



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Dinàmica poblacional i deriva antigènica de *Bordetella pertussis*
i el paper d'altres espècies del gènere *Bordetella* en
l'emergència de la tosferina al segle XXI**

TESI DOCTORAL

Alba Mir Cros

DIRECTORS

Dr. Juan José González López

Dra. María Nieves Larrosa Escartín

Programa de doctorat en Microbiologia

Departament de Genètica i Microbiologia, Facultat de Biociències

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, maig 2021



**Dinàmica poblacional i deriva antigènica de *Bordetella pertussis*
i el paper d'altres espècies del gènere *Bordetella* en
l'emergència de la tosferina al segle XXI**

Tesi doctoral presentada per **Alba Mir Cros** per tal d'optar al grau de Doctor en Microbiologia en el programa de Doctorat de Microbiologia del Departament de Genètica i Microbiologia de la Facultat de Biociències de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del **Dr. Juan José González López** i de la **Dra. María Nieves Larrosa Escartín** i la tutoria del **Dr. Juan José González López**.

Barcelona, maig 2021

El Dr. Juan José González López, facultatiu adjunt del Servei de Microbiologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron i professor associat del Departament de Genètica i Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, com a director i tutor de la tesi, i la Dra. María Nieves Larrosa Escartín, cap clínic del Servei de Microbiologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron i professora associada del Departament de Genètica i Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, com a directora de la tesi

Certifiquen que,

La memòria titulada "Dinàmica poblacional i deriva antigènica de *Bordetella pertussis* i el paper d'altres espècies del gènere *Bordetella* en l'emergència de la tosferina al segle XXI", presentada per la doctoranda Alba Mir Cros, s'ha realitzat sota la seva direcció i tutoria en el Servei de Microbiologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, Grup d'Investigació de l'Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, complint les condicions exigides per ser presentada i defensada com a Tesi Doctoral davant del tribunal que correspongui.

Perquè així consti, i per als efectes oportuns firmen el present document a Barcelona, 30 d'abril de 2021.



Dr. Juan José González López

Director i tutor



Dra. María Nieves Larrosa Escartín

Directora



Alba Mir Cros

Doctoranda

Empassa't la vida a glopades.
Que no t'espantin els monstres dels impossibles,
no deixis que els crits del món, que el consell cec, que la veu dels incrèduls,
posin en dubte les teves ales.

- Alguer Miquel -

A tu

Als meus pares, Pere i M^aTeresa,
a les meves germanes, Marta i Maria,
a la meva família i entorn,
i molt especialment, a totes les persones
que han patit la tosferina i a les seves famílies.

AGRAÏMENTS

Tanco aquesta etapa després de sis anys acumulant una gran quantitat de vivències, però sobretot, durant els quals he conegut a persones que m'han marcat per sempre professionalment i personalment. Aquestes són, molt probablement les línies més complicades d'escriure, però sense cap mena de dubte, mereixeu tota la meva gratitud, sense tots vosaltres res d'això hauria tingut sentit ni hauria sigut possible.

Als meus directors de tesi, el Dr. Juanjo González i la Dra. Nieves Larrosa, gràcies pel vostre entusiasme i les vostres ganes de treballar i ensenyar. Juanjo, ets l'artífex que ha fet que tot hagi estat possible. Gràcies per apostar per mi, per oferir-me tantes oportunitats, per posar a les meves mans el projecte *Bordetella*, he après infinitat de coses i he gaudit molt explorant i explotant aquesta mina d'or. Gràcies per fer-me pensar, per donar-me tanta llibertat, per deixar-me equivocar, per ajudar-me a créixer dia rere dia. Durant tots aquests anys m'he sentit molt ben cuidada, gràcies per tota la confiança i la complicitat que m'has transmès dia rere dia, per tenir la teva porta sempre oberta per escoltar-me, aconsellar-me, tranquil·litzar-me, o el que hagués fet falta. Nieves, gràcies per tots els consells, els ànims i tota la tendresa i dolçor que desprends, sempre disposada a donar-ho tot per tothom. Gràcies a tots dos per haver-me acompanyat en aquest camí, ha valgut molt la pena haver-vos conegut, escoltar-vos, aprendre de vosaltres i treballar al vostre costat.

Dr. Tomàs Pumarola, Dra. Maite Martín i Dra. Gema Codina, gràcies a tots tres per haver sumat sempre i per haver confiat en el projecte des del primer dia tant com nosaltres. A totes les persones que formen part d'aquesta gran família, el Servei de Microbiologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, gràcies per ser-hi i per fer que el dia a dia durant tots aquests anys hagi sigut tan fàcil.

Dra. Magda Campins, Dr. Carlos Rodrigo, Diego van Ezzo, Xavi Martínez i Dra. Mireia Jané, gràcies per haver aportat la vostra experiència i tot el vostre coneixement al projecte. Dr. Sylvain Brisse i Dra. Valérie Bouchez, de l'Institut Pasteur de París i Dra. Ana Bento, de la Universitat d'Indiana, gràcies, la vostra col·laboració en el projecte ha estat absolutament enriquidora.

A totes les persones que durant tots aquests anys heu format part de Recerca, les quals heu estat al meu costat, m'heu regalat el vostre millor somriure, m'heu animat i abraçat sempre que ho he necessitat, m'heu ajudat en tot i heu fet que venir a treballar cada dia hagi sigut un autèntic regal. Núria, gràcies per ser una germana gran en l'inici d'aquesta aventura. Anna i Paula, gràcies per haver-me ajudat i guiat amb la vostra experiència i el vostre amor i passió per la investigació. Núria Crua, Mireia, Marina, gràcies per tots els moments que recordo del vostre pas pel laboratori, sou tres persones fantàstiques. Héctor, gràcies per haver arribat amb tanta frescor i energia i, sobretot, per haver agafat amb tantes ganes el projecte *Bordetella*. Compartir aquest camí amb persones tan meravelloses ha sigut un autèntic plaer, gràcies per ser-hi dia rere dia, molt especialment a vosaltres tres. Toni, vam connectar des del primer moment, has sigut el meu millor còmplice, gràcies per tots els consells, per saber-me escoltar i per regalar-me tants bons moments al teu costat. Albert, treballar colze a colze amb tu ha estat una delícia, gràcies per tenir tota la paciència del món amb mi i per ensenyar-me tantes i tantes coses que mai hagués imaginat que aprendria. T'has convertit en el millor company d'aventura, aquell amb qui una mirada és suficient per entendre'ns, gràcies per estar sempre disposat a tot. Thais, ets la peça que fa funcionar tot l'engranatge, sinònim de bon ambient, rigor i empena, amb qui no em cansaria de treballar, gràcies per ser com ets i per haver-hi sigut des del primer dia i fins a l'últim. Sense cap mena de dubte heu estat els tres pilars d'aquesta experiència, em sento molt afortunada d'haver-vos pogut conèixer, haver-vos gaudit i haver-vos tingut tan a prop en aquesta etapa de la meua vida. Sé que m'enduc a tres grans amics per sempre, us estimo molt.

A ells i elles. Judith, Eli, Maris i Ari, gràcies per haver caminat al meu costat durant tants anys, per ser-hi sempre, sé que per anys que passin i malgrat la distància, seguirem deixant petjades juntes. Sergi, la vida em va fer el millor regal el dia que et vaig conèixer, gràcies per estimar-me tant i per saber treure el millor de mi sempre. A tots els companys i companyes de pis que he tingut, tants vespres plegats, tantes estones viscudes, hem compartit moments molt especials i hem après molt els uns dels altres, gràcies a tots per haver format part d'aquesta experiència tan vital.

A la meua família, us adoro i admiro, gràcies pel vostre suport incondicional i la vostra paciència eterna. Cosins i tiets, gràcies per fer-me sentir el vostre amor infinit i la vostra

protecció, sé que puc comptar sempre que ho necessiti amb cada un de vosaltres i això, és impagable. Àvia, ets probablement la dona més forta que conec, gràcies per ensenyar-nos a lluitar, per fer-nos veure que les recompenses arriben amb esforç, dedicació i passió pel que un fa i que la sort, has de sortir a buscar-la. Marta i Maria, sou les persones que millor em coneixen i que més m'entenen, juntes som imparables, gràcies per omplir-me la vida fent que aquesta sigui més bonica, i com bé sabeu, l'autèntica aventura ha estat créixer i aprendre al vostre costat. Papa i mama, no seria ningú sense vosaltres, gràcies per haver-m'ho donat i ensenyat tot, per haver-me transmès la vostra filosofia de vida, en què els valors com l'amor, el respecte, la generositat i l'empatia no hi escassegen, per no haver-me posat mai cap límit i per haver confiat en mi sempre. Us ho dec tot, família, em sento molt privilegiada i agraïda per haver nascut i crescut envoltada de tots vosaltres.

A Peralada i a tota la seva gent, gràcies per la quantitat de records que tinc amb tots vosaltres, plens d'estima i en un entorn idoni, formeu part del meu refugi, on puc venir a agafar aire quan la ciutat m'atrapa i carregar-me de la millor energia. Les mil abraçades que m'enduc cada vegada que pujo, les xerrades de barra de bar, les moltes hores al camp de futbol, els moments únics viscuts amb tots vosaltres plens de bogeria i la diversió, ningú més ens entendria... Sou casa, sou família.

Penso que estem en aquesta vida per compartir. Gràcies a tots vosaltres, i a tanta gent que no he mencionat, per haver compartit amb mi tots els instants, les experiències, els coneixements, els consells, les alegries i també els moments més difícils que han fet possible i real aquest projecte. Gràcies a tots per ensenyar-me i demostrar-me dia rere dia que tot el que és essencial és invisible als ulls.

A TOTS, MOLT AGRAÏDA!

GLOSSARI

AC-Hly: toxina adenilat ciclasa-hemolisina

ACIP: *Asvisory Committee on Immunization Practies*

ADP: difosfat d'adenosina

ADN: àcid desoxiribonucleic

AEP: *Asociación Española de Pediatría*

Arg: arginina

ARNr: àcid ribonucleic ribosomal

Asp: asparagina

ASPCAT: Agència de Salut Pública de Catalunya

ATP: trifosfat d'adenosina

BG: medi de cultiu Bordet Gengou

BvgAS: sistema regulador de dos components

cAMP: monofosfat d'adenosina cíclic

CAV: *Comité Asesor de Vacunas*

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI: concentració mínima inhibidòria

CMSP: cèl·lula mononuclear de sang perifèrica

DNT: toxina dermonecròtica

DTPa: vacuna acel·lular enfront de la diftèria, el tètanus i la tosferina

dTpa: vacuna acel·lular de baixa càrrega antigènica enfront de la diftèria, el tètanus i la tosferina

DTPw: vacuna de cèl·lules completes enfront de la diftèria, el tètanus i la tosferina

ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control*

EEA: *European Economic Area*

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

EPHI: estenosi pilòrica hipertròfica infantil

Etest: prova epsilon

EUA: Estats Units d'Amèrica

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

EUVAC.NET: *European surveillance network for selected vaccine-preventable diseases*

FDA: *Food and Drug Administration*

FHA: hemaglutinina filamentosa

FIM: fímbria

Gln: glutamina

Gly: glicina

HB: virus de l'hepatitis B

Hib: *Haemophilus influenzae* tipus B

Ig: immunoglobulina

IL: interleuquina

INE: *Instituto Nacional de Estadística*

IFN-I: interferó de tipus I

IFN-γ: interferó gamma

IS: seqüència d'inserció

kb: kilobase

kDa: kilodalton

LPS: lipopolisacàrid

MALDI-TOF: *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*

MLVA: *multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis*

MT: *multiple-locus variable-number tandem-repeat type*

OMS: Organització Mundial de la Salut

OMVs: vesícules de membrana externa

pb: parells de bases

PbvgA/S: promotor del sistema regulador BvgAS

PCR: reacció en cadena de la polimerasa

PFGE: *pulsed-field gel electrophoresis*

Pptx: promotor de la toxina pertussis

PRN: pertactina

Pro: prolina

PTX: toxina pertussis

RENAVE: *Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica*

RL: medi de cultiu Regan Lowe

RT-PCR: reacció en cadena de la polimerasa a temps real

RTI: raó de taxa d'incidència

R0: nombre bàsic reproductiu

Ser: serina

SS: seqüència senyal

TESSy: *The European Surveillance System*

TCT: citotoxina traqueal

TCF-A: factor de colonització traqueal A

Th1: limfòcits T col·laboradors de tipus 1 o resposta immunològica limfocitària de tipus 1

Th17: limfòcits T col·laboradors de tipus 17 o resposta immunològica limfocitària de tipus 17

Th2: limfòcits T col·laboradors de tipus 2 o resposta immunològica limfocitària de tipus 2

TLR4: *toll-like receptor 4*

Tmr: cèl·lules de memòria residents als teixits

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

T3SS: sistema de secreció de tipus III

UE: Unió Europea

UFC: unitat formadora de colònies

VPI: virus de la poliomièlitis inactivat

VNTR: *variable-number of tandem repeats*

Xaa: algun aminoàcid

WGS: *whole genome sequencing*

16S: subunitat petita dels ribosomes procariotes

23S: subunitat gran dels ribosomes procariotes

ÍNDEX GENERAL

ÍNDEX DE TAULES	I
ÍNDEX DE FIGURES	II
RESUM	III
ABSTRACT	VI
PUBLICACIONS	IX
COMUNICACIONS	X
INTRODUCCIÓ	1
1. Història de la tosferina	3
i. Breu definició de la malaltia	3
ii. Microbiologia de les espècies del gènere <i>Bordetella</i>	4
2. Patogènesis de <i>Bordetella pertussis</i>	7
i. Mecanismes patogènics	9
3. Epidemiologia de la tosferina	19
i. Global	19
ii. Europa	22
iii. Espanya i Catalunya.....	23
iv. Incidència de la malaltia per grups d'edat	27
v. Estacionalitat	28
vi. Dinàmica de la transmissió.....	29

4. Aspectes clínics	32
i. Presentacions clíniques	32
ii. Complicacions de la malaltia	35
iii. Definició de cas.....	37
5. Diagnòstic microbiològic	40
6. Tractament	49
i. Macròlids.....	53
ii. Altres alternatives terapèutiques.....	54
iii. Profilaxis postexposició	54
iv. Resistència a macròlids	55
7. Vacunes i immunització	57
i. Tipus i composició de les vacunes.....	58
ii. Immunogenicitat, eficàcia i efectivitat de les vacunes acel·lulars	63
iii. Immunització de l'embarassada.....	65
iv. Cobertures vacunals	69
8. Immunitat	71
i. Immunitat natural	71
ii. Immunitat vehiculada per vacunes	73
9. Desenvolupament de noves vacunes	78
10. Altres espècies del gènere <i>Bordetella</i> productores de tosferina	82
i. <i>Bordetella holmesii</i>	82
ii. <i>Bordetella parapertussis</i>	86

ESTUDI 1. Caracterització de l'epidemiologia molecular i la diversitat antigènica d'aïllats clínics de *Bordetella pertussis* causants de tosferina. 90

ESTUDI 2. Emergència de *Bordetella holmesii* com agent productor de tosferina a Barcelona. 91

ESTUDI 3. Identificació i caracterització de *Bordetella pertussis* deficient en pertactina a Espanya. 92

RESULTATS 94

ESTUDI 1. Caracterització de l'epidemiologia molecular i la diversitat antigènica d'aïllats clínics de *Bordetella pertussis* causants de tosferina. 96

ESTUDI 2. Emergència de *Bordetella holmesii* com agent productor de tosferina a Barcelona. 111

ESTUDI 3. Identificació i caracterització de *Bordetella pertussis* deficient en pertactina a Espanya. 118

DISCUSSIÓ 140

ESTUDI 1. Caracterització de l'epidemiologia molecular i la diversitat antigènica d'aïllats clínics de *Bordetella pertussis* causants de tosferina. 143

ESTUDI 2. Emergència de *Bordetella holmesii* com agent productor de tosferina a Barcelona. 162

ESTUDI 3. Identificació i caracterització de *Bordetella pertussis* deficient en pertactina a Espanya. 171

CONCLUSIONS 186

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES 195

ANNEXES 230

ANNEX 1. Material suplementari Estudi 1: Caracterització de l'epidemiologia molecular i la diversitat antigènica d'aïllats clínics de <i>B. pertussis</i> productors de tosferina.	231
ANNEX 2. Material suplementari Estudi 3: Estudi de l'expressió de l'antigen de la pertactina entre els aïllats clínics de <i>B. pertussis</i> productors de tosferina.....	247
ANNEX 3. Document d'aprovació per a la presentació de la Tesi Doctoral com a compendi de publicacions.....	250

ÍNDEX DE TAULES

Taula 1. Trets fenotípics i característiques bioquímiques o de creixement de les espècies del gènere *Bordetella* productores de tosferina7

Taula 2. Presència i absència dels diversos factors de virulència entre les espècies del gènere *Bordetella* productores de tosferina18

Taula 3. Possibles dianes utilitzades pel diagnòstic de *Bordetella* spp. per RT-PCR i interpretació suggerida dels resultats.....47

Taula 4. Agents antimicrobians pel tractament i profilaxi postexposició de la infecció per *B. pertussis*50

Taula 5. Composició i indicacions de les vacunes enfront de la tosferina comercialitzades a Espanya.....61

Taula 6. Resum de la prevalença de *B. holmesii* recollida en estudis previs163

Taula 7. Mecanismes responsables de la deficiència en pertacina en *B. pertussis*.176

ÍNDEX DE FIGURES

Figura 1. Estructura filogenètica (<i>neighbour-joining tree</i>) d'acord a les seqüències del gen 16S de l'ARNr de les setze espècies descrites del gènere <i>Bordetella</i>	5
Figura 2. Interacció de <i>B. pertussis</i> amb les superfícies mucoses.....	8
Figura 3. Presentació de la PRN, la FHA i les FIM a la superfície cel·lular de <i>B. pertussis</i>	15
Figura 4. Esquema de la xarxa reguladora BvgAS	17
Figura 5. Incidència global de la tosferina reportada anualment i cobertura vacunal en primovacunació	20
Figura 6. Distribució dels casos de tosferina per cada 100.000 habitants declarats durant l'any 2018 entre els països de la UE	23
Figura 7. Incidència de la tosferina a Espanya i cobertura vacunal en primovacunació	25
Figura 8. Incidència de la tosferina a Catalunya	26
Figura 9. Cicle epidemiològic de <i>B. pertussis</i> abans i després de l'ús generalitzat de les vacunes enfront de la tosferina	31
Figura 10. Esquema del curs clínic d'un quadre típic de tosferina.....	34
Figura 11. Esquema del moment òptim per a realitzar les proves diagnòstiques en funció del curs clínic de la malaltia	41
Figura 12. Cobertura vacunal estimada per l'any 2019 a escala mundial per a la immunització primària enfront de la tosferina	70
Figura 13. Procés immunològic induït per la infecció natural per <i>B. pertussis</i>	73
Figura 14. Immunitat induïda per la immunització amb les vacunes DTPw i DTPa ..	74

RESUM

La tosferina és una malaltia infecciosa aguda causada generalment per *Bordetella pertussis*, un còcc bacil gramnegatiu, de reservori exclusivament humà i amb una elevada transmissibilitat per via aèria. Es caracteritza per presentar un quadre respiratori de tos intensa que, sovint, pot perllongar-se durant setmanes o mesos. Es tracta d'una malaltia que s'observa majoritàriament en edat preescolar i escolar, essent els infants menors d'1 any els que presenten una major incidència de la malaltia i també les formes més greus (<3 mesos), requerint sovint, l'atenció de cures intensives. En els adolescents i els adults, les formes clíniques solen ser més lleus o inespecífiques, el que implica que en moltes ocasions passi desapercibuda. Això fa que aquests siguin el principal reservori del microorganisme, tenint un paper crucial en la seva transmissió.

Tot i que la vacunació és la millor estratègia per a la prevenció de la tosferina, observant-se un gran descens en la incidència de la malaltia amb la introducció de les vacunes de cèl·lules completes (DTPw) als anys cinquanta, així com de les morts associades, al llarg dels darrers vint anys, s'ha observat una reemergència de la infecció malgrat les extenses campanyes de vacunació i les elevades taxes d'immunització. Aquesta s'ha convertit, avui en dia, en una de les malalties que es pot prevenir mitjançant la vacunació amb una de les taxes d'incidència més altes. Entre les possibles causes implicades en el ressorgiment de la tosferina, destaca l'adaptació de *B. pertussis* a la immunitat conferida per les vacunes acel·lulars (DTPa), les quals es van introduir en el nostre entorn a finals dels anys noranta, així com l'emergència de noves espècies del gènere *Bordetella*, com és el cas de *B. holmesii*, contra la qual les vacunes utilitzades no confereixen protecció.

Per una banda, el procés d'adaptació de *B. pertussis* a la immunitat induïda per les vacunes DTPa ha evidenciat com, coincidint amb la introducció d'aquestes, han

aparegut noves poblacions de *B. pertussis* que han anat reemplaçant de forma progressiva les variants antigèniques presents a les composicions vacunals utilitzades. En aquest sentit, s'ha observat un viratge en l'estructura de les poblacions de *B. pertussis* circulants, reflectida pel recanvi dels perfils electroforètics que han circulat entre els períodes d'ús de les vacunes DTPw i les vacunes DTPa, així com de l'emergència i posterior predomini del genotip MT27, el qual s'ha observat en el 79,3% dels aïllats de *B. pertussis* circulants després de la introducció de les vacunes DTPa. Addicionalment, en aquestes poblacions, les quals són les responsables de les últimes onades epidèmiques observades de la malaltia en el nostre entorn, s'han observat polimorfismes en els gens que codifiquen la toxina pertussis (*ptxA*) i en el seu promotor (*ptxP*), la pertactina (*prn*) i la fimbria de tipus 3 (*fim3*). Així, la combinació al·lèlica *ptxA1/prn2/fim3-2*, la qual presenta formes antigèniques diferents a les que es troben contingudes en les vacunes DTPa, s'ha observat com a majoritària (52,7%) entre els aïllats que han circulat en el nostre medi després de la introducció d'aquest tipus de vacuna. Addicionalment, la presència majoritària (97,7%) del promotor de la toxina pertussis de tipus 3 (*ptxP3*) condiciona un increment de la producció d'aquest determinant de virulència en aquests aïllats de *B. pertussis* que el posseeixen.

