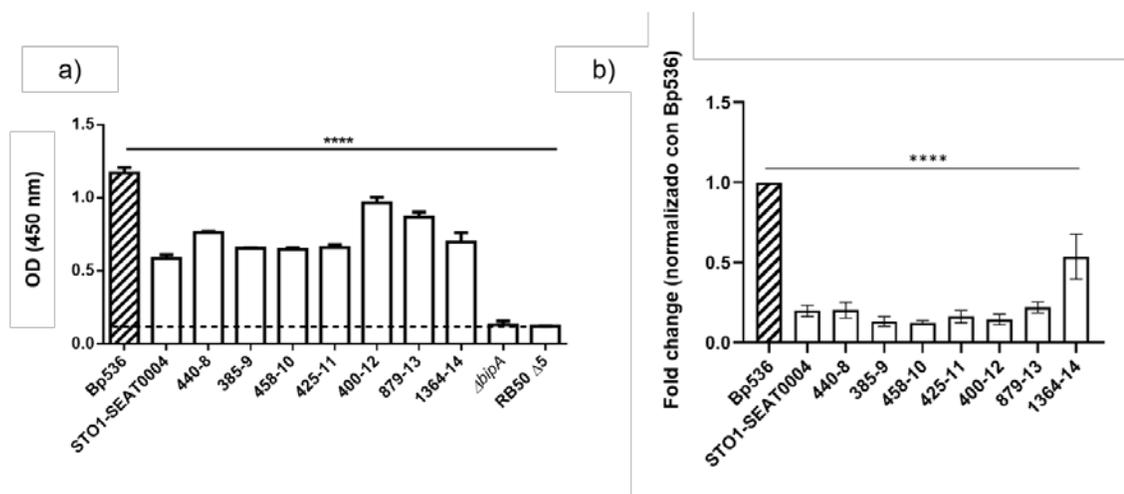


Figura 19. Evaluación de la expresión/producción del gen *bipA* y la proteína BipA. a) los niveles de producción de la proteína BipA fueron evaluados mediante la técnica de ELISA. Tres ensayos independientes fueron realizados incluyendo tres réplicas experimentales en cada uno. Las barras muestran el promedio y DS de un ensayo independiente. Las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante one-way ANOVA y Tukey posttest; ****: $P < 0.0001$ con respecto a la cepa productora baja de biopelícula, Bp536; b) la expresión del gen *bipA* fue evaluada mediante qPCR, los datos fueron valuados mediante cuantificación relativa con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, ****: $P < 0.0001$ con respecto a la cepa productora baja de biopelícula, Bp536.

7.10. Adhesión a células epiteliales A549

Para la evaluación del porcentaje de adhesión a células epiteliales (A549), se seleccionaron dos aislamientos productores (440-8 y 385-9) y dos fuertes productores de BPS (425-11 y 1364-14). De la misma manera, se incluyó el aislamiento no productor de biopelícula (888-13) (figura 20). Nuestros resultados mostraron todos los aislamientos productores de biopelícula presentan niveles de adhesión mayores que la cepa Bp536. Sin embargo, solo aquellos fuertes productores de BPS presentaron porcentajes de adhesión desde un 60 hasta un 100% como puede ser observado en la figura. Estos resultados muestran: 1) la adaptación de los aislamientos circulantes de *B. pertussis* a través de los años y 2) producción de BPS está directamente relacionada con el porcentaje de adhesión a las células epiteliales A549 de pulmón de humano.

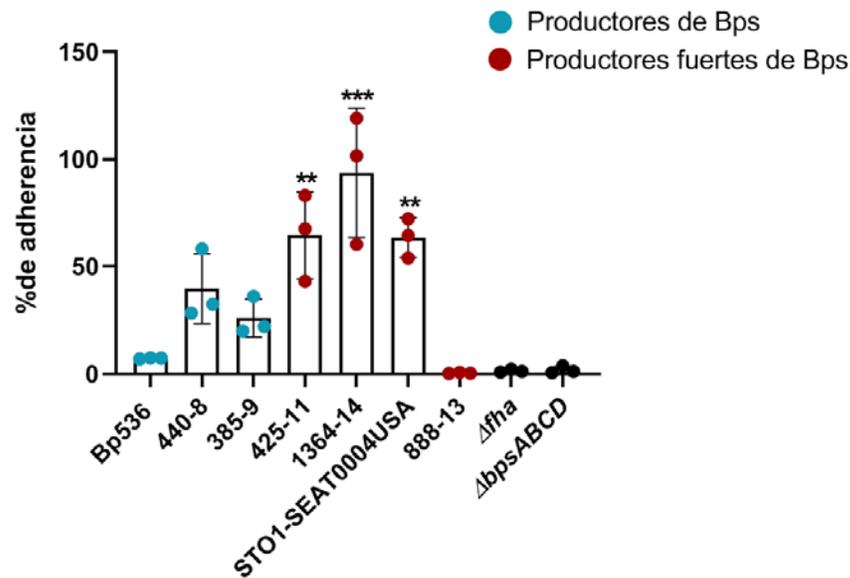


Figura 20. Adhesión bacteriana a células epiteliales de pulmón de humano, A549. Las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante one-way ANOVA y Tukey posttest; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ con respecto a la cepa wild type Bp536.

7.11. Ensayos de colonización en animales

Con el objetivo de conocer la influencia de la producción de biopelícula en la colonización del tracto respiratorio, un aislamiento productor fuerte de biopelícula (385-9) y la cepa referencia Bp536, fueron utilizados para infectar ratones C57BL/G Jackson, intranasalmente. Los resultados obtenidos tras siete días post infección demostraron que el aislamiento fuerte productor de biopelícula coloniza fuertemente el septo nasal y los pulmones, a niveles significativamente mayores que la cepa referencia. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en tráquea (figura 21).

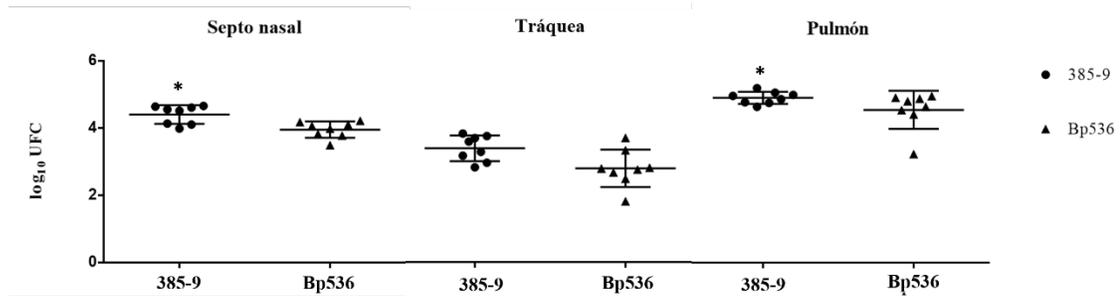


Figura 21. Colonización del tracto respiratorio murino por la cepa Bp536 y el aislamiento circulante de México fuerte productor de biopelícula 385-9. Las barras horizontales representan los valores promedio de cada grupo. Las diferencias estadísticas fueron calculadas mediante ANOVA one-way y Dunnett's posttest, *: $P < 0.05$ con respecto a la cepa wild type Bp536.

8. DISCUSIÓN

B. pertussis, el agente causal de la tosferina, continúa causando brotes alrededor del mundo a pesar a la cobertura de vacunación. Particularmente en México se ha detectado un incremento en el número de casos de la enfermedad. En este estudio determinamos la epidemiología molecular por tipificación por secuenciación de los genes que codifican para los principales factores de virulencia, así como también evaluamos y caracterizamos la producción de biopelícula de los aislamientos circulantes y su posible influencia y cambios derivados por la vacunación.

Estudios anteriores han sugerido que la vacunación con la vacuna wP ha llevado a la generación de cepas que presentan variantes alélicas y antigénicas en los principales factores de virulencia del microorganismo (*prn*, *ptxP*, *ptxA*, *fim2*, *fim3*, *fha*), así como a la aparición de cepas de *ptxP3* hipervirulentas (Bouchez et al. 2015). Nuestros resultados son consistentes con esta idea. En México, se utilizó la vacuna wP durante más de 50 años, lo que puede haber facilitado la aparición y circulación de cepas de *ptxP3* en nuestra población. Estudios anteriores en otros países han demostrado la asociación entre la aparición de cepas de *ptxP3* y el resurgimiento de la enfermedad (Mooi et al. 2009). A pesar de esto, no se analizaron aislamientos colectados antes de la introducción de la wP al esquema de vacunación en México.

