



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea  
Scienze Biologiche**

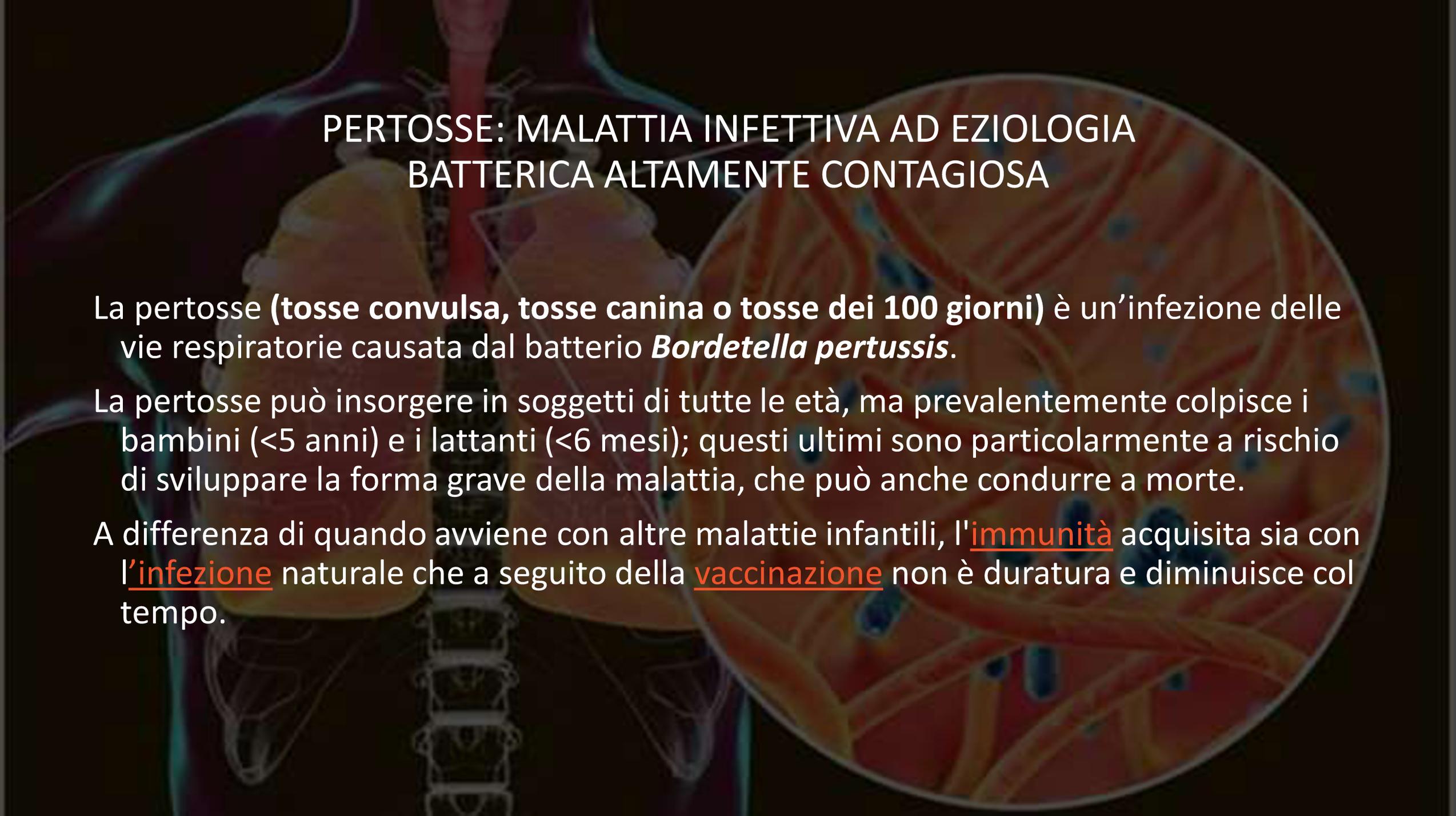
Whoop! There it is: The surprising resurgence of pertussis.

Ops! Eccola qua: la sorprendente riemergenza della pertosse.

Tesi di Laurea di:  
Valentina Inglima

Docente Referente:  
Eleonora Giovanetti

Sessione autunnale  
Anno Accademico  
2020/2021



## PERTOSSE: MALATTIA INFETTIVA AD EZIOLOGIA BATTERICA ALTAMENTE CONTAGIOSA

La pertosse (**tosse convulsa, tosse canina o tosse dei 100 giorni**) è un'infezione delle vie respiratorie causata dal batterio *Bordetella pertussis*.