D'altra banda, s'ha posat de manifest la circulació d'aïllats de *B. pertussis* que deixen d'expressar l'antigen vacunal de la pertactina (PRN), mantenint la seva virulència i capacitat per produir malaltia. Aquests han suposat 27,2% del total d'aïllats, identificant-se únicament en el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa. En aquest sentit, l'aparició i disseminació exitosa, d'un clúster d'aïllats que han presentat una deleció en el promotor i part del gen que codifica aquest determinant de virulència (58,1%, *prn::del(-292, 1340)*), ha evidenciat l'expansió dels aïllats de *B. pertussis* que no expressen PRN en el nostre medi.

D'aquesta manera, la disseminació d'aïllats de *B. pertussis* que expressen antígens vacunals que posseeixen epítops no reconeguts pels anticossos generats mitjançant l'ús de les vacunes DTPa, així com la pèrdua de l'expressió d'aquests antígens com a importants mecanismes d'adaptació i evasió de la immunitat conferida per les vacunes antipertússiques utilitzades al llarg dels últims anys en el nostre medi, sembla ser un mecanisme que pot comprometre la seva eficàcia.

Finalment, la descripció de l'emergència de *B. holmesii* com a agent causal de la tosferina, observant-se una prevalença d'aquest microorganisme del 3,9% l'any 2015 i del 8,8% l'any 2016, demostra que la seva circulació ha pogut contribuir en el ressorgiment de la tosferina en el nostre medi. En relació amb aquests, no s'han observat diferències en les característiques clíniques-epidemiològiques dels casos originats per *B. holmesii* en comparació amb aquells causats per *B. pertussis*, ni s'han evidenciat complicacions o recidives després del seu tractament amb azitromicina. Així, el conjunt d'observacions reforça la necessitat d'adaptar les eines diagnòstiques actuals per la identificació correcta de les etiologies de la tosferina.

ABSTRACT

Whooping cough is an acute infectious disease usually caused by *Bordetella pertussis*, a gram-negative coccobacillus, with an exclusively human reservoir and high airborne transmissibility. It is characterized by presenting a respiratory picture of intense cough that can often last for weeks or months. This disease is mostly observed in preschool and school age, presenting the highest incidence in and the most severe forms in children under 1 year of age and the most severe forms (<3 months), which often requiring intensive care support. Regarding adolescents and adults, clinical forms are usually milder or nonspecific, implying that it often goes unnoticed. Therefore, it makes them the main reservoir of the microorganism, playing a crucial role in its transmission.

Although vaccination is the best strategy for the pertussis prevention and a major decline in the incidence of the disease is observed with the introduction of whole-cell vaccines (DTPw) in the 1950s, as well as associated deaths, over the last twenty years, a re-emergence of infection has been observed despite extensive vaccination campaigns and high immunisation rates. Nowadays pertussis is one of the vaccine-preventable disease with the highest incidence rates. Among the possible causes that are involved in the pertussis resurgence, the adaptation of *B. pertussis* to the immunity conferred by acellular vaccines (DTPa), which were introduced into our environment in the late 1990s, as well as the emergence of new species of the genus *Bordetella*, as is the case with *B. holmesii* against which the vaccines used do not confer protection, are some of the most important ones that have be considered.

On the one hand, the process of adaptation of *B. pertussis* to the immunity induced by DTPa vaccines has been evidenced by the new populations of *B. pertussis* that have appeared and have gradually replaced the antigenic variants present in the vaccine, concurrently with its introduction. In this sense, a change in the structure of circulating *B. pertussis* populations has been observed, reflected by the replacement

of the PFGE electrophoretic profiles that have circulated within the different vaccine periods. It is remarkable the emergence and subsequent predominance of the MT27 genotype, which has been observed in 79.3% of circulating *B. pertussis* isolates after the introduction of DTPa vaccines. Additionally, in these populations, which are responsible for the latest epidemic waves of the disease observed in our environment, polymorphisms in the genes encoding the pertussis toxin (*ptxA*) and its promoter (*ptxP*), pertactin (*prn*) and fimbria type 3 (*fim3*). Thus, the allelic combination *ptxA1/prn2/fim3-2*, which include different antigenic forms than those contained in DTPa vaccines, has been observed as the most prevalent (52.7%) among the isolates that have circulated in our environment after the introduction of this type of vaccine. Additionally, a high prevalence (97.7%) of the type 3 pertussis toxin promoter (*ptxP3*), which induces an increase in the production of this virulence determinant in these *B. pertussis* isolates, is found in isolates obtained after the DTPa vaccine.

Other factor that has evidenced the *B. pertussis* adaptation is the emergence of pertactin (PRN) negative isolates maintaining its virulence and ability to produce disease. In our study, PRN-negative isolates have accounted for the 27.2% of the total studied isolates. They have been identified only during the period of exclusive use of DTPa vaccines. In this sense, the emergence and successful dissemination of a cluster of isolates that possess a deletion in the promoter and part of the gene encoding this determinant of virulence (58.1%, *prn::del* (-292 , 1340)), has evidenced the expansion of most of the *B. pertussis* isolates that do not express PRN in our environment.

Thus, the spread of *B. pertussis* isolates expressing vaccine antigens possessing epitopes not recognized by antibodies generated by the use of DTPa vaccines, as well as the loss of expression of these antigens as an important mechanism of adaptation

and evasion of immunity conferred by pertussis vaccines, seems to be a mechanism contributing to compromise the vaccine effectiveness.

Finally, the description of the emergence of *B. holmesii* as the causative agent of pertussis, observing a prevalence of this microorganism of 3.9% in 2015 and 8.8% in 2016, shows that its circulation has been able to contribute to the pertussis resurgence in our environment. In relation to these, no differences were observed in the clinical-epidemiological characteristics of the pertussis cases by *B. holmesii* and those caused by *B. pertussis*, nor were there any complications or relapses after its treatment with azithromycin. Thus, we describe the emergence of *B. holmesii* as a causative agent of whooping cough in Spain. Accurate diagnosis of the causative agent of this disease is crucial to determine the real incidence and prevalence of the microbial species involved, to assess its contribution to the epidemiology of whooping cough, to evaluate whether specific antimicrobial drug treatments should be implemented and, in terms of public health, to assess the efficacy of the pertussis vaccine.

PUBLICACIONS

ARTICLES CIENTÍFICS

1. A. Mir-Cros, A. Moreno-Mingorance, M.T. Martín-Gómez, G. Codina, T. Cornejo-Sánchez, M. Rajadell, D. Van Esso, C. Rodrigo, M. Campins, M. Jané, T. Pumarola, A. Fàbrega, J.J. González-López. **Population dynamics and antigenic drift of *Bordetella pertussis* following whole cell vaccine replacement, Barcelona, Spain, 1986-2015.** *Emerging Microbes & Infections*, 2019;8(1):1711-1720. 10.1080/22221751.2019.1694395.

Journal Impact Factor (2019): 5.776, Q1.

2. A. Mir-Cros, G. Codina, M.T. Martín-Gómez, A. Fàbrega, X. Martínez, M. Jané, D. Van Esso, T. Cornejo, C. Rodrigo, M. Campins, T. Pumarola, J.J. González-López. **Emergence of *Bordetella holmesii* as a causative agent of whooping cough, Barcelona, Spain.** *Emerging Infectious Diseases*, 2017;23(11):1856-1859. 10.3201/eid2311.170960.

Journal Impact Factor (2017): 7.422, D1.

3. N. Piedra-Carrasco, L. Miguel, A. Fàbrega, B. Viñado, D. Company, A. Mir-Cros, M.L. Fox, B. Almirante, N. Larrosa, I. Ruiz-Camps, J.J. González-López. **Effectiveness of a double-carbapenem regimen in a KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infection in an immunocompromised patient.** *Microbial Drug Resistance*, 2018;24(2):199-202. doi: 10.1089/mdr.2017.0129.

Journal Impact Factor (2018): 2.397, Q3.

4. N. Piedra-Carrasco, A. Fàbrega, W. Calero-Cáceres, T. Cornejo-Sánchez, M. Brown-Jaque, A. Mir-Cros, M. Muniesa, J.J. González-López. **Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* recovered from a Spanish river ecosystem.** *PLoS One*, 2017;12(4):e0175246. doi: 10.1371/journal.pone.0175246.

Journal Impact Factor (2017): 2.766, Q1.

CAPÍTOL DE LLIBRE

1. A. Mir-Cros, J.J. González-López. **Cambios en la epidemiología molecular de *Bordetella pertussis* en Barcelona.** Campins Martí M., Moraga Llop F.A., editores, 2017. Vacunas, 2017:33 – 43. ISBN M-29152-2017.

COMUNICACIONS

PRESENTACIONS ORALS

1. A. Mir-Cros, M.T. Martín, G. Codina, A. Cano, M. Jané, M. Campins, T. Pumarola, J.J. González-López. **Epidemiología molecular y perfil antigénico de *Bordetella pertussis* productora de tosferina en el área metropolitana de Barcelona entre 2007 y 2014.** Comunicación nº 285 (Presentación oral). XX SEIMC, Barcelona.
2. A. Mir-Cros, M.T. Martín, G. Codina, A. Fàbrega, D. Van Esso, M. Campins, M. Jané, C. Rodrigo, T. Pumarola, J.J. González López. **Emergence of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Spain.** Communication nº O1137 (Oral presentation). 28th ECCMID, Madrid.
3. A. Mir-Cros, M.T. Martín, G. Codina, D. Van Esso, M. Campins, M. Jané, C. Rodrigo, T. Pumarola, J.J. González López. **Emergencia de *Bordetella pertussis* no productora de pertactina en España.** Comunicación nº 136 (Presentación oral). XXII SEIMC, Bilbao.
4. A. Mir-Cros, A. Moreno-Mingorance, M.T. Martín, G. Codina, T. Cornejo-Sánchez, A. Fàbrega, D. Van Esso, C. Rodrigo, M. Campins, M. Jané, T. Pumarola, J.J. González López. **Emergencia y diseminación de un nuevo linaje de *Bordetella parapertussis* deficiente en pertactina en Barcelona.** Comunicación nº 40 (Presentación oral). XXIII SEIMC, Madrid.
5. A. Mir-Cros, A. Moreno-Mingorance, M.T. Martín, G. Codina, T. Cornejo-Sánchez, A. Fàbrega, D. Van Esso, M. Campins, C. Rodrigo, M. Jané, T. Pumarola, J.J. González López. **Molecular epidemiology and virulence gene content of *Bordetella parapertussis* producing whooping cough in Barcelona.** Oral presentation, EUPERT Strain Genomics, Rome, 2019.

PRESENTACIONS PÒSTER

1. A. Mir-Cros, M.T. Martín, G. Codina, T. Pumarola, J.J. González-López. **Molecular epidemiology, antigenic profile and macrolide resistance of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in Barcelona from 2007 to 2014.** Communication nº P0869 (Poster). 26th ECCMID, Amsterdam.
2. A. Mir-Cros, G. Codina, M.T. Martín, M.A. Casas, F. Barroso, M. Campins, P. Ciruela, N. Larrosa, T. Pumarola, J.J. González-López. **Resistencia a macrólidos en *Bordetella pertussis* productora de tosferina en Barcelona ente 1986 y 2015.** Comunicación nº 380 (Póster). XX SEIMC, Barcelona.
3. A. Mir-Cros, G. Codina, T. Cornejo, M.T. Martín, T. Pumarola, J.J. González-López. **Emergence of *Bordetella holmesii* as a causative agent of pertussis-like illness in Barcelona, Spain.** Communication nº P0024 (Poster). 27th ECCMID, Vienna.
4. A. Mir-Cros, M.T. Martín, G. Codina, C. Rodrigo, M. Jané, M. Campins, T. Pumarola, J.J. González-López. **Molecular epidemiology and antigenic profile of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in Barcelona from 1989 to 2015.** Communication nº ESP17-0932 (e-Poster presentation). 35th ESPID, Madrid.
5. A. Mir-Cros, G. Codina, M.T. Martín, M. Campins, C. Rodrigo, M. Jané, N. Larrosa, T. Pumarola, J.J. González-López. **Surveillance of macrolide resistance in *Bordetella pertussis* producing whooping cough in Barcelona.** Communication nº ESP17-0920 (e-Poster). 35th ESPID, Madrid.
6. A. Mir-Cros, G. Codina, T. Cornejo, M.T. Martín, M. Jané, M. Campins, C. Rodrigo, T. Pumarola, J.J. González-López. **Emergence of *Bordetella holmesii* as a causative agent of pertussis-like illness in Barcelona, Spain.** Communication nº ESP17-0937 (e-Poster). 35th ESPID, Madrid.
7. A. Mir-Cros, M.T. Martín, G. Codina, A. Fàbrega, D. Van Esso, M. Campins, M. Jané, C. Rodrigo, T. Pumarola, J. J. González López. **Molecular epidemiology and antigenic profile of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in Barcelona from 1986 to 2015.** Poster presentation. EUPERT Strain Genomics, Copenhagen, 2018.
8. A. Mir-Cros, M.T. Martín, G. Codina, A. Fàbrega, D. Van Esso, M. Campins, M. Jané, C. Rodrigo, T. Pumarola, J.J. González López. **Emergence of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Spain.** Poster presentation. EUPERT Strain Genomics, Copenhagen, 2018.
9. A. Mir-Cros, A. Moreno-Mingorance, M.T. Martín, G. Codina, T. Cornejo-Sánchez, A. Fàbrega, D. Van Esso, M. Campins, C. Rodrigo, M. Jané, T. Pumarola, J.J. González López. **Molecular epidemiology and virulence gene content of *Bordetella parapertussis* producing**

whooping cough in Barcelona. Poster presentation. 12th International Symposium on Bordetella, Brussels, 2019.

10. [A. Mir-Cros](#), A. Moreno-Mingorance, M.T. Martín, G. Codina, T. Cornejo-Sánchez, A. Fàbrega, D. Van Esso, M. Campins, C. Rodrigo, M. Jané, T. Pumarola, J.J. González López. **Molecular epidemiology and virulence gene content of *Bordetella parapertussis* producing whooping cough in Barcelona.** Communication nº ESPID19-0936 (e-Poster presentation). 37th ESPID, Ljubljana.

11. [A. Mir-Cros](#), A. Moreno-Mingorance, M.T. Martín, G. Codina, T. Cornejo-Sánchez, A. Fàbrega, D. Van Esso, C. Rodrigo, M. Campins, M. Jané, T. Pumarola, J.J. González López. **Emergencia y diseminación de un nuevo linaje de *Bordetella parapertussis* deficiente en pertactina en Barcelona.** Presentació oral en format pòster. XXVIII Jornades de la Societat Catalana de Malalties Infeccioses i Microbiologia Clínica, Lleida.



INTRODUCCIÓ

1. Història de la tosferina

Basat en registres històrics, en el segle VII, durant la dinastia Sui, el metge xinès de gran reputació Yuangfang Chao va recollir en un tractat un extens catàleg de malalties. En ell, apareix la descripció d'una malaltia pediàtrica perllongada en el temps coneguda en aquell moment com “la tos dels 100 dies”¹. Altres observacions prematures inclouen brots de la malaltia registrats a Persia al segle XV i brots observats a París al llarg del segle XVI, suggerint que la malaltia s’ha distribuït àmpliament en poblacions humanes durant uns quants cents d’anys². Guillaume de Baillou va ser el primer a parlar de la malaltia a Europa, descrivint-ne la fase paroxística i la seva propagació epidèmica a París durant l’any 1578. Aquest va descriure una nova malaltia a la que va denominar “quinte”, la qual afectava principalment els nens de 4 a 10 anys, presentant-se com a tos seca i violenta seguida de vòmit i associada a una elevada mortalitat^{3,4}. Tres-cents anys després, l’any 1883, l’alemany Carl Burger va reconèixer per primera vegada bacils en una mostra d’esput tenyida d’un pacient amb clínica compatible amb una tosferina. Així i tot, no va ser fins passats vint-i-tres anys, l’any 1906, quan el belga Jules Bordet, juntament amb Octave Gengou, van poder fer créixer i aïllar amb èxit el microorganisme responsable del quadre de tosferina que patia el seu fill, mèrit que li va ser reconegut l’any 1920 quan Jules Bordet va ser guardonat amb el Premi Nobel 1919 en Fisiologia o Medicina pel seu treball en el camp de la immunologia microbiana, inclòs el seu estudi de l’agent causal de la tosferina, *Bordetella pertussis*^{5,6}.

i. Breu definició de la malaltia

La tosferina és una malaltia infecciosa aguda altament contagiosa causada generalment per *B. pertussis*, un microorganisme de reservori exclusivament humà i d’elevada transmissió per via aèria. És considerada una de les malalties que es pot prevenir mitjançant la vacunació amb una de les incidències més elevades a escala

mundial. Es caracteritza per presentar un quadre respiratori de tos intensa que es pot perllongar durant setmanes o mesos. S'observa majoritàriament en edat preescolar i escolar, encara que els adolescents i els adults són el principal reservori del microorganisme, jugant un paper crucial en la seva transmissió⁶.

ii. Microbiologia de les espècies del gènere *Bordetella*

Les espècies del gènere *Bordetella* són Beta Proteobacteries classificades dins l'ordre Burkholderiales i la família *Alcaligenaceae*. El gènere inclou un total de setze espècies diferents de petits cocabacils gramnegatius, encapsulats i en la seva gran majoria aeròbics estrictes, que creixen de forma òptima entre 35 °C i 37 °C. Es tracta d'espècies estretament relacionades genèticament, les quals es poden diferenciar per trets característics del seu creixement, identificant-se fenotípicament per tècniques bioquímiques o, alguna d'elles, per tècniques proteòmiques (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*, MALDI-TOF). Degut a la seva difícil discriminació per seqüenciació del gen 16S de l'ARNr, per la identificació genètica de les diverses espècies que conformen el gènere *Bordetella* es recorre a la seqüenciació de gens concrets alternatius com el gen *nrdA*, el qual codifica la cadena alfa de la ribonucleòsid-difosfat reductasa, o altres gens essencials com el gen *recA*, així com a la seqüenciació del genoma complet^{7,8}. Avui en dia, les espècies descrites del gènere són: *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella holmesii*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella avium*, *Bordetella hinzii*, *Bordetella pseudohinzii*, *Bordetella trematum*, *Bordetella petri*, *Bordetella ansorpii*, *Bordetella bronchialis*, *Bordetella flabilis*, *Bordetella sputigena*, i les últimes en incorporar-se, *Bordetella muralis*, *Bordetella tumulicola* i *Bordetella tumbae* (Figura 1)^{7,9-11}.

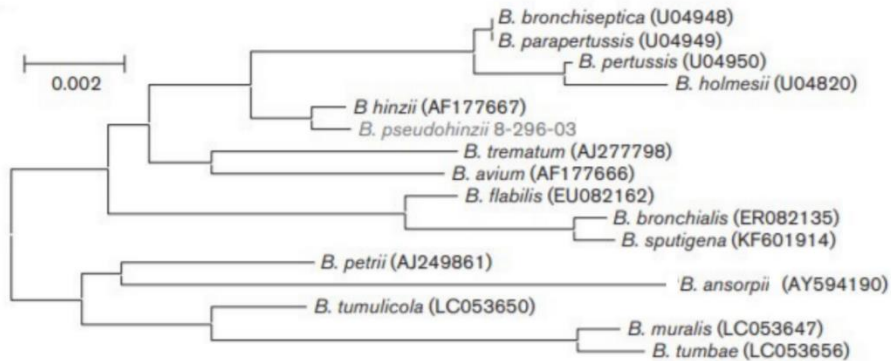


Figura 1. Estructura filogenètica (*neighbour-joining tree*) d'acord a les seqüències del gen 16S de l'ARNr de les setze espècies descrites del gènere *Bordetella*. Figura de Yury V. Ivanov *et al.* 2016⁹.

D'aquestes, *B. pertussis*, *B. parapertussis* i *B. bronchiseptica* conformen el grup d'espècies clàssiques, que juntament amb *B. holmesii* tenen capacitat per causar malaltia a individus humans, produint principalment, afectacions a les vies respiratòries. *B. pertussis*, la qual és un patògen estrictament humà que no té un reservori animal conegut, és el principal agent etiològic de la tosferina, patologia que també pot ser originada per *B. holmesii* i per un llinatge concret de *B. parapertussis* adaptat a humans (*B. parapertussis_{hu}*). L'altre, el llinatge de *B. parapertussis* adaptat a ovins (*B. parapertussis_{ov}*), causa infecció respiratòria en animals domèstics, principalment en bestiar oví i porcí. *B. bronchiseptica*, tot i que ocasionalment s'ha identificat produint malaltia en persones amb contacte proper amb animals, produeix principalment patologia respiratòria en gossos, porcs, conills i gats. *B. holmesii* i *B. bronchiseptica*, a més de les afectacions a les vies respiratòries, poden produir afectacions sistèmiques en persones immunodeprimides^{12–27}. *B. avium* i *B. hinzii* són considerades les espècies aviàries, sent *B. avium* l'agent etiològic de la *Turkey coryza* en aus salvatges o domèstiques, malaltia que també pot ser causada per *B. hinzii*. Ambdues espècies poden infectar de forma ocasional a persones amb immunosupressió, ja que s'han aïllat de pacients amb afectacions pulmonars subjacents o amb malalties cròniques de base. *B. pseudohinzii* es va diferenciar de *B.*

hinzii per la seva distància genètica, tractant-se d'una espècie que s'ha descrit com a causant de patologia respiratòria en ratolins^{9,28-38}. *B. trematum* s'ha aïllat de lesions cutànies o d'infeccions d'oïda en humans i *B. petrii*, tot i que es va descriure per primera vegada com una espècie ambiental trobada en mostres de sediments de rius, també s'ha aïllat de forma anecdòtica en humans³⁹⁻⁴³. *B. ansorpii* es va identificar per primera vegada en un exsudat purulent d'un quist epidèrmic i posteriorment s'ha trobat també en els hemocultius d'un pacient immunodeprimit^{44,45}. *B. bronchialis*, *B. flabilis* i *B. sputigena* s'han identificat en mostres respiratòries de pacients diagnosticats de fibrosi quística¹¹. Finalment, les incorporacions més recents del gènere *Bordetella* són les espècies ambientals *B. muralis*, *B. tumulicola* i *B. tumbae*, totes elles aïllades de mostres recollides de la superfície de la paret de guix de les pintures murals de les tombes Takamatsuzuka, a la localitat d'Asuka, al Japó. Aquestes, es van descriure per primera vegada l'any 2015, unes troballes que recolzen l'evidència que membres del gènere *Bordetella* existeixen també en el medi ambient, podent ser ubics en el sòl i/o l'aigua¹⁰.