Curiosamente, dos genotipos emergentes fueron detectados con un cambio importante en el gen que codifica para el tipo de FIM3. El alelo cambió temporalmente de *fim3-2* a *fim3-1*. Este cambio se ha asociado anteriormente con la transición de la vacuna wP a aP, en países donde las proteínas FIM se incluyen como antígenos vacunales (Kurniawan et al. 2010). Por otro lado, se ha demostrado que una gran proporción de los aislamientos que alberga la combinación alélica *ptxP3-prn2*, carece de la expresión de la PRN (Lam et al. 2014). La circulación de los aislamientos PRN deficientes ha coincidido con una mayor incidencia ocurrida anteriormente en los Estados Unidos y Australia (Safarchi et al. 2016; Pawloski et al. 2014). Sin embargo, es necesario ampliar los estudios para determinar si los aislamientos circulantes de México

carecen de la expresión de la misma. Interesantemente, las proteínas FIM y PRN no están incluidas en la vacuna aP, por lo que la circulación de los genotipos emergentes encontrados en México podría ser resultado de una expansión global de aislamientos mayormente adaptados en poblaciones vacunadas.

Creemos que la vacunación aP ha contribuido a la diseminación del microorganismo debido a que tan solo dos años después de la reemplazo de wP por aP, hubo un cambio en la epidemiología patrón de la enfermedad con brotes ocurridos en 2009 y 2012 (años con las tasas de incidencia más altas en el estado).

Los resultados de la serotipificación mostraron cambios temporales importantes. Se ha demostrado que las cepas referencia utilizadas en la vacunación expresan el tipo de FIM2. La amplia utilización de la vacuna wP a lo largo de los años pudo haber creado una presión selectiva para la circulación de aislamientos que expresan únicamente el tipo de FIM3 y de esta manera, lograr “escapar” de la inmunidad generada por vacunación. Tras la introducción de la vacuna aP, en donde se incluyen únicamente la PTX y la FHA como antígenos vacunales, se pudo haber llevado a una nueva adaptación y al cambio en el patrón epidemiológico para el 2011, en donde los aislamientos colectados expresan solamente la FIM2.

Como anteriormente fue mencionado, en el 2014 se demostró que la vacuna aP no protege contra la colonización y la transmisión del microorganismo (Warfel et al. 2014). Aunado a esto, se ha demostrado que los aislamientos circulantes actuales presentan una alta producción de biopelícula y que pueden colonizar el tracto respiratorio murino en niveles significativamente mayores que las cepas referencia. Incluso, investigaciones realizadas han llegado a sugerir que la producción de biopelícula en *B. pertussis* podría contribuir a la persistencia, transmisión y continua circulación del microorganismo (Cattelan et al. 2017). A pesar de esto, se ha cuestionado si en realidad, los aislamientos circulantes se han adaptado o bien, las cepas referencia han perdido la habilidad de producción de biopelícula.

Pese a que la mayoría de los aislamientos analizados se mostraron como fuertes productores de biopelícula, en este estudio por primera vez, reportamos un aislamiento no productor proveniente de un caso positivo de tosferina (tabla 2). Este fenotipo coincidió con la falta de producción del anillo bacteriano al crecerlo en medio SS en rotación constante, utilizando tubos de poliestireno. De la misma manera, resultados similares fueron encontrados usando superficies de vidrio, en donde se encontró una baja adhesión bacteriana (figura 10). Consistentemente, los aislamientos fuertes productores de biopelícula mostraron biopelículas maduras a puntos de tiempo tempranos en comparación con la cepa referencia.

Debido a que los tipos de superficies influyen ampliamente en la producción de biopelícula de los microorganismos (Rodney 2002), experimentos adicionales fueron realizados, demostrando el mismo fenotipo de biopelícula, tanto en superficies de poliestireno y vidrio, para todos los aislamientos evaluados (datos no mostrados). En este trabajo por tanto reportamos una correlación positiva entre la formación del anillo bacteriano tras su crecimiento en rotación constante (figura 7), la fuerte producción de biopelícula (figura 12) y autoagregación bacteriana (figura 13).

Se ha demostrado en estudios controlados en humanos, que se requieren alrededor de 10⁵ UFC para lograr colonizar el tracto respiratorio (de Graaf et al. 2019). Por otro lado, se necesitan gotas de estornudos de aproximadamente 30 µm para poder quedar suspendidas en el aire y ser transmitidas (Cattelan et al. 2017). *B. pertussis* infecta exclusivamente al humano, por lo que su supervivencia depende ampliamente de la transmisión (Melvin et al. 2014). La rápida autoagregación bacteriana podría ser parte de la adaptación de los aislamientos circulantes para generar partículas del tamaño necesario para su transmisión, resistencia a desecación y al sistema inmunológico, así como para iniciar la producción de biopelícula. A pesar de esto, estudios detallados de transmisión en distintos modelos animales son necesarios para comprobar el efecto de la autoagregación de *B. pertussis* en la transmisión. El fenotipo de biopelícula ha mostrado también una correlación con la alta expresión del gen *fhaB* y alta producción de la FHA

(figura 15 y 16). Esto ha sido previamente reportado en aislamientos colectados de Argentina y EUA (Cattelan et al. 2017). Por lo que los aislamientos colectados de México podrían haberse adaptado produciendo mayores niveles de la FHA para favorecer la autoagregación bacteriana y producción de biopelícula.

Interesantemente se ha detectado una mayor producción de BPS polisacárido con una tendencia incrementada por año (figura 17). Nosotros sugerimos que este efecto podría haberse derivado de los cambios en la vacunación llevando a los aislamientos a una adaptación a través de los años. Los niveles de producción de BPS pudieron haberse incrementado tras la introducción de la vacuna aP al esquema de vacunación, ya que solo genera inmunidad contra la PTX y la FHA. De manera importante, se encontró un efecto potenciado de adhesión a células epiteliales en aquellos aislamientos considerados como fuerte productores de BPS (aislamientos del 2011 al 2014). Previamente se ha mostrado que el BPS promueve la colonización y formación de biopelícula (Conover et al. 2010). Nuestros resultados sugieren que la alta producción de la FHA y de BPS, en un efecto combinado, aumentan el porcentaje de adhesión bacteriana a células A549.

Se ha encontrado que la alta producción de biopelícula es inversamente proporcional a la producción del inhibidor ACT en células planctónicas (Hoffman et al. 2017). Por el contrario, encontramos que todos los aislamientos, tanto productores como no productores muestran niveles bajos de producción de la ACT. Esto sugiere que la falta producción de biopelícula del aislamiento 888-13 podría deberse a la baja expresión de la FHA y no a una alta producción del inhibidor, como lo es en el aislamiento control GMT1. Sin embargo, estudios de secuenciación del gen *fhaB-fhaC*, así como de la zona del promotor son necesarios.

A pesar de que la proteína BipA de membrana externa, es ampliamente expresada en el modo de biopelícula (Arnal et al. 2015), nosotros demostramos que se expresa en niveles significativamente bajos en la fase planctónica. Por lo que dicha proteína podría tener un efecto inhibitorio en la autoagregación inicial, probablemente enmascarando a la adhesina principal encargada de la autoagregación bacteriana, la

FHA. Resultados similares han sido detectados en *B. holmesii* (Hiramatsu et al. 2014). Sin embargo, estudios de delección y complementación son necesarios para comprobar dicho efecto. Por otro lado, es necesario evaluar la expresión del gen *bipA* y producción de la proteína en modo biopelícula.