La pertosse può insorgere in soggetti di tutte le età, ma prevalentemente colpisce i bambini (<5 anni) e i lattanti (<6 mesi); questi ultimi sono particolarmente a rischio di sviluppare la forma grave della malattia, che può anche condurre a morte.

A differenza di quando avviene con altre malattie infantili, l'immunità acquisita sia con l'infezione naturale che a seguito della vaccinazione non è duratura e diminuisce col tempo.

# BORDETELLA PERTUSSIS PRODUCE DIVERSE TOSSINE CHE INFLUENZANO LE INTERAZIONI OSPITE-PATOGENO.

**Tossina pertussica PT ha una varietà di effetti biologici e tossici:**

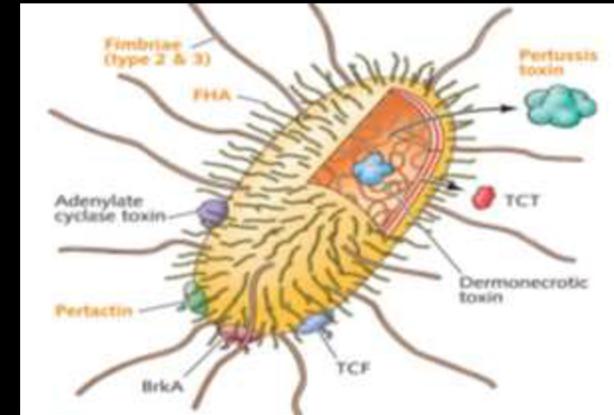
- Induce leucocitosi
- Inibisce il segnale delle chemochine
- Causa problemi cardiaci
- Riduce l'integrità della barriera vascolare
- Favorisce la colonizzazione
- Inibisce le difese aspecifiche
- Inibisce l'attività macrofagica
- Promuove l'infiammazione polmonare

**citotossina tracheale**

**Tossina dell'adenilato ciclasi/emolisina**

- Attività emolitica
- Inibizione della fagocitosi
- Soppressione di citochine e chemochine proinfiammatorie
- Induzione dell'efflusso di ioni potassio
- Induzione della morte cellulare
- Promuove la colonizzazione
- Inibisce la clearance

- Morte delle cellule ciliate
- Inibizione della chemiotassi dei neutrofilo



## GENERE BORDETELLA

### ***Bordetella pertussis* :**

#### **Pertosse**

*B. parapertussis* :

forme minori di pertosse

*B. bronchiseptica*:

infezioni respiratorie

*B. holmesii* :

setticemie in splenectomizzati

- Coccobacilli gram neg
- Diametro di 0,2-0,5 micron
- Aerobi stretti
- Immobili
- Asporigeni
- Capsulati, con fimbrie

## FATTORI DI VIRULENZA

### Adesine

- Emoagglutinina filamentosa (FHA)
- Pertactina (o 69K)
- Fimbrie (FIM)

### Esotossine

- Tossina Pertussica (PT)**
- Tossina dell'adenilciclasi/emolisina
- Citotossina tracheale (TCT)
- Tossina dermonecrotica

### Endotossina

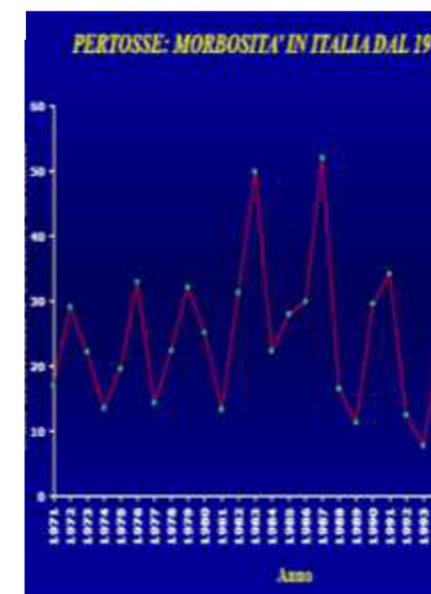
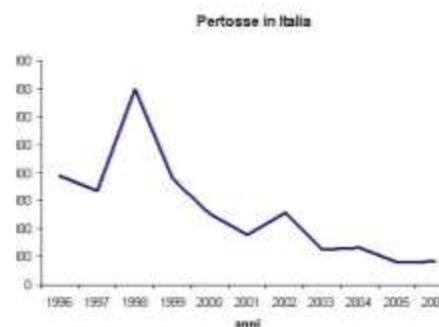
- Lipo-oligosaccaride (LOS)

Nonostante l'elevata copertura vaccinale a livello globale, la pertosse sta riemergendo in tutto il mondo.

*B. pertussis* è stata scoperta nel 1906 da Jules Bordet e Octave Gengou, i quali svilupparono anche il primo vaccino a cellule intere inattivate.

Il vaccino fu perfezionato nel 1920 da Louis Sauer presso l'Evanston Hospital.

Nel 1925, un vaccino attenuato fu somministrato su larga scala dal medico danese Thorvald Madsen. Madsen lo utilizzò per controllare le epidemie di pertosse insorte nelle Isole Faroe nel Mare del Nord.



[https://www.vaccinarsi.org/assets/uploads/images/vantaggi\\_vacc/vacc\\_prevengono/pertosse/figura2.jpg](https://www.vaccinarsi.org/assets/uploads/images/vantaggi_vacc/vacc_prevengono/pertosse/figura2.jpg)

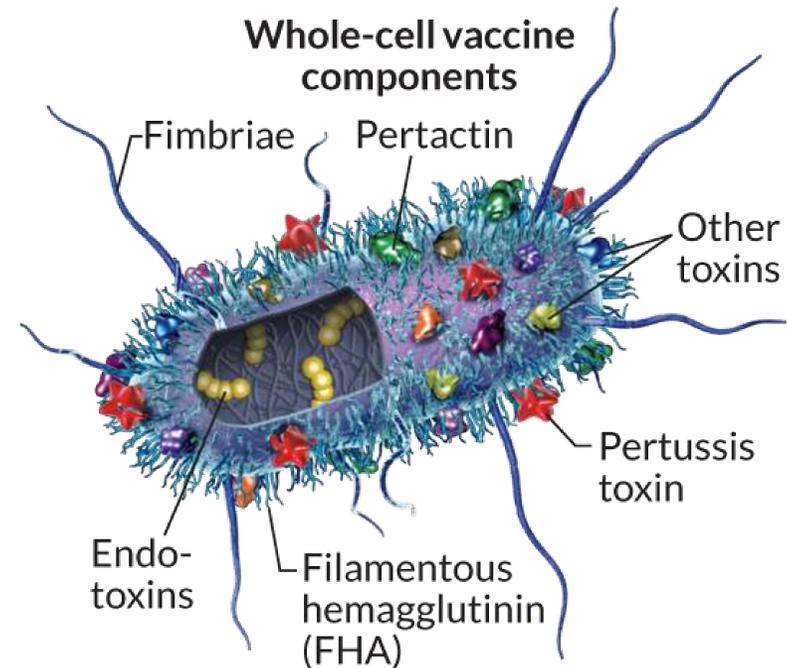
[https://www.vaccinarsi.org/assets/uploads/images/vantaggi\\_vacc/vacc\\_prevengono/pertosse/figura1.jpg](https://www.vaccinarsi.org/assets/uploads/images/vantaggi_vacc/vacc_prevengono/pertosse/figura1.jpg)

I **vaccini a cellule intere inattive (wPV)**, introdotti negli anni 40, si dimostrarono estremamente efficaci nel prevenire la malattia grave, nel ridurre la colonizzazione del tratto respiratorio, e nel prevenire la trasmissione.

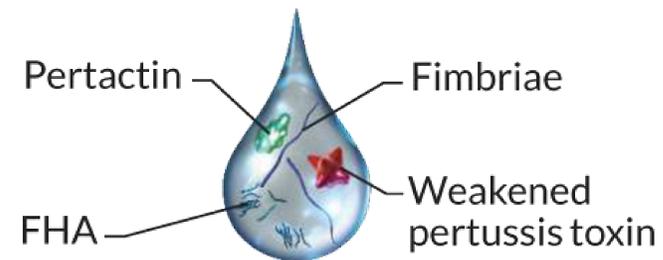
Tuttavia, l'insorgenza di **reazioni avverse e i timori** riguardo la loro sicurezza, hanno portato alla sospensione dei wPV, sostituiti da **vaccini acellulari a subunità** (da 1 a 5 componenti proteiche) con frazioni antigeniche purificate (aPV).

In primati (non umani) mentre l'immunizzazione con wPV previene l'infezione e la trasmissione, quella con aPV non impedisce la trasmissione.

Anche se più sicuri ed efficaci nel prevenire la malattia, i vaccini aPV erano in grado di evocare una risposta immunitaria di breve durata con scarsa prevenzione dell'infezione.



**Acellular vaccine components**



# VACCINI E VACCINAZIONE

Tutti i **vaccini anti-pertosse** contengono la tossina pertussica inattivata (PT).

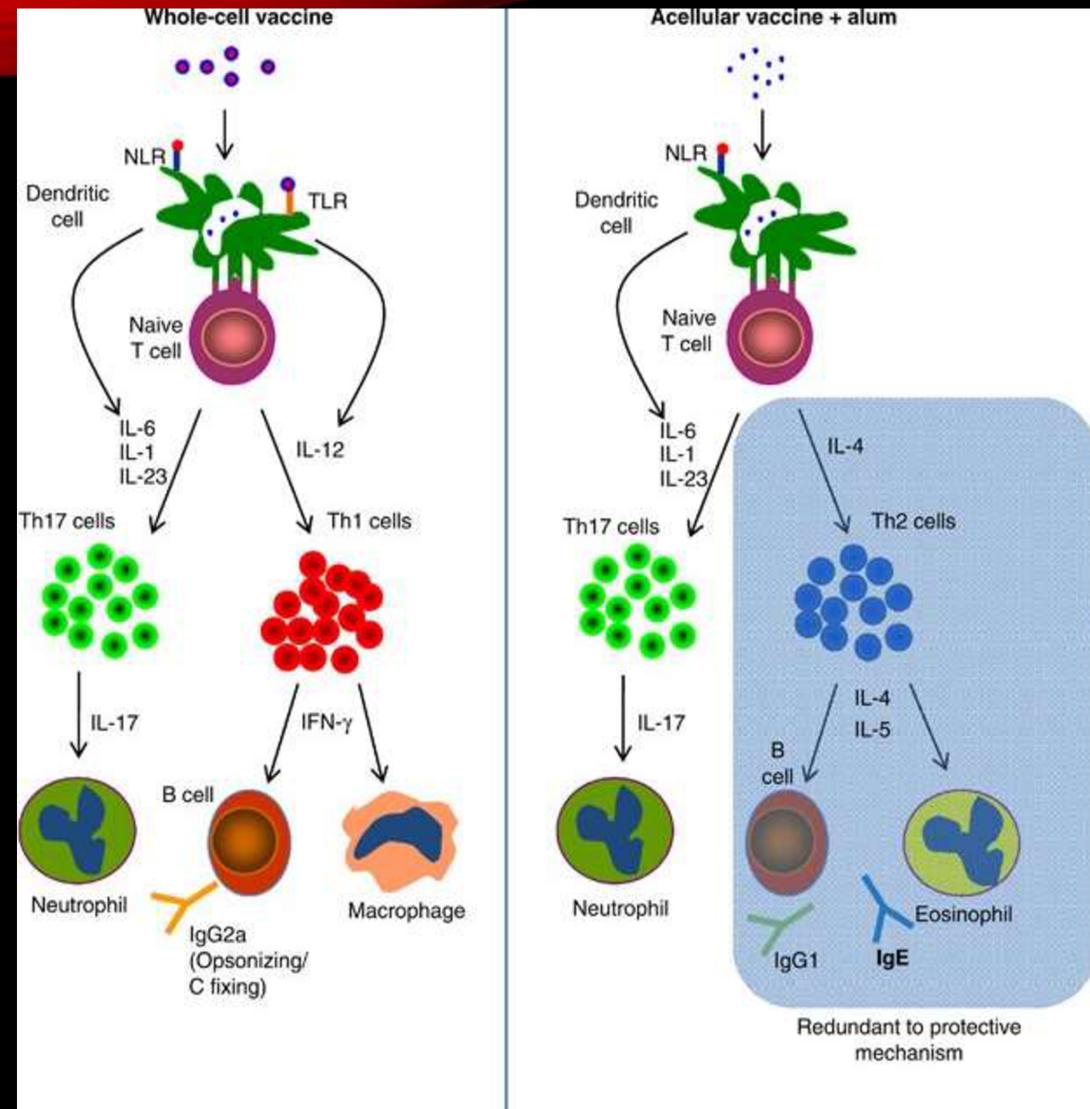
Questo antigene (unico componente in alcune formulazioni), evoca la produzione di anticorpi protettivi, così come si verifica per altri antigeni inclusi nelle composizioni vaccinali, quali l'emoagglutinina filamentosa, la pertactina (PRN), e le fimbrie di tipo 2 e 3.

Lo studio della risposta immunitaria nell'infezione naturale e, in seguito a immunizzazione con **vaccini a cellule intere**, ha permesso di chiarire che in entrambe le situazioni si sviluppa una immunità di tipo misto T-helper (Th)-1 / Th-17, finalizzata all'attivazione di macrofagi e neutrofili in sede mucosale.

Al contrario, i **vaccini acellulari** inducono una risposta immunitaria di tipo Th-2 finalizzata alla produzione di anticorpi neutralizzanti le tossine batteriche.

L'attivazione di un differente profilo immunitario potrebbe, almeno in parte, spiegare la mancata prevenzione della colonizzazione delle vie respiratorie superiori in soggetti vaccinati con il vaccino acellulare.

La **tossina pertussica**, presente come antigene nei vaccini acellulari sembra avere, a causa dell'inattivazione chimica, una capacità **non** ottimale di indurre una memoria immunologica a lungo termine, **spiegando così il rapido declino dell'immunità umorale indotta dai vaccini acellulari.**

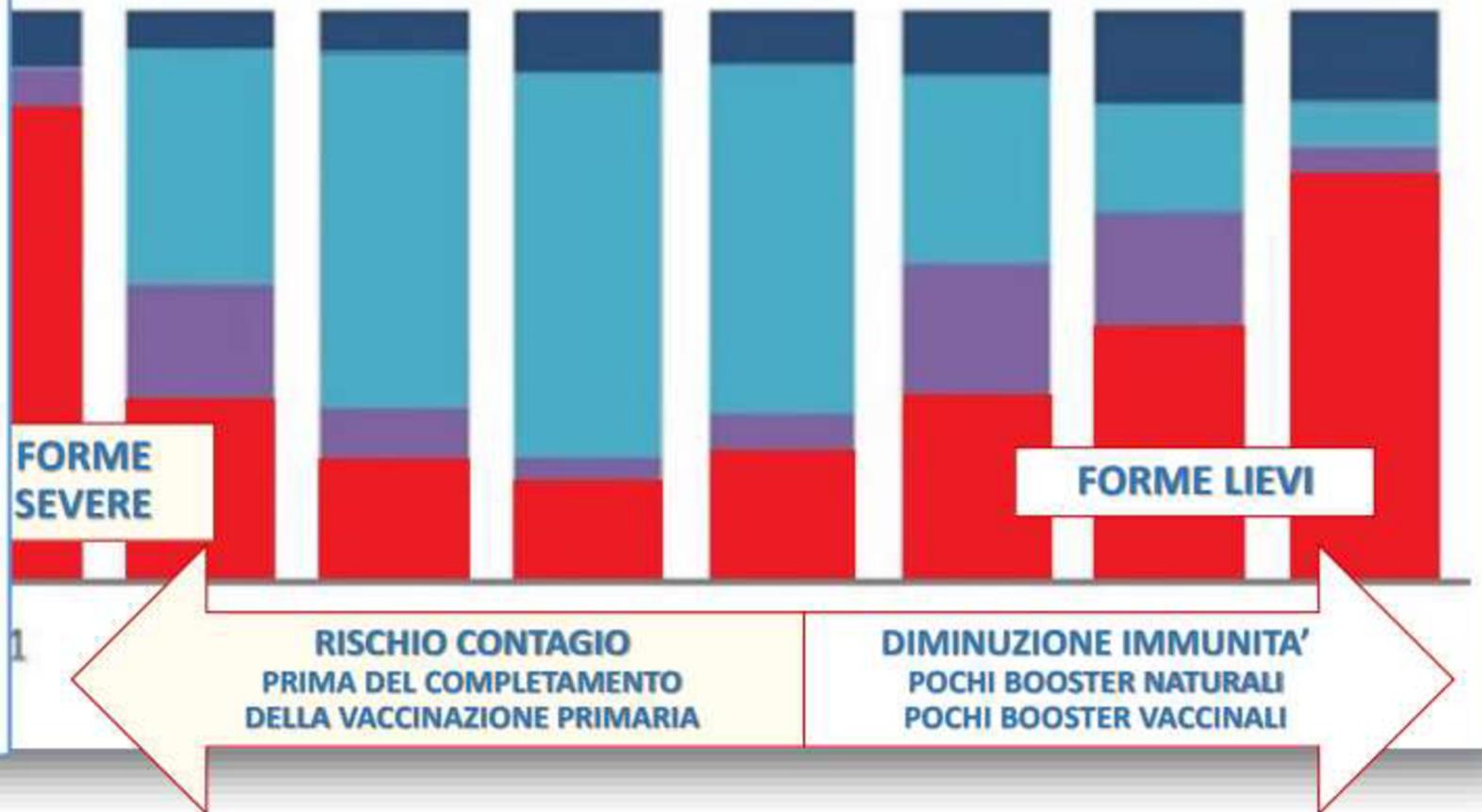


# RAGIONI DELLA RIEMERGENZA DELLA PERTOSSE

Aumento delle notifiche di pertosse:  
diversi possibili motivi

- Impiego più esteso della conferma di laboratorio;
- Varianti della *Bordetella pertussis* (es: PRN-negative);
- Più rapido decremento della immunità da vaccini acellulari (rispetto a quelli a cellule intere, indipendentemente dalla composizione e dalla schedula) e mancanza di risposta mucosale ed herd immunity;
- Immunità da infezione naturale non permanente.
- Aumento dei casi negli adulti.

Distribuzione % dei casi di pertosse per stato vaccinale ed età  
EU, 2017 (n=30.103)





Studi di epidemiologia molecolare hanno dimostrato come negli ultimi anni si sia verificata una **divergenza antigenica** tra gli isolati clinici di *B. pertussis* e i ceppi vaccinali, per quanto riguarda le proteine superficiali del batterio, come la PT e la PRN, in grado di evocare una immunità protettiva.

In particolare, nel corso degli ultimi 30 anni, sono emersi in Europa, Asia e America, **ceppi di *B. pertussis* con una variante allelica del promotore della PT (ptxP3)** responsabile di una maggior produzione di tossina e quadri clinici più severi soprattutto nei neonati, perché in grado di eludere più efficacemente l'immunità dell'ospite. |

I ceppi ptxP3, identificati per la prima volta nel 1988, hanno oggi sostituito la totalità dei ceppi ptxP1 a livello globale. |

Un **altro antigene che sta assumendo sempre maggiore rilevanza è la PRN.** Ceppi deficitari della proteina di superficie PRN (PRN-) sono oggetto di numerosi studi per considerare o meno la possibilità di mantenere questo antigene nella composizione degli attuali vaccini acellulari.

Recentemente, inoltre, sono stati isolati **ceppi in cui gli antigeni PRN e FHA** (entrambi contenuti nel vaccino attuale) sono assenti. La perdita di questi antigeni potrebbe rappresentare un vantaggio per il patogeno anche nei soggetti vaccinati.

Alcuni studi hanno esaminato le differenze fenotipiche tra il ceppo di riferimento e cBp.

Sono state osservate variazioni nell'espressione di diversi antigeni: pertactina aPV (Prn), tossina pertussica (PT), emoagglutinina filamentosa (Fha), e fimbrie (Fim2/3).

**Per comprendere il fenomeno del riemergere della pertosse nel suo complesso occorre considerare la continua variazione genotipica e fenotipica dei ceppi cBp e i meccanismi che consentono a questi ceppi di resistere modulando le risposte immunitarie adattive e innate dell'ospite.**

**IMPORTANTE:** identificare antigeni essenziali e altamente conservati in cBp isolati da molteplici Paesi al fine di includerli nelle future formulazioni di aPV.

**LA RICERCA PER LA  
MESSA A PUNTO DELLE  
FORMULAZIONI  
VACCINALI HA  
IMPIEGATO IL CEPPO  
TOHAMA I, ISOLATO IN  
GIAPPONE NEGLI ANNI  
50**

# EVOLUZIONE BATTERICA:

## PERSISTENZA

I meccanismi che consentono a Bp di persistere nel nasofaringe e circolare tra gli esseri umani sono scarsamente studiati.

Bp forma aggregati multicellulari e biofilm sul setto nasale e nella trachea.

È probabile che stiano circolando ceppi di Bp più virulenti.

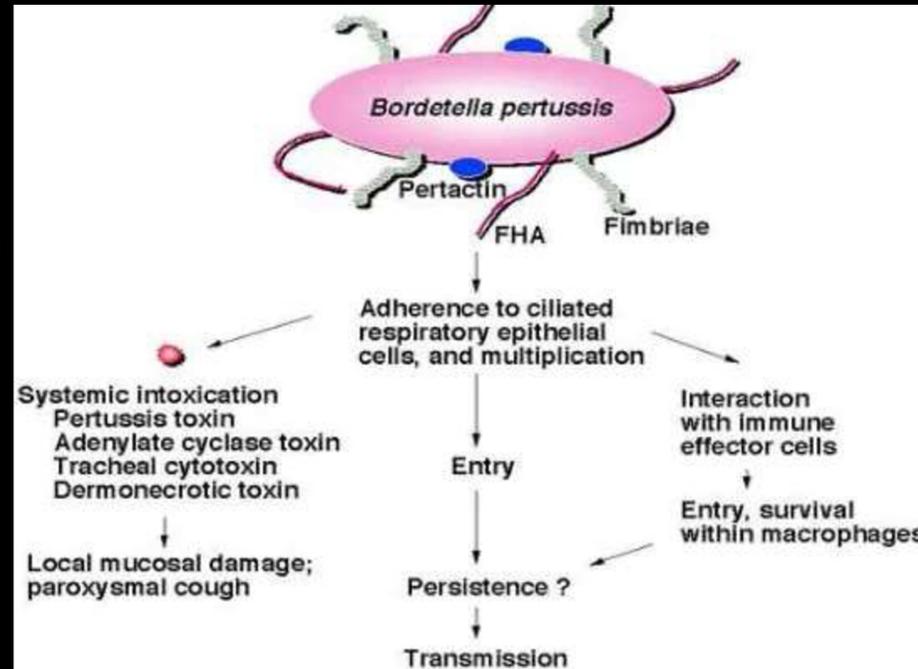
Questi fenotipi sono correlati con una maggiore espressione di fattori che promuovono la formazione di biofilm (Fha e Bps), e una ridotta o trascurabile produzione della tossina adenilato ciclasi intrinseca (che inibisce la formazione di biofilm)

## TRASMISSIONE

Nei biofilm Bp è al riparo dall'immunità umorale e cellulare; ciò potrebbe favorire lo stato di portatore cronico a livello nasofaringeo

**Le droplet respiratorie sono i principali veicoli di trasmissione di Bp.**

L'impatto delle dimensioni delle particelle nella trasmissione di Bp non è noto.



## COLONIZZAZIONE

Una limitazione rilevante dei aPV è l'assenza di un antigene coinvolto nella colonizzazione del tratto respiratorio superiore.

**Il Bps è il primo fattore di virulenza conosciuto in grado di promuovere l'adesione e la colonizzazione del naso da parte di Bp nel modello murino.**

È inoltre essenziale per la crescita e la maturazione dei biofilm nel setto nasale del topo.

Un aPV che contiene Bps potrebbe influenzare la colonizzazione batterica e la conseguente trasmissione.

# CONCLUSIONE E PROPOSTE PER COLMARE LE LACUNE NELLO SVILUPPO DI VACCINI PIÙ EFFICACI

Recenti studi su modelli murini hanno mostrato che l'aPV sperimentale con adiuvanti che suscitano risposte prevalentemente Th1 forniscono una migliore protezione contro l'infezione da Bp rispetto ai vaccini adiuvati con allume, suggerendo che la modifica delle attuali formulazioni possa migliorare l'efficacia del vaccino.

Si è visto inoltre che BcfA, una proteina della membrana esterna di Bp, ha una forte azione adiuvante attivando le risposte immunitarie innata e adattativa.

L'immunizzazione di topi con un aPV sperimentale contenente BcfA come adiuvante ha indotto una clearance più rapida di Bp a livello polmonare rispetto all'aPV adiuvato con allume, il che suggerisce che un vaccino che contenga BcfA potrebbe garantire una protezione più duratura.

Dunque l'aggiunta di BcfA come adiuvante ai vaccini approvati può evocare risposte immunitarie più protettive rispetto alle attuali formulazioni.

Tutti hanno bisogno del

## VACCINO CONTRO LA PERTOSSE



BAMBINI	ADOLESCENTI	FUTURE MAMME	ADULTI E ANZIANI
- 3 dosi nel primo anno - richiamo a 6 anni	- richiamo a 12 anni	- tra la 28 <sup>a</sup> e la 32 <sup>a</sup> settimana	- in ogni momento se non sono mai stati vaccinati - richiamo ogni 10 anni

 [www.cdc.gov/whoopingcough](http://www.cdc.gov/whoopingcough) 

# CONTROLLARE IL RIEMERGERE DELLA PERTOSSE

La ricerca futura dovrà concentrarsi su:

- differenze (fenotipiche e nella virulenza) nei ceppi cBp
- Insuccesso degli aPV nel prevenire colonizzazione nasofaringea e trasmissione di Bp
- Protezione non duratura indotta da aPV.

Per affrontare queste questioni, la ricerca dovrebbe avere come priorità:

- l'inclusione negli aPV di antigeni conservati e coinvolti nella colonizzazione del nasofaringe;
- valutare l'efficacia dell'immunizzazione mucosale e comprendere i meccanismi alla base;
- lo sviluppo di sistemi in vitro ed ex vivo che replichino l'habitat respiratorio umano, il che favorirebbe la comprensione delle interazioni microrganismo-ospite durante la malattia nell'uomo.

Complessivamente, queste strategie consentiranno di sviluppare vaccini di nuova generazione più efficaci nel prevenire l'infezione sostenuta da questo patogeno altamente contagioso.

# RIASSUNTO

Il batterio Gram-negativo *Bordetella pertussis* è l'agente eziologico della pertosse; si localizza preferenzialmente nelle cellule di rivestimento dell'apparato respiratorio, determinando una tosse violenta e particolarmente insidiosa, per il rischio di soffocamento, nei neonati.

Un controllo efficiente dell'infezione e della malattia e un'immunità protettiva di lunga durata sono forniti al meglio dai vaccini contro la pertosse a cellule intere (wPV), che suscitano forti risposte immunitarie cellulari e umorali asimmetriche Th1/17. Tuttavia, le reazioni avverse suscitate dai wPV ha portato alla loro sostituzione negli Stati Uniti e in altri paesi con vaccini acellulari contro la pertosse (aPV), che inducono risposte miste Th1/2-sbilanciate. Sebbene gli attuali aPV proteggano gli individui immunizzati dalla malattia grave, non proteggono efficacemente dall'infezione e dalla trasmissione interumana. Adolescenti e adulti infetti da *B. pertussis* accusano tosse prolungata e ciò può costituire fino al 50% dei casi segnalati. Questi individui possono fungere da fonte di infezione per neonati e bambini che non sono vaccinati o sono troppo piccoli per essere vaccinati completamente.

Nel 2016, più di 139.000 casi e 89.000 decessi dovuti a pertosse sono stati registrati a livello globale dall'OMS.

Gran parte della patogenesi della pertosse è attribuibile alle principali tossine secrete, PT, CyaA e TCT, prodotte durante l' infezione di *B. pertussis*. Sebbene ci sia ancora molto da chiarire sul loro ruolo, è chiaro che queste tossine sopprimono le risposte immunitarie protettive e aggravano le patologie nel tratto respiratorio e (nel caso del PT) in altri sistemi di organi. Un'ulteriore comprensione di queste attività tossiche e delle risposte dell'ospite sarà importante nello sviluppo di terapie e vaccini ottimali per trattare e prevenire la pertosse.

Le ipotesi più accreditate per spiegare la riemergenza della pertosse includono:

1. Incompleta vaccinazione che avviene in un background di cambiamento demografico;
2. Variazioni genotipiche e fenotipiche tra riferimento vaccinale e ceppi Bp circolanti a livello globale;
3. Colonizzazione, Persistenza e Trasmissione della Bp nasale.
4. Perdita progressiva dell'immunità naturale e vaccinale

Per controllare il riemergere della pertosse, sono stati implementati sistemi di sorveglianza e di diagnostica per ottenere informazioni riguardo al reale "burden" della malattia. Si stanno anche portando avanti studi sulla natura dei ceppi circolanti che presentano numerose mutazioni relative ai componenti attualmente presenti nei vaccini in uso. La possibilità di collezionare ceppi da vari Paesi con politiche vaccinali molto diverse tra loro permetterà di analizzare i cambiamenti nel tempo dei ceppi di *Bp*. Negli ultimi anni, infatti, si sta discutendo su come ipolimorfismi genici di questo patogeno possano influenzare l'efficacia dei vaccini anti-pertosse e se l'aumento di outbreak nei Paesi con elevata copertura vaccinale sia riconducibile a proteine di superficie mutate a livello aminoacidico.