

La vacunación contra pertussis: Estado actual y perspectivas futuras

Celso Pérez-Bolaños, Lourdes Proenza-Alonso y Rafael Fando-Calzada.

Departamento de Bioquímica, Dirección Enfermedades Infecciosas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6412, La Habana, Cuba. Correo electrónico: celso.perez@cnic.edu.cu.

Recibido: 22 de julio de 2011

Aceptado: 1ro de noviembre de 2011

Palabras clave: pertussis, vacunas, tosferina, *Bordetella*, Parapertussis.

Key words: pertussis, vaccines, whooping-cough, *Bordetella*. Parapertussis.

RESUMEN. La tosferina o pertussis es una enfermedad producida por la bacteria Gram negativa *Bordetella pertussis* y constituye actualmente un problema de salud a escala mundial, siendo la población infantil la más vulnerable dentro de los grupos de riesgo. Suele ser fatal en niños menores de un año, debido a que la tos paroxística característica bloquea las vías respiratorias, lo cual provoca la asfixia y la muerte. Adicionalmente, se observan eventos adversos o complicaciones serias de la enfermedad tales como neumonías bacterianas secundarias, epilepsias, encefalopatía, apnea e hipertensión pulmonar. En la actualidad se aplican programas extensivos de vacunación contra pertussis en todo el mundo, de modo que la enfermedad está considerada como relativamente bien controlada. Según informes de la Organización Mundial de la Salud, cerca del 82 % de toda la población infantil mundial recibió las tres dosis de la vacuna de pertussis en 2008. La vacunación global contra pertussis en ese año evitó cerca de 687 000 muertes por la enfermedad. Sin embargo, se ha observado que ocurre un resurgimiento de ella a escala mundial, así como una prevalencia en zonas del mundo donde la vacunación es pobre. El presente trabajo tuvo como objetivo presentar una revisión acerca de los problemas inherentes a la vacunación contra esta enfermedad en el contexto actual de su resurgimiento a escala universal, la forma de enfrentarlos y resolverlos, para su aplicación en Cuba en caso necesario. La vacunación contra pertussis necesita de nuevos enfoques dirigidos a la eliminación de un flagelo que afecta primordialmente a la población infantil, que es el futuro de la humanidad. La solución del problema parece ser la búsqueda de nuevas vacunas más eficaces y la extensión de los esquemas de vacunación a la población de adolescentes y adultos que rodean a los infantes, así como a las mujeres en estado de gestación y a los recién nacidos.

ABSTRACT. Whooping cough or pertussis is an illness caused by the Gram-negative bacterium *Bordetella pertussis* and currently constitutes a world-wide health problem, being childhood the most vulnerable among the population risk groups. The illness is used to be fatal in children before one year, mostly due to its typical paroxystic cough, which blocks breathing thus provoking asphyxia and death. Furthermore, some adverse effects or serious complications are observed such as secondary bacterial pneumonia, epilepsy, encephalopathy, apnea and lung hypertension. At present, extensive vaccination programs are being universally applied, so that the illness is considered as relatively well-controlled. From the World Health Organization, near to 82 % of the world childhood population received the three doses of the pertussis vaccine in 2008. That year pertussis global vaccination avoided near to 687 000 deaths. Nevertheless, it was observed a world-wide resurgence of the illness as well as prevalence in zones where vaccination is poor. Giving an overview of the problems concerning pertussis vaccination in the current context of its universal resurgence, the way of facing and solving them in Cuba if necessary is the purpose of this work. Vaccination against pertussis needs of new approaches for eliminating a scourge that affects mainly childhood, the future of mankind. The solution to the problem seems to be searching for new, more efficient vaccines and the extent of vaccination schedules to adolescents and adults surrounding children, as well as pregnant women and newborns.

INTRODUCCIÓN

La tosferina o pertussis es una enfermedad aguda que afecta el tracto respiratorio en humanos y otros mamíferos relacionados con el hombre. Es provocada fundamentalmente por la bacteria Gram negativa *Bordetella pertussis* y en menor medida por *Bordetella parapertussis*, siendo la población infantil la más vulnerable. En niños menores de un año la enfermedad tiende a ser fatal, la tos paroxística característica bloquea las vías respiratorias, lo que provoca la asfixia y la muerte. Otros efectos adversos o complicaciones serias de la enfermedad se observan, tales

como neumonías bacterianas secundarias, epilepsias, encefalopatía, apnea e hipertensión pulmonar.^{1,2}

Se ha postulado que la transmisión de la enfermedad ocurre *via* aerosoles respiratorios producidos al toser la persona afectada, portadora de la bacteria.³ Nueve especies de *Bordetella* se han identificado hasta el presente, de ellas, solamente tres especies, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* y *B. holmesii*, han sido asociadas a afecciones respiratorias en humanos y otros mamíferos, particularmente, *B. bronchiseptica* en infecciones respiratorias severas en pacientes inmunocomprometidos.⁴

Esta enfermedad constituye actualmente un problema de salud a escala mundial y está comprendida entre las seis principales causas de muerte prevenibles por vacunación, aún en países con una gran cobertura de vacunación.⁵ Estimados de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sugieren que en 2008 ocurrieron cerca de 16 millones de casos a escala mundial, de ellos, el 95 % corresponde a países en desarrollo. Cerca de 195 000 niños murieron a consecuencia de la enfermedad.⁶

Debido a que la población infantil es la más afectada, la vacunación contra pertussis fue desarrollada tempranamente.^{7,8} Inicialmente los preparados vacunales (vacunas celulares) empleaban células completas de *B. pertussis*, inactivadas con calor o químicamente, usualmente formaldehído o timerosal, entre otros agentes.^{1,8} Las formulaciones vacunales posteriores (vacunas acelulares) incluyen los elementos inmunogénicos celulares, particularmente, la toxina, pectartina, fimbrias y hemoaglutinina filamentosa (FHA) y han demostrado ser eficientes, así como, en general, menos reactogénicas.^{1,9-11}

En la actualidad, se aplican programas extensivos de vacunación contra pertussis en todo el mundo, de modo que la enfermedad se considera como relativamente bien controlada. Según informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), cerca del 82 % de toda la población infantil mundial recibió las tres dosis de la vacuna de pertussis en 2008. La vacunación global contra pertussis en ese año evitó cerca de 687 000 muertes por la enfermedad.⁶ Sin embargo, se ha observado un resurgimiento de ella a escala mundial, así como una prevalencia en zonas del mundo donde la vacunación es pobre.¹²

El presente trabajo tuvo como objetivo presentar una revisión acerca de los problemas inherentes a la vacunación contra esta enfermedad en el contexto actual de su resurgimiento a escala universal, la forma de enfocarlos y resolverlos, para su posible aplicación en Cuba, en caso necesario.