Los ensayos de colonización mostraron que el aislamiento fuerte productor de biopelícula muestra una mayor colonización en septo nasal y pulmón en tracto respiratorio murino comparado con la cepa referencia Bp536. Esto podría ser efecto de la alta producción de la FHA y/o alta producción de biopelícula. A pesar de esto, estudios de cinéticas de colonización bacteriana son necesarios, en donde se incluyan: 1) análisis de la tasa bacteriana inicial (colonización en 24 hpi), 2) tasa bacteriana post infección de > 7 días (10, 14 y 25 días) para conocer la persistencia bacteriana, 3) ratones control para analizar por microscopía y comprobar la formación de biopelícula en el tracto respiratorio murino, 4) la inclusión tanto de aislamientos productores como no productores de biopelícula, y 5) ensayos de transmisión con distintos modelos animales.

Entre las limitaciones de este estudio se encuentran: 1) la falta de aislamientos colectados en la era pre-vacunal (pre-wP) y 2) limitados datos epidemiológicos de los pacientes.

Por todo lo anterior, la reemergencia de la tosferina en México podría ser consecuencia de un efecto combinado de cambios en la estrategias de vacunación y adaptación de los aislamientos circulantes los cuales: 1) pertenecen a dos genotipos hipervirulentos *ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-2* y *ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-1*, 2) presentan una fuerte producción de biopelícula comparado con la cepa referencia Bp536 y el aislamiento anteriormente reportado como “hiperproductor” STO1-SEAT0004USA, 3) autoagregan rápidamente en puntos tempranos de tiempo, 4) presentan altos niveles de producción de FHA, BPS polisacárido y adhesión a células epiteliales, 5) baja producción del inhibidor ACT y 6) una potenciada colonización en tracto respiratorio a los 7 dpi.

9. CONCLUSIONES

- Los aislamientos circulantes de México pertenecen a dos genotipos hipervirulentos *ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-2* y *ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-1*, los cuales podrían ser resultado de una diseminación/expansión global de aislamientos mayormente adaptados.
- Se detectaron cambios en el serotipo de FIM a través de los años, en donde el serotipo FIM3 fue desplazado en el 2011 por el FIM2.
- La mayor parte de los aislamientos circulantes de *B. pertussis* de México son fuertes productores de biopelícula.
- La producción de biopelícula se encuentra positivamente relacionada con la autoagregación bacteriana y la alta producción de la FHA y BPS polisacárido en aislamientos circulantes de *B. pertussis* de México.
- Se detectó por primera vez un aislamiento de *B. pertussis*, no productor de biopelícula.
- Los aislamientos circulantes presentan alta producción de bps polisacárido con una tendencia incrementada a través de los años.
- La FHA es necesaria para la adhesión a células epiteliales A549 y para formación de biopelícula, en aislamientos circulantes de *B. pertussis* de México.
- Nuestros resultados sugieren que la alta producción de la FHA y de BPS, en un efecto combinado, aumentan el porcentaje de adhesión bacteriana a células A549.
- La producción de BipA en modo de células planctónicas podría tener un efecto inhibitorio de la autoagregación bacteriana.
- Los aislamientos productores de biopelícula presentan potenciada colonización en tracto respiratorio murino, por lo que la producción de biopelícula podría tener un efecto en la persistencia y transmisión del microorganismo.

10.LITERATURA CONSULTADA

Advani A, Donnelly D, and Hallander H. 2004. Reference system for characterization of *Bordetella pertussis* pulsed-field gel electrophoresis profiles. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 2890-2897.

Arnal L, Grunert T, Cattelan N, de Gouw D, Villalba MI, Serra DO, Mooi FR, Ehling-Schulz M, Yantorno OM. 2015. *Bordetella pertussis* Isolates from Argentinean Whooping Cough Patients Display Enhanced Biofilm Formation Capacity Compared to Tohama I Reference Strain. *Frontiers in Microbiology* 8; 6:1352.

Boucher, P. E., Maris, A. E., Yang, M. S. & Stibitz, S. The response regulator BvgA and RNA polymerase α subunit C-terminal domain bind simultaneously to different faces of the same segment of promoter DNA. *Molecular Cell* 11: 163-173.

Bouchez V, Hegerle N, Strati F, Njamkepo E, Guiso N. 2015. New data on vaccine antigen deficient *Bordetella pertussis* isolates. *Vaccines* 3: 751–770.

Carbonetti N, Artamonova G, Andreasen C, Bushar N. 2005. Pertussis Toxin and Adenylate Cyclase Toxin Provide a One-Two Punch for Establishment of *Bordetella pertussis* Infection of the Respiratory Tract. *Infection and Immunity* 2698-2703.

Cattelan N, Jennings-Gee J, Dubey P, Yantorno OM, Deora R. 2017. Hyperbiofilm Formation by *Bordetella pertussis* Strains Correlates with Enhanced Virulence Traits. *Infect Immun.* Nov 17: e00373-17.

Cattelan N, Yantorno O, Deora R. 2018. Structural Analysis of *Bordetella pertussis* Biofilms by Confocal Laser Scanning Microscopy. *Bio-Protocol.* 8:15.

Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia. Manual de Vacunación

2008-2009. 2008. Secretaría de Salud (SS).

Clarke M, McIntyre PB, Blyth CC, Wood N, Octavia S, Sintchenko V, Giles L, Quinn H, Hill V, Hanly G, Lan R, Marshall HS. 2016. The relationship between *Bordetella pertussis* genotype and clinical severity in Australian children with pertussis. *The Journal of Infection* 72: 171-78.

Conover M, Parise G, Cheraton F, Sukumar N, Deora R. 2010. The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Molecular Microbiology* 77:1439-1455.

Conover MS, Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Deora R. 2010. The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Molecular Microbiology* 2010; 77: 1439-1455.

Conover MS, Mishra M, Deora R. 2011. Extracellular DNA is essential for maintaining *Bordetella biofilm* integrity on abiotic surfaces and in the upper respiratory tract of mice. *PloS One* 6: e16861.

Cummings, CA, Bootsma, HJ, Relman DA, Miller JF. 2006. Species and strain-specific control of a complex, flexible regulon by *Bordetella* BvgAS. *Journal of Bacteriology* 188, 1775-1785.

de Gouw D, Hermans PW, Bootsma HJ, Zomer A, Heuvelman K., Diavatopoulos DA, Mooi RF. 2014. Differentially expressed genes in *Bordetella pertussis* strains belonging to a lineage which recently spread globally, *Plos One* 9:e84523.

de Gouw D, Serra D, I de Jonge M, Hermans P, Wessels H, Zomer A, Yantorno O, Diavatopoulos D, Mooi F. 2014. The vaccine potential of *Bordetella pertussis* biofilm-derived membrane proteins. *Emerging Microbes and Infections* 3, e5.

Decker KB, James TD, Stibitz S, Hinton DM. 2012. The *Bordetella pertussis* model of exquisite gene control by the global transcription factor BvgA. *Microbiology* 158: 1665-1676.

De Serres G, Shadmani R, Duval B, Boulianne N, Dery P, Douville Fradet M, Rochette L, Halperin SA. 2000. Morbidity of pertussis in adolescents and adults. *The Journal of Infectious Diseases* 182:174-179.

Deora, R., Bootsma, HJ, Miller JF, Cotter P. 2001. Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Molecular Microbiology* 40: 669-683.

Dirección General de Epidemiología (DGE). Anuario de morbilidad 1984-2016. Available at http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/incidencia_enfermedad.html (Accessed 27 February 2019).

Doyle, R. 2001. Microbial growth in biofilms, part B: special environments and physiochemical aspects. *Methods Enzymology* 337.

Esposito S, Stefanelli P, Fry NK, Fedele G, He Q, Paterson P, Tan T, Knuf M, Rodrigo C1, Weil C, Flanagan KL, Hung I, Lutsar I, Edwards K, O'Ryan M, Principi N. 2019. Pertussis Prevention: Reasons for Resurgence and Differences in the Current Acellular Pertussis Vaccines. *Frontiers in Immunology*. 3; 10:1344.

Frances A, Matheson M, Fry N, Labram B, Goringea A. 2012. Antibody Responses to Individual *Bordetella pertussis* Fimbrial Antigen Fim2 or Fim3 following Immunization with the Five Component Acellular Pertussis Vaccine or to Pertussis Disease. *Clinical and Vaccine Immunology* 1776-1783.

Fry N, Neal S, Harrison T, Miller E, Matthews R, and George R. 2001. Genotypic variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertactin and pertussis toxin in

historical and recent clinical isolates in the United Kingdom. *Infection and immunity* 5520-5528.