D'aquesta manera, *B. pertussis*, juntament amb *B. parapertussis* i *B. holmesii*, són les úniques espècies que tenen capacitat per infectar els éssers humans causant un quadre respiratori clàssic de tosferina. Entre elles, el principal agent etiològic de la tosferina, *B. pertussis*, és un microorganisme no mòbil, oxidasa positiu, catalasa positiu, ureasa negatiu, exigent pel que fa a requeriments de creixement i relativament inert bioquímicament¹². Les altres dues espècies del gènere que poden causar quadres respiratoris en humans similars a la tosferina causada per *B. pertussis* són *B. parapertussis*, un microorganisme similar a *B. pertussis*, sent també no mòbil i catalasa positiu, però diferenciant-se per ser oxidasa negatiu i ureasa positiu, per ser menys exigent en el creixement en cultiu i per produir un pigment marronós soluble en alguns medis de cultiu, i *B. holmesii*, un microorganisme oxidasa negatiu,

ureasa negatiu, productor d'un pigment marronós soluble en alguns medis de cultiu i poc exigent en el creixement en cultiu (Taula 1)^{7,46}.

Taula 1. Trets fenotípics i característiques bioquímiques o de creixement de les espècies del gènere *Bordetella* productores de tosferina*.

		Espècie		
		<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. holmesii</i>
Tret fenotípic o característica bioquímica o de creixement	Creixement en RL o BG	+ (3-4 dies)	+ (2-3 dies)	+
	Creixement en agar sang	-	+/-	+
	Catalasa	+	+	+
	Oxidasa	+	-	-
	Ureasa	-	+	-
	Reducció de nitrats	-	-	-
	Hemòlisi de tipus beta	+	+	-
	Motilitat	+/-	-	-
	Producció de pigments	-	+ (marronós)	+ (marronós)

* RL, medi de cultiu Regan Lowe; BG, medi de cultiu Bordet Gengou; +, positiu; -, negatiu; +/-, positiu en alguns casos i negatiu en altres. *Dades del Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough caused by Bordetella pertussis/Bordetella parapertussis*, OMS 2014, Robbin S. Weyant et al. 1995 i Casandra L. Hoffman et al. 2019^{27,46,47}.

2. Patogènesis de *Bordetella pertussis*

B. pertussis és un bacteri patogen que estableix infecció per via respiratòria i roman localitzat, durant aquesta, a la mucosa del tracte respiratori superior humà, causant dany local i manifestacions sistèmiques. La patogenicitat d'aquest microorganisme involucra nombrosos factors de virulència, entre els quals s'inclouen toxines, endotoxines, sistemes de secreció, factors implicats en l'adherència, factors de resistència a sèrum i sistemes de regulació (Figura 2). La producció d'aquests factors de virulència permet la unió del microorganisme i l'evasió de les defenses de l'individu, contribuint al desenvolupament de la infecció i a la producció del quadre clínic associat. A conseqüència, es desencadena la posterior resposta immunitària

característica de la infecció, la qual té lloc pel paper immunomodulació de *B. pertussis* i en resposta al dany tissular causat per la pròpia infecció^{6,48}.

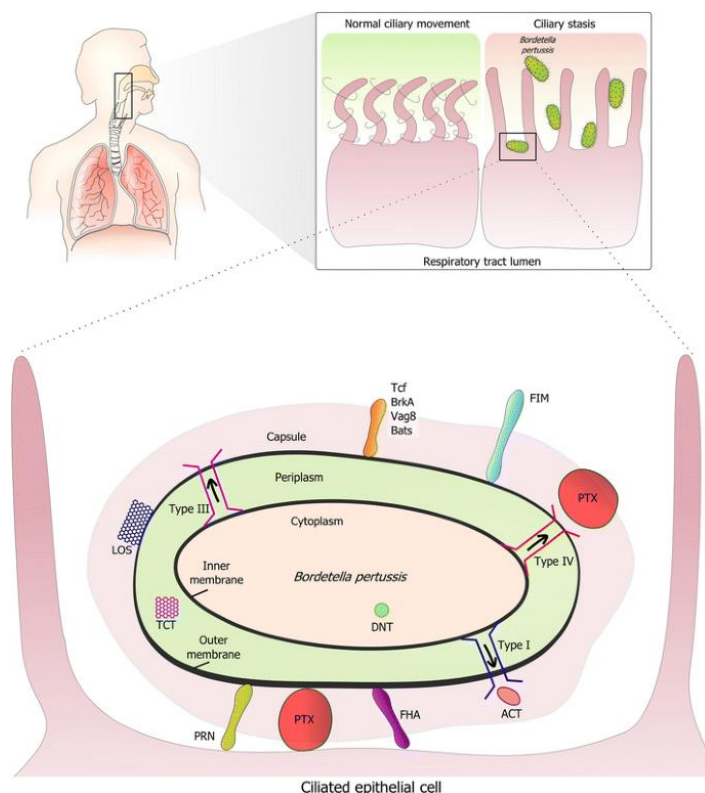


Figura 2. Interacció de *B. pertussis* amb les superfícies mucoses. Figura de Ilse Jongerius *et al.* 2015⁴⁹.

Breument, la hemaglutinina filamentosa (FHA), les fímbries (FIM) i la pertactina (PRN) són tres determinants de virulència importants durant el procés d'unió a l'epiteli respiratori de *B. pertussis*. La toxina pertussis (PTX), la qual actua també com una adhesina, és un dels principals factors de virulència del microorganisme. L'evasió de les defenses de l'individu ocorre principalment a través de la seva acció, així com del paper de la toxina adenilat ciclase-hemolisina (AC-Hly). Addicionalment, un dels mecanismes que presenta el microorganisme per evitar l'acció del complement

vehiculada per anticossos és la producció de BrkA, una proteïna associada a la superfície amb un paper important en la resistència al sèrum. Per a la regulació de tots ells, *B. pertussis* presenta l'operó *bvg* (Veure Sistemes de regulació, pàgina ?), compost per *bvgA* i *bvgS*, els quals formen el sistema de transducció de senyals de dos components que controla els estats o fases virulentes i avirulentes de *B. pertussis*, expressió dels quals està regulada per factors ambientals. La major part del dany tissular local a les cèl·lules epitelials ciliades és produït per l'acció de la citotoxina traqueal (TCT) i la toxina dermonecrotica (DNT). A diferència d'altres malalties bacterianes, hi ha poques manifestacions sistèmiques degudes a la infecció per *B. pertussis* ja que aquesta no entra al torrent sanguini ni es dissemina. Tot i això, la PTX és el principal determinant de virulència que origina les manifestacions sistèmiques, entre les que s'inclouen la leucocitosis, la limfocitosis, la encefalopatia i la hipertensió pulmonar, observades en aquells quadres més greus de tosferina en els infants de menys edat^{6,48}.

i. Mecanismes patogènics

Els principals mecanismes patogènics de *B. pertussis*, algun dels quals pot ser produït també per *B. parapertussis* i *B. holmesii* s'exposen i descriuen a continuació^{6,50,51}:

Toxines, endotoxines i sistemes de secreció

Les principals funcions de les toxines i les endotoxines són danyar o inhibir els mecanismes de defensa de l'hoste, contribuint així a l'aparició de les manifestacions clíniques de la malaltia mentre que els sistemes de secreció participen en el seu alliberament.

- Toxina pertussis (*pertussis toxin*, PTX)

La PTX és una proteïna periplasmàtica de 94 kDa formada per 5 subunitats produïda exclusivament per *B. pertussis*, sent la seva principal i característica toxina. No obstant això, el locus *ptx-ptl* es troba present tant en *B. pertussis* com en *B. parapertussis*, encara que en aquesta última acumula una sèrie de mutacions en el seu promotor que fan que no s'expressi (Taula 2). Es tracta d'una exotoxina de tipus AB₅ secretada pel sistema de secreció de tipus IV, formada per una subunitat catalítica A (S1) amb activitat ADP-ribosiltransferasa i quatre subunitats B (S2-S5) d'unió als receptors cel·lulars. Presenta activitat enzimàtica que, a més de facilitar l'adhesió del microorganisme a l'epiteli del tracte respiratori humà, és responsable de diversos efectes en l'hoste, entre els quals es troba, la producció de limfocitosis, l'augment de la susceptibilitat a la histamina, la inhibició de la funció dels fagòcits i leucòcits i l'alteració en la secreció d'insulina. Tot això es manifesta amb un augment de les secrecions respiratòries així com la producció de la mucositat característica de la primera fase de la malaltia. Immunològicament, modifica la capacitat de resposta de les cèl·lules T i indueix la producció d'immunoglobulina (Ig) E, responsables de la immunitat perllongada generada per l'organisme enfront de la malaltia. És considerant un important immunogen, per la qual cosa és un dels principals components de les vacunes acel·lulars (DTPa)⁵²⁻⁵⁹.

- Citotoxina traqueal (*tracheal cytotoxin*, TCT)

La TCT és una exotoxina de 9,2 kDa produïda per *B. pertussis* i també per *B. parapertussis* (Taula 2). Es tracta d'un monòmer disacàrid-tetrapèptid derivat de la degradació de la paret cel·lular, un fragment del peptidoglicà, el qual té una gran afinitat específica per les cèl·lules epitelials ciliades. Actua estimulant la producció de citocines pro inflamatòries, induint la producció d'òxid nítric i causant danys a les cèl·lules ciliades de l'epiteli, altrament anomenat colòstasis. Actua alterant els mecanismes d'aclariment, neteja i regeneració de les cèl·lules del tracte respiratori,

la qual cosa origina la tos característica de la malaltia. A més, la seva acció es relaciona també amb la presència de febre, gall inspiratori i paroxismes⁵⁹⁻⁶⁴.

- Toxina adenilat ciclasa-hemolisina (*toxin adenylate cyclase-haemolysin*, AC-Hly)

L'AC-Hly és una proteïna extracitoplasmàtica secretada pel sistema de secreció de tipus I que presenta dos dominis funcionals C- i N- terminals activats per calmodulina de 25 kDa i 18 kDa, respectivament. És produïda tant per *B. pertussis* com per *B. parapertussis*, encara que la d'aquesta segona presenta patrons de modificació post-traduccionals que fa que presenti propietats citotòxiques lleugerament diferents a les que presenta la de *B. pertussis* (Taula 2). S'uneix a les cèl·lules diana a través del domini C-terminal i transforma l'ATP en cAMP a través de l'extrem N-terminal. És una toxina bifuncional que presenta activitat enzimàtica tant d'AC-Hly, funcionant principalment com a factor antiinflamatori. Inhibeix la migració i activació dels fagòcits, bloqueja la producció d'òxid nítric bactericida per part dels macròfags, suprimeix l'efecte citotòxic dels neutròfils, monòcits i cèl·lules citocides naturals i inhibeix l'activació i quimiotaxis de les cèl·lules T, sent important pel bacteri durant la fase inicial de la malaltia. La infecció natural i, en menor mesura l'administració de les vacunes de cèl·lules completes (DTPw), estimulen la producció d'elevats títols d'anticossos contra l'AC-Hly, els quals perduren fins a l'edat adulta^{59,61,65-69}.

- Toxina dermonecròtica (*dermonecrotic toxin*, DNT)

La DNT és una proteïna citoplasmàtica de 160 kDa de tipus AB, formada per un domini N-terminal d'unió al receptor (B) i un domini C-terminal amb activitat enzimàtica (A), produïda tant per *B. pertussis* com per *B. parapertussis* (Taula 2). Es tracta d'una toxina termolàbil, de la qual es desconeix amb exactitud el seu paper en la patogènesi de la malaltia. S'ha observat en ratolins i primats que a diferents dosis produeix vasoconstricció i necrosis isquèmica local. Tot i que falten evidències, és

probable que en humans produeixi la destrucció localitzada del teixit del tracte respiratori^{70,71}.

- Lipopolisacàrid (*lipopolysaccharide*, LPS)

El LPS és una endotoxina que confereix protecció al bacteri enfront de la lisi cel·lular vehiculada pel complement, present en *B. pertussis*, *B. parapertussis* i *B. holmesii*. No obstant això, el LPS de *B. pertussis*, a diferència del de *B. parapertussis* i *B. holmesii*, manca de les cadenes laterals d'antigen O (lipooligosacàrid) a causa de la deleció dels gens *wbm* (Taula 2). D'aquesta manera, el LPS de *B. pertussis* es compon tan sols del nucli oligosacàrid i del lípid A. El LPS és el principal responsable de la presència de febre després de la immunització amb les vacunes DTPw, presenta propietats antigèniques i adjuvants, però no té capacitat protectora, no sent un component de les vacunes DTPa⁷²⁻⁷⁷.

- Sistema de secreció de tipus III (*type III secretion system*, T3SS)

El T3SS és un sistema compost per més de 20 proteïnes, el qual és utilitzat pel microorganisme per expulsar proteïnes efectores a les cèl·lules hoste eucariotes com, per exemple, BopB, BopN, BopD, Bsp22 i BopC/BteA, freqüentment relacionades amb la colonització i persistència a l'epiteli respiratori⁷⁸⁻⁸².

Adhesines i altres factors implicats en l'adherència

La principal funció de les adhesines, entre les que s'inclouen la PRN, la FHA i les FIM, i els altres factors implicats en l'adherència és facilitar la unió del microorganisme a les cèl·lules epitelials ciliades del tracte respiratori humà.

- Pertactina (*pertactin*, PRN)

La PRN és una proteïna autotransportador de la superfície bacteriana de 69 kDa que intervé en la unió a les cèl·lules eucariotes a través del motiu RGD (Arg-Gly-Asp) i és

produïda per *B. pertussis* i *B. parapertussis*, la qual produeix una proteïna amb una gran similitud amb la PRN de *B. pertussis* (Figura 3 i Taula 2). Com totes les proteïnes autotransportadores, les quals formen part del sistema de secreció de tipus V, el polipèptid immadur de la PRN de 93 kDa inclou un domini passatger central flanquejat per una seqüència senyal (SS) a l'extrem N-terminal i un domini de porina a l'extrem C-terminal. La funció de la SS és dirigir el polipèptid al periplasma, escindint-se durant aquest procés, mentre que l'extrem C-terminal forma un canal a la membrana exterior per tal de que s'exporti el domini passatger a la superfície, el qual es plega per formar una estructura en hèlix. És una proteïna altament polimòrfica, especialment en dues regions anomenades R1 i R2, les quals presenten diverses repeticions dels motius GGXXP (Gly-Gly-Xaa-Xaa-Pro) i PQP (Pro-Gln-Pro), respectivament, utilitzades per definir els diferents al·lels descrits de la proteïna. La PRN és una proteïna resistent a l'aclariment vehiculat pels neutròfils i altament immunògena, la qual és un dels components en la majoria de composicions de les vacunes DTPa⁸³⁻⁸⁹.

- Hemaglutinina filamentosa (*filamentous haemagglutinin*, FHA)

La FHA és una proteïna filamentosa gran en forma de forquilla i altament immunogènica que presenta dues formes, una primera associada a la paret cel·lular i una segona en forma de proteïna secretada (Figura 3). Es tracta d'una adhesina produïda per *B. pertussis*, *B. parapertussis* i també per *B. holmesii*, la qual presenta una proteïna altament relacionada amb la FHA produïda per *B. pertussis* i *B. parapertussis* (Taula 2). La FHA és una proteïna autotransportadora que forma part del sistema de secreció de tipus V, sintetitzant-se com un precursor FhaB de 367 kDa, el qual modifica el seu extrem N-terminal i escindeix el seu extrem C-terminal per tal de formar la proteïna FHA madura de 220 kDa. La proteïna transportadora de la membrana externa FhaC és un dels principals membres de la via de secreció de la FHA, la qual interactua amb FhaB, forma porus i permet la secreció de la FHA,

ambdues classificant-se com els membres del sistema de secreció de dos socis TPS. L'escissió de la forma lliure de la FHA al medi extracel·lular és conseqüència de l'acció de la proteasa SphB1. La FHA presenta un domini d'unió a heparina i un motiu de reconeixement de carbohidrats (CRD), a més del motiu RGD (Arg-Gly-Asp), compartit amb la ja esmentada PRN. Gràcies a aquests, la seva activitat intercedeix en l'adhesió inicial del microorganisme a les cèl·lules de l'epiteli del tracte respiratori superior així com és essencial per superar l'aclariment mucociliar i facilitar la progressió de la infecció al llarg del tracte respiratori, promou la fagocitosi per macròfags i neutròfils polimorfonuclears, indueix l'alliberament de molècules antiinflamatòries i suprimeix la producció de molècules proinflamatòries per part dels macròfags i les cèl·lules dendrítiques. Es tracta d'un dels principals components de la majoria de composicions de les vacunes DTPa⁹⁰⁻⁹⁸.

- Fímbries (*fimbriae* – type I pili, FIM)

Les FIM són projeccions filamentoses de naturalesa proteica de la superfície bacteriana, produïdes per *B. pertussis* (Figura 3). *B. parapertussis*, tot i presentar els gens que codifiquen les fímbries, no les expressen (Taula 2). Hi ha dos tipus de productes FIM segons la seva subunitat principal, el 2 i el 3, els quals són susceptibles a patir variacions polimòrfiques i representen dos serotips específics d'aglutinògens. Els gens *fim* estan subjectes a una variació de la fase fimbrial per un aparellament incorrecte en el tram de residus de citosina ubicats entre les posicions -10 i -35 dels promotors *fim2* i *fim3*. Tots dos presenten una subunitat menor o antígen FimD com a estructura comuna d'unió a la integrina VLA5 de la superfície dels monòcits i als sucres sulfatats. FIM2 i FIM3 són dos components importants en el procés de colonització de la mucosa respiratòria inferior i amb implicació en l'adherència del microorganisme i la supressió de la resposta inflamatòria inicial a la infecció. Les FIM estan incloses d'algunes composicions de les vacunes DTPa^{17,97,99-103}.

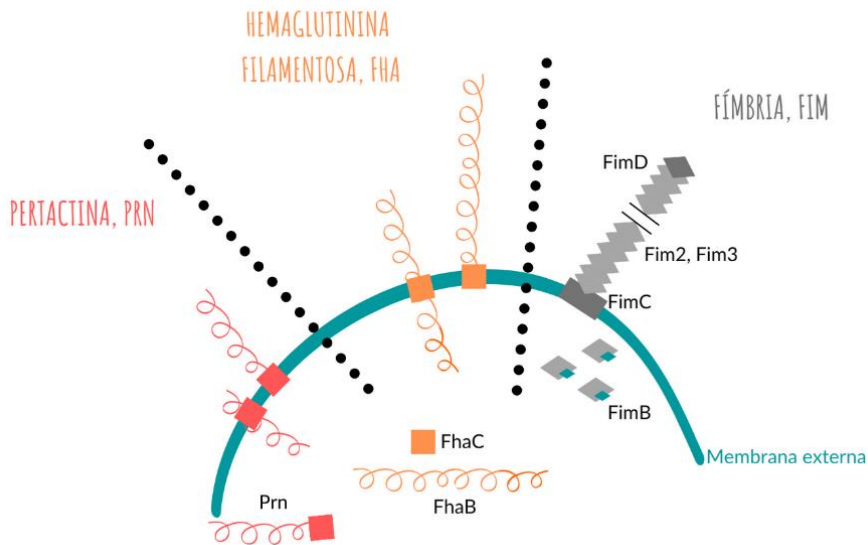


Figura 3. Presentació de la PRN, la FHA i les FIM a la superfície cel·lular de *B. pertussis*. **Figura modificada de Jeffrey A. Melvin et al. 2014⁶⁵.**

- Factor de colonització traqueal A (*tracheal colonization factor A*, TCF-A) i BapC (*autotransporter protein C*)

El TCF-A i la BapC són dues proteïnes autotransportadores de superfície exclusivament produïdes per *B. pertussis* (Taula 2). El primer, a banda de ser una proteïna de superfície és també una proteïna secretada de 60kDa, la qual actua principalment en el procés d'adherència. La segona, es tracta d'una proteïna d'entre 90 i 100 kDa que, de la mateixa manera que la primera, està fonamentalment involucrada en l'adherència del microorganisme a les cèl·lules de l'hoste. Ambdues presenten el mateix motiu RGD (Arg-Gly-Asp) que la PRN i la FHA i, a diferència d'aquestes, el motiu addicional SGXG (Ser-Gly-Xaa-Gly), punt d'unió del glicosaminoglicà, una estructura de naturalesa glucídica present en el teixit epitelial, entre altres¹⁰⁴⁻¹⁰⁷.