Breve historia de la vacunación contra *B. pertussis*

El desarrollo de las vacunas contra pertussis comenzó tempranamente, una vez que se logró cultivar exitosamente la especie bacteriana *Bordetella pertussis* en el laboratorio.⁴ Las primeras vacunas consistieron en células completas en fase I de *B. pertussis*, inactivadas con calor o agentes químicos. Entre los años 1940 y 1950, este tipo de vacunas fue esencial en la prevención de la enfermedad en muchos países.¹ Las vacunas iniciales eran monocomponentes, pero en 1947, se diseñaron vacunas de células completas, en combinación con los toxoides de la difteria y el tétanos (DTP).⁴ En los Estados Unidos la inmunización de infantes con vacunas de células completas fue rutinaria hasta la aplicación de las vacunas acelulares (DTaP) en la década de 1990.¹ En la de 1950, otros países aplicaron la inmunización rutinaria contra pertussis con vacunas de células completas y en la actualidad, muchos países desarrollados y en desarrollo aún la aplican, incluyendo a Cuba.¹² La vacunación extensiva disminuyó significativamente el número de casos de la enfermedad, pero la publicidad que se generó en contra de este tipo de vacunas debido a las reacciones adversas que provocan, inicialmente asociadas a eventos neurológicos catastróficos y muertes, originó resistencia a las campañas de vacunación y consecuentemente, la incidencia de pertussis se incrementó nuevamente en todo el mundo. Paradójicamente, estos hechos demostraron que la vacunación era la única medida efectiva contra la enfermedad y de alguna manera, estimuló el desarrollo de las vacunas acelulares.^{9,13}

En el desarrollo de estos preparados vacunales de células completas se ensayaron diferentes variantes que incluyeron células con medio de cultivo, lavadas, de pertussis mezcladas con las de otros microorganismos que infectan el tracto respiratorio, así como vacunas fraccionadas, “detoxificadas” y enriquecidas con “factores tóxicos”.¹⁴ Entre 1962 y 1977, se comercializó en los Estados Unidos como TrisSlogan, Eli Lilly Co., un preparado crudo DTaP obtenido por extracción química de células enteras, centrifugación y exclusión de los restos celulares.¹ Este hecho puede tomarse como antecedente de las vacunas acelulares contra pertussis. Para entonces era conocido que la toxina pertúsica (PT), la hemoaglutinina filamentosa (FHA) y el lipopolisacárido (LPS) son liberados al medio líquido durante el crecimiento de la bacteria, de modo que podían concentrarse y separarse mediante centrifugación en gradiente de densidad. Como resultado, se determinó que PT era el antígeno más importante en el diseño de las vacunas acelulares y que el LPS debía ser excluido, ya que era la causa fundamental de las reacciones adversas.^{1,9,10} Por tal razón, las vacunas de células completas son más reactogénicas que las acelulares, que no contienen LPS o está presente en trazas.¹⁴

Las primeras vacunas acelulares de pertussis (DTaP), de componentes conocidos y cuantificables fueron desarrolladas y aplicadas con éxito en Japón en 1981, ante los brotes epidémicos generalizados de la enfermedad.^{9,15} La tecnología seguida básicamente consistió en la centrifugación de los cultivos y la concentración de los sobrenadantes PT, FHA y otros antígenos, incluyendo LPS. El LPS fue eliminado, luego de ultracentrifugación y PT inactivada con formalina.⁹ Esta vacuna acelular, denominada *Vacuna adsorbida y purificada de Pertussis* se aprobó en Japón y fue ampliamente aceptada como más segura y eficaz, con muy raras reacciones adversas. De hecho, la enfermedad fue eliminada virtualmente en ese país gracias a esta vacuna.¹⁶ Posteriormente, su uso se generalizó en Europa y Estados Unidos, luego de estudios adicionales de reactogenicidad y eficacia.¹⁷

Diferentes tipos de vacunas acelulares se evaluaron en Japón, Estados Unidos, Europa y África entre 1980 y 1985, todas ellas con un contenido en proporciones variables: toxina pertúsica (PT), hemoaglutinina filamentosa (FHA), pectartina (PRN) y fimbrias (FIM). Así, por ejemplo, existe una vacuna acelular pentavalente utilizada en los Estados Unidos que contiene ambos serotipos de fimbrias FIM2 y FIM3.¹⁴ Por otra parte, estudios realizados a mediados de 1990 mostraron que las vacunas que contenían PRN eran más eficientes que las vacunas que contenían PT solamente o PT-FHA.⁴ A pesar de que se conoce que el lipopolisacárido LPS es el responsable de la mayor parte de las reacciones locales y sistémicas adversas en las vacunas DTP;⁴ la infección con *B. pertussis* no está acompañada por la toxicidad usual de LPS (fiebre y shock), de modo que LPS modificado genéticamente pudiera utilizarse en vacunas opcionales como antígeno o adyuvante o ambos.¹ En 1991, la primera vacuna DTaP de cuatro y cinco dosis se aprobó en los Estados Unidos y más adelante, en 1996, otras vacunas fueron igualmente aprobadas para la serie primaria (dosis 1, 2 y 3).¹⁷

El “Ser o no Ser” de la vacunación contra *B. pertussis*

Antes de que la vacuna contra pertussis estuviera disponible, la enfermedad causaba elevadas tasas de mortalidad y morbilidad.³ Posteriormente, la utilización de vacunas redujo marcadamente estos índices y, por

ejemplo, en los Estados Unidos, la incidencia de casos reportados de la enfermedad se redujo en 157 veces durante el período comprendido entre 1940 y 1984. Sin embargo, la enfermedad continúa circulando. En general, las vacunas celulares son más eficientes que las acelulares, pero son más reactogénicas. Las vacunas acelulares, al ser menos reactogénicas, pueden aplicarse a adolescentes y adultos, lo que redundaría en un mejor control de la enfermedad.¹⁷

Por otra parte, la inmunidad después de la vacunación tiene una duración limitada, en ambas (DTP y DTaP) la inmunidad comienza a disminuir después de tres a cinco años y no se reporta protección demostrable después de los 10 a 12 años. En el caso particular de las vacunas acelulares, la presencia de anticuerpos post-vacunación sugiere que la protección dura entre cinco y diez años.¹

Es importante tener en cuenta que la inmunidad posterior a la infección natural por *B. pertussis* no es mayor que la que se obtiene por inmunización.¹⁸ Por ejemplo, la evaluación de niños menores de 16 años con tos prolongada, mayor o igual a los 14 d en el Reino Unido y Canadá reveló tosferina en el 35 % de los casos, de ellos, entre un 60 y un 80 % habían sido inmunizados en la infancia.^{19,20}

Se ha observado que la vacunación ha ocasionado un desplazamiento en la incidencia de casos reportados de pertussis desde niños de 1 a 9 años en poblaciones sin vacunar, a casos de niños, adolescentes y adultos en poblaciones vacunadas, posiblemente debido a tres razones fundamentales: a) Inmunidad incompleta en niños que han recibido menos de las tres dosis establecidas; b) Inmunidad relativamente corta luego de la vacunación; c) Aumento en la vigilancia en número de casos en adolescentes y adultos.^{1,4}

Es conocido que la tosferina o pertussis ha experimentado últimamente una re-emergencia en muchos países, tanto desarrollados como en vías de desarrollo, a pesar de las campañas de vacunación generalizadas y que el fenómeno no está asociado a cambios en los patrones de resistencia de la bacteria frente a los antibióticos,²¹⁻²⁴ como es el caso de algunos microorganismos patógenos en otras enfermedades, como ocurre en la tuberculosis.^{25,26} Un ejemplo relativamente reciente lo constituye el brote epidémico de pertussis en California, en 2010.²⁷

El fenómeno de la “resurgencia” de pertussis en los Estados Unidos se ilustra elocuentemente en un trabajo de Cherry, 2003 (Fig. 1).^{28,29} Se observa un declive en el número de casos reportados, coincidentemente con la aplicación de la vacuna (años 1940 en adelante). Por otra parte, el au-

mento en el número de casos, correspondiente al período comprendido entre 1980 y 2000 (parte superior derecha, Fig. 1) es modesto si se le compara con el cuadro general, de modo que la “resurgencia” no parece ser significativa.^{28,29}

Un análisis de los mismos datos por edades revela que en la etapa de pre-vacunación, el 95 % de los casos reportados eran niños menores de 10 años de edad, con solamente un 7,5 % correspondiente al primer año de vida (Tabla 1). Sin embargo, durante el período 1978-1981, aunque la mayoría de los casos era reportado en niños menores de 10 años (88,2 %), el porcentaje de casos en niños menores de 1 año (53,5 %) era seis veces mayor respecto a la etapa de pre-vacunación.

Finalmente, en la etapa de “resurgencia” (1997-2000), el 49,8 % correspondió a personas mayores de 10 años. En opinión del autor, este modesto incremento en el número de casos durante el período indicado no merece el calificativo de “resurgente”, puesto que la tasa de casos reportados es aún 50 veces menor que los informados en la época anterior a la vacunación.

Diversos autores señalan que los cambios genéticos en la especie *B. pertussis* hacen que las vacunas sean menos efectivas y que la inmunidad inducida por ellas haya disminuido.^{22,27,30,31} Este hecho, unido a una mayor preocupación por la enfermedad por parte de las autoridades de la salud, los médicos y la población en general, una mayor eficiencia de los laboratorios, mejores métodos para la confirmación del diagnóstico y una mayor capacidad para reconocer la enfermedad en adolescentes y adultos ha traído como resultado un aumento en los reportes de la tosferina a escala mundial.³²⁻³⁵ Numerosos estudios indican que ambos grupos etarios constituyen un reservorio de *B. pertussis* y son la mayor fuente de transmisión de la enfermedad a niños parcialmente inmunizados, particularmente, a los lactantes (Fig. 2).^{21,34-37}

Otros autores han señalado que la resurgencia puede deberse a la utilización de vacunas solamente efectivas contra *B. pertussis* y no contra *B. parapertussis* y que este hecho coincide con la introducción de las vacunas acelulares. Tales vacunas portan antígenos comunes para *B. pertussis* y *B. parapertussis* y por otra parte, carecen de ciertos antígenos de superficie, tales como el antígeno O, solamente presentes en *B. parapertussis*.³⁹

Problemas actuales de la vacunación contra la tosferina o pertussis

La resurgencia a escala universal de la tosferina o pertussis ha revelado un conjunto de problemas a enfrentar.

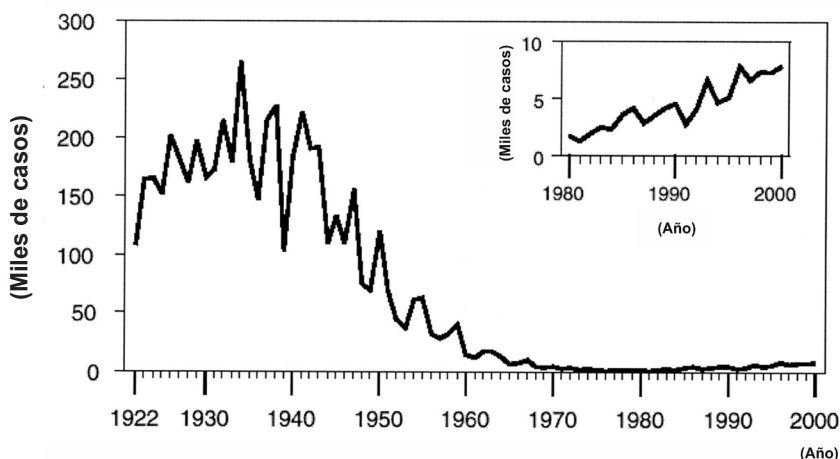


Fig. 1. Número de casos reportados de pertussis en los Estados Unidos, por año, 1997-2000.^{28,29}

Tabla 1. Distribución en porcentajes de casos reportados de pertussis por grupos de edades en tres períodos de tiempo

Grupo de edades (Años)	Massachusetts (1933-1939)	Estados Unidos (1978-1981)	Estados Unidos (1997-2000)
< 1	7,5	53,5	29,4
1-4	41,1	26,5	11,1
5-9	46,0	8,2	9,8
10-14	4,1	5,4	
10-19			29,4
≥ 15	0,9	6,5	
≥ 20			20,4

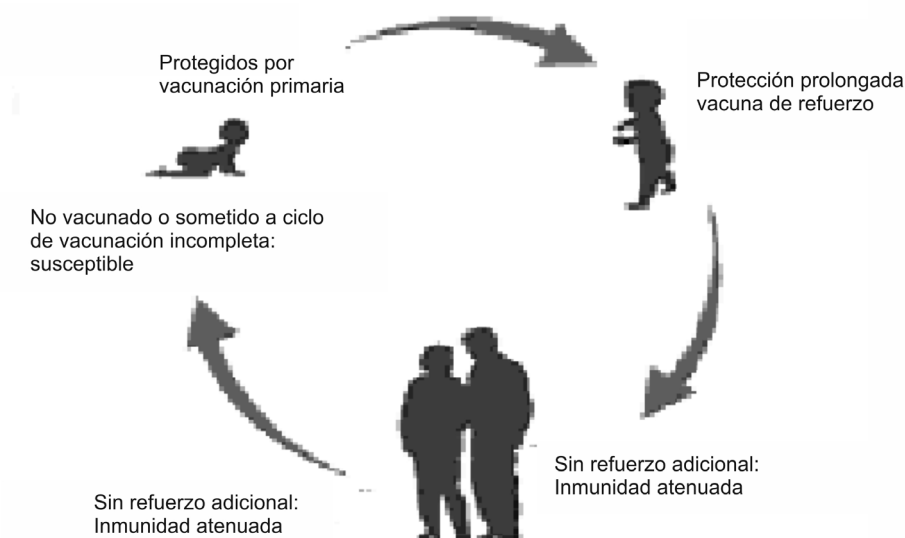


Fig. 2. Ciclo de transmisión de pertussis entre adultos y niños.³⁸

En sentido general, una vacuna ideal debe cumplir con ciertos requerimientos importantes: debe reproducir o mimetizar una respuesta inmunológica similar a la de la infección natural, además de ser efectiva (más del 90 % de protección). La vacuna en cuestión debe poseer efectos secundarios mínimos y ser completamente segura, con una inmunidad persistente a largo plazo. Por otra parte, es recomendable que sea de dosis única, compatible con otras vacunas y de administración no invasiva (vía oral preferentemente). Igualmente importante es su administración precoz en los primeros meses de la vida. Finalmente, la vacuna ideal debe ser estable a temperatura ambiente, de fácil producción y económicamente asequible.⁴⁰

Una tendencia universal en el empleo de las vacunas contra pertussis ha sido la sustitución paulatina de las vacunas de células completas por vacunas acelulares, debido a la mayor reactogenicidad de las primeras.⁴¹ Para evitar los efectos indeseables de las vacunas de células completas DTP, se han desarrollado dos generaciones de vacunas DTaP, libres de tales efectos que sin embargo, resultaron menos eficientes que sus controles DTP.^{42,43} Estas observaciones sugieren la necesidad de incluir antígenos adicionales en las próximas DTaP, con el fin de mejorar la eficacia vacunal.¹

Las vacunas DTaP actuales son de un solo componente (toxoides PT), de dos componentes (PT y FHA), tres

componentes (PT, FHA y PRN), cuatro componentes (PT, FHA, PRN y FIM2) y de cinco componentes (PT, FHA, PRN y FIM2/3). Con excepción de la vacuna de cinco componentes fabricada en Canadá, las vacunas acelulares no son tan eficaces como las europeas compuestas de células enteras.^{1,44} No obstante, debido a que es más fácil fabricar vacunas combinadas basadas en vacunas anti-pertussis acelulares y a que las cuestiones de seguridad revisten una gran importancia, es probable que otros países, incluso aquellos en vías de desarrollo, adopten este tipo de vacunas. El costo es una cuestión a tener en cuenta, sobre todo en los países menos desarrollados, pero es posible que la competencia entre fabricantes conduzca a una reducción de precios.^{45,46}

Algunos autores han reportado variaciones en los genotipos en las cepas o aislamientos clínicos de pertussis con relación a las cepas vacunales en diferentes países, particularmente en los Países Bajos.²² Evidentemente, este hecho muestra un problema que puede influir en la eficacia de las vacunas actuales.

Un estudio realizado por investigadores europeos en cinco países de Europa en 2010 de una serie de datos serológicos en combinación con la información sobre los patrones de contactos sociales, relativo a la incidencia de pertussis, reveló que la vacunación actual no previene la circulación continuada y la reinfección, mayormente

desplazada hacia adolescentes y adultos. En las condiciones actuales, la circulación de pertussis a un nivel subcrónico proporciona un refugio al patógeno, de tal manera que puede evolucionar e infectar poblaciones vacunadas.⁴⁷ Se ha recomendado la inmunización temprana de los infantes neonatos, de las madres en estado de gestación, pre- y posparto y el personal de salud relacionado con la enfermedad, así como de los empleados de las escuelas y otras instituciones relacionadas con el cuidado infantil.^{6,48,49}

Perspectivas futuras de la inmunización contra *B. pertussis*

La inmunidad natural o la adquirida mediante la vacunación no dura toda la vida, la protección suele ser muy baja luego de 10 años, si no se aplica un reforzamiento o revacunación,⁵⁰ lo que invariablemente resulta en un incremento en el número de casos de adultos y adolescentes con baja inmunidad y susceptibles de infección. Como se ha mencionado, estos grupos son a su vez, la fuente de infección de niños con un esquema de vacunación incompleta.^{1,10} A pesar de que las vacunas acelulares representan un progreso en la vacunación DTP, se requiere de múltiples dosis para alcanzar una máxima eficiencia. De esta manera, el desarrollo de una vacuna a bajo costo que inmunice eficientemente con una sola dosis sería particularmente importante para los países en vías de desarrollo, donde posiblemente el difícil acceso a los centros de salud puede dificultar la vacunación completa de los niños.

Una alternativa a la vacunación parenteral lo constituye la vacunación nasal de una sola dosis. Un reporte interesante lo constituye el empleo de una vacuna celular, consistente de 250 µg de proteínas, aplicadas semanalmente a seis voluntarios adultos por *via* nasal. Se observó un incremento de anticuerpos IgA a *B. pertussis* en fluido nasal en todos los casos. Fue significativo que tres de las vacunas con una marcada respuesta nasal de anticuerpos, mostraron igualmente una respuesta incrementada de anticuerpos IgA a IgG en suero al antígeno. Por otra parte, la respuesta de anticuerpos en saliva al antígeno de células completas, así como los anticuerpos en suero y secreciones a la toxina pertúsica PT y hemoaglutinina filamentosa FHA fue insignificante, excepto un incremento moderado de FHA en fluido nasal.⁵¹

La infección natural con *B. pertussis* es capaz de inducir una inmunidad fuerte, duradera y que mengua más tardíamente que la inmunidad inducida.⁵² Además, induce respuestas inmunes antígeno - específicas tipo Th1, detectables aún en recién nacidos hasta de un mes de edad.⁵³ Estas observaciones sugieren que las vacunas vivas deben aplicarse por vía nasal, de modo que simulen una infección natural. El candidato vacunal sería una cepa genéticamente atenuada, con una patogenicidad disminuida y que mantiene su capacidad de colonización del epitelio respiratorio e induce inmunidad protectora. Esta estrategia se desarrolló por Mielcarek *et al.*⁵⁴ a partir de la inactivación genética del locus *ptx* en la cepa BPZE1. Los ensayos posteriores en modelo de ratón indicaron que la cepa estaba muy atenuada, no obstante, colonizó el tracto respiratorio y fue capaz de inducir una fuerte inmunidad protectora, luego de una sola inmunización nasal. La protección contra *B. pertussis* fue similar a la inducida mediante inyección de dos dosis de vacuna acelular (aPV) en ratones adultos, pero fue superior en ratones infantes. La protección se extendió a *Bordetella parapertussis*, mientras que la vacuna acelular no lo hizo.⁵⁴ Estos resultados apuntan hacia la

posibilidad de emplear la vacunación nasal, no agresiva, en etapas tempranas de la vida, inclusive al nacer.

La investigación básica sobre los factores de virulencia constituyó una premisa importante en el desarrollo de nuevas vacunas contra pertussis. La inclusión de otros factores de virulencia diferentes a los hasta ahora utilizados en el diseño de nuevas vacunas DTaP es una perspectiva a tener en cuenta. Tal es el caso de ciertas proteínas asociadas a la superficie celular, como por ejemplo, los autotransportadores BrkA (una adhesina opcional), la proteína de membrana Vag8 y SphB, una lipoproteína con actividad proteasa, necesaria para la maduración de FHA en *B. pertussis*. Se excluyen como posibles candidatos la adenilato ciclasa CyaA, puesto que los anticuerpos anti-CyaA manifiestan reacción cruzada con familias RTX - hemolisinas de otras especies bacterianas Gram negativas.¹ Esto es igualmente válido para la citotoxina traqueal.¹ Otra opción importante la constituye el sistema de secreción tipo III (T3SS), que funciona como un sistema exportador de factores de virulencia, a través de un mecanismo de nanoinyección a la célula huésped. De esta manera, T3SS como antígeno protector puede ser aplicado como un nuevo componente de la vacuna acelular.¹

Naturalmente, en el diseño de nuevas vacunas debe tomarse en cuenta si son lo suficientemente efectivas contra las cepas de *B. pertussis* en circulación, ya que se han detectado variaciones significativas en los genotipos en algunos aislamientos clínicos.^{22,55-57} Por otra parte, el Instituto Butantan en Brasil ha desarrollado una nueva tecnología, sencilla y relativamente barata, que remueve los lipopolisacáridos y además, produce el lípido monofosforil-A, utilizado como adyuvante. Esta nueva vacuna con bajo contenido de LPS, combinada con antígenos de la difteria y el tétanos (DTP bajo) es tan potente como la vacuna DTP regular y menos reactogénica.^{46,58} Los autores del trabajo brindan esta vacuna como una posibilidad para los países en vías de desarrollo.

De particular interés resulta una patente de Bernard Mahon que logra aumentar la eficiencia de una formulación vacunal acelular contra pertussis mediante la incorporación de interleucina 12 (IL12), en lugar del aluminio como adyuvante. Esta tecnología incrementó considerablemente la producción y la protección de interferón IFN-γ en el modelo de ratón.⁵⁹

El desarrollo de una vacuna BCG-Pertussis recombinante, que permita el comienzo de la vacunación contra pertussis en la primera semana de vida, antes del calendario estándar, es otra estrategia interesante.⁴⁶ *Mycobacterium bovis* BCG se considera un candidato con gran potencialidad como hospedero para la presentación de antígenos heterólogos en el desarrollo de nuevas vacunas recombinantes.^{60,61} La vacuna multivalente recombinante BCG (rBCG) tendría varias ventajas: a) Una sola dosis sería suficiente para conferir inmunidad celular a largo plazo. b) La OMS recomienda que BCG sea administrada al nacer. c) BCG es el mejor adyuvante conocido en animales y humanos. d) Presenta bajos costos de producción y es termoestable. Los autores de este trabajo obtuvieron una cepa BCG recombinante, portadora de subunidad S1 inactiva de la toxina PT de *B. pertussis*, cuyo antígeno se localiza en la pared de la micobacteria. La vacuna resultante fue de bajo costo y potencialmente efectiva contra ambas enfermedades: pertussis y tuberculosis y pudiera inducir protección en niños susceptibles y recién nacidos, particularmente, en países en vías de desarrollo donde la vacunación de neonatos con *Mycobacterium bovis* BCG está establecida.

Uno de los objetivos a largo plazo de la prevención por inmunización de la tosferina o pertussis es la eliminación del agente infeccioso *Bordetella pertussis*. Esto es teóricamente posible para todas las infecciones donde no existe reservorio animal (por ej., la rabia) o ambiental (por ej., el tétanos). Este objetivo se alcanzó con la viruela en 1978.¹ En general, los programas de inmunización universal contra pertussis han sido exitosos, pero no han afectado la circulación de *B. pertussis*. La vacunación con TdaP, (vacunas de dosis reducida para adolescentes y adultos), a largo plazo puede reducir y tal vez eliminar la mortalidad y morbilidad.^{12,62}

Actualmente, se recomiendan diferentes estrategias en la vacunación TdaP: vacunación de refuerzo de preadolescentes y adolescentes; de adultos de edad por encima de los 65 años; utilización de TdaP en lugar de toxoides tetánico o diftérico en caso de heridas; inmunización de los trabajadores de la salud y aplicación de la vacunación "capullo" (vacunación de los miembros de la familia que rodean al bebé) para prevenir pertussis en el caso de infantes demasiado jóvenes para ser inmunizados.¹² La vacunación de adolescentes y adultos, dado que estos grupos etarios constituyen la fuente de infección de infantes no vacunados o reinfección de infantes insuficientemente vacunados, particularmente en el ámbito del hogar, puede contribuir a la disminución en el número de casos reportados de la enfermedad. Esta estrategia incluye la vacunación de la madre *post-partum*, o en el segundo o tercer trimestre.^{41,43} La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, en el idioma inglés) aprobó el uso de vacunas DTaP para la vacunación de refuerzo a adolescentes y adultos. Un grupo de países desarrollados tales como Alemania, Canadá y Francia y otros en vías de desarrollo han recomendado la vacunación rutinaria de adolescentes con vacunas acelulares de pertussis.⁵⁷

Puesto que *B. pertussis* no posee reservorio natural, la condición *sine qua non* de la eliminación de la tosferina o pertussis y de la circulación de *B. pertussis* sería una vacuna que confiera una protección a largo plazo contra las infecciones clínicas y subclínicas. A tales efectos, se requiere un programa universal continuo de inmunización pediátrica de vacunación TdaP. Este programa incluiría una vacunación cada diez años. Podría comenzar en la pre-adolescencia y continuar en la edad adulta, hasta los 65 años.¹²

Una posibilidad a considerar es el empleo de vesículas de membrana externa (OMV en idioma inglés) como vacunas acelulares contra pertussis. Las bacterias Gram negativas liberan de forma natural vesículas lipídicas a partir de la membrana externa, portadoras de muchos antígenos bacterianos nativos. Poseen propiedades inmunogénicas, capacidad adyuvante implícita; son incorporadas fácilmente a células de mamíferos y pueden ser manipuladas mediante ingeniería genética, lo que las hace atractivas como plataformas liberadoras de vacunas. En principio, este enfoque ha sido aplicado exitosamente en el diseño de candidatos vacunales contra el serogrupo B de meningococos en Cuba, Noruega y Nueva Zelanda.⁶³ En el caso de *Bordetella pertussis* existen reportes de la aplicación de las OMV para el diseño de vacunas acelulares. Por ejemplo, Roberts *et al.*⁶⁴ describen la obtención y evaluación de OMV en la cepa Tohama CIP 8132 de *Bordetella pertussis* como candidato vacunal contra pertussis. Las OMV en cuestión contenían inmunógenos de superficie conocidos, tales como pectartina, adenilato ciclasa-hemolisina, toxina pertúsica; así como el lipo-oligosacárido (LOS). Las OMV

caracterizadas fueron sometidas a reto intranasal en modelo murino y su capacidad protectora fue adecuada.⁶⁴ Se observó un aumento de la respuesta inmune natural en TNF α , IL-6 y CCL20 y los resultados de los experimentos de reto intranasal con *B. pertussis* en ratones BALB/c inmunizados fueron positivos, así como la tasa de eliminación. Puesto que los resultados de la utilización de OMV son similares a los obtenidos en el sistema control de inmunización con células completas, esta tecnología es atractiva a la hora de considerar su aplicación en el diseño de nuevas vacunas acelulares. Por otra parte, investigadores argentinos diseñaron OMV en *Bordetella pertussis* con baja endotoxigenidad (OMV-BpPagL), que contenían inmunógenos de superficie tales como la pectartina y toxina pertúsica, además de la 3-deacilasa lipídica A, procedente de *B. bronchiseptica*. Los ensayos de reto de OMV-BpPagL en modelo murino intranasal y en ratón mostraron resultados positivos respecto a su capacidad protectora y una adecuada eliminación, además de inducción normal de la expresión de las interleucina IL6 y IL1 en pulmón, movilización de neutrófilos, con una baja inducción y movilización de citocinas pro-inflamatorias.⁶⁵

Algunas consideraciones perspectivas para la vacunación contra pertussis en Cuba

Como es conocido, Cuba se declaró libre de tosferina o pertussis en 1994 como consecuencia de la aplicación de un programa nacional de salud muy eficiente.⁶⁶ Actualmente, con el aumento del intercambio y la colaboración con países en los que se han reportado brotes importantes de la enfermedad, existe la posibilidad de importación de la tosferina, difícil de controlar mediante cuarentenas, debido a la transmisión por la vía respiratoria mediante aerosoles.¹

La vacunación contra esta enfermedad en Cuba se lleva a cabo empleando células completas, como parte de vacunas multivalentes contra la difteria y el tétanos (DPT) o de otras enfermedades como la influenza o la hepatitis B.^{67,68} La vacuna cubana de células completas DTP se aplica de forma parenteral mediante inyección intramuscular. Contiene una suspensión de células de las cepas de *Bordetella pertussis* 134, 165 y 509, previamente inactivadas y absorbidas en gel de hidróxido de aluminio con timerosal como preservativo.⁶⁹ Esta vacuna se recomienda para la inmunización activa de lactantes y niños entre los dos y dieciocho meses de edad, así como para la inmunización primaria y de refuerzo en niños menores de 7 años.

Hasta el presente, no existen en Cuba formulaciones de vacunas acelulares contra pertussis la que en principio, deben contener los determinantes antigénicos fundamentales: toxina pertúsica (PT), hemoaglutinina filamentososa (FHA), pectartina y fimbrias.¹ El desarrollo de nuevas cepas genéticamente atenuadas, con una mayor y mejor expresión de tales determinantes antigénicos, así como de otros de importancia, sería una perspectiva a considerar en el diseño de nuevas vacunas acelulares. De hecho, el diseño de nuevas cepas vacunales mediante manipulaciones genéticas, dirigido a la inactivación de la toxina pertúsica (PT) y a su sobre-expresión, a partir de las cepas que componen la vacuna celular en uso puede ser una estrategia valiosa. Adicionalmente, debe considerarse el desarrollo y la aplicación de la tecnología de vesículas de membrana externa en el diseño de nuevas vacunas acelulares, dado su potencial creciente.⁶³⁻⁶⁵

Aunque la vacuna celular que se utiliza en Cuba contiene tres cepas diferentes de *B. pertussis*, lo que asegura cierta variabilidad antigénica,⁶⁹ sería igualmente

interesante realizar un muestreo que permita conocer la posible presencia de otras cepas de pertussis en circulación, diferentes a las cepas vacunales, que pudieran ocasionar eventualmente brotes de la enfermedad por ineficacia en la aplicación de las vacunas vigentes.⁵⁷

Otra vertiente a evaluar sería incluir *Bordetella parapertussis* en el diseño de nuevas vacunas acelulares. Esta especie es también agente causal de la enfermedad, si bien *B. pertussis* se considera el fundamental.^{1,70} Puesto que las nuevas vacunas acelulares solamente contienen antígenos de *B. pertussis*, ellas son poco eficaces o ineficaces contra *B. parapertussis*. En un estudio realizado de coinfección *pertussis* - *parapertussis* en modelo de ratón, Long *et al.*⁷⁰ encontraron un incremento en 40 veces el número de unidades formadoras de colonias de *B. parapertussis* en pulmón, luego de la aplicación de una vacuna acelular contra *B. pertussis*. Por otra parte, la vacunación acelular impide la inmunidad del huésped contra *B. parapertussis* medida como reducción de la inflamación de pulmón y respuesta de neutrófilos. Los autores sugieren que la amplia vacunación acelular pudiera crear hospederos más susceptibles a la infección con *B. parapertussis*. A pesar de que estos resultados en ratones no deben ser directamente extrapolables a humanos, una alternativa a la infección *pertussis-parapertussis* pudiera ser el empleo de vacunas vivas atenuadas por vía nasal,⁵⁴ o bien, el desarrollo de vacunas de células completas *B. pertussis* - *B. parapertussis* o la suplementación de vacunas acelulares contra *B. pertussis* con antígenos protectores de *B. parapertussis*, particularmente, el antígeno O de LPS, cuyos genes codificadores normalmente están ausentes en la primera especie.^{1,39,71}

CONCLUSIONES

La vacunación contra la pertussis o tosferina necesita de nuevos enfoques que ayuden a enfrentar la re-emergencia de la enfermedad a escala universal. A pesar de que algunos autores consideran que el fenómeno es solo aparente, esto puede ser un alerta para tomar decisiones drásticas, dirigidas a la eliminación de un flagelo que afecta primordialmente a la población infantil, el futuro de la humanidad. La solución del problema parece ser la búsqueda de nuevas vacunas más eficaces y la extensión de los esquemas de vacunación a la población de adolescentes y adultos que rodean a los infantes, así como a las mujeres en estado de gestación y recién nacidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. Clin Microbiol Rev. 2005;18(2):326-82.
2. Heininger U. Recent progress in clinical and basic pertussis research. Eur J Pediatr. 2001;160:203-13.
3. Versteegh FGA., Schellekens JFP, Fleer A, Roord JJ. Pertussis: a concise historical review including diagnosis, incidence, clinical manifestations and the role of treatment and vaccination in management. Rev Med Microbiol. 2005;16:79-89.
4. Cherry, JD, Heininger U. Pertussis and other *Bordetella* infections. Textbook of pediatric infectious diseases, 5th ed. R. D. Feigin, J. D. Cherry, G. J. Demmler, and S. Kaplan (ed.), Philadelphia, USA. The W B. Saunders Co; 2004:p.1588-1608.
5. World Health Organization (2004) The world health report 2004-Changing history. Geneva: WHO. [Consultado 10 de mayo de 2011]. Disponible en: <http://www.who.int/whr/2004/en>
6. World Health Organization (2008) Immunization, Vaccines and Biologicals. Pertussis. [Consultado 10 de mayo de 2011]. Disponible en: <http://www.who.int/immunization/topics/pertussis/en/index.html>

7. Cherry JD. The epidemiology of pertussis and pertussis immunization in the United Kingdom and the United States: a comparative study. Curr Probl Pediatr. 1984;14:1-78.
8. Cherry JD, Brunell PA, Golden GS, Karson DT. Report of the task force on pertussis and pertussis immunization-1988. Pediatrics. 1988;81:939.
9. Sato Y, Kimura M, Fukumi H. Development of a pertussis component vaccine in Japan. Lancet. 1984;i:122-126.
10. Cherry JD. Pertussis in the preantibiotic and prevaccine era, with emphasis on adult pertussis. Clin Infect Dis. 1999;28(Suppl. 2):S107-S111.
11. Robinson A, Irons LI, Ashworth LAE. Pertussis vaccine: present status and future prospects. Vaccine 1985;3(1):11-22.
12. Cherry JD. The Present and Future Control of Pertussis. Clin Infect Dis. 2010;51(6):663-7.
13. Romanus V, Jonsel RL, Bergquist SO. Pertussis in Sweden after the cessation of general immunization in 1979. Pediatr Infec Dis J. 1987;6:364-371.
14. Decker MD, Edwards KM, Steinhoff MC, Rennels MB, Pichichero ME, Englund JA, *et al.* Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: adverse reactions. Pediatrics. 1995;96:557-566.
15. Kimura M, Kuno-Sakai H. Pertussis vaccines in Japan. Acta Paediatr. 1988;30:143-153.
16. Sato Y, Sato H. Development of acellular pertussis vaccines. Biologicals. 1999;27:61-69.
17. Cherry JD. Historical perspective on Pertussis and use of vaccines to prevent It: 100 years of pertussis (the cough of 100 days). Microbe 2007;2(3):139-144.
18. Cherry JD. Epidemiological, clinical, and laboratory aspects of pertussis in adults. Clin Infect Dis. 1999;28(Suppl 2):S112-17.
19. Senzilet LD, Halperin SA, Spika JS, Alagaratnam M, Morris A, Smith B. Pertussis is a frequent cause of prolonged cough illness in adults and adolescents. Clin Infect Dis. 2001;32:1691-1697.
20. Harnden A, Grant C, Harrison T, Perera R, Brueggemann AB, Mayon-White R, *et al.* Whooping cough in school age children with persistent cough: prospective cohort study in primary care. BMJ. 2006;333:174-7.
21. Berbers GA, de Greeff SC, Mooi FR. Improving pertussis vaccination. Hum Vaccin. 2009;5:497-503.
22. Mooi FR, Van Loo IH, King AJ. Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: a cause for its reemergence? Emerg Infect Dis. 2001;7:526-528.
23. Sintchenko V. The re-emergence of pertussis: implications for diagnosis and surveillance. N S W Public Health Bull. 2008;19:143-5.
24. Sintchenko V, Brown M, Gilbert GL. Is *Bordetella pertussis* susceptibility to erythromycin changing? MIC trends among Australian isolates 1971-2006. J Antimicrob. Chemotherapy Adv. [Consultado 12 de mayo de 2011]. Disponible en: jac.oxfordjournals.org/content/early/2007/09/06/jac.dkm343.full.pdf
25. Todar K. *Mycobacterium tuberculosis* and Tuberculosis (2008). [Consultado 12 de mayo de 2011]. Disponible en: <http://www.textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html>
26. Prakash CS. Tuberculosis and antibiotic resistance. Curr Science. 2002;82(1):17-18.
27. Barrett S. Pertussis Epidemic in California (2010). [Consultado 12 de mayo de 2011]. Disponible en: http://www.quackwatch.org/03HealthPromotion/immu/pertussis_california.html
28. Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis-United States, 1997-2000. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2002;51:73-6.
29. Cherry JD. The science and fiction of the "resurgence" of Pertussis. Pediatrics. 2003;112(2):405-7. [Consultado 12 de mayo de 2011]. Disponible en: <http://pediatrics.aappublications.org/content/112/2/405.full.html>
30. King AJ, Van Gorkom T, Van der Heide HG, Advani A, Van der Lee S. Changes in the genomic content of circulating *Bordetella pertussis* strains isolated from the Netherlands, Sweden, Japan and Australia: adaptive evolution or drift? BMC Genomics. 2010;11:64.
31. Cherry JD. The epidemiology of pertussis: a comparison of the epidemiology of the disease pertussis with the

- epidemiology of *Bordetella pertussis* infection. *Pediatrics*. 2005;115:1422-1427.
32. Taranger J, Trollfors B, Bergfors E, Knutsson N, Lagergard T, Schneerson R, *et al.* Immunologic and epidemiologic experience of vaccination with a monocomponent pertussis toxoid vaccine. *Pediatrics*. 2001;108:E115.
 33. Black S. Epidemiology of pertussis. *Pediatr Infect Dis J*. 1997;16:S85-89.
 34. Pebody RG, Gay NJ, Giammanco A, Baron S, Schellekens J, Tischer A, *et al.* The seroepidemiology of *Bordetella pertussis* infection in Western Europe. *Epidemiol Infect*. 2005;133:159-171.
 35. Pichichero ME. Booster vaccinations: can immunologic memory outpace disease pathogenesis? *Pediatrics*. 2009;124:1633-41.
 36. Purdy KW, Hay JW, Botteman MF, Ward JI. Evaluation of strategies for use of acellular pertussis vaccine in adolescents and adults: a cost-benefit analysis. *Clin Infect Dis*. 2004;39:20-8.
 37. Tanaka M, Vitek CR, Pascual FB, Bisgard KM, Tate JE, Murphy TV. Trends in pertussis among infants in the United States, 1980-1999. *JAMA*. 2003;290:2968-75.
 38. Blangiardi F, Ferrera G. Reducing the risk of pertussis in newborn infants. *J Prev Med Hyg*. 2009;50:206-216.
 39. Zhang X, Goebel EM, Rodriguez ME, Preston A, Harvill ET. The O antigen is a critical antigen for the development of a protective immune response to *Bordetella parapertussis*. *Infect Immun*. 2009;77:5050-58.
 40. Tregnaghi M. Presente y futuro de las vacunas. *Arch Argent Pediatr*. 2002;100(1):44-9.
 41. World Health Organization. Weekly epidemiological record. 2010;85(40):385-400. [Consultado 12 de mayo de 2011]. Disponible en: <http://www.who.int/wer>
 42. Liese JG, Meschievitz CK, Harzer E, Froeschle J, Hosbach P, Hoppe JE *et al.* Efficacy of a two-component acellular pertussis vaccine in infants. *Pediatr Infect Dis J*. 1997;16:1038-44.
 43. Schmitt HJ, Wirsing von König CH, Neiss A, Bogaerts H, Bock HL, Schulte-Wissermann H *et al.* Efficacy of acellular pertussis vaccine in early childhood after household exposure. *JAMA* 1996;275:37-41.
 44. Plotkin SA. Revisiones. Vacunas en el siglo veintiuno. *Vacunas*. 2002;3:18-28.
 45. Plotkin SA. Vaccines in the 21st century. *Infect Dis Clin North America*. 2001;15:307-327.
 46. Dias WO, Leite LCC, Horton DSPQ, Sakauchi MA, Kubrusly FS, Furuyama N *et al.* New approaches in pertussis vaccines for developing countries *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. A. Méndez-Vilas (Ed.) [Consultado 12 de mayo de 2011]. Disponible en: www.formatex.org/microbio/pdf/pages668-672.pdf
 47. Kretzschmar M, Teunis PFM, Pebody RG. Incidence and Reproduction Numbers of Pertussis: Estimates from Serological and Social Contact Data in Five European Countries. *PLoS Med*. 2010; 7 (6) : e1000291.
 48. Vidal P, Reyna J, Richardson V, Gómez CM, Sánchez E, Hernández J. Infección por *Bordetella pertussis* en lactantes. Perspectiva de la prevención por medio de inmunización materna con DPT acelular. *Enf Inf Microbiol*. 2010;30(2):59-62.
 49. Ulloa GR, Ávila AML. *Pertussis* in Latin America: Current situation and future vaccination challenges. *Expert Rev Vaccines*. 2008;7:1569-80.
 50. Pichichero ME, Blatter MM, Kennedy WA, Hedrick J, Descamps D, Friedland LR. Acellular pertussis vaccine booster combined with diphtheria and tetanus toxoids for adolescents. *Pediatrics*. 2006;117(4):1084-1093. [Consultado 12 de mayo de 2011]. Disponible en: <http://pediatrics.aapublications.org/content/117/4/1084.full.html>
 51. Berstad AKH, Holst I, Frøholm IO, Haugen IL, Wedege E, Ofung F *et al.* A nasal whole-cell pertussis vaccine induces specific systemic and cross-reactive mucosal antibody responses in human volunteers. *J Med Microbiol*. 2000;49:157-163.
 52. Wirsing von König CH, Halperin S, Riffelmann M, Guiso N. Pertussis of adults and infants. *Lancet Infect Dis* 2002;20:744-50.
 53. Mascart F, Verscheure V, Malfroot A, Hainaut M, Piérard D, *et al.* *Bordetella pertussis* infection in 2-months-old infants promotes Type 1 T cell responses. *J Immunol* 2003;170:1504-09.
 54. Mielcarek N, Debie AS, Raze D, Bertout J, Rouanet C, *et al.* Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS Pathog*. 2006;2(7):e65.
 55. Heikkinen E, Kallonen T, Saarinen L, Sara R, King AJ, Mooi FR *et al.* Comparative Genomics of *Bordetella pertussis* Reveals Progressive Gene Loss in Finnish Strains. *PLoS ONE* 2007;2(9):e904.
 56. Caro V, Bouchez V, Guiso N. Is the sequenced *Bordetella pertussis* strain Tohama I representative of the species? *J Clin Microbiology*. 2008;46(6):2125-28.
 57. Kallonen T, Quishiu H. *Bordetella pertussis* strain variation and evolution postvaccination. *Expert Rev*. 2009;8(7):863-875.
 58. Higashi HG, Luna E, Precioso AR; Vilela M, Kubrusly FS, Dias WO *et al.* Acellular and "low" pertussis vaccines: adverse events and the role of mutations. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2009;5(3):131-4.
 59. Mahon B. Pertussis vaccine. [Consultado 12 de mayo de 2011]. Disponible en: http://www.biotechnologypireland.com/pooled/articles/BF_DOCART/view.asp?Q=BF_DOCART_210905
 60. Nascimento IP, Dias WO, Mazzantini RP, Miyaji EN *et al.* Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live *Bordetella pertussis* in mice. *Infection and Immunity*. 2000;68(9):4877-83.
 61. Gicquel B. BCG as a vector for the construction of multivalent recombinant vaccines. *Biologicals*. 1995;23:113-118.
 62. Halperin SA. The control of pertussis-2007 and beyond. *N Engl J Med*. 2007;356:110-3.
 63. Collins BS. Gram-negative outer membranes in vaccine development. *Discovery Medicine*. Published July 2, 2011.[Consultado: 30 de septiembre de 2011]. Disponible en: <http://www.discoverymedicine.com/Brenda-S-Collins/2011/07/02/gram-negative-outer-membrane-vesicles-in-vaccine-development/>
 64. Roberts R, Moreno G, Bottero D, Gaillarda ME, Fingermann M, Graieba A *et al.* Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. *Vaccine*. 2008;26(36):4639-46.
 65. Asensio CJ, Gaillard ME, Moreno G, Bottero D, Zurita E, Rumbo M *et al.* Outer membrane vesicles obtained from *Bordetella pertussis* Tohama expressing the lipid A deacylase PagL as a novel acellular vaccine candidate. *Vaccine*. 2011;29(8):1649-56.
 66. Collazo MM, Pérez-Cristiá R. Programa Nacional de Inmunización en Cuba. Implicaciones económicas y beneficios obtenidos. [Consultado 12 de mayo de 2011]. Disponible en: www.economiadelasalud.com/ediciones/56/08_pdf/cuba.pdf
 67. Landys M, Figueroa JM, Lara A, Perdomo V. Interacción del componente pertussis de células completas con los antígenos tetánico, *Haemophilus influenzae* tipo B y hepatitis B en ensayos de potencia para vacunas combinadas. *Vaccinmonitor*. 2008;17(1):7-15. [Consultado 12 de mayo de 2011]. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=203414611002>
 68. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB); Heber Biotec, S.A. HEBERPENTA. [Consultado 12 de mayo de 2011]. Disponible en: www.cecmad.sld.cu/Docs/RegSan/RCP/Bio/Vacs/HEBERPENTA.pdf
 69. Diphtheria-Tetanus-Pertussis vaccine. (Adsorbed onto Aluminum Hydroxide gel). Intramuscular injection. Consultado 12 de mayo de 2011]. Disponible en: http://www.finlay.sld.cu/carera/dtp_ingles09.htm
 70. Long GH, Karanikas AT, Harvill ET, Read AF, Hudson PJ. Acellular pertussis vaccination facilitates *Bordetella parapertussis* infection in a rodent model of bordetellosis. *Proc R Soc*. 2010;B 277:2017-25.
 71. Burianova-Vysoka B, Burian V, Kriz B, Pellar T, Hellerova J, Radkovsky J. Experiences with a new combined vaccine against *B. parapertussis*, diphtheria, tetanus and *B. pertussis* employed in a field trial in Prague 10. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*. 1970;14:481-7.