Fuchslocher B, Millar L, Cotter P. 2003. Comparison of *bipA* Alleles within and across *Bordetella* Species. *Infection and Immunity*, 3043-3052.

Ganguly T, Johnson J, Kock N, Parks G, Deora R. 2014. The *Bordetella pertussis* Bps Polysaccharide Enhances Lung Colonization by Conferring Protection from Complement mediated Killing. *Cell Microbiology* 16: 1105-1118.

Glaser, P., Ladant, D., Sezer, O., Pichot, F., Ullmann, A. and Danchin, A. 1988. The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 2: 19-30.

Gorringe AR, Vaughan TE. 2014. *Bordetella pertussis* fimbriae (Fim): relevance for vaccines. *Expert Review of Vaccines* 10: 1205-14.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. 2: 95-108.

Hegerle N, y Guiso N. 2014. *Bordetella pertussis* and pertactin-deficient clinical isolates: lessons for pertussis vaccines, *Expert Review Vaccines*. 9:1135-1146.

Heck DV, Trus, BL, Steven, AC. 1996. Three-dimensional structure of *Bordetella pertussis* fimbriae. *Journal of Structural Biology* 116: 264-269.

Hewlett EL, Donato GM, Gray MC. 2006. Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: more than just making cyclic AMP. *Molecular Microbiology* 59:447-459.

Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersboll BK, Molin S.

2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 146: 2395-2407.

Hoffman C, Eby J, Gray M, Damron F, Melvin J, Cotter P, Hewlett E. 2017. *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin Interacts with Filamentous Haemagglutinin to Inhibit Biofilm Formation in vitro. *Molecular Microbiology* 103: 214-228.

Inatsuka CS, Julio SM, Cotter PA. 2005. *Bordetella* filamentous hemagglutinin plays a critical role in immunomodulation, suggesting a mechanism for host specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 18578-18583.

Kallonen T, Mertsola J, Mooi FR, He Q. 2012. Rapid detection of the recently emerged *Bordetella pertussis* strains with the *ptxP3* pertussis toxin promoter allele by real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection* 18: E377-379.

Kurniawan J, Maharjan RP, Chan WF, Reeves PR, Sintchenko V, Gilbert GL, Mooi FR, Lan R. 2010. *Bordetella pertussis* clones identified by Multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *Emerging Infectious Diseases* 16, 297–300.

Kilgore PE, Salim AM, Zervos MJ, Schmitt HJ. 2016. Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews* 29: 449-86.

Lam C, Octavia S, Ricafort L, Sintchenko V, Gilbert GL, Wood N, McIntyre P, Marshall H, Guiso N, Keil AD, Lawrence A, Robson J, Hogg G, Lan R. 2014. Rapid increase in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Australia. *Emerging Infectious Diseases* 20, 626–633.

Locht, C, Antoine, R, Dubuisson F. 2001. *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Current Opinion in Microbiology*. 4: 82-89.

Mattoo S, Cherry JD. 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clinical Microbiology Reviews*. 2:326-382.

Mazar J, Cotter PA. 2006. Topology and maturation of filamentous hemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Molecular Microbiology* 62:641-654.

Melvin JA, Scheller EV, Miller JF, Cotter PA. 2014. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nature Reviews Microbiology*. 12:274-288.

Miyaji Y, Otsuka Y, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K. 2013. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. *PLoS ONE* 8, e77165.

Mooi FR, Hallander H, Wirsing von König CH, Hoet B, Guiso N. 2000. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 3:174-181.

Mooi FR, Inge HM, van Gent M, He Q, Bart M, Heuvelman K, de Greeff S, Diavatopoulos D, Teunis P, Nagelkerke N, Mertsola J. 2009. *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerging Infectious Diseases* 15, 1206-1213.

Mooi, FR, Oirschot V, Heuvelman K, Van Der H, Gaastra W, Willems R. 1998. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infection and Immunity* 66: 670-675.

Mooi FR, Van Der Maas NA, De Melker HE. 2014. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin. *Epidemiology and Infection* 142, 685-694.

O'Toole GA, Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* 2:295-304.

Pawloski LC, Queenan AM, Cassiday PK, Lynch AS, Harrison MJ, Shang W, Williams MM, Bowden KE, Burgos-Rivera B, Qin X, Messonnier N, Tondella ML. 2014. Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clinical and Vaccine Immunology*. 21:119-25.

Petersen RF, Dalby T, Dragsted DM, Mooi F, Lambertsen L. 2012. Temporal trends in *Bordetella pertussis* populations, Denmark, 1949–2010. *Emerging Infectious Diseases* 18: 767-774.

Rodney M. 2002. Biofilms: Microbial life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8: 881-889.

Safarchi A, Octavia S, Wu SZ, Kaur S, Sintchenko V, Gilbert GL, Wood N, McIntyre P, Marshall H, Keil AD, Lan R. 2016. Genomic dissection of Australian *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2012 epidemic. *Journal of Infection*. 72: 468-77.

Sakamoto H, Bellalou J, Sebo P, Ladant D. 1992. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. *The Journal of Biological Chemistry* 267:13598-13602.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: 671675.

Secretaría de Salud, Dirección general de Epidemiología, Lineamientos para la vigilancia epidemiológica de tosferina y síndrome coqueluchoide por laboratorio. 2015.

Disponible en:

http://www.indre.salud.gob.mx/sites/indre/descargas/pdf/Lineamientos/lineamientos_para_la_vigilancia_de_tosferina_y_sindrome_coqueluchoide.pdf

Serra D, Conover M, Arnal L, Parise G, Rodriguez M, Yantorno O, Deora R. 2011. FHA-Mediated Cell-Substrate and Cell-Cell Adhesions Are Critical for *Bordetella pertussis* Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and in the Mouse Nose and the Trachea. PlosOne 6: e28811.

Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Mishra M, Deora R. 2007. The *Bordetella* Bps polysaccharide is critical for biofilm development in the mouse respiratory tract. Journal of Bacteriology 189: 8270-8276.

Stockbauer KE, Fuchslocher B, Miller JF, Cotter P. 2001. Identification and characterization of BipA, a *Bordetella* Bvg-intermediate phase protein. Molecular Microbiology. 39: 65-78.

Suárez IL, Herbas-RI, Gómez CM, Richardson VL. 2012. Shaping a new strategy against *B. pertussis*: a public health problem in Mexico. Boletín Médico del Hospital Infantil de México 69: 298-304.

Tatti KM, Wu KH, Tondella ML, Cassidy PK, Cortese MM, Wilkins PP, Sanden GN. 2008. Development and evaluation of dual-target real time polymerase chain reaction assays to detect *Bordetella* spp. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 61: 264-272.

Tatti KM, Sparks K, Boney K, Tondella M. 2011. Novel multitarget real-time PCR assay for rapid detection of *Bordetella* species in clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology 49: 4059-4066.

Tuomanen, E. 1986. Piracy of adhesins: attachment of superinfecting pathogens to respiratory cilia by secreted adhesins of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* 54: 905-908.

Uhl, MA, Miller JF. 1994. Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. USA 91: 1163-1167.

Ulloa GR, Avila ML. 2008. Pertussis in Latin America: current situation and future vaccination challenges. *Expert Review of Vaccines*. 10:1569-15.

Van Gent M, Heuvelman CJ, van der Heide HG, Hallander HO, Advani A, Guiso N, Wirsing von König CH, Vestrheim DF, Dalby T, Fry NK, Pierard D, Detemmerman L, Zavadilova J, Fabianova K, Logan C, Habington A, Byrne M, Lutyńska A, Mosiej E, Pelaz C, Gröndahl-Yli-Hannuksela K, Barkoff AM, Mertsola J, Economopoulou A, He Q, Mooi FR. 2015. Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998-2012. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 34: 821-830.

Vergara-Irigaray N, Chavarria-Martínez A, Rodríguez-Cuesta J, Miller J, Cotter P, Martínez de Tejada G. 2005. Evaluation of the Role of the Bvg Intermediate Phase in *Bordetella pertussis* during Experimental Respiratory Infection. *Infection and Immunity* 73: 748-760.

Whitchurch, CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295, 1487.

Weiss AA, Falkow S. 1984. Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* 43: 263-269.

Weber C, Boursaux-Eude C, Coralie G, Caro V, Guiso N. 2001. Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, Where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years, Journal of Clinical Microbiology, 39 :4396-4403.

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

Willems R, Paul A, van der Heide, Mooi FR. 1990. Fimbrial phase variation in *Bordetella pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation. The EMBO Journal 9: 2803-2809.

Xu Z, Octavia S, Luu LDW, Payne M, Timms V, Tay CY, Keil AD, Sintchenko V, Guiso N, Lan R. 2019. Pertactin-Negative and Filamentous Hemagglutinin-Negative *Bordetella pertussis*, Australia, 2013-2017. Emerging Infectious Diseases 25: 1196-1199.

Zhang L, Xu Y, Zhao J, Kallonen T, Cui S, Xu Y, Hou Q, Li F, Wang J, He Q, and Zhang S. Effect of Vaccination on *Bordetella pertussis* Strains, China. Emerging Infectious Diseases 16: 1695-701.

11. Apéndices

11.1. Resumen biográfico

Jessica Lizzeth Gutiérrez Ferman

Candidato para el Grado de

Dr. En Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: Caracterización genotípica, evaluación de biopelícula y factores de virulencia de aislamientos de *Bordetella pertussis* del estado de Nuevo León, México.

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, México.

Educación:

Ene-Dic,
2019

Estudiante de Intercambio Internacional

Microbial Infection and Immunity, Universidad Estatal de Ohio, Columbus, OH, USA
(Tutoría: Dr. Rajendar Deora)

Ene 2016-Dic
2019

Ph.D. en Ciencias con Orientación en Microbiología

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México
(Tutoría: Dra. Licet Villarreal Treviño, Dra. Elvira Garza González)

- Nominado y aceptado para la concesión de una beca nacional de doctorado por el CONACYT de México.
- Nominado y aceptado para la concesión de una beca de intercambio académico a la Universidad Estatal de Ohio, Columbus, OH, EE. UU., Por el CONACYT de México

2014-2016 **Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología (Cédula: 9834434)**
Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León,
México
(Tutoría: Dra. Licet Villarreal Treviño, Dra. Elvira Garza González)

- Nominado y aceptado para la concesión de una beca nacional de maestría por el CONACYT de México.
- Mención honorífica por antecedentes académicos sobresalientes, trabajo de tesis y examen de grado de calidad excepcional.

2008-2013 **Químico Bacteriólogo Parasitólogo (Cédula: 8642699)**
Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México

Publicaciones a la fecha:

Padilla-Orozco M., Mendoza-Flores L., Herrera-Alonso A., Garza-González E., **Gutiérrez-Ferman J.L.**, Rodríguez - López J.M., Camacho-Ortiz A. Generalized and prolonged use of gentamicin-lock therapy is associated with a reduction of hemodialysis catheter associated infections due to Gram negative species. *Nephron*. 2019; 143(2):86-91.

J. L. Gutiérrez-Ferman, L. Villarreal-Treviño, J. M. Ramírez-Aranda, A. Camacho-Ortiz, M. R. Ballesteros-Elizondo, M. R. Moreno-Juárez, S. Mendoza-Olazarán M. E., de la O Cavazos, J. Z. Villarreal-Pérez, M. A. Gómez-Govea, E. Garza-González. Emergence of *ptxP3* lineage in *Bordetella pertussis* strains circulating in a population in northeastern Mexico. *Epidemiol Infect.* 2018 Dec; 146(16):2096-2101.

Martínez-Reséndez MF; González-Chávez JM; Garza-González E; Castro-Fuentes LN; **Gutiérrez-Ferman JL**; Echániz-Aviles G; Camacho-Ortiz A; Carnalla-Barajas MN; Soto- Noguero A; Maldonado-Garza HJ; Hernández-Balboa CL; Llaca-Díaz JM; Flores-Treviño SM. Non-typeable *Haemophilus influenzae* Biofilm Production and Severity in Lower Respiratory Tract Infections in a Tertiary Hospital in Mexico. *J Med Microbiol.* 2016. 12:1385-91.

Flores-Treviño S, **Gutiérrez-Ferman JL**, Morfín-Otero R, Rodríguez-Noriega E, Estrada- Rivadeneyra D, Rivas-Morales C, Llaca-Díaz JM, Camacho-Ortiz A, Mendoza-Olazarán S, Garza-González E. *Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico: antimicrobial resistance, biofilm formation and clonal diversity. *J Med Microbiol.* 2014. 63:1524-30.

11.2. Publicaciones indexadas que derivaron de este trabajo

Emerging of *ptxP3* lineage in *Bordetella pertussis* strains circulating in a population in northeastern Mexico

Original Paper

Cite this article: Gutiérrez-Ferman JL *et al* (2018). Emerging of *ptxP3* lineage in *Bordetella pertussis* strains circulating in a population in northeastern Mexico. *Epidemiology and Infection* **146**, 2096–2101. <https://doi.org/10.1017/S0950268818002303>

Received: 7 November 2017
Revised: 1 May 2018
Accepted: 25 July 2018
First published online: 23 August 2018

Key words:

Bordetella pertussis; genotyping; Mexico; *ptxP3*; pulsed-field gel electrophoresis

Author for correspondence:

E. Garza-González, E-mail: elvira_garza_gzz@yahoo.com

J. L. Gutiérrez-Ferman¹, L. Villarreal-Treviño², J. M. Ramírez-Aranda³, A. Camacho-Ortiz⁴, M. R. Ballesteros-Elizondo⁵, M. R. Moreno-Juárez⁵, S. Mendoza-Olazarán¹, M. E. de la O Cavazos⁵, J. Z. Villarreal-Pérez⁶, M. A. Gómez-Govea² and E. Garza-González¹

¹Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario 'Dr José Eleuterio González', Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México; ²Departamento de Microbiología General, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México; ³Servicio de Medicina Familiar, Hospital Universitario 'Dr José Eleuterio González', Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México; ⁴Servicio de Infectología, Hospital Universitario 'Dr José Eleuterio González', Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México; ⁵Secretaría de Salud de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México and ⁶Servicio de Endocrinología, Hospital Universitario 'Dr José Eleuterio González', Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México

Abstract

We determined the molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* isolates to evaluate its potential impact on pertussis reemergence in a population of Mexico. Symptomatic and asymptomatic cases were included. Pertussis infection was confirmed by culture and real-time polymerase chain reaction (PCR). Selected *B. pertussis* isolates were further analysed; i.e. clonality was analysed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and *ptxP-ptxA*, *prn*, *fim2* and *fim3* typing was performed by PCR and sequencing. Out of 11 864 analysed samples, 687 (5.8%) were positive for pertussis, with 244 (36%) confirmed by both culture and PCR whereas 115 (17%) were positive only by culture and 328 (48%) were positive only by PCR. One predominant clone (clone A, $n = 62/113$; 55%) and three major subtypes (A1, A2 and A3) were identified by PFGE. All 113 selected isolates had the allelic combination *ptxP3-ptxA1*. The predominant clone A and the three major subtypes (A1, A2 and A3) corresponded to the emerging genotypes *ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-2* and *ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-1*. In conclusion, the presence of an endemic clone and three predominant subtypes belonging to the genotypes *ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-2* and *ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-1* were detected. This finding supports the global spread/expansion reported for these outbreaks associated genotypes.

Introduction

Bordetella pertussis is the primary aetiologic agent of pertussis, a highly contagious, vaccine-preventable disease of the human respiratory tract [1].

In Mexico, vaccination against pertussis started in 1954 with the use of an inactivated whole-cell vaccine (wP) that was used for more than 50 years in a five-dose scheme. Side effects of this vaccine led to the development of an acellular vaccine (aP) [2] which was introduced in 2007 [3].

The current immunization schedule consists of four doses of a pentavalent acellular vaccine (DTaP/Hib/IPV) (Sanofi-Aventis de México, S.A. de C.V.) that contains pertussis toxin (PT) and filamentous hemagglutinin (FHA) toxoids as protective antigens and is administered at 2, 4, 6 and 18 months of age. The fifth and final dose, administered at the age of 4 years, is a booster with absorbed diphtheria, tetanus and whole-cell pertussis vaccine (DTwP) (Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México, S.A. de C.V.). This vaccine contains the inactivated *B. pertussis* strains Bp134, Bp509, Bp6224 and Bp25525 [4–7].

The increase in pertussis has been attributed mainly to improved diagnostic methods and the use of acellular vaccines which fails to protect against the colonisation and transmission of the aetiologic agent [8, 9]. On the other hand, it has been suggested that the whole-cell vaccine has led to the global emergence of *ptxP3* positive strains, which have been associated with increased virulence of the pathogen [10, 11] and more severe disease [11, 12]. Also, it has been reported the appearance of isolates that present allelic variations among the main virulence factors used as vaccine antigens, such as pertussis toxin, FHA, pertactin (PRN) and fimbriae (FIM) [13].

In the last decade, several countries reported an increase of pertussis cases, including Australia, the Netherlands, Spain, Japan, Canada, the USA, Peru and Brazil [11, 14–18].

In 2009 and 2012, the number of pertussis cases increased in various states of Mexico, amongst which: Sonora, Jalisco, Durango, Estado de Mexico and Nuevo León. In Nuevo León the pertussis incidence increased from 4.45 to 5.69 cases per 100 000 inhabitants [19].

In order to explain the reemergence of pertussis, we assessed the molecular epidemiology of *B. pertussis* isolates circulating in the population of northeastern Mexico.

Methods

Ethics statement

This study was performed in compliance with the requirements of the research and biosafety ethics committee of the School of Medicine of the 'Universidad Autónoma de Nuevo León' (Approval GA17-00001). Epidemiological and demographic data of the patients were included as part of a routine laboratory diagnosis. Therefore, no informed consent was required.

Study population and pertussis diagnosis

Symptomatic and asymptomatic cases were recruited from eight different public health jurisdictions of the secretary of health of Nuevo León, Mexico from the epidemiological week (EW) 52, 2006 to EW 52, 2014. The Centres for Disease Control clinical criteria for pertussis formed the guidelines to identify suspected cases of pertussis [20].

Of each suspicious pertussis case, a maximum of five personal contacts were recruited. Asymptomatic contacts were defined as those contacts with the detection of *Bordetella* spp. positive by culture and PCR without any symptoms.

Nasopharyngeal swabs were cultured on charcoal agar plates (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA) supplemented with 5% w/v defibrinated sheep blood and cephalixin (0.04 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, the USA). Colonies with *Bordetella* morphology were phenotypically tested, i.e. Gram staining, catalase, oxidase, motility, urea hydrolysis, nitrate reduction, citrate utilisation and culture on MacConkey and blood agar. Species identification of the recovered isolates by culture and the samples of nasopharyngeal swabs were confirmed by real-time PCR [21]. Recovered isolates were stored at -80°C in brain-heart infusion broth containing 30% glycerol.

Demographic information was obtained from all patients with a positive pertussis diagnosis. Epidemiological data, such as case or contact, age and gender was recovered. Vaccination history was obtained from National Vaccination Card used in Mexico from each patient.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

PFGE was performed on selected isolates. Isolates were grown for 72 h at 37°C on charcoal agar plates supplemented with 5% w/v defibrinated sheep blood. Colonies were washed in 2 ml 0.85% w/v saline solution (3 min, 13 500 rpm) and the pellet was resuspended in 410 µl PIV buffer (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl; pH 7.4). After the addition of 150 µl 1.5% w/v molecular grade agarose, plugs were prepared from homogeneous mixtures.

The plugs were incubated at 37°C for 3 h in 1 ml lysis solution (6 mM Tris (pH 8), 1 M NaCl, 100 mM EDTA (pH 8), 0.5% w/v, N-lauroylsarcosine, 0.2% w/v, N-deoxycholate) containing 1 mg/ml lysozyme (Bio Basic, Inc. Ontario, Canada) and 50 µg/ml RNase A (US Biological). The lysis solution was replaced by 1 ml ES-buffer (100 mM EDTA (pH 8), 1% w/v N-lauroylsarcosine) with 0.1 mg/ml proteinase K (Biolone, USA Inc., Boston, MA. E.U.A.) and incubated overnight at 55°C . After repeated washing (5×30 min. with agitation) of the plugs in $1 \times$ TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 8), they were incubated for 12 h at 37°C with restriction buffer containing 20 eU XbaI enzyme (Promega Fitchburg, Wisconsin, USA). Plugs were loaded on a 1.0% w/v agarose gel with $0.5 \times$ Tris-borate-EDTA. The pulsed-field program was run on a CHEF-DRII system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) under previously described conditions [22]. Restriction patterns were visually compared with Lab-Works-IVP 4.5 software (Ultra-Violet products, Upland, Armonk, NY). The similarity coefficients of PFGE patterns were calculated using the Jaccard coefficient and SPSS v20.0 software.

Isolates with identical (i.e. 100% similar) restriction patterns were classified as a clone and strains that differed in 2–3 restriction fragments were classified as a subtype [23].

Genotyping

To sequence the *ptxP*, *ptxA*, *prn*, *fim2* and *fim3* regions in selected *B. pertussis* isolates, DNA was extracted with the phenol-chloroform method and amplified by PCR using previously described oligonucleotides and conditions [24, 25]. PCR products were purified by precipitation with 3 M sodium acetate and absolute ethanol at -20°C . The products were sequenced at Macrogen, Korea. Sequencing reactions were performed in the DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD) using the ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). The samples were injected to electrophoresis in an ABI 3730xl DNA Analyser (Applied Biosystems) and the sequences were compared on the Bio Edit platform (Biological Sequence Alignment Editor Platform).

Statistical analysis

Difference between vaccinated and unvaccinated cases was calculated using the Wilcoxon signed-rank test and the Z-test of proportions was applied to compare the clone A variations through the years with the SPSSv20 software. A $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Study population and species detected

Among 11 864 nasopharyngeal swabs analysed, 687 (5.8%) were positive for pertussis; 244 (36%) were confirmed by both culture and PCR and 328 (48%) only by PCR (Table 1). The most frequently detected species were: *B. pertussis* ($n = 665/687$, 97%), *Bordetella parapertussis* ($n = 16/687$, 2.3%) and *Bordetella bronchiseptica* ($n = 2/687$). Four cases ($n = 4/687$) had a coinfection involving *B. pertussis* and *B. parapertussis*. We recovered a total of 359 clinical isolates (352 *B. pertussis*, 6 *B. parapertussis* and 1 *B. bronchiseptica*) during the study period.

Table 1. Study population included from 2006 to 2014, in the state of Nuevo León, Mexico

Year	Population included (n)	Laboratory-confirmed symptomatic and asymptomatic cases			Total	
		Only by culture	Only by PCR	Culture and PCR	Symptomatic cases	Asymptomatic cases
2006	ND	1	ND	ND	0	1
2007	ND	4	ND	ND	2	2
2008	440	34	ND	ND	21	13
2009	3171	76	ND	ND	54	22
2010	906	0	46	11	29	28
2011	1501	0	76	41	91	26
2012	2280	0	105	74	146	33
2013	1553	0	45	51	67	29
2014	2013	0	56	67	95	28
Total	11 864	115	328	244	505	182

ND: no data because the PCR diagnosis was not performed. The PCR was implemented in 2010.

Table 2. Distribution of vaccination by age group of the symptomatic cases

Age group	Cases with indicated number of vaccine doses (%)					Total
	0	1	2	3	≥4	
<2 m	87 (97)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	88
2–18 m	94 (55)	62 (36)	10 (6)	3 (2)	1 (0.5)	170
19 m–4 y	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1
5–15 y	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1
Total n (%)	183 (69)*	63 (24)	10 (4)	3 (1.1)	1 (0.3)	260

m, months; y, years; ND, no data available.

* $P < 0.05$ between vaccinated ($n = 77$) and unvaccinated ($n = 183$) patients.

Epidemiological data

Epidemiological data were available from 359 cases: 265 symptomatic (74%) and 94 asymptomatic (26%). Among symptomatic cases, 142 (53%) were female and 123 (47%) were male. The mean age of symptomatic cases was 2 months (range 13 days–13 years). Interestingly, 55% ($n = 94$) of the children aged between 2 and 18 months had not received any aP vaccine at all, while 36% ($n = 62$) had received only the first dose (Table 2). In contrast, of the 94 asymptomatic cases, 68 (72%) were female and 26 (28%) were male. The mean age of the contacts was 24 years (range 10 months–77 years). More than 83% of asymptomatic cases should have had the complete immunisation scheme. However, only one participant had the complete scheme.

Clonal diversity of the isolates

A total of 113 *B. pertussis* isolates recovered from both symptomatic ($n = 81$) and asymptomatic ($n = 32$) cases were selected for PFGE typing, using a simple sampling technique stratified by years (Confidence level CI 99%, Confidence Interval CI = 10). The total size of each stratum was calculated with the following formula: $n_i = n (N_i/N)$, where 'n' is the total size previously

calculated ($n = 113$), 'N' is the total size of the population of the study ($n = 352$) and 'N_i' is the size of the stratum (number of the isolates collected by years). On this basis, we included 1 isolate from 2007, 11 from 2008, 23 from 2009, 4 from 2010, 13 from 2011, 24 from 2012, 16 from 2013 and 21 from 2014. DNA digestion generated a maximum of 15 restriction fragments and 12 pulsotypes with a similarity from 75 to 100% (Fig. 1).

Twelve different clones were identified; the predominant clone was designated A and three major subtypes were identified as A1, A2 and A3. Clone A represented 55% ($n = 62/113$) of the isolates and persisted from 2009 to 2014. The frequency of Clone A increased from 2% in 2010 to 37% in 2012 ($P < 0.05$) and to 21% in 2014. Subtype A1 persisted from 2008 to 2011 and increased from 33% in 2008 to 53% in 2009. Nevertheless, it was not detected in the following years (2012–2014). Subtype A2 was identified for 3 years (2008, 2009 and 2011) and was not identified in the following years. On another hand, Subtype A3 appeared from 2012 to 2014 while clone A decreasing. None of the predominant pulsotypes was detected in 2007 (Fig. 2).

Among the selected isolates, just four of them were detected to be case/contact related with two belonging to clone A (recovered in 2008) and two to clone A1 (recovered in 2014).

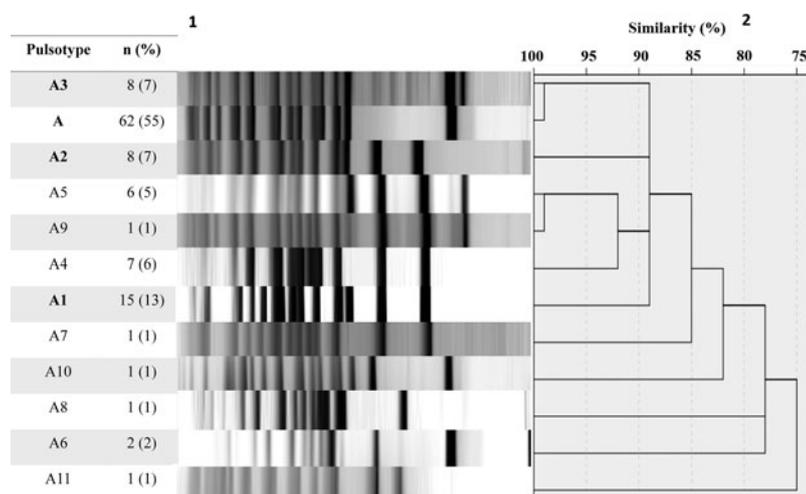


Fig. 1. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of 113 *B. pertussis* isolates collected from 2007 to 2014. ¹number and percent of isolates corresponding to each genotype. ²Similarity coefficient generated using SPSS 20.0 software.

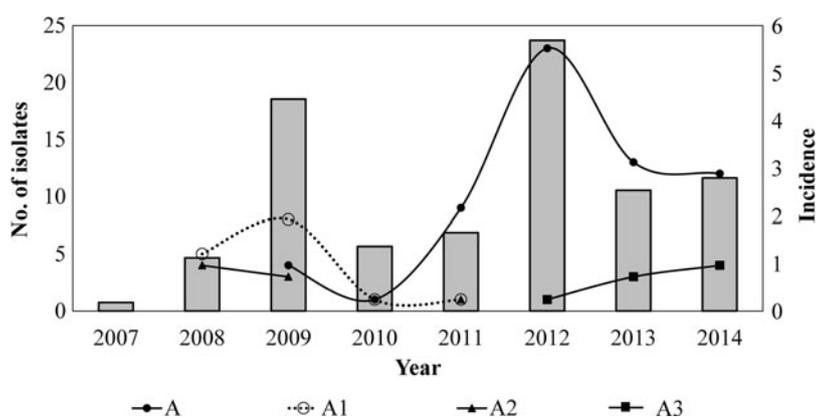


Fig. 2. Temporal relation of the hypervirulent clone (A) and subtypes (A1, A2 and A3) over the years. Bars represent the incidence of reported cases of pertussis (per 100 000 hab) by years, in Nuevo Leon, Mexico, from 2007 to 2014.

Pulsotypes and vaccination status

Clone A and subtypes A1, A2 and A3 were isolated from both vaccinated and unvaccinated participants; 45% ($n = 28/62$) of all participants infected with clone A had not received any vaccine, 24% ($n = 15/62$) had received the first dose of aP vaccine and 1.6% ($n = 1/62$) had received three aP vaccine doses. Interestingly, none of the participants infected with clone A or the major subtypes had been given the fifth and final dose as recommended by the vaccination schedule.

Clone A was recovered from the eight health districts of the state of Nuevo Leon. It appeared in 2009 in the city of Monterrey (state capital) and spread from there to the other municipalities during the following years. On the other hand, subtype A3 was recovered from five health districts and subtypes A1 and A2 from three.

Typing of *ptxP* and *ptxA* regions

Sequencing yielded that 100% ($n = 113/113$) of isolates harboured the allelic combination *ptxP3-ptxA1* (*ptxS1A*). A random selection of clone A and subtypes A1–A3 were typed for *prn*, *fim2* and *fim3* genes. The comparative analysis demonstrated the presence of *ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-2* (subtypes A1 = 2008 and A2 = 2009) and *ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-1* (Clone A = 2012, A3 = 2014) genotypes.

Discussion

This is the first report on the epidemiological and molecular analysis of *B. pertussis* isolates from a population of northeastern Mexico in a period from 2006 to 2014. We identified four representative pulsotypes (A, A1, A2 and A3) and displayed the dynamic and epidemiological changes of *B. pertussis* strains throughout the study period.

Subtypes A1 and A2 were displaced by clone A, which predominated during the 2012 outbreak. Clone A spread through the state of Nuevo Leon and became endemic for 6 consecutive years (2009–2014) in both the vaccinated (aP vaccine) and unvaccinated population. Interestingly, clone A was the only one that was distributed in all jurisdictions, which demonstrates its ability for statewide dissemination.

Previous studies have suggested that vaccination with the wP vaccine has led to the generation of strains presenting allelic and antigenic variants in the major virulence factors of the microorganism (*prn*, *ptxP*, *ptxA*, *fim2*, *fim3*, *fha*), as well as to the emergence of hypervirulent *ptxP3* strains [13]. Our results are consistent with this idea. In Mexico, the wP vaccine was used for more than 50 years, which may have facilitated the appearance of *ptxP3* strains in our population. However, this cannot be demonstrated because isolates were not collected before and during the period that wP vaccine was applied. Despite this, the *ptxP3* lineage could be involved. Previous studies in other countries have

shown the association between the appearance of *ptxP3* strains and the resurgence of the disease [10, 26].

Interestingly, the endemic clone A showed the emerging genotype *ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-1* also known as MT27a [16]. In this genotype, the allele for the fimbria type changed from *fim3-2* to *fim3-1*. This change has been associated with both the transition from wP to aP vaccination in countries where fimbrial proteins are included as antigens of aP vaccine [27].

The appearance of emerging genotypes has agreed with the increased pertussis incidence in other countries as well seems to be related in Mexico [11]. It has been shown that a large proportion of the isolates is harbouring the allelic combination *ptxP3-prn2*, lack expression of the PRN [28]. It is necessary to extend the studies to find out if PRN deficient isolates are circulating in Mexico.

Although this situation has been associated with the wide use of aP vaccine which includes PRN, these isolates were detected before the implementation of aP vaccination. Despite this, its appearance coincides with an increased incidence previously occurred in the USA and Australia [29, 30]. Contrarily, in Mexico, FIM and PRN proteins are not included in the aP vaccination.

We believe that aP vaccination has contributed to the dissemination of the microorganism because only 2 years after the replacement of wP by aP there was a shift in the epidemiological pattern of the disease with outbreaks in 2009 and 2012 (years with the highest incidence rates in the state).

Besides, we detected a high level of incomplete vaccination schemes; only one participant had a complete vaccination scheme. This is an alarming situation because children and adults are the main sources of transmission to unvaccinated infants [31–34]. The findings highlight the importance of rigorous evaluation of the vaccination scheme used in Mexico as well as the assessment of the effectiveness of the applied aP vaccine.

The observed increment in pertussis may also reflect the use of more sensitive and specific diagnostic methods. In Nuevo León, in the past, pertussis was confirmed by culture and phenotypic tests. In 2010, the use of dual-target real-time PCR was implemented [35] and in 2011, a multiple target real-time PCR was used [21]. The multiple target PCR allows the identification of *B. parapertussis*, *Bordetella holmesii* and a presumptive identification of *B. bronchiseptica*. Our data show that the implementation of multiplex PCR coincides with an increase in identified pertussis cases. Although this is a known phenomenon, it is worth mentioning because the diagnosis of pertussis by both phenotypic and genotypic methods is performed only in four Mexican states: Nuevo León, Sonora, San Luis Potosí and Chiapas [36].

This study has some limitations, e.g. the incomplete vaccination history data, the limited clinical data from patients; and that some symptomatic cases and related asymptomatic cases may represent the same strain and thus may introduce selection bias in the sampling.

In conclusion, the presence of an endemic clone and three predominant subtypes belonging to the genotypes *ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-2* and *ptxP3-ptxA1-prn2-fim2-1-fim3-1* were detected. This finding supports the global spread/expansion reported for these outbreaks associated genotypes.

Acknowledgements. We thank Denisse Rodríguez Gómez for her kind assistance at the laboratory.

Conflict of interest. None.

References

1. Carbonetti NH (2016) *Bordetella pertussis*: new concepts in pathogenesis and treatment. *Current Opinion in Infectious Diseases* **29**, 287–294.
2. Sato Y, Kimura M and Fukumi H (1984) Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet* **1**, 122–126.
3. Perez-Perez GF et al. (2015) Pertussis in Mexico, an epidemiological overview. A study of 19 years at the Instituto Mexicano del Seguro Social. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social* **52**, 164–170.
4. World Health Organization. Immunization schedules by diseases. Available at http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/diseases (Accessed 27 February 2018).
5. Manual de vacunación 2008–2009. Available at http://saludchiapas.gob.mx/doc/biblioteca_virtual/manuales_modelos/Manual_Vacunacion_2008_2009.pdf (Accessed 27 February 2018).
6. Cofepris. Comisión de autorización sanitaria. Available at <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/Vacunas/Vacunas.pdf> (Accessed 27 February 2018).
7. Cofepris. Vacuna absorbida antidiférica, antitetánica y contra la tosferina. Available at <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/Vacunas/085m2003.pdf> (Accessed 27 February 2018).
8. Mooi FR, Van Der Maas NA and De Melker HE (2014) Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin. *Epidemiology and Infection* **142**, 685–694.
9. Warfel JM, Zimmerman LI and Merkel TJ (2014) Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 787–792.
10. Mooi FR et al. (2009) *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerging Infectious Diseases* **15**, 1206–1213.
11. Bailon H et al. (2016) Increase in pertussis cases along with high prevalence of two emerging genotypes of *Bordetella pertussis* in Peru, 2012. *BMC Infectious Diseases* **16**, 422.
12. Clarke M et al. (2016) The relationship between *Bordetella pertussis* genotype and clinical severity in Australian children with pertussis. *The Journal of Infection* **72**, 171–178.
13. Bouchez V et al. (2015) New data on vaccine antigen deficient *Bordetella pertussis* isolates. *Vaccines* **3**, 751–770.
14. Campbell P et al. (2012) Increased population prevalence of low pertussis toxin antibody levels in young children preceding a record pertussis epidemic in Australia. *PLoS ONE* **7**, e35874.
15. Witt MA, Katz PH and Witt DJ (2012) Unexpectedly limited durability of immunity following acellular pertussis vaccination in preadolescents in a North American outbreak. *Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* **54**, 1730–1735.
16. Miyaji Y et al. (2013) Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008–2010 pertussis epidemic in Japan. *PLoS ONE* **8**, e77165.
17. Fathima S et al. (2014) *Bordetella pertussis* in sporadic and outbreak settings in Alberta, Canada, July 2004–December 2012. *BMC Infectious Diseases* **14**, 48.
18. Rocha EL et al. (2017) The characterization of *Bordetella pertussis* strains isolated in the Central-Western region of Brazil suggests the selection of a specific genetic profile during 2012–2014 outbreaks. *Epidemiology and Infection* **145**, 1392–1397.
19. Dirección General de Epidemiología (DGE). Anuario de morbilidad 1984–2016. Available at http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/incidencia_enfermedad.html (Accessed 27 February 2018).
20. Centros para el control y la prevención de enfermedades. Available at <https://www.cdc.gov/pertussis/countries/lapp-mexico-sp.html> (Accessed 27 February 2018).
21. Tatti KM et al. (2011) Novel multitarget real-time PCR assay for rapid detection of *Bordetella* species in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **49**, 4059–4066.
22. Bisgard KM et al. (2001) Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* by pulsed-field gel electrophoresis profile: Cincinnati, 1989–1996. *The Journal of Infectious Diseases* **183**, 1360–1367.

23. **Tenover FC *et al.*** (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 2233–2239.
24. **Schmidtke AJ *et al.*** (2012) Population diversity among *Bordetella pertussis* isolates, United States, 1935–2009. *Emerging Infectious Diseases* **18**, 1248–1255.
25. **Borisova O *et al.*** (2007) Antigenic divergence between *Bordetella pertussis* clinical isolates from Moscow, Russia, and vaccine strains. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* **14**, 234–238.
26. **King AJ *et al.*** (2013) Genome-wide gene expression analysis of *Bordetella pertussis* isolates associated with a resurgence in pertussis: elucidation of factors involved in the increased fitness of epidemic strains. *PLoS ONE* **8**, e66150.
27. **Kurniawan J *et al.*** (2010) *Bordetella pertussis* clones identified by multi-locus variable-number tandem-repeat analysis. *Emerging Infectious Diseases* **16**, 297–300.
28. **Lam C *et al.*** (2014) Rapid increase in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Australia. *Emerging Infectious Diseases* **20**, 626–633.
29. **Pawloski LC *et al.*** (2014) Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* **21**, 119–125.
30. **Safarchi A *et al.*** (2016) Genomic dissection of Australian *Bordetella pertussis* isolates from the 2008–2012 epidemic. *The Journal of Infection* **72**, 468–477.
31. **Conde-Glez C *et al.*** (2014) Seroprevalence of *Bordetella pertussis* in the Mexican population: a cross-sectional study. *Epidemiology and Infection* **142**, 706–713.
32. **Bigard KM *et al.*** (2004) Infant pertussis: who was the source? *The Pediatric Infectious Disease Journal* **23**, 985–989.
33. **de Greeff SC *et al.*** (2010) Pertussis disease burden in the household: how to protect young infants. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* **50**, 1339–1345.
34. **Wendelboe AM *et al.*** (2007) Transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **26**, 293–299.
35. **Tatti KM *et al.*** (2008) Development and evaluation of dual-target real-time polymerase chain reaction assays to detect *Bordetella* spp. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **61**, 264–272.
36. **Lineamientos para la vigilancia epidemiológica de tos-ferina y síndrome coqueluchoide por laboratorio.** InDRE. Available at http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/23793/Lineamientos_para_la_vigilancia_epidemiologica_de_tosferina_y_sindrome_coqueluchoide.pdf (Accessed 27 February 2018).