Factors de resistència al sèrum

B. pertussis utilitza nombroses estratègies per evadir el sistema immunològic, inclosa la capacitat per resistir a la mort a través del complement. En aquest sentit, les proteïnes autotransportadores de superfície Vag8 i BrkA, d'aproximadament 100 kDa i de 73 kDa, respectivament, són els principals factors de resistència al sèrum (Taula 2). Concretament, Vag8, identificat tant en *B. pertussis* com en *B. parapertussis*, actua unint-se a l'inhibidor de l'esterasa C1 (C1inh), una proteïna reguladora del sistema del complement, mentre que BrkA, per la seva banda, participa en la resistència al complement prevenint l'acumulació de C4 depositat i la formació del complex d'atac de membrana¹⁰⁸⁻¹¹¹.

Sistemes de regulació

Molts dels factors de virulència de *B. pertussis* estan activats pel sistema regulador de dos components (BvgAS), format pel sensor quinasa BvgS i pel regulador de la resposta BvgA (Figura 4).

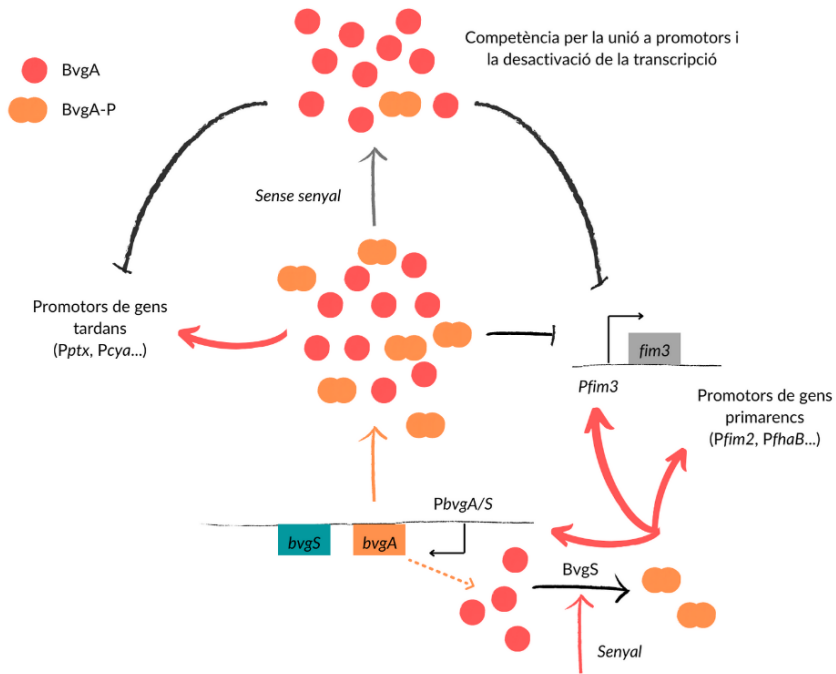


Figura 4. Esquema de la xarxa reguladora BvgAS. Figura modificada de Alice Boulanger *et al.* 2015¹¹².

En condicions no inductives, un nivell basal de transcripció del promotor de *bvgA/bvgS* (*Pbvga/S*) produeix una quantitat baixa de BvgS i BvgA no fosforilada. En presència d'un senyal, BvgS s'activa i fosforila a BvgA (BvgA-P), facilitant-se la seva dimerització així com la transcripció activa d'aquells gens de virulència primerencs activats per promotors de tipus vag, entre els que es troben els promotors de la FHA i les FIM. L'augment de la transcripció del promotor *Pbvga/S* resulta en un augment dels nivells de BvgA i BvgA-P, donant lloc a l'activació dels promotors d'aquells gens de virulència tardans, com són els promotors de l'AC-Hly i la PTX. D'aquesta manera, la fosforilació de BvgA és necessària pel microorganisme, ajudant-lo en el procés d'adaptació i colonització de les vies respiratòries. Contràriament, amb la manca de senyal, el nivell de BvgA-P disminueix ràpidament degut a l'activitat fosfatasa de BvgS, induint-se aquells gens de virulència reprimits per promotors de tipus vrg,

l'activació d'algun dels quals implica la síntesi de polisacàrid capsular o l'expressió de gens flagel·lars i de quimiotaxis^{65,112-120}.

Taula 2. Presència i absència dels diversos factors de virulència entre les espècies del gènere *Bordetella* productores de tosferina*.

	Espècie			
	Factor de virulència	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. holmesii</i>
Toxines	PTX	+	d	-
	TCT	+	+	-
	AC-Hly	+	+	-
	DNT	+	+	-
Endotoxina	LPS	+ (sense antigen O)	+ (amb antigen O)	+ (amb antigen O)
Sistema de secreció	T3SS	+	+	-
Factors d'adherència	PRN	+	+	-
	FHA	+	+	+
	FIM	+	d	-
	TCF-A	+	-	-
	BapC	+	-	-
Factors de resistència al sèrum	Vag8	+	+	-
	BrkA	+	-	-
Sistema de regulació	BvgAS	+	+	+

* PTX, toxina pertussis; TCT, citotoxina traqueal; AC-Hly, toxina adenilat ciclase-hemolisina; DNT, toxina dermonecròtica; LPS, lipopolisacàrid; T3SS, sistema de secreció de tipus 3; PRN, pertactina; FHA, hemaglutinina filamentosa; FIM, fimbries; TCF-A, factor de colonització traqueal A; BapC, autotransportador BapC; Vag8, factor de resistència a sèrum Vag8; BrkA, factor de resistència a sèrum BrkA; BvgAS, sistema de regulació BvgAS; +, presència; -, absència; d, degenerat. **Dades de Paul E. Kilgore et al. 2016, Laure F. Pittet et al. 2016 i Bodo Linz et al. 2016^{6,50,51}.**

3. Epidemiologia de la tosferina

Quan no es disposava de vacunes per prevenir la tosferina, aquesta va ser una malaltia important i una de les principals causes de mort entre els infants. Amb la introducció de les vacunes a la dècada dels anys quaranta, la taxa d'incidència de la tosferina es va veure reduïda de forma dràstica, especialment des de finals dels anys vuitanta i principis dels anys noranta coincidint amb l'augment de les cobertures vacunals en primovacunació a escala mundial¹²¹. Tant en l'era prevacunal com en l'era vacunal, la tosferina s'ha caracteritzat per ser una malaltia endèmica cíclica, amb pics epidèmics que ocorren cada 3-5 anys, com a resultat del cicle immunològic de la població. Això és degut a que ni la infecció natural ni la immunització enfront de la tosferina indueixen una immunitat de per vida^{122,123}. Recentment, al llarg dels últims vint anys, la tosferina ha ressorgit a escala global malgrat la immunització i les bones cobertures vacunals, suposant un augment en la incidència de la malaltia, les hospitalitzacions i les morts associades. La raó d'aquest ressorgiment és, probablement, multifactorial^{6,14}.

i. Global

La tosferina és una malaltia endèmica tant en països amb rentes altes com en països amb rentes baixes, amb freqüents brots que ocorren de forma esporàdica en diferents llocs arreu del món. L'Organització Mundial de la Salut (OMS) va situar els casos de tosferina comunicats mundialment per sota dels 2 milions de casos anuals a partir de l'any 1980, xifra que anys més tard, a partir de l'any 1990 i coincidint amb

un clar augment dels valors de cobertures vacunals en primovacunació (>70%), es va col·locar per sota dels 0,5 milions de casos de tosferina anuals (Figura 5)¹²¹. És evident com, al llarg de les últimes dècades, la vacunació rutinària enfront de la tosferina ha fet reduir de forma dràstica la incidència de la malaltia. No obstant això, en els darrers vint anys s'ha observat un canvi en l'epidemiologia de la malaltia, la qual inicialment afectava majoritàriament als nens menors de 6 anys. Actualment, l'evolució epidemiològica de la infecció observada en adolescents i adults, els quals són els grups d'edat amb major potencial com a transmissors del microorganisme, és especialment preocupant a escala mundial, inclús en països amb economies relativament fortes i altes taxes de vacunació infantil¹²⁴⁻¹³¹. Les últimes dades de les quals es disposa a nivell global són de l'any 2019, amb 132.754 casos de tosferina notificats mundialment¹²¹.

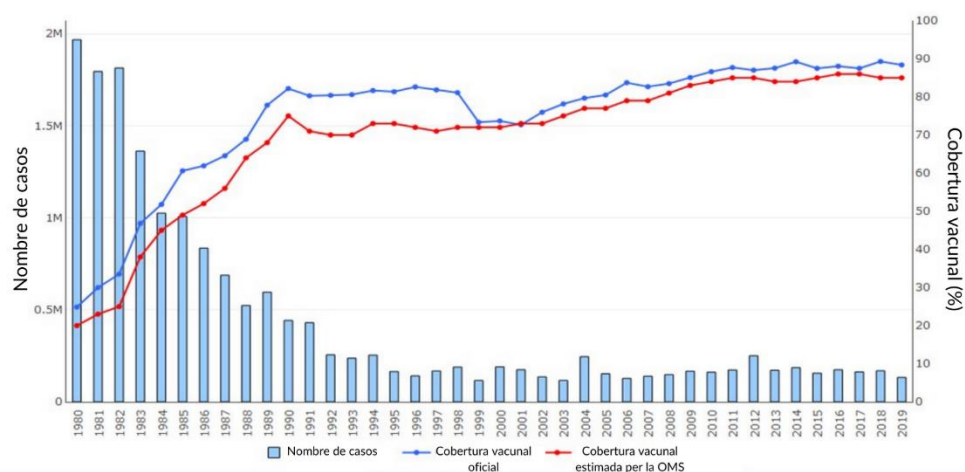


Figura 5. Incidència global de la tosferina reportada anualment i cobertura vacunal en primovacunació. **Figura modificada de la World Health Organization: Immunization, Vaccines and Biologicals Programme. Pertussis [Internet]. Geneva (Switzerland): The Organization; [updated 2020 Aug14]¹²¹.**

"https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/pertussis/en/"

Tot i això, encara existeixen molts desafiaments a l'hora d'estimar la incidència global de la tosferina, com són: 1) infraestructura de vigilància limitada en molts països en vies de desenvolupament, la qual no facilita l'oportuna notificació dels casos sospitosos; 2) absència de laboratoris o laboratoris amb pocs recursos en molts països en vies de desenvolupament per recolzar les proves rutinàries de tosferina i poca uniformitat entre països en la disponibilitat de proves per tal de fer el diagnòstic microbiològic molecular de la malaltia; i 3) falta de personal sanitari en moltes àrees, la qual cosa limita la identificació clínica de la malaltia. A més, l'OMS ha assenyalat l'absència d'uniformitat en l'aplicació del conjunt de definicions estandarditzades de tosferina dins del marc de la vigilància^{132,133}. De fet, l'any 1999, un estudi va estimar la possible incidència global de la tosferina en 48,5 milions de casos totals i 3,9 milions de morts, 30,6 milions dels quals i 390.000 morts en infants menors de 5 anys, xifra extraordinàriament superior a la comunicada per l'OMS en aquell mateix any (<0,5 milions de casos)¹³⁴. Recentment, un nou estudi va situar la incidència global estimada de la tosferina a l'any 2014 per als infants menors de 5 anys en 24,1 milions de casos i 160.700 morts anuals¹³⁵. Addicionalment, estimar la càrrega de la tosferina global és un repte important a causa de diversos factors, com són els canvis amb el pas del temps en els sistemes de vigilància i mètodes de diagnòstic o els canvis en els calendaris vacunals nacionals així com en les composicions de les vacunes. És per això que, un dels principals desafiaments a l'hora d'estimar la càrrega de la tosferina a nivell global fa referència a la informació comunicada pels diversos sistemes de vigilància, notificant-se en alguns països tan sols aquells casos diagnosticats clínicament o en d'altres, només aquells casos diagnosticats microbiològicament, sobre o infravalorant-se, en moltes situacions, la càrrega real de la malaltia. A més, la baixa sospita de tosferina entre els adolescents i els adults, per als quals el patró de tos o les manifestacions clíniques poden ser atípiques, fa assumir una important infranotificació dels casos en aquest grup¹³⁶⁻¹⁴⁴.

ii. Europa

A Europa, la *European surveillance network for selected vaccine-preventable diseases* (EUVAC-NET) del *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) va xifrar en 35.627 els casos de tosferina notificats l'any 2018 entre trenta Estats Membre de la Unió Europea (UE) i la *European Economic Area* (EEA), suposant una taxa de notificació de 8,2 casos per cada 100.000 habitants. El nombre total de casos notificats ha mantingut una tendència molt similar des de l'any 2012, any en què es va observar un fort augment en el nombre de casos detectats a Europa, amb un total de 42.572 casos i una taxa de notificació d'11,6 casos per cada 100.000 habitants (Figura 6). Alemanya, Països Baixos, Noruega, Espanya i Regne Unit van representar el 72% del total de casos notificats al *The European Surveillance System* (TESSy) l'any 2018, sent el 62% individus majors de 15 anys. El grup d'infants menors d'1 any, que en moltes ocasions no van completar la sèrie de primovacunació enfront de la tosferina a causa de la seva curta edat, van presentar la taxa d'incidència més elevada (44,4 casos per cada 100.000 habitants), sent el grup d'edat més afectat seguit del grup d'edat de 10 a 14 anys (22 casos per cada 100.000 habitants)^{145,146}.

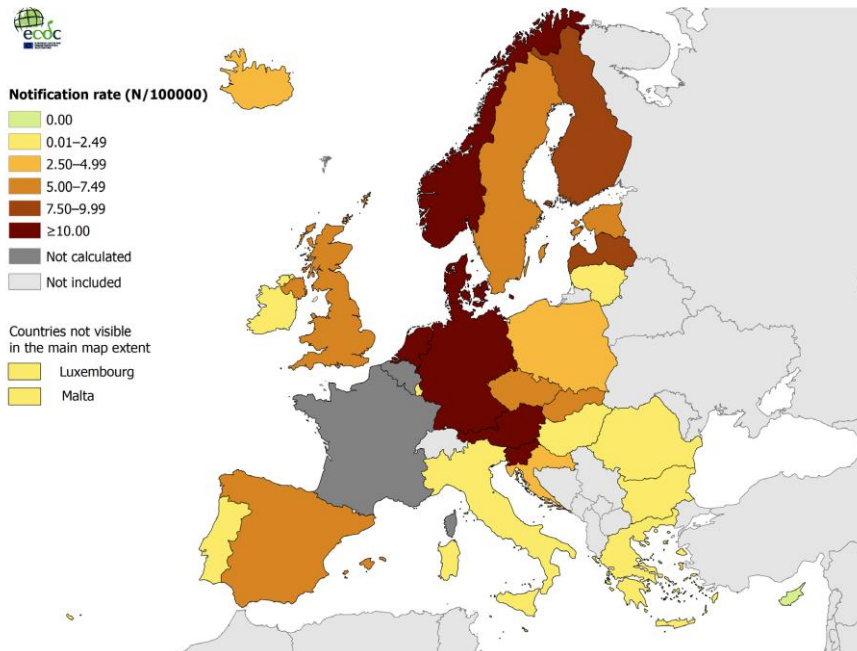


Figura 6. Distribució dels casos de tosferina per cada 100.000 habitants declarats durant l'any 2018 entre els països de la UE. *Figura del European Centre for Disease Prevention and Control. Pertussis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC; 2020¹⁴⁵.*

iii. Espanya i Catalunya

A Espanya, la tosferina és una malaltia de declaració obligatòria des de l'any 1982. A més, des de la creació de la *Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica* (RENAVE), es tracta d'una malaltia de declaració obligatòria individualitzada, de manera que, des de l'any 1996 es notifiquen tots els casos sospitosos, probables i confirmats de la malaltia. Addicionalment, tots aquells brots amb interès comunitari es comuniquen nacionalment amb caràcter urgent, pels quals es remet un informe amb les dades epidemiològiques bàsiques fins tres mesos després de la finalització d'aquest. Des de l'any 1982 i fins a l'any 1998, la incidència de la tosferina a Espanya va presentar una marcada tendència decreixent, més acusada des de l'any 1996, any en el qual es va incloure la quarta dosi de la vacuna antipertússica en el calendari sistemàtic de vacunacions, mantenint-se una incidència aproximada d'1 cas per cada 100.000

habitants i suposant un descens en el nombre de casos superior al 95%. Entre 1998 i 2010, amb cobertures vacunals en primovacunació superiors al 90%, es van produir tres onades epidèmiques de la malaltia (1998-2001, 2002-2005 i 2006-2009), amb incidències anuals que no superaven els 2 casos per 100.000 habitants. L'any 2010, coincidint amb l'inici de la quarta ona epidèmica (2010-2013) ocorreguda des de l'any 1998, es va començar a detectar un augment dels casos notificats de tosferina, arribant als 1,9 casos per 100.000 habitants i trobant-se la malaltia, en una situació d'epidèmia sostinguda des de llavors. Als anys 2011 i 2012, la incidència es va multiplicar per quatre, arribant als 7,2 i 7,5 casos per 100.000 habitants, respectivament. Finalment, l'última ona epidèmica (2014-2018) que ha tingut lloc es va iniciar l'any 2014, arribant a un pic màxim d'incidència a l'any 2015, de 18 casos per 100.000 habitants, seguida de 10,6 casos i 7,8 casos per 100.000 habitants en els anys 2017 i 2018, respectivament, anys de descens de l'última ona epidèmica de tosferina (Figura 7)¹⁴⁷.

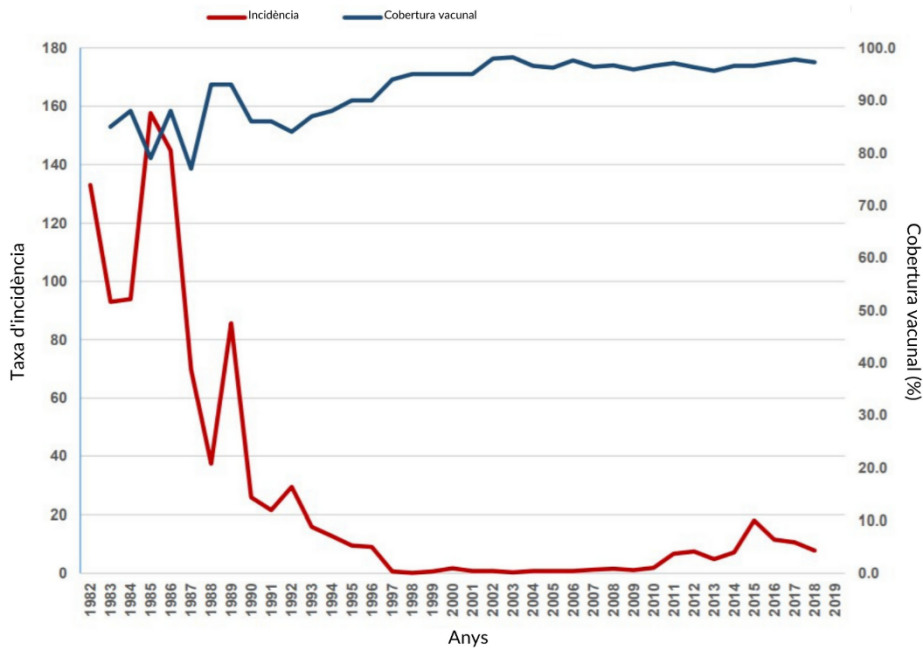


Figura 7. Incidència de la tosferina a Espanya i cobertura vacunal en primovacunació. *Figura modificada de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiología-ISCIII. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Instituto Nacional de Estadística*¹⁴⁸. https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20A-Z/TOSFERINA/Gr%C3%A1fico_%20tosferina_2019.pdf

Pel que fa a la mortalitat de la malaltia, segons l'estadística de mortalitat per causa de mort del *Instituto Nacional de Estadística* (INE), en l'era prevacunada, les morts per tosferina superaven els 30 casos anuals a Espanya. Amb la introducció de la vacunació enfront de la tosferina, a partir dels anys setanta, la mortalitat per tosferina es va anar reduint, arribant a no registrar-se gairebé defuncions en la dècada dels noranta per aquesta causa. Al llarg del període 1997-2017, a Espanya hi ha hagut un total de setanta-quatre morts per tosferina, el que suposa una taxa de letalitat del 0,5%, totes elles registrades en infants menors de 4 mesos¹⁴⁹. Entre els anys 2000 i 2006, la mitjana va ser d'una mort per tosferina a l'any, mentre que al llarg del període 2007-2016, la mortalitat es va incrementar fins a les cinc morts de mitjana anuals, arribant a registrar-se vuit defuncions als anys 2011 i 2015, coincidint

amb els pics de màxima incidència de la malaltia de les dues últimes onades. Finalment, l'any 2016 es van notificar a Espanya quatre morts per tosferina¹⁴⁷.

Catalunya, durant el període 2005-2018, s'ha situat sempre entre les tres primeres comunitats autònomes d'Espanya amb major incidència de tosferina per cada 100.000 habitants, comunicant dades d'incidència d'entre 2,5 i 21 casos per cada 100.000 habitants entre els anys 2005 i 2014. Posteriorment, a l'any epidèmic 2015 es va informar d'una incidència de 49,2 casos per cada 100.000 habitants a Catalunya i incidències de 26,3, 24,6 i 18,2 casos per cada 100.000 habitants en els següents anys 2016, 2017 i 2018, respectivament, consolidant la tendència creixent de la malaltia al llarg dels darrers anys (Figura 8)¹⁵⁰.

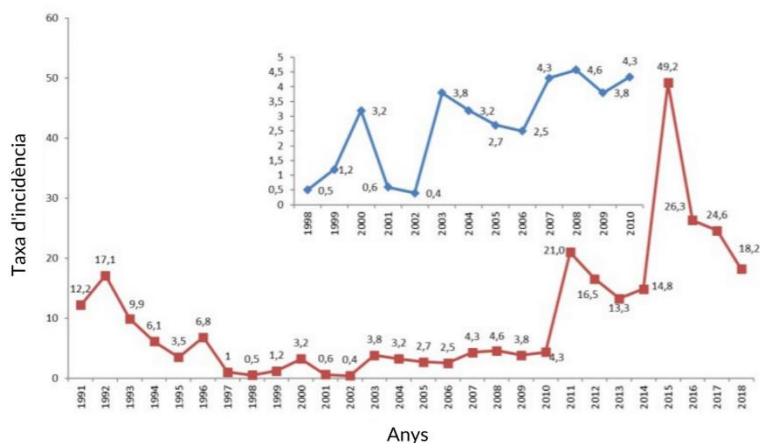


Figura 8. Incidència de la tosferina a Catalunya. **Figura modificada del Butlletí Epidemiològic de Catalunya (BEC). Registre de malalties de declaració obligatòria (MDO). Agència de Salut Pública de Catalunya¹⁵⁰.**

https://canalsalut.gencat.cat/web/.content/_Actualitat/Butlletins/Promocio_proteccio_salut/bec_butlleti_epidemiologic_de_catalunya/2019/bec-mar-2019.pdf

iv. Incidència de la malaltia per grups d'edat

Infants

La tosferina és una malaltia majoritàriament infantil, la qual afecta sobretot al grup d'infants menors d'1 any, especialment als menors de 3 mesos, seguits del grup d'infants d'1 a 4 anys i del grup d'infants de 5 a 9 anys. A Espanya, des de l'any 2011, la tosferina en nadons menors d'1 any ha anat en augment, passant d'assolir un màxim d'incidència de 197,9 casos per cada 100.000 habitants durant l'ona epidèmica 2010-2013, amb pic epidèmic l'any 2011, a un màxim d'incidència de 457,2 casos per cada 100.000 habitants durant l'última ona epidèmica, amb pic epidèmic l'any 2015. Entre aquests, el grup de nadons menors de 3 mesos és el que acumula el major nombre de casos, amb una incidència màxima l'any 2015 de 1.114,3 casos per cada 100.000 habitants. Aquest mateix comportament s'observa per a la resta de grups d'edat en infants, arribant, durant l'última ona epidèmica (2014-2018), amb un màxim pic epidèmic l'any 2015, a valors d'incidència per sobre dels registrats en prèvies onades epidèmiques. La vacunació infantil és la principal eina per combatre la tosferina en aquesta població, recomanant-se la immunització dels nadons a partir dels 2 mesos d'edat. Avui en dia, la tosferina segueix sent una malaltia relacionada amb la infància i especialment preocupant, per la seva gravetat, en aquells nadons que encara no han rebut la vacuna¹⁴⁷.

Adolescents i adults

L'epidemiologia de la tosferina ha patit un viratge al llarg de les últimes 2 o 3 dècades en molts països, observant-se un augment important dels casos en adolescents i adults. Actualment, les bones cobertures de vacunació entre la població infantil no limiten la circulació de *B. pertussis* entre la població adolescent i adulta. A Espanya, en el període 1998-2018 la incidència de tosferina en el grup d'edat de 10 a 14 anys ha passat de 2,3 casos per cada 100.000 habitants a finals de la dècada dels anys noranta a registrar-se una incidència de 68,2 casos per cada 100.000 habitants l'any

2015, coincidint amb l'últim pic epidèmic de la malaltia. La mateixa tendència ascendent s'ha observat per al grup d'edat de 15 a 49 anys, amb una incidència de 0,1 casos per cada 100.000 habitants l'any 1998 i assolint una incidència de 7,3 casos per cada 100.000 habitants l'any 2015, així com per al grup d'edat de majors de 50 anys, pel qual es va reportar una incidència l'any 2015 de 3,7 casos per cada 100.000 habitants. L'augment observat en el nombre de casos comunicats entre els adolescents i adults és atribuït, en gran part, a una disminució de la immunitat, la qual es produeix anys després de la vacunació infantil. Aquesta immunitat minvant pot tenir un paper important en la transmissió de la tosferina per part dels adolescents i els adults als seus contactes estrets¹⁴⁷.

v. Estacionalitat

Al llarg d'uns anys, l'estacionalitat de la tosferina es va posar en dubte ja que, a diferència d'altres patògens respiratoris, *B. pertussis* està molt associada a brots uniformes que no mostren un patró estacional clar. Els estudis realitzats en aquest sentit no demostraven que la tosferina tingués una estacionalitat marcada, doncs, es trobaven resultat ambigus comunicats per diversos treballs realitzats en diferents països i en distints contextos epidemiològics. Els experts remarcaven que probablement el comportament de la malaltia depenia d'un conjunt de factors com són l'edat, el clima, el nivell socioeconòmic o el comportament social, entre d'altres, de cada territori^{129,151-159}. Tot i això, malgrat observar-se brots de la malaltia en diferents èpoques de l'any, també s'apuntava que la tosferina solia presentar un augment durant els mesos d'estiu i tardor¹⁶⁰.

Recentment, alguns estudis duts a terme als EUA o a Alemanya són partidaris de parlar que la tosferina presenta un patró estacional definit, observant-se pics d'activitat coincidint amb els estius^{161,162}. Aquesta dinàmica de la malaltia s'ha vist reflectida de forma més o menys constant a Europa, on per exemple, al passat any

2018, el nombre més elevat de casos es va registrar a l'agost mentre que el més baix va ser a l'abril. Un any abans, el 2017, la tendència va ser lleugerament diferent, sent el maig el mes amb més casos informats i el desembre el mes amb el nombre més baix de casos informats. No obstant això, considerant el període 2014-2018, el nombre de casos de tosferina informats pels diferents països va arribar al seu màxim cada estiu¹⁴⁶.

vi. Dinàmica de la transmissió

La tosferina és una malaltia altament contagiosa de distribució mundial. Es transmet de persona a persona amb una gran eficiència a través del contacte amb gotes transportades per l'aire, altrament conegudes com a aerosols. Els individus colonitzats o infectats tenen la capacitat d'aerosolitzar les partícules bacterianes a través de la tos, els esternuts o les secrecions respiratòries. Estudis de transmissió de les malalties infeccioses han estimat diverses vegades el nombre bàsic reproductiu (R0), el qual defineix el nombre esperat de casos secundaris originats de mitjana a partir d'un cas primari confirmat en una població completament susceptible. Basant-se en estimacions del R0 publicats l'any 1993, la tosferina va ser considerada molt més contagiosa que la poliomielitis, la verola, la rubèola, les galteres i la diftèria, demostrant que una persona infectada de tosferina pot trametre la malaltia a 12-17 persones susceptibles més, xifra similar al R0 del xarampió (12-18), mentre que els R0 de la poliomielitis i la verola (5-7), la rubèola (6-7), les galteres (4-7) i la diftèria (6-7) són substancialment inferiors¹⁶³. Posteriorment, l'any 2010 es va notificar que el R0 per a la tosferina en cinc països europeus (Finlàndia, Alemanya, Itàlia, Països Baixos i Regne Unit) durant els anys noranta era d'aproximadament 5,5, xifra inferior a l'observada en estimacions d'estudis previs¹⁶⁴.

D'altra banda, pel que fa al temps transcorregut en la presentació dels símptomes entre el cas primari i el secundari, una revisió de l'any 2014 va estimar que l'interval

mitjà des de l'aparició dels símptomes en el cas primari i l'aparició dels símptomes en el cas secundari és de 22,8 dies¹⁶⁵. De la mateixa manera, es va estimar que la taxa d'atac secundari per la tosferina, indicador epidemiològic que s'usa per mesurar la comorbiditat entre les persones que conviuen amb una persona infectada, se situa entre el 80% i el 90%^{166,167}. Addicionalment, un estudi de contactes de casos de tosferina en infants i adolescents de fins a 16 anys dut a terme a l'Hospital Universitari Vall d'Hebron entre els anys 2005 i 2009, va mostrar una prevalença de contactes positius del 33,2%, essent el risc de tenir un contacte positiu 3 vegades superior en el cas dels menors de 6 mesos d'edat¹⁶⁸.

L'anàlisi de les dades epidemiològiques demostren com la vacunació massiva de la població infantil ha provocat un viratge en el patró epidemiològic i la dinàmica de transmissió de la tosferina per grups d'edat (Figura 9). En l'era prevacunal, la tosferina era una infecció típica de la infància, especialment associada a infants de fins a 10 anys, els quals adquirien immunitat natural després de passar la malaltia i posteriorment amb reforços de la immunitat per contacte amb individus infectats al llarg de la seva vida. Els nounats rebien per transferència placentària anticossos protectors materns durant l'embaràs, que posteriorment perdien convertint-se en susceptibles durant la seva infància. Contràriament, les altes cobertures de vacunació infantil característiques de l'era vacunal i la consegüent pèrdua d'immunitat amb els anys, no eviten la circulació de *B. pertussis* entre la població adolescent i adulta. Aquesta població adolescent i adulta jove actual, que van rebre la primovacunació i les dosis de record durant la seva infància, bé sigui amb la immunització a través de les vacunes DTPw com a través de les vacunes DTPa, perden la immunitat quan arriben a l'edat adolescent o adulta jove, especialment aquella població immunitzada amb les vacunes DTPa (Veure apartat 7.ii.). A conseqüència d'això, els nounats no tenen anticossos materns protectors, persistint susceptibles a la infecció fins a l'inici de la vacunació sistemàtica. Tanmateix, els adolescents i els adults joves passen a ser susceptibles a la infecció i capaços de

transmetre-la a altres individus susceptibles, especialment perillós per als infants menors d'1 any¹⁶⁹. És per aquest motiu que, amb la immunització de l'embarassada es persegueix reduir la incidència de la malaltia entre els infants acabats de néixer així com reduir la gravetat i la mortalitat de la tosferina en aquest grup de població¹⁷⁰.

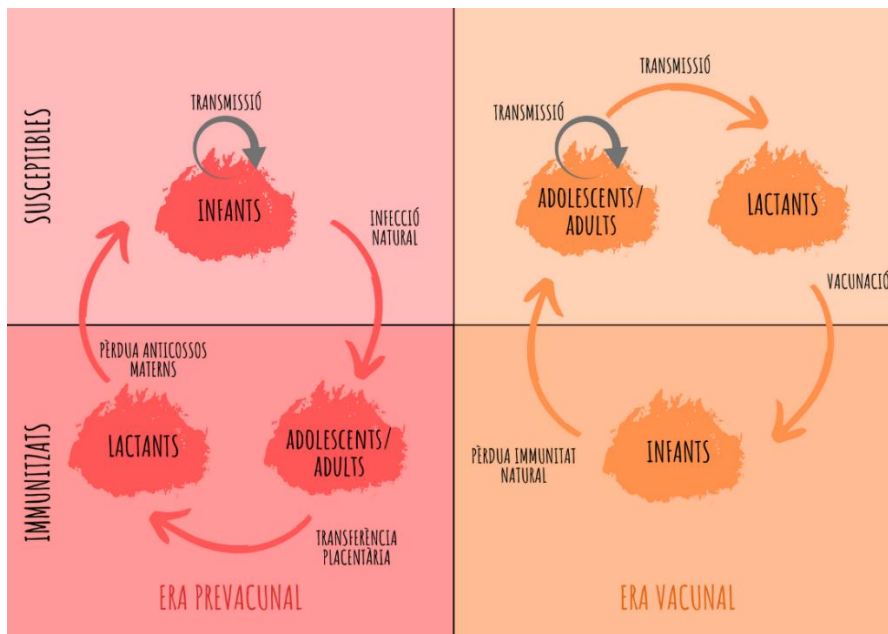


Figura 9. Cicle epidemiològic de *B. pertussis* abans i després de l'ús generalitzat de les vacunes enfront de la tosferina. Figura modificada de Erik L. Hewlett *et al.* 2005¹⁶⁹.

Posant el focus en l'epidemiologia de la malaltia en l'era vacunal, molts països van notificar una disminució dels casos de tosferina des de la introducció de la vacunació. No obstant això, avui en dia també és notori el ressorgiment de la malaltia arreu malgrat les polítiques vacunals establertes i les bones cobertures vacunals assolides. Aquest fenomen no coincideix en el temps a escala global, sinó que es considera que s'ha produït en diferents moments al llarg d'un període de transició de prop de 20 anys. Malgrat la variació espacial i temporal, poden existir grans patrons en

l'epidemiologia de la tosferina que donarien lloc a dues fases recents dominants, un període de declivi que finalitza entre els anys vuitanta i els anys noranta segons el país, seguit del ressorgiment posterior, el qual s'allarga fins a l'actualitat. Les causes de les fluctuacions en l'epidemiologia de la tosferina són, ara com ara, un important tema de controvèrsia entre els experts, encara que molts estudis apunten que l'evolució de *B. pertussis*, l'evanescència de la protecció conferida per les vacunes antipertussiques, la transmissió persistent entre els adolescents i els adults, els quals presenten quadres simptomàtics menys evidents, l'actual disponibilitat de millors proves diagnòstiques ràpides i senzilles, la millora en els sistemes de vigilància que faciliten la notificació dels casos o el recanvi de les vacunes DTPw per les vacunes DTPa podrien explicar el ressorgiment de la tosferina. Altres factors que s'apunten són l'augment de les bosses de subimmunització, les quals condueixen a una acumulació de persones susceptibles d'on poden sorgir brots i les respostes immunes variables entre els grups objectiu, podent-se traduir en la disminució dels nivells d'anticossos protectors en algunes persones. Així doncs, ens trobem actualment davant d'un important augment dels casos i de la incidència global de tosferina⁶.

4. Aspectes clínics

L'espectre de símptomes clínics observats a conseqüència de la infecció per *B. pertussis* i la seva presentació varia segons l'edat del pacient, el grau d'immunitat, l'ús d'antibiòtics i la presència de coinfecció respiratòria^{48,171}.

i. Presentacions clíniques

En els pacients infectats amb *B. pertussis*, el període d'incubació generalment té una durada de cinc a deu dies, tot i que aquest es pot perllongar fins a les tres setmanes. Encara que la malaltia es presenta clínicament en major freqüència com un quadre

tos persistent de llarga durada, el ventall de signes i símptomes associats és molt ampli, variant entre els nadons, els adolescents i els adults. Els infants manifesten una gran varietat de símptomes, des de la malaltia asimptomàtica o lleu del tracte respiratori superior fins a la malaltia greu, amb tos persistent i progressiva que es pot perllongar durant setmanes o mesos. El símptoma clàssic de la tosferina, a partir del qual en deriva el nom de la malaltia, consisteix en la tos violenta amb una expulsió ràpida d'aire dels pulmons, seguida de la posterior inhalació d'aire acompanyada d'un fort soroll. En infants, generalment, el curs clínic de la tosferina progressa a través de tres etapes consecutives després de l'exposició i la incubació, tardant d'entre dos a quatre mesos en completar-se la recuperació (Figura 10)^{172,173}:

- Fase catarral

La tosferina té un inici insidiós amb símptomes catarrals indistingibles dels de les infeccions comunes de les respiratòries superiors, entre els quals s'inclouen la rinitis, els esternuts, la conjuntivitis no purulenta amb llagimeig excessiu, la febrícula, el malestar general i la tos lleu i ocasional, la qual gradualment es converteix en més severa. La fase catarral sol durar de mitjana entre una i dues setmanes. En la fase catarral prematura, la tosferina és altament contagiosa, amb una taxa d'atac secundari d'entre un 80% i un 90% entre els contactes domèstics no immunes. Els pacients no tractats poden transmetre la infecció fins tres setmanes després o més des de l'inici de la tos, disminuint-se ràpidament la transmissibilitat després de la fase catarral^{172,173}.

- Fase paroxística

La tos, que inicialment és intermitent pot esdevenir paroxística. En els casos típics, els paroxismes acaben amb un esforç inspiratori llarg acompanyat d'un agut crit al final o "gall inspiratori", podent anar associats al vòmit posttussigen. Altres símptomes característics d'aquesta fase són la cianosi i el cansament. Els paroxismes de tos, que solen tenir un predomini nocturn, generalment augmenten en freqüència

i gravetat a mesura que avança la malaltia, podent observar-se una mitjana de quinze atacs diaris. La fase paroxística té una durada d'entre tres i sis setmanes, encara que pot persistir fins a les deu setmanes, caracteritzada per un augment de la freqüència de la tos al llarg de les primeres una o dues setmanes, una fase sostinguda de tos durant dues o tres setmanes i una posterior disminució gradual^{172,173}.

- Fase de convalescència

En la fase de convalescència, disminueixen els atacs de tos i la seva intensitat. Aquesta fase té una durada variable d'entre una i dotze setmanes^{172,173}.

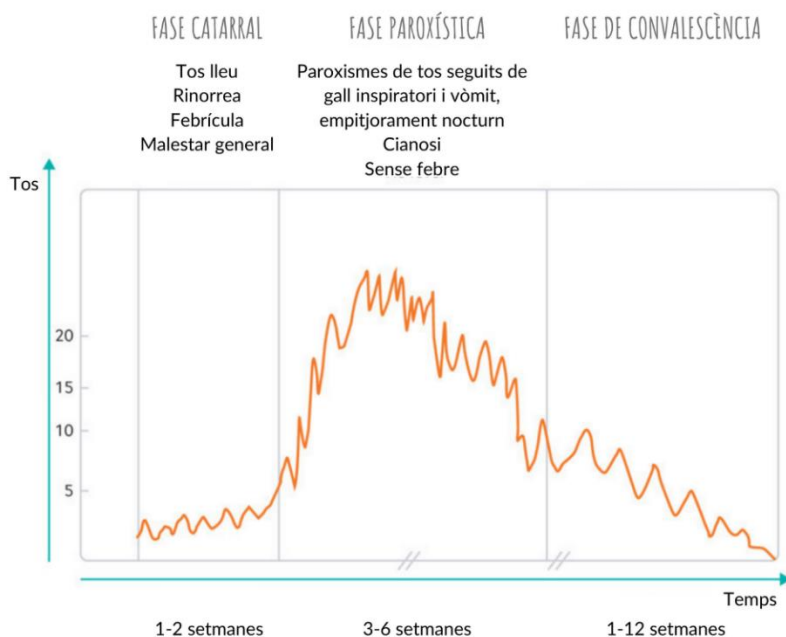


Figura 10. Esquema del curs clínic d'un quadre típic de tosferina. Figura modificada de Dipesh P. Gopal *et al.* 2019¹⁷¹.

Els adolescents i els adults parcialment protegits mitjançant la vacunació poden infectar-se amb *B. pertussis*, presentant manifestacions clíniques atípiques i més

lleus que els afectats en edats infantils. Alguns d'aquests casos poden mantenir-se asimptomàtics, d'altres poden presentar quadres simptomàtics que van des d'un refredat lleu a una tos persistent de més d'una setmana de duració, sense vòmit ni gall inspiratori. De fet, es va arribar a estimar que entre un 12% i un 32% dels quadres de tos de més d'una setmana de durada en adults es deuen a una tosferina¹⁷⁴. De mitjana, la durada de la tos en adults amb tosferina és de 36 a 48 dies¹⁷⁵. Aquestes presentacions lleus i atípiques en adolescents i adults fa que molts casos no es diagnostiquin. És per això que, els adolescents i els adults solen ser, en moltes ocasions la font d'infecció dels infants. En aquest sentit, una revisió sobre la cerca de la font d'infecció en infants menors de 6 mesos, es va concloure que entre un 74% i un 96% dels casos de tosferina estudiats, els familiars es van identificar com l'origen, sent les mares la font d'infecció en un 39% dels casos, els pares en un 16% i els avis en un 5%. De forma més heterogènia, les estimacions per als germans i els contactes fora del domicili com a font d'infecció, van ser del 16-43% i del 4-22%, respectivament¹⁷⁶.

ii. Complicacions de la malaltia

Per als pacients de totes les edats, el reconeixement clínic tardà de la tosferina pot estar associat a una major probabilitat de resultar en complicacions clíniques i seqüeles. En general, els nounats tenen un major risc de patir un quadre de tosferina greu, arribant a estar associat a la insuficiència respiratòria greu o la mort. Al voltant de la meitat dels infants menors d'1 any que contrauen tosferina necessiten rebre atenció mèdica a l'hospital, requerint-se amb més freqüència pels lactants de menor edat^{6,149,151,177-180}.

Les complicacions menys greus són l'anorèxia i la deshidratació, degudes al vòmit i a la disminució de la ingesta. Els efectes de l'augment de la pressió intrapulmonar durant els atacs de tos pot provocar incontinència, pneumotòrax, epistaxis,

hematomes subdursals, hemorràgies subconjuntivals, fractures de costelles, hèrnies i prolapses rectals¹⁸¹. Les complicacions neurològiques, com les convulsions o l'encefalopatia, són rares, succeint en un 0,5-1% dels casos, solen ser el resultat de l'acció directa de les toxines o poden ser conseqüència de la hipòxia, les hemorràgies o les oclusions vasculars secundàries degudes als atacs paroxístmics de tos i els episodis d'apnea. La complicació més greu de la malaltia, la tosferina maligna, es caracteritza per un ràpid progrés a la fallida respiratòria, leucocitosis i limfocitosis severa, manifestacions neurològiques i finalment, hipertensió pulmonar, la qual porta a la mort del pacient en un elevat percentatge de casos malgrat l'aplicació de mesures terapèutiques intensives¹⁸²⁻¹⁸⁷. En lactants i infants petits, la tosferina pot anar acompanyada de la coinfecció amb altres patògens respiratoris. Les sobreinfeccions bacterianes i víriques poden agreujar el curs clínic de la malaltia, podent-se presentar en forma de sinusitis, otitis mitjana i pneumònia. La més freqüent és la pneumònia, la qual pot ser causada també per la pròpia infecció per *B. pertussis*, afecta en major proporció als infants menors de 6 mesos d'edat, especialment als recent nascuts menors d'1 mes d'edat (10-18%)^{181,188}. D'altra banda, el virus respiratori sincicial causa coinfecció en fins al 33% dels infants hospitalitzats per tosferina. El progrés ràpid de la pneumònia i la hipertensió pulmonar pot donar lloc a la fallida cardíaca o a arrítmies cardíques greus^{134,175,188-191}.

Els adolescents i els adults també poden presentar complicacions per la tosferina, però aquestes solen ser menys greus en aquests grups d'edat, especialment en aquells individus que han estat vacunats. Pel que fa als adults, fins al 12% dels casos requereixen hospitalització. Les complicacions en aquest grup solen incloure insomni, apnea, pèrdua de pes, incontinència urinària, síncope i fractura de costelles. Menys freqüentment, s'inclou la pneumònia, l'otitis mitjana i en molt rares ocasions, la mort^{6,192-194}.

iii. Definició de cas

L'OMS defineix com a cas sospitós de tosferina un individu de qualsevol edat amb tos d'almenys dues setmanes d'evolució, un lactant amb tos de qualsevol durada o qualsevol persona en un entorn de brot, sense un altre diagnòstic probable i, bé amb presència d'almenys un dels següents símptomes: paroxismes de tos, gall inspiratori, vòmit posttussigen o vòmit sense una altra causa aparent i apnea en els menors d'1 any, o bé tenint la sospita clínica de tosferina. En aquest últim cas s'ha de tenir en compte que un quadre de tosferina en pacients immunitzats o prèviament infectats pot presentar-se sense els signes clàssics de tosferina, per la qual cosa podria no ser captat per la definició de cas sospitós anterior. D'altra banda, l'OMS estableix que un cas confirmat es pot determinar mitjançant la confirmació de laboratori o per vinculació epidemiològica, definint com a cas confirmat de tosferina un individu que compleix amb la definició de cas sospitós i té confirmació de laboratori, sigui per l'aïllament de *B. pertussis*, sigui per la detecció d'àcid desoxiribonucleic (ADN) genòmic de *B. pertussis* mitjançant l'assaig de reacció en cadena de la polimerasa (PCR), o sigui per la detecció d'alts nivells d'anticossos IgG enfront de la PTX en un individu major d'11 anys després d'almenys un any d'haver rebut l'última dosi de la vacuna. L'OMS especifica que un cas de vincle epidemiològic és aquell individu que compleixi amb la definició de cas sospitós amb un contacte proper a un cas confirmat pel laboratori o a un cas vinculat epidemiològicament a un brot durant les tres setmanes prèvies a l'inici de la tos. En aquest context, s'entén per contacte proper el fet de tenir una exposició directa amb un cas, la qual inclou els convivents o els contactes familiars, individus que han passat la nit a la mateixa habitació que un cas i individus que tenen contacte amb secrecions respiratòries, orals o nasals d'un cas confirmat pel laboratori. Finalment, es defineix com un cas possible de tosferina un individu que coneix un cas sospitós, però que no compleix amb la classificació de cas confirmat definit anteriorment, categoria que s'inclouen els casos sospitosos sense

tenir les proves diagnòstiques realitzades i els casos amb proves diagnòstiques negatives¹⁷².

Els CDC van publicar l'any 2020 que els criteris clínics per considerar una tosferina són, en absència d'un diagnòstic més probable, la presència de tos amb almenys dues setmanes d'evolució i almenys un dels següents signes o símptomes acompanyants: tos paroxística, gall inspiratori, vòmit posttussigen o apnea, sigui amb presència o no de cianosis. De la mateixa manera, els criteris de laboratori per l'evidència confirmatòria poden ser, bé l'aïllament de *B. pertussis* en una mostra clínica o bé la PCR positiva per *B. pertussis* i el vincle epidemiològic com el contacte amb un cas confirmat pel laboratori de tosferina. Amb tot això, s'estableix que es reconeix com a cas probable de tosferina a l'individu que, en absència d'un diagnòstic més probable, compleix amb els criteris clínics de la malaltia o a l'individu que presenta malaltia amb tos de qualsevol durada i almenys la presència d'un dels altres símptomes acompanyants i que és vincle epidemiològic d'un cas de tosferina confirmat pel laboratori. Així mateix, es reconeix com a cas confirmat de tosferina a l'individu que presenta tos aguda de qualsevol durada i que té l'aïllament de *B. pertussis* en una mostra clínica o la PCR positiva per *B. pertussis*¹⁹⁵.

La definició de cas de tosferina revisada l'any 2018 per la UE publicada pel ECDC contribueix a posar de manifest les presentacions atípiques de la malaltia en adults, adolescents i persones vacunades, puntualitzant que és necessari posar el focus en les característiques de la tos, particularment si és de naturalesa paroxística, augmenta durant la nit i ocorre en absència de febre. Addicionalment, aclareix aspectes relatius a la confirmació en el laboratori, considerant criteris confirmatoris de laboratori pel diagnòstic directe l'aïllament de *B. pertussis* o la detecció d'ADN de *B. pertussis* en una mostra clínica, preferiblement en una mostra de la nasofaringe, i criteris confirmatoris de laboratori per diagnòstic indirecte la detecció de resposta d'anticossos específica per a *B. pertussis*, realitzada mitjançant *Enzyme-Linked*

ImmunoSorbent Assay (ELISA) amb la PTX altament purificada i de referència per l'OMS com a estàndard. Tot i això, la UE indica que els resultats de la prova d'anticossos han de ser interpretats d'acord amb l'estat vacunal del pacient enfront de la tosferina, de manera que si aquest està vacunat en els últims anys abans de la recollida de la mostra, el títol d'anticossos específics contra la PTX de *B. pertussis* resultant pot ser conseqüència de, o modificat per, la vacunació prèvia¹⁹⁶.

A Espanya, la definició de cas segons els criteris clínics no difereixen del publicats per l'OMS, els CDC o el ECDC, prèviament descrits. Pel que fa als criteris de laboratori, la RENAVE puntualitza una sèrie de consideracions a tenir en compte en el diagnòstic microbiològic de la tosferina. Aquestes apunten que l'aïllament de *B. pertussis* mitjançant el cultiu és el *gold standard* en el diagnòstic de confirmació de la tosferina i que aquest, s'haurà de realitzar amb una mostra recollida durant les dues primeres setmanes des de l'inici de la tos o fins a una setmana després de l'inici de la tos paroxística, i abans d'iniciar el tractament antibiòtic. D'altra banda, indiquen que la PCR només s'han de realitzar quan la clínica és compatible amb un quadre de tosferina i dins de les dues primeres setmanes després de l'inici de la tos, encara que poden ser útils fins a la quarta setmana. Sobre el diagnòstic serològic, descriuen que és útil especialment davant la sospita de brots i en infants grans i adults que no hagin estat vacunats durant l'últim any, realitzant-se aquest durant les últimes fases de la malaltia. Finalment, pel que fa al criteri epidemiològic, aquest defineix el contacte amb un cas de tosferina confirmat pel laboratori entre sis i vint dies abans de l'inici dels símptomes. Així doncs, els casos es classifiquen en cas sospitosos, si l'individu compleix els criteris clínics, cas probable, si l'individu compleix els criteris clínics i té vincle epidemiològic amb un cas confirmat i cas confirmat si l'individu compleix amb els criteris clínics i de laboratori. A banda, segons la definició de brot, es considera amb l'aparició de dos o més casos de tosferina relacionats i que almenys un d'ells sigui un cas confirmat¹⁹⁷.

De la mateixa manera, a Catalunya, segons l'Agència de Salut Pública de Catalunya (ASPCAT), la descripció clínica de la tosferina es defineix com una malaltia infecciosa que es caracteritza per l'aparició de tos de dues setmanes o més de duració, i atacs de tos o paroxismes tussígens, seguits d'estridor (gall) inspiratori, vòmit posttussigen o apnea. Pel diagnòstic de tosferina, tan sols cal la presència de només un d'aquests símptomes acompanyants de la tos, en absència d'una altra causa aparent. Per la seva banda, els criteris de laboratori per al seu diagnòstic són l'aïllament de *B. pertussis* o la detecció del seu ADN per tècniques d'amplificació en frotis nasofaringi. Addicionalment, l'ASPCAT afegeix l'aclariment que les proves serològiques no estan estandarditzades i que els resultats d'una serologia positiva requereixen sempre d'una avaluació individualitzada. Per considerar un cas confirmat, l'individu ha de presentar la malaltia confirmada pel laboratori o bé aquesta ha de ser clínicament compatible i relacionada amb un cas confirmat mentre que per considerar un cas sospitos, l'individu ha de presentar una malaltia clínicament compatible¹⁹⁸.

5. Diagnòstic microbiològic

La reemergència de la tosferina fa fonamental disposar d'un diagnòstic microbiològic ràpid, estandarditzat, amb una elevada sensibilitat i especificitat, resultat del qual permeti implementar l'antibioteràpia adequada i establir les mesures necessàries per a prevenir la transmissió de l'agent causal. A més, el diagnòstic és especialment important a l'hora d'identificar canvis en l'epidemiologia de la malaltia a conseqüència d'alteracions en l'eficàcia vacunal, la disminució de la immunitat, l'emergència de soques de *B. pertussis* que escapin de la immunitat conferida per la vacuna o per identificar noves espècies de *Bordetella* productores de quadres clínics similars als produïts per *B. pertussis* i per les que les vacunes actualment utilitzades no són útils⁴⁶.

Actualment, hi ha dos tipus d'enfoc en el diagnòstic de laboratori de la tosferina, el diagnòstic directe i el diagnòstic indirecte. Les tècniques de diagnòstic directe (cultiu i reacció en cadena de la polimerasa a temps real (RT-PCR)) sempre són l'opció preferida pel diagnòstic de la tosferina en la seva fase aguda, presentant una major especificitat que la les tècniques de diagnòstic indirecte (serologia). Aquestes últimes es reserven principalment per aquells casos en què han passat quatre setmanes des de l'inici de la tos i, tot i això, el fet que els nivells elevats d'IgG poden ser detectats durant més d'un any després de la infecció natural o de la vacunació, l'ús de la serologia pot comportar la detecció de falsos positius (Figura 11)⁴⁶.

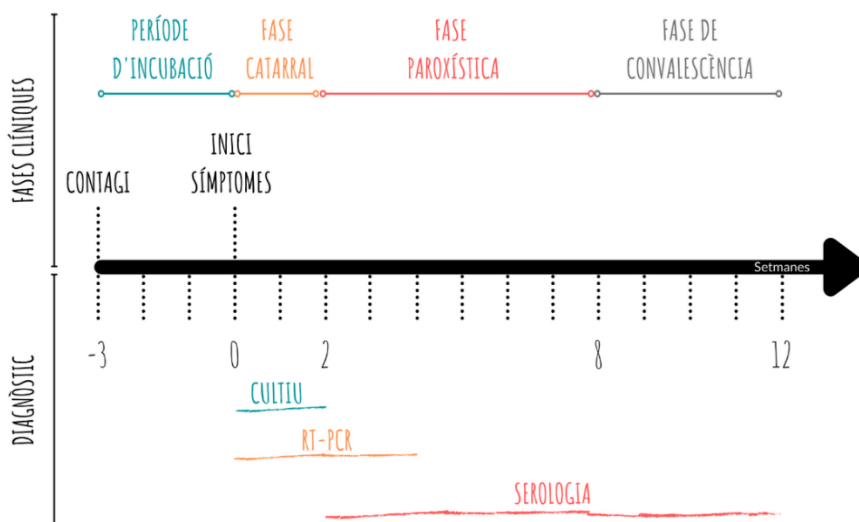


Figura 11. Esquema del moment òptim per a realitzar les proves diagnòstiques en funció del curs clínic de la malaltia. **Figura modificada de Centers for Disease Control and Prevention. Clinical Features i Centers for Disease Control and Prevention. Diagnosis Confirmation**^{199,200}.
 "https://www.cdc.gov/pertussis/clinical/features.html,https://www.cdc.gov/pertussis/clinical/diagnostic-testing/diagnosis-confirmation.html"

Diagnòstic directe

El diagnòstic directe consisteix a identificar el microorganisme responsable de la malaltia, sigui aïllant-lo en cultiu o detectant el seu ADN mitjançant l'ús de les tècniques basades en l'amplificació d'àcids nucleics, com la RT-PCR o les tècniques d'amplificació isotèrmica⁴⁶.

- Cultiu

Tradicionalment, la confirmació de laboratori de la tosferina s'ha realitzat mitjançant l'aïllament del microorganisme responsable per cultiu, sent aquesta la tècnica *gold standard* pel diagnòstic confirmatori de la tosferina²⁰¹. La sensibilitat del cultiu depèn tant de la qualitat de la mostra com del moment en què es recull, relacionant-se l'èxit d'aquest amb la presa de la mostra biològica i el seu transport i emmagatzematge, concretament si aquesta es realitza durant les dues o tres primeres setmanes des de l'inici de la tos i abans de començar el tractament antibiòtic (Figura 11). *B. pertussis* i *B. parapertussis* es poden aïllar de frotis nasofaringis recollits amb hisops d'alginat càlcic o dacró i no de cotó, d'aspirats nasofaringis o d'esputs extrets d'infants, adolescents o adults. Utilitzar l'aspirat nasofaringi augmenta la taxa de positivitat del cultiu, doncs hi ha estudis que demostren que s'obté un guany del 15% en la taxa d'aïllament del microorganisme quan s'utilitza com a mètode de recol·lecció de la mostra en nadons l'aspirat nasofaringi. Després de la recol·lecció, la mostra ha de ser guardada a temperatura ambient (15-30 °C) i transportada ràpidament al laboratori de microbiologia, ja que *B. pertussis* i *B. parapertussis* són bacteris làbils, observant-se un descens considerable de la taxa d'aïllament quan el transport de la mostra es realitza a 4 °C i durant més de 48 h. Pel transport de les mostres, s'han d'utilitzar medis específics de transport que garanteixin la viabilitat del microorganisme, entre els que s'inclouen la caseïna hidrolitzada amb àcid al 1% o el medi Amies amb carbó. Un cop al laboratori, les mostres s'han de sembrar en els medis de cultiu d'enriquiment selectius òptims per aquests microorganismes, podent utilitzar-se els medis Regan Lowe (RL) o Bordet Gengou (BG) suplementats

amb glicerol, peptones i de sang d'ovella (o preferiblement de cavall) desfibrinada, ambdós preparats amb 40 µg/ml de cefalexina per tal d'inhibir el creixement de la microbiota normal present a la nasofaringe. Les plaques sembrades s'incuben en condicions d'aerobiosi durant set dies, a 35-36 °C i amb condicions d'humitat, revisant-se als tres i als set dies posteriors a la sembra. Tot i que *B. pertussis* presenta un creixement més lent en el medi BG, les taxes de creixement del microorganisme passats set dies d'incubació són molt similars entre els medis BG i RL^{46,132}.

En l'examen microscòpic de les colònies crescudes passats tres o quatre dies d'incubació, les colònies típiques de *B. pertussis* o *B. parapertussis* es poden observar en les plaques de BG o RL com a colònies petites (1 mm de diàmetre), similars a gotes de mercuri i lluents. Microscòpicament, tant *B. pertussis* com *B. parapertussis* es poden observar com a petits cocbacils gramnegatius en la tinció de Gram. Per la posterior identificació de *B. pertussis* i *B. parapertussis*, l'OMS fa les següents recomanacions⁴⁶:

- Verificar la puresa del creixement mitjançant una tinció de Gram.
- Comprovar que *B. pertussis* no creix en el medi Agar Sang.
- Determinar les característiques bioquímiques de les colònies, com per exemple, l'oxidasa, la ureasa, el nitrat-reductasa o la utilització de carbohidrats, havent-se mostrat anteriorment les característiques pròpies de cada espècie (Taula 1).
- Realitzar l'aglutinació en portaobjectes amb anticossos monoclonals o policlonals enfront de *B. pertussis* i *B. parapertussis*.

Malgrat les recomanacions que fa l'OMS en relació a l'ús de tècniques basades en característiques bioquímiques o l'ús de tècniques basades en l'aglutinació, a dia d'avui, l'espectrometria de masses MALDI-TOF és una eina àmpliament emprada en molts laboratoris de microbiologia, útil per a la identificació de les diferents espècies del gènere *Bordetella*²⁰².

El cultiu és el mètode de diagnòstic de la tosferina més específic. No obstant, la seva sensibilitat varia àmpliament segons els mètodes emprats per la recollecció i transport de les mostres, així com de factor de l'individu com són la immunització prèvia, l'interval de temps transcorregut des de l'inici dels símptomes, l'ús d'antibiòtics i l'edat, tal i com s'ha descrit anteriorment. Diversos estudis han comunicat taxes de sensibilitat pel cultiu de *B. pertussis* que oscil·len entre el 15% i el 80%, observant-se els percentatges d'èxit més elevats entre els nadons. No obstant a això, tot i el baix rendiment del cultiu, és important continuar realitzant-lo per tal de poder disposar dels aïllats del microorganisme per a estudis d'evolució i adaptació del patogen, així com realitzar la vigilància de la resistència als antibiòtics^{46,132}.

- Reacció en cadena de la polimerasa en temps real (RT-PCR)

El mètodes de detecció d'àcids nucleics com l'assaig RT-PCR són els més utilitzats actualment pel diagnòstic de la tosferina, presentant major rapidesa i una excel·lent sensibilitat en comparació amb el cultiu. La RT-PCR és una tècnica que es pot realitzar a partir de mostres respiratòries sense dependre de la viabilitat del cultiu, la qual cosa permet la detecció del bacteri inclús en aquells pacients amb tos persistent de més de dues o tres i fins a quatre setmanes d'evolució o tractats amb antibiòtics, pels quals el rendiment del cultiu és més baix (Figura 11)²⁰³. A l'hora de recollir la mostra, en aquest cas es prefereix utilitzar hisops de dacró, mentre que tampoc es recomana l'ús d'hisops de cotó, no sent la seva conservació i el seu transport uns factors que limitin l'eficiència de la tècnica. No obstant, també s'ha de tenir precaució alhora d'utilitzar-les ja que, degut a que la RT-PCR detecta material genètic, aquesta pot detectar bacteris no viables. A més, la principal preocupació de l'ús de les tècniques de detecció d'àcids nucleics és la contaminació. És per tot això que s'ha de ser prudent amb els resultats positius per RT-PCR en absència de confirmació clínica, serològica o de cultiu^{46,132}.

Una seqüència d'inserció (IS) és un element genètic mòbil que presenta repeticions de seqüències invertides en els seus extrems i contenen un marc de lectura obert en el que es codifica una transposasa. Es troben en els genomes en múltiples còpies, de manera que són bones per ser considerades objectius per als mètodes de diagnòstic basats en RT-PCR. Encara que hi ha IS específiques per les diverses espècies del gènere *Bordetella*, l'intercanvi de material genètic entre elles fa que actualment moltes d'elles es trobin presents en varies espècies de *Bordetella* spp. a la vegada. Antigament, s'havia assumint que la IS481 i la IS1001 eren específiques de *B. pertussis* i *B. parapertussis*, respectivament, trobant-se la IS481 habitualment en més de dues-cents còpies en el genoma de *B. pertussis* i la IS1001 en aproximadament vint còpies en el genoma de *B. parapertussis*¹³². No obstant, posteriorment, ambdues IS s'han identificat en el genoma d'altres espècies, trobant-se la IS481 present també en el genoma de *B. holmesii* amb un nombre variable d'entre aproximadament deu i cinquanta còpies. De forma addicional, la IS481 es troba també present en un baix nombre de còpies en el 3% dels aïllats de *B. bronchiseptica* pertanyents al clúster I. Per la seva banda, la IS1001 no només es troba en el genoma de *B. parapertussis*, sinó també en el genoma del 29% dels aïllats de *B. bronchiseptica* pertanyents al clúster I. Finalment, la IS1002 es troba present tant en *B. pertussis* com en *B. parapertussis*, amb aproximadament cinc i nou còpies respectivament, i també en poques còpies en algun aïllat de *B. bronchiseptica*²⁰⁴⁻²⁰⁶. Addicionalment a aquestes tres elements, la h-IS1001 és exclusiva de *B. holmesii*, trobant-se en un nombre variable de còpies segons diversos autors, des de tres a cinc còpies fins a aproximadament setanta còpies en el genoma d'aquesta²⁰⁴.

S'han descrit nombrosos assajos de RT-PCR dirigits a la detecció de les diverses IS, inclosos assajos de RT-PCR múltiple contra més d'una diana, presentant tots ells una elevada sensibilitat a causa de la presència de múltiples còpies d'aquests elements en el genoma de les diferents espècies del gènere *Bordetella*. Concretament, les RT-PCRs múltiples per la cerca de les dianes IS481 i IS1001 són àmpliament utilitzades.

Totes elles també presenten una bona especificitat en la detecció de *Bordetella* spp., però tal i com s'ha descrit anteriorment, a causa de la presència d'aquestes dianes en diverses espècies del gènere, al llarg dels últims anys ha sigut necessari incloure dianes addicional per tal d'augmentar l'especificitat de les proves diagnòstiques utilitzades, podent identificar de forma correcte totes les espècies del gènere *Bordetella*. Aquestes solen ser altres IS com la IS1002 o la h-IS1001 o gens de còpia única com el promotor de la toxina pertussis (*Pptx*) i el gen *recA* o gens de funció desconeguda denominats BP0283, BP485 i BP3385, els quals garanteixen l'especificitat de la tècnica tot i que en comprometen la sensibilitat¹³². Breument, el conjunt de dianes utilitzades més comunament pel diagnòstic de *Bordetella* spp. per RT-PCR així com la interpretació suggerida pels resultats es recull a la Taula 3.

Taula 3. Possibles dianes utilitzades pel diagnòstic de *Bordetella* spp. per RT-PCR i interpretació suggerida dels resultats*.

Diana	Present en	Nombre de còpies per genoma	Combinacions de resultats possibles d'una RT-PCR de <i>Bordetella</i>					Interpretació suggerida
			IS481	IS1001	IS1002	ptxP	h-IS1001	
IS481	<i>B. pertussis</i>	50-200	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>Bordetella</i> spp.
	<i>B. holmesii</i>	8/10-49						
	Alguna <i>B. bronchiseptica</i>	<5						
IS1001	<i>B. parapertussis</i>	~20	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	<i>B. pertussis</i>
	Alguna <i>B. bronchiseptica</i>	1-7						
IS1002	<i>B. pertussis</i>	4-9	Pos†	Neg	Pos†	Neg	Neg	<i>Bordetella</i> spp./ <i>B. pertussis</i>
	<i>B. parapertussis</i>	9						
	<i>B. bronchiseptica</i>	1						
h-IS1001	<i>B. holmesii</i>	3/5-69	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	<i>B. parapertussis</i>
ptxP	<i>B. pertussis</i>	1	Neg	Pos†	Neg	Neg	Neg	<i>Bordetella</i> spp./ <i>B. parapertussis</i>
recA	<i>B. holmesii</i>	1	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	<i>B. holmesii</i>

* RT-PCR, reacció en cadena de la polimerasa a temps real; IS481, seqüència d'inserció 481; IS1001, seqüència d'inserció 1001; IS1002, seqüència d'inserció 1002; ptxP, gen que codifica el promotor de la toxina pertussis; h-IS1001, seqüència d'inserció 1001 de *B. holmesii*; recA, gen que codifica la proteïna RecA; Pos, positiu; Neg, negatiu. Dades de Anneke van der Zee *et al.* 1996, Mike J. Loeffelholz *et al.* 2000, Kathleen M. Tatti *et al.* 2011, A. Tizolova *et al.* 2013 i Anneke van der Zee *et al.* 2015^{132,205,207-209}.

† En rares ocasions es podria tractar d'una *B. bronchiseptica*.

Diagnòstic indirecte

El diagnòstic serològic de la tosferina està basat en la detecció d'anticossos específics enfront del microorganisme al sèrum d'un individu infectat. Concretament, la tècnica recomanada per l'OMS és la mesura d'anticossos anti-PTX en un assaig ELISA en el sèrum d'una persona infectada després d'almenys dues o tres setmanes des de l'inici de la tos (Figura 11). A banda dels anticossos anti-PTX, els quals són específics d'una resposta enfront de *B. pertussis*, també es pot realitzar l'assaig serològic mesurant anticossos anti-FHA, anti-PRN, anti-FIM i anti-AC-Hly, sent tots aquests menys específics, ja que pot observar efectes de reactivitat creuada amb anticossos induïts per altres espècies de *Bordetella* o, inclús, per altres espècies bacterianes. És per això que, pel diagnòstic rutinari de la tosferina, es recomana la detecció d'anticossos anti-PTX, sent la PTX un antígen protector important en la resposta immune a la infecció i la immunització. Encara que existeixen proves ELISA per detectar IgG, IgA i IgM enfront de *B. pertussis*, les proves de IgG són les que s'utilitzen amb més freqüència com a proves diagnòstiques i són les més sensibles per a tots els grups d'edat, les millor estandarditzades i les més àmpliament disponibles. En aquest sentit, l'ELISA basat en la detecció de IgG anti-PTX presenta una sensibilitat del 92,2%^{46,132}.

No obstant això, es tracta d'una tècnica no recomanada en el cas dels lactants, ja que, com que són pacients amb sistemes immunitaris immadurs, podrien existir interferències amb els anticossos materns transferits via placentària durant l'embaràs. A més, és possible que els nounats no produeixin una resposta d'anticossos enfront de la PTX. D'altra banda, com que les IgG augmenten de dues a tres setmanes després de la infecció o la immunització primària i una setmana després de la immunització de record, fa difícil distingir entre aquestes dues respostes d'anticossos. És per això que, a menys que es tinguin sèrums emparellats pel diagnòstic serològic que evidencin una seroconversió significativa, tampoc es pot utilitzar com a prova diagnòstica durant l'any següent

a la vacunació, ja que no es detecten diferències entre els nivells d'anticossos produïts a causa de la infecció natural dels produïts per efecte de la vacunació^{132,210}.

6. Tractament

Hi ha una quantitat limitada d'agents antimicrobians disponibles pel maneig d'un quadre de tosferina. A la Taula 4 es descriuen els principals antibiòtics utilitzats pel tractament de la tosferina, juntament amb la dosificació, la pauta de tractament i els possibles efectes adversos o contraindicacions de cadascun⁶.

La selecció de l'antibiòtic pel tractament de la tosferina s'ha de fer d'acord a diverses consideracions com són l'edat del pacient, els efectes o les interaccions adversos relacionats amb el fàrmac, la tolerabilitat, l'adherència al règim de medicació i el cost. D'altra banda, l'eficàcia de la teràpia antibiòtica depèn de l'etapa en què s'administri. En aquest sentit, el paper dels antimicrobians en el tractament de la tosferina quan aquests s'administren de forma tardana en el curs de la malaltia genera certa controvèrsia, doncs el seu paper principal consisteix a disminuir la gravetat i la durada d'aquesta així com en disminuir el període de transmissibilitat i impedir la propagació de la infecció, la qual cosa s'assoleix amb la seva administració de forma primerenca, durant la fase catarral de la malaltia i no quan s'administren durant la fase paroxística. Aproximadament el 80-90% dels pacients amb tosferina no tractada eliminaran de forma espontània la presència de *B. pertussis* en la nasofaringe en un termini de tres o quatre setmanes des de l'inici de la tos. No obstant això, els lactants no tractats ni vacunats poden romandre positius fins més enllà de les sis setmanes^{211,212}.

Taula 4. Agents antimicrobians pel tractament i profilaxi postexposició de la infecció per *B. pertussis**‡.

Agent	Edat	Dosificació	Pauta de tractament	Consideracions
Eritromicina	> 1 mes	<u>> 1 mes:</u> 40 mg/kg/dia (màx. 1-2 g/dia) en 4 dosis <u>Adolescents i adults:</u> 2000 mg/dia en 4 dosis	7-14 dies	<u>Nounats:</u> Interaccions amb fàrmacs metabolitzats pel citocrom P450, poca tolerància <u>Adults:</u> Major risc d'EPHI en nounats, droga de la categoria B per les embarassades segons la FDA
Azitromicina	No restriccions d'edat	<u>< 1 mes:</u> 10 mg/kg/dia (màx. 500 mg) en 1 dosi <u>≥ 6 mesos:</u> 10 mg/kg el dia 1 i 5 mg/kg els dies 2-5 <u>Adolescents i adults:</u> 500 mg el dia 1 i 250 mg els dies 2-5	5 dies (< 6 mesos) o 2-5 dies (≥ 6 mesos i adults)	<u>Nounats:</u> Interaccions amb fàrmacs metabolitzats pel citocrom P450, bona tolerància <u>Adults:</u> Droga de la categoria B per les embarassades segons la FDA
Claritromicina	> 1 mes	<u>≥ 1 mes:</u> 15 mg/kg/dia en 2 dosis (màx. 1g/dia) <u>Adolescents i adults:</u> 1000 mg/dia en 2 dosis	7 dies	<u>Nounats:</u> Tolerància moderada <u>Adults:</u> Interaccions amb fàrmacs metabolitzats pel citocrom P450, droga de la categoria C per les embarassades segons la FDA
Trimetoprim-sulfametoxazole	> 2 mesos	<u>> 2 mesos:</u> 8 mg/kg/dia de trimetoprim i 40 mg/kg/dia de sulfametoxazole en 2 dosis <u>Adolescents i adults:</u> 320 mg/dia de trimetoprim i 1600 mg/dia de sulfametoxazole en 2 dosis	14 dies	<u>Nounats:</u> Tractament de segona línia pels que presenten resistència o intolerància als macròlids

Adults: Droga de la categoria C per les embarassades segons la FDA, contraindicat en dones embarassades i mares lactants

* mg, mil·ligram; g, gram; kg, kilogram; h, hora; màx., màxim; EPHI, estenosi pilòrica hipertròfica infantil; FDA, *Food and Drug Administration*^{6,213,214}.

¥ Droga de la categoria B: els estudis en animals no han demostrat un risc fetal, però no existeixen estudis en humans, o bé, els estudis en animals han demostrat un risc per al fetus que no s'ha confirmat en estudis en humans. Les drogues d'aquesta categoria generalment es consideren segures.

Droga de la categoria C: els estudis en animals han revelat efectes adversos en el fetus, però no hi ha estudis controlats en humans, o bé, no es disposa d'estudis en animals i humans. Les drogues d'aquesta categoria es poden administrar a dones embarassades si el benefici per aquesta supera el risc per al fetus²¹⁵.

Així doncs, la pauta recomanable pel tractament de la tosferina consisteix a administrar antibioteràpia en els majors d'1 any dins les tres primeres setmanes des de l'aparició de la tos i en els menors d'1 any i dones embarassades dins les sis primeres setmanes des de l'aparició de la tos, sent especialment rellevant actuar a curt termini en aquest segon grup. Tot i que el moment òptim per iniciar el tractament enfront de la tosferina i que aquest millori el curs clínic i eviti la transmissió de la infecció és durant la fase catarral de la malaltia, en moltes ocasions, aquest no s'inicia en aquesta fase. És per això que, organismes com els CDC encoratgen als clínics a iniciar el tractament antibiòtic segons el criteri clínic i inclús abans que es coneguin els resultats confirmatoris del laboratori de diagnòstic si hi ha una alta sospita clínica de tosferina, especialment en lactants, els quals corren el risc de patir les formes més greus de la malaltia²¹⁶.

Ni el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ni l'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) han establert avui en dia els límits de susceptibilitat als agents antimicrobians pel tractament de *B. pertussis*, per tant, als laboratoris de diagnòstic microbiològic no se solen realitzar les proves de susceptibilitat corresponents, depenent l'efectivitat de la teràpia de l'estadi de la malaltia en què s'iniciï el tractament^{217,218}. Tot i això, hi ha una història i una experiència considerable tant en la realització de les proves de susceptibilitat als antibiòtics per a *B. pertussis* com en el tractament clínic de la tosferina. D'aquesta manera, encara que les proves per estudiar la sensibilitat de *B. pertussis* als antibiòtics no estan suficientment estandarditzades, es recomanen les proves de susceptibilitat per disc difusió i Etest per l'estudi d'aïllats individuals i les proves de susceptibilitat per disc difusió, Etest o agar dilució per estudis a gran escala, utilitzant-se els estàndards provisionals per la interpretació dels resultats, els quals resten oberts a modificacions o reajustos en futures investigacions²¹³.

i. Macròlids

Els macròlids són els antibiòtics d'elecció pel tractament i la profilaxi postexposició de la tosferina. L'azitromicina és l'únic antimicrobià recomanat per als nounats fins a 1 mes d'edat, la qual presenta un perfil de seguretat elevat i és ben tolerada. No obstant això, els macròlids s'han d'utilitzar amb precaució en aquest grup, ja que hi ha una associació entre l'exposició a l'eritromicina i a l'azitromicina amb un major risc de presentar estenosi pilòrica hipertròfica infantil (EPHI) en nounats, especialment en els lactants menors de 2 setmanes d'edat i quan aquestes són administrades via oral, inclosos aquells casos que la reben indirectament a través de la llet materna. Tot i això, l'azitromicina segueix sent el fàrmac d'elecció pel tractament o la profilaxi postexposició de la tosferina en els lactants menors d'1 mes d'edat, ja que el risc de desenvolupar un quadre de tosferina greu o complicacions potencialment mortals és molt alt. En aquests casos es recomana el control de l'administració de l'antibioteràpia en aquests pacients per tal de detectar de forma prematura l'aparició d'EPHI o altres afectes adversos greus^{211,219-224}. Per als infants i adults, qualsevol dels tres antibiòtics pot ser utilitzat. No obstant això, l'azitromicina i la claritromicina permeten una dosificació menys freqüent, millorant d'aquesta manera l'adherència a la teràpia. A més, l'azitromicina presenta un efecte limitat o nul sobre el sistema del citocrom P450 així com menys interaccions amb altres fàrmacs com si presenten l'eritromicina i la claritromicina, ambdós amb potencial inhibitori del citocrom P450^{211,225}.

En un estudi publicat l'any 2007, en el qual es va fer una revisió de tretze assajos clínics per tal d'avaluar els riscos i beneficis del tractament antibiòtic i la profilaxi postexposició enfront de la tosferina, que incloïa més de 2000 participants, es va observar que l'administració de pautes curtes (azitromicina durant 3-5 dies o claritromicina o eritromicina durant 7 dies) són tan efectives per erradicar la presència de *B. pertussis* de la nasofaringe i prevenir la recidiva com l'ús de pautes llargues (eritromicina durant 10-14 dies)²²⁶.

Avui en dia, se sap poc sobre l'eficàcia de la teràpia antibiòtica d'elecció enfront de la infecció per *B. pertussis* pel tractament de la infecció per *B. parapertussis* i *B. holmesii*, però algunes dades *in vitro* suggereixen que els macròlids serien també efectius per tractar la produïda per ambdues espècies²²⁷.

ii. Altres alternatives terapèutiques

La principal alternativa als macròlids és el trimetoprim-sulfametoxazole, el qual es pot utilitzar en infants majors de 2 mesos d'edat i en adults en casos d'hipersensibilitat o al·lèrgia als macròlids. La seva administració no es recomana a dones embarassades, mares lactants o infants menors de 2 mesos d'edat a causa dels efectes adversos que pot produir a aquests grups²¹¹. D'altra banda, altres famílies d'antimicrobians com són els β -lactàmics (especialment l'ampicil·lina i l'amoxicil·lina), el cloramfenicol, algunes quinolones i algunes tetraciclins han demostrat una bona activitat *in vitro*, tot i que encara són necessaris estudis clínics que demostrin la seva eficàcia com a tractament i profilaxi postexposició²¹⁴. Pel que fa a les quinolones, un únic treball realitzat al Japó va comunicar la detecció de sis aïllats de *B. pertussis* resistents a àcid nalidíxic recollits entre els anys 2004 i 2006, no descrivint-se casos de resistència a quinolones en cap altre treball²²⁸. Contràriament en el cas de l'ampicil·lina i l'amoxicil·lina, el cloramfenicol i les tetraciclins, no s'han descrit, a dia d'avui, casos de resistència en *B. pertussis*^{213,214}.

iii. Profilaxis postexposició

L'ús prudent dels agents antimicrobians per la profilaxi postexposició és útil per erradicar la presència de *B. pertussis* de la nasofaringe en els contactes. Els agents antimicrobians disponibles per realitzar la profilaxis postexposició entre els contactes són els mateixos que es consideren pel tractament de la tosferina. Entre els contactes que han de fer profilaxis postexposició s'inclouen les persones que han

estat en contacte estret amb casos confirmats de tosferina, siguin cohabitants, cuidadors, personal sanitari o qualsevol persona que hagi tingut una exposició directa amb el pacient, hagi compartit espai durant almenys 1 h o hagi tingut contacte amb les seves secrecions respiratòries. En aquests casos, es recomana profilaxis postexposició per a tots els contactes propers asimptomàtics per tal de prevenir l'aparició de casos secundaris, independentment del seu estat vacunal, tot i que la decisió d'administrar-la depèn de factors com la gravetat de la malaltia, la durada i la càrrega de l'exposició i la immunocompetència dels subjectes exposats. Aquells casos propers que siguin simptomàtics s'han de tractar com a nous casos²²⁹.

És aconsellable administrar la profilaxis postexposició en els contactes dins les tres primeres setmanes posteriors a l'exposició, especialment en entorns d'alt risc, utilitzant les mateixes dosis que en el tractament (Taula 4)^{216,229}. En aquest sentit, un estudi dut a terme a Catalunya i Navarra entre els anys 2012 i 2013 conclou que la profilaxi postexposició va tenir una eficàcia global del 43,9% en prevenir la transmissió domiciliària, sent aquesta major quan l'azitromicina es va administrar durant els primers set dies des de l'inici dels símptomes del cas índex. A més, els autors puntualitzen que la profilaxi va ser ineficaç quan es va administrar passats catorze dies²³⁰.

iv. Resistència a macròlids

Pel que fa a la resistència a macròlids, la primera soca de *B. pertussis* altament resistent als macròlids es va detectar l'any 1994 al comtat de Yuma, Arizona. Aquesta es va aïllar d'un infant de 2 mesos d'edat i va mostrar una concentració mínima inhibidora (CMI) a l'eritromicina de $>64\mu\text{g}/\text{ml}$ ^{231,232}. A partir de llavors la detecció de soques de *B. pertussis* resistents als macròlids ha sigut puntual als EUA, Taiwan, la Xina, Iran, Brasil i Japó²³³⁻²³⁸. La primera observació a Europa es va detectar a França l'any 2012. Es tracta d'una soca aïllada d'un infant de 18 dies d'edat, la qual va

mostrar una CMI enfront de l'eritromicina de $>256\mu\text{g}/\text{ml}$ ²³⁹. Recentment, l'augment de la resistència a macròlids en *B. pertussis* ha sigut notable en països com la Xina, on dos estudis que es van dur a terme en els períodes 2012-2013 i 2013-2014, respectivament, van notificar que el 88% i el 92% dels aïllats de *B. pertussis* estudiats van ser resistents als macròlids^{240,241}. Addicionalment i de forma més recent, a Vietnam han notificat que el 19% dels aïllats analitzats entre els anys 2016 i 2018 han sigut resistents als macròlids²⁴². La presència d'aquest elevat nombre d'aïllats de *B. pertussis* resistents als macròlids a la Xina i en altres països com Vietnam s'ha relacionat amb l'abús en l'ús d'aquests antibiòtics en aquests països. S'ha observat que aquestes soques resistents a macròlids posseeixen característiques genètiques particulars com són el *Pptx* de tipus 1 (*ptxP1*) i els *multiple-locus variable-number tandem-repeat types* (MT)s 104, 55 i 195, característiques poc comunes en les poblacions de *B. pertussis* que circulen en l'actualitat en la majoria de països d'occident²⁴²⁻²⁴⁶. No obstant això, diversos estudis duts a terme en altres països com Austràlia, els EUA, el Regne Unit o Finlàndia no han detectat la presència de soques de *B. pertussis* resistents als macròlids²⁴⁷⁻²⁵⁰.

Fins al moment, l'únic mecanisme descrit en *B. pertussis* que li atorga resistència als macròlids és la presència de la mutació A2047G en el lloc d'unió de l'eritromicina, la claritromicina i l'azitromicina en el domini V de l'ARNr 23S, fàcilment detectable per PCR^{251,252}. Malgrat que les soques resistents a macròlids són actualment poc freqüents en molts països i, per tant, els macròlids poden seguir sent considerats el tractament d'elecció a les guies terapèutiques actuals, la vigilància continuada mitjançant la realització d'estudis de sensibilitat segueix sent necessària per tal de poder detectar precoçment la possible aparició de resistències en *B. pertussis* i mirar de prevenir la seva disseminació^{248,250}.

7. Vacunes i immunització

La immunització enfront de la tosferina va sorgir com una possible estratègia eficient per a la prevenció i el control de la malaltia des del moment en què Jules Bordet i Octave Gengou, del *Pasteur Institute of Brussels*, van aconseguir aïllar *B. pertussis* l'any 1906. Charles Nicolle, del *Pasteur Institute of Tunis*, va utilitzar una vacuna viva com a tractament durant una epidèmia de tosferina a Tunísia l'any 1913, la qual va ser la primera d'una sèrie de vacunes que es van desenvolupar al llarg de les dues següents dècades. Els primers estudis de camp els va realitzar Thorvald Madsen, del *Danish State Institute in Copenhagen*, a les Illes Fèroe durant dues grans epidèmies de tosferina que van tenir lloc als anys 1923 i 1929, durant les quals es van immunitzar més de 2000 individus amb una vacuna viva atenuada a baixa temperatura. Aquesta estratègia va disminuir en més del 20% els casos de tosferina entre les persones vacunades en comparació amb les no vacunades, suposant un cert grau de protecció per part de vacuna. A més, es va observar que els símptomes en les persones vacunades que desenvolupaven la malaltia eren menys greus que els observats entre els no vacunats. No obstant això, va descriure dues reaccions mortals passades 48 h de la immunització. Al 1932, Pearl Kendrick i Grace Eldering van començar a treballar en una vacuna inactivada, en la qual van tractar el bacteri amb timerosal i refrigeració per a la seva inactivació. La primera vacuna moderna enfront de la tosferina va ser desenvolupada per Pearl Kendrick i Grace Eldering, del *Michigan Department of Health in Grand Rapids*, l'any 1942. Aquesta es tractava d'una vacuna inactivada de cèl·lules completes combinada amb els toxoides diftèrics i tetànics, la qual va ser aprovada l'any 1943 per la *American Academy of Pediatrics* i utilitzada de forma generalitzada als EUA a partir de l'any 1953²⁵³.

i. Tipus i composició de les vacunes

Les vacunes antipertússiques són vacunes inactivades que tenen diferents tipus de presentació segons el tipus d'antígens immunitzants que contenen. Les vacunes de cèl·lules completes (DTPw), desenvolupades al llarg dels anys trenta, es fabriquen a partir de cultius estandarditzats de soques seleccionades de *B. pertussis* que s'inactiven mitjançant calor i formol mentre que les vacunes acel·lulars (DTPa), desenvolupades al llarg dels anys vuitanta, contenen un o més antígens purificats i inactivats del microorganisme, entre els quals es troben la PTX, la FHA, la PRN, la FIM2 i la FIM3. Per la seva banda, les vacunes DTPa, segons la quantitat d'antigen que contenen, poden ser de càrrega antigènica estàndard (Pa), utilitzades en la immunització primària, o de càrrega antigènica baixa (pa), utilitzades en la immunització de record i en la immunització de l'embarassada. Els agents immunitzants, tant de les vacunes DTPw com de les vacunes DTPa es presenten en una solució salina amb agents estabilitzants i sals d'alumini com a adjuvant, potenciador de la resposta immune. Totes elles són vacunes combinades amb altres antígens que confereixen immunitat enfront d'altres malalties, podent ser trivalents, tetravalents, pentavalents o hexavalents⁶.

A Espanya, la vacunació enfront de la diftèria, el tètanus i la tosferina es va iniciar l'any 1965 a través de dues campanyes anuals, administrant-se en dues dosis en aquells infants que tenien entre 3 mesos i 3 anys d'edat. L'any 1967 es va decidir afegir-hi una tercera dosis. Fruit de l'èxit obtingut amb aquestes actuacions, es va constatar la necessitat de disposar d'un calendari continu de vacunacions, el qual es va implementar l'any 1975 i contemplava la vacunació enfront de la tosferina als 3, 5 i 7 mesos d'edat. L'any 1995 es va aprovar per al següent any un nou calendari sistemàtic de vacunacions per franges, en el qual la pauta d'immunització primària enfront de la diftèria, el tètanus i la tosferina va passar als 2-3, 4-5 i 6-7 mesos d'edat, incorporant-se també la vacunació enfront de la tosferina en la immunització de record situada a la franja de 15-18 mesos d'edat. Fins llavors, les vacunes utilitzades

eren les vacunes DTPw, les quals presentaven un cert perfil de reactogenicitat local i efectes adversos a nivell sistèmic, tals com febres elevades i problemes neurològics, així com la seva eficàcia en la infància variava significativament en funció de diferents factors, com la variabilitat entre lots. És a finals dels anys noranta i principis del segle XXI quan diverses comunitats autònomes van substituir les vacunes DTPw per les vacunes DTPa, començant per la dosi que s'utilitzava als 18 mesos d'edat, considerant-se el període 1998-2005 com la franja de reemplaçament de les vacunes DTPw i la implementació de les vacunes DTPa. A partir de l'any 2000, es va anar incorporant de forma progressiva al calendari vacunal de les diferents comunitats autònomes l'administració d'una cinquena dosi de la vacuna DTPa als 4-6 anys d'edat. L'any 2005 es va substituir definitivament en totes les comunitats autònomes, i per a totes les dosis, l'ús de les vacunes DTPw per les vacunes DTPa. Les vacunes dTpa es van anar incorporant a partir de l'any 2011 en la dosi dels 4-6 anys, després d'observar-se una tendència a una menor reactogenicitat mantenint una immunogenicitat similar. L'any 2012, la dosi de dTpa que anteriorment s'administrava als 4-6 anys es va fixar als 6 anys. Finalment, l'any 2017 es va fixar la immunització primària en dues dosis als 2 i 4 mesos d'edat i la immunització de record en dues dosis als 11 mesos i 6 anys. Aquesta s'administrava amb la composició DTPa en els casos que haguessin rebut anteriorment 3 dosis i amb la composició dTpa en els casos que haguessin rebut 4 dosis prèvies de la vacuna. Enguany, donada la limitada durada de la immunitat enfront de la tosferina, el *Comité Asesor de Vacunas* (CAV) de l'*Asociación Española de Pediatría* (AEP) insisteix en la recomanació d'incloure al calendari espanyol de vacunacions sistemàtiques una dosi de record amb dTpa per als adolescents, aconsellada entre els 12-14 anys. Tot i això, avui en dia, Astúries és l'única comunitat autònoma d'Espanya que des de l'any 2017 inclou en el seu calendari sistemàtic de vacunacions la dosi de dTpa entre els 12-14 anys, tal com recomana l'AEP²⁵⁴. La immunització de l'embarassada a Espanya es va iniciar entre els anys 2014 i 2016 segons cada comunitat autònoma, administrant-se

una dosi per cada embaràs entre les setmanes 27 i 36 de gestació, preferiblement entre les setmanes 28 i 32²⁵⁴⁻²⁵⁶. Pel que fa a la resta de països europeus, s'observen pautes vacunals similars amb lleugeres variacions en el nombre de dosis i els temps d'administració²⁵⁷.

Actualment, l'any 2021, el programa vigent de vacunació a Espanya enfront de la tosferina al llarg de tota la vida inclòs en el calendari de vacunacions sistemàtiques, contempla les següents dosis^{254,255}:

- Vacunació en la lactància: immunització amb tres dosis de DTPa als 2, 4 i 11 mesos, seguint la pauta 2+1 per la que es considera la primovacunació amb dues dosis i una primera dosi de record.
- Vacunació en infants de 6 anys: immunització amb DTPa als menors vacunats als 2, 4 i 11 mesos (pauta 2+1) quan compleixen l'edat de 6 anys. Els menors vacunats als 2, 4, 6 i 18 mesos (4 dosis en total, pauta 3+1) reben una dosi de dTpa.
- Recomanació per part del CAV de l'AEP de la vacunació dels adolescents de 12-14 anys: immunització amb una dosi de dTpa a la franja entre els 12 i 14 anys.
- Vacunació prenatal: immunització de l'embarassada amb una dosi de dTpa en cada embaràs a partir de la setmana 27 de gestació, preferentment en la setmana 27 o 28.

Avui en dia, hi ha diverses vacunes enfront de la tosferina comercialitzades a Espanya (Taula 4)²⁵⁸.

Taula 5. Composició i indicacions de les vacunes enfront de la tosferina comercialitzades a Espanya*.

Nom comercial (Laboratori) Components	Antígens de tosferina	Altres antígens	Indicacions segons fitxa tècnica
Vacunes amb elevada càrrega del component tosferina (Pa)			
Vacunes Hexavalents			
Infanrix Hexa® (GlaxoSmithKline, GSK) DTPa-VPI-Hib-HB	PTX (25 µg) FHA (25 µg) PRN (8 µg)	Toxoide diftèric, Toxoide tetànic, Antigen de superfície del virus de la Hepatitis B, Poliovirus inactivat, Polisacàrid de <i>Haemophilus</i> <i>influenzae</i> tipus b	Immunització primària i immunització de record en lactants i infants entre les 6 setmanes i els 36 mesos d'edat
Hexyon® (Sanofi Pasteur) DTPa-VPI-Hib-HB	PTX (25 µg) FHA (25 µg)	Toxoide diftèric, Toxoide tetànic, Poliovirus inactivat, Antigen de superfície del virus de la Hepatitis B, Polisacàrid de <i>H. influenzae</i> tipus b	Immunització primària i immunització de record en lactants i infants a partir de les 6 setmanes d'edat
Vaxelis® (MSD) DTPa-VPI-Hib-HB	PTX (20 µg) FHA (20 µg) PRN (3 µg) FIM2, FIM3 (5 µg)	Toxoide diftèric, Toxoide tetànic, Antigen de superfície del virus de la Hepatitis B, Poliovirus inactivat, Polisacàrid de <i>H. influenzae</i> tipus b	Immunització primària i immunització de record en lactants i infants a partir de les 6 setmanes d'edat (no estudiada en infants majors de 15 mesos)

Vacunes amb baixa càrrega del components tosferina (pa)

Vacunes Tetravalents

Boostrix Polio® (GlaxoSmithKline, GSK) dTpa-VPI	PTX (8 µg)	Toxoide diftèric, Toxoide tetànic, Poliovirus inactivat	Immunització de record a partir dels 3 anys d'edat i protecció passiva en la primera infància després de la immunització materna durant l'embaràs
	FHA (8 µg)		
	PRN (2,5 µg)		

Vacunes Trivalents

Boostrix® (GlaxoSmithKline, GSK) dTpa	PTX (8 µg)	Toxoide tetànic, Toxoide diftèric	Immunització de record a partir dels 4 anys d'edat i protecció passiva en la primera infància després de la immunització materna durant l'embaràs
	FHA (8 µg)		
	PRN (2,5 µg)		
Triaxis® (Sanofi Pasteur) dTpa	PTX (2,5 µg)	Toxoide tetànic, Toxoide diftèric	Immunització de record a partir dels 4 anys d'edat i protecció passiva en la infància després de la immunització materna durant l'embaràs
	FHA (5 µg)		
	PRN (3 µg)		
	FIM2, FIM3 (5 µg)		

* DTPa, vacuna acel·lular enfront de la diftèria, el tètanic i la tosferina; dTpa, vacuna acel·lular de baixa càrrega antigènica enfront de la diftèria, el tètanic i la tosferina; VPI, virus de la poliomièlitis inactivat; Hib, *Haemophilus influenzae* tipus B; HB, virus de l'hepatitis B; PTX, toxina pertussis; FHA, hemaglutinina filamentosa; PRN, pertactina; FIM2 i FIM3, fimbries de tipus 2 i 3; µg, microgram. **Dades de la Asociación Española de Pediatría, Comité Asesor de Vacunas, Fichas técnicas de Vacunas, Tosferina²⁵⁸.**

ii. Immunogenicitat, eficàcia i efectivitat de les vacunes acel·lulars

Són diversos els assajos clínics que han demostrat que la majoria de vacunes DTPa actualment utilitzades en els diferents programes d'immunització indueixen respostes immunes robustes i bons títols d'anticossos després de la vacunació, mostrant una elevada eficàcia²⁵⁹⁻²⁶². S'han descrit eficàcies per vacunes DTPa multicomponents d'almenys tres components (PTX, FHA i PRN) d'entre el 84-85% en prevenir la tosferina típica i d'entre el 71-78% en prevenir la tosferina lleu²⁶³. De la mateixa manera, s'ha estimat una eficàcia per a una vacuna DTPa de dos components (PTX, FHA) del 85%, el que va dur a la seva aprovació i implementació en els programes de vacunació²⁶⁴. Per la seva banda, la vacuna DTPa d'un sol component (PTX) se segueix utilitzant en països del nord d'Europa, com és el cas de Dinamarca, mostrant una eficàcia del 71%. Un estudi previ va apuntar l'eficàcia absoluta menor de les vacunes DTPa d'un o dos components (67-70%) en comparació amb els valors descrits per les vacunes DTPa de tres o més components (80-84%), ambdues lleugerament inferior amb l'eficàcia absoluta observada per les vacunes DTPw, la qual es va situar de forma heterogènia entre el 37-92%²⁶⁵. No obstant això, la comparació de l'eficàcia entre les vacunes DTPw i DTPa o entre diverses vacunes DTPa no ha dut a tenir conclusions clares, faltant, avui en dia, evidències que donin suport a la superioritat d'una vacuna DTPa respecte d'una altra^{266,267}. Degut a la seva variabilitat, la comparació de l'eficàcia entre les vacunes DTPw i les vacunes DTPa, així com entre les diverses vacunes DTPa amb entre un i cinc components antigènics, no ha permès arribar a conclusions clares. Tot i així, la bona immunogenicitat demostrada per part de les vacunes DTPa, unida a la seva menor reactogenicitat, tant en la primovacunació com en la vacunació de record, van empènyer el recanvi de les vacunes DTPw^{265,268,269}. No obstant això, la pèrdua d'immunitat amb el temps així com l'expansió de clons de *B. pertussis* amb polimorfismes en els antigens inclosos en les composicions vacunals, fa palesa que l'efectivitat vacunal d'aquest tipus de vacunes no és òptima²⁶⁰.

Per la seva banda, en tots els assajos clínics realitzats amb les vacunes dTPa es va observar una adequada resposta immunitària un mes després de la vacunació amb dTPa en el 80% dels adolescents i adults, mentre que en infants s'ha demostrat una immunogenicitat similar a la de les vacunes DTPa i un bon perfil de seguretat^{260,270-274}.

Es desconeix la durada de la protecció conferida per les vacunes DTPa, però se sap que, de la mateixa manera que també ocorre després de patir la malaltia o amb la immunitat adquirida amb les vacunes DTPw, no és de per vida i disminueix amb el temps²⁷⁵. Diverses estimacions apunten que la infecció natural proporcionaria de 7-10 a 20 anys de protecció, mentre que la protecció obtinguda amb la vacunació oscil·laria entre els 4 i els 14 anys. Concretament, s'estima que la protecció conferida per les vacunes DTPw seria aproximadament d'entre 4 i 14 anys mentre que l'adquirida amb la vacunació DTPa duraria al voltant de 5 anys^{275,275-277}. Per tal d'esclarir aquest últim punt, s'estima que per cada any després de l'última dosi rebuda de la vacuna DTPa, la probabilitat de tenir una tosferina augmenta un 27-33%. Addicionalment s'apunta que no existeixen diferències entre diferents esquemes de vacunació (3 dosis o bé 5 dosis de DTPa) i que es podria estimar la durada de la immunitat després de la vacunació en una mitjana de 3 anys, mantenint-se protegits tan sols el 10% dels infants passats 8,5 anys de l'administració de l'última dosi^{275,277,278}. De la mateixa manera, uns altres treballs, estimen que la probabilitat de contraure una tosferina augmenta de mitjana un 42% cada any després d'haver-se rebut l'última dosi de vacuna DTPa. Així doncs, una efectivitat inicial del 95% disminuiria al 71% passats cinc anys després de rebre l'última dosi mentre que una efectivitat inicial del 90% es reduiria al 42% en el mateix període de temps. Entre els infants de 5 a 9 anys, l'eficàcia superaria el 75%, aproximadament, i més del 65% dels infants romandrien immunes a la tosferina passats cinc anys de la darrera dosi de DTPa^{279,280}. A conseqüència d'això, la immunitat conferida per la vacunació és minvant en el temps, fent que els infants

grans, els adolescents i els adults siguin susceptibles a la infecció per *B. pertussis*, justificant-se, per tant, la necessitat d'administrar dosis de record entre els adolescents i els adults per tal d'aconseguir una adequada protecció per a tots els grups d'edat^{275,279,281-283}. D'altra banda, encara que molts casos de tosferina ocorren en individus vacunats, la gravetat de la malaltia i la presència de complicacions sembla estar fortament relacionada amb el temps transcorregut des de la vacunació o de l'episodi d'infecció natural, així com amb al fet de no rebre les dosis corresponents a l'edat recomanada segons un esquema vacunal adequat²⁸⁴.

iii. Immunització de l'embarassada

Entre els anys 2008 i 2011, el 83% de les morts per tosferina registrades pels CDC van tenir lloc entre els lactants menors de 3 mesos d'edat¹⁶⁰. A més, diversos estudis duts a terme en diferents països apunten que els convivents són la principal font d'infecció per la tosferina en els infants^{126,134,176,285-291}. A causa de la transmissió contínua de la tosferina entre la comunitat i els infants recents nascuts, els quals no poden ser immunitzats enfront de la tosferina, i amb l'objectiu de reduir la gravetat i la mortalitat associades a la tosferina durant els primers mesos de vida, l'*Advisory Committee on Immunization Practices* (ACIP) dels CDC van proposar l'any 2011 l'administració de les vacunes dTpa a les dones embarassades i persones de contacte com una de les principals estratègies de prevenció de la tosferina en aquest grup, sent aquesta segura i immunogènica^{170,292-294}. L'estratègia tenia el doble propòsit de generar protecció directa a les mares i prevenir la infecció i la transmissió al recent nascut i de proporcionar protecció indirecta del lactant mitjançant la transferència passiva a través de la placenta d'anticossos al fetus. D'aquesta manera, els EUA es van convertir en el primer país en introduir la vacuna de la tosferina en l'embarassada, amb una dosi de dTpa entre les setmanes 27 i 36 de gestació. L'efectivitat estimada de la vacuna en la prevenció de la tosferina durant els dos

primers mesos de vida en els lactants va ser del 91,4%, i del 69% durant els dotze primers mesos²⁹⁵. De la mateixa manera que els títols d'anticossos disminueixen passat un any de la vacunació amb dTpa en adults sans, els títols d'anticossos antipertússics materns també disminueixen de forma ràpida²⁹⁶⁻²⁹⁸. Per aquest motiu, les recomanacions de la immunització amb dTpa recau des de l'any 2012 en totes les dones embarassades i en cada embaràs, independentment de l'interval transcorregut entre aquests i de la prèvia recepció d'una dosi de dTpa, demostrant-se una transferència d'anticossos eficient a través de la placenta, malgrat que els títols d'anticossos no siguin els òptims ni de llarga durada²⁹⁹⁻³⁰¹.

A Europa, l'any 2012 el Regne Unit va ser en primer país que va introduir la vacuna dTpa a les dones embarassades, aconseguint una cobertura del 64% en el primer any d'implementació i una efectivitat de la vacuna del 91% en la prevenció de la tosferina duran els dos primers mesos de vida³⁰². Amb la introducció de l'estratègia es va observar un menor risc de contraure tosferina entre els lactants nascuts de mares vacunades, sense detectar-se un major risc de part prematur, mort fetal, mort materna o neonatal o altra complicació posterior a la immunització en aquest grup. Altres estudis duts a terme també al Regne Unit arran de la introducció de la vacuna dTpa a la dona embarassada, han situat l'efectivitat d'aquesta entre el 90-95%³⁰³⁻³⁰⁵. No obstant això, estudis duts a terme posteriorment en diversos països, han registrat valors d'efectivitat dels programes de vacunació enfront de la tosferina en gestants més heterogenis, amb valors d'entre el 69-91%³⁰⁶⁻³¹¹. L'any 2016, el departament de salut del Regne Unit, seguint l'evidència tranquil·litzadora d'un estudi suís, el qual demostrava una immunogenicitat adequada de la vacuna quan aquesta s'administrava en etapes primerenques de l'embaràs, va actualitzar les recomanacions de la vacunació prenatal per aconsellar-la en qualsevol moment entre la franja de les 16-32 setmanes de l'embaràs³¹². De fet, la immunització primerenca durant el segon trimestre de l'embaràs s'ha associat a títols més alts d'anticossos transferits enfront de la PTX i la FHA que els estimats quan la vacunació

es realitza a partir de la setmana 25 de l'embaràs. Tot i això, el moment òptim per fixar la immunització de l'embarassada encara genera certa controvèrsia^{312,313}.

A Espanya, la Comissió de Salut Pública va aprovar el programa de vacunació de l'embarassada l'any 2015, encara que aquest ja s'havia implementat en algunes comunitats com Catalunya, Navarra i Astúries l'any 2014. Des de llavors, el calendari sistemàtic de vacunació de l'embarassada inclou una dosi de dTpa entre les setmanes 27-28 i 36 de l'embaràs, idealment entre les setmanes 28 i 32. En aquells casos en què hi hagi una sospita de prematuritat, la immunització de l'embarassada es pot realitzar des de la setmana 16 de gestació, preferiblement a partir de la setmana 20 de l'embaràs. De la mateixa manera que les recomanacions prèvies en altres països, s'indica la vacunació de les dones en cada un dels embarassos, independentment de l'estat vacunal anterior³¹⁴. La introducció de la immunització de l'embarassada a Espanya va suposar una reducció de la incidència d'hospitalitzacions per tosferina en el lactants, sent significativament menor en aquelles regions que van adoptar l'estratègia amb anterioritat. S'ha descrit una taxa d'hospitalització de 195,5 casos per cada 100.000 habitants i de 119,5 casos cada 100.000 habitants als anys 2016 i 2017, respectivament, xifres que no s'havien observat des d'anys anteriors al 2011¹⁴⁹. Des de l'any 2012, la raó de taxa d'incidència (RTI) comparant el grup d'edat en el que s'espera la reducció de la malaltia (<3 mesos) amb un altre grup d'edat en el que no s'espera la reducció de la malaltia (3-11 mesos) s'ha vist reduïda de forma progressiva, passant de 7,5 al 2012 al 2,2 al 2016, anticipant-se el descens en aquelles comunitats autònomes que van implementar la immunització de l'embarassada abans de mitjans de l'any 2015¹⁴⁷. A Espanya es disposa actualment de tres vacunes dTpa indicades per la immunització de l'embarassada enfront de la tosferina (Taula 5)²⁵⁸.

Tot i la introducció de la l'estratègia de la immunització de l'embarassada, inicialment hi va haver certes preocupacions referent a seva l'aplicació, com són que

la seguretat de les vacunes dTpa tant per les mares com pels lactants no s'havia avaluat de forma exhaustiva, que l'elevada concentració d'anticossos tramesos a través de la placenta podria minimitzar la resposta immune induïda per la immunització enfront de la tosferina en el lactant, la possible interferència entre els anticossos materns i els anticossos generats pel lactant després de la seva vacunació, que la immunitat passiva enfront de la tosferina no permetria assolir una immunitat col·lectiva suficient per a protegir els lactants de les exposicions de la comunitat i que la durada de la protecció conferida per la transferència d'anticossos materns és tan breu que no té un impacte en la morbiditat de la tosferina fora de la infància^{301,315-317}. Alguns d'aquests aspectes han sigut abordats en diversos estudis, observant-se títols d'anticossos de 2 a 20 vegades superiors en el grup de dones vacunades i títols d'anticossos de 3 a 36 vegades més alts en el cordó umbilical del grup de dones vacunades. També s'han observat concentracions adequades d'anticossos en aquells lactants amb mares vacunades durant l'embaràs, inclús després de rebre la primera dosi de les vacunes DTPa, mostrant una major resposta immunitària en néixer i dos mesos després. No obstant això, s'han observat lleus disminucions en la resposta immune després de completar la immunització primària amb les vacunes DTPa en aquells infants amb mares vacunades, sense identificar-se diferències en la resposta immune després de completar la immunització de reforç. Tot i que s'ha descrit un petit augment en la incidència de corioamnionitis en gestants vacunades, troballa que no ha sigut corroborada, no s'han observat reaccions greus associades a les vacunes dTpa en les mares, els fetus o els lactants, com ara prematuritat, ruptura prematura de membranes, retràs en el creixement intrauterí o malformacions. Estudis addicionals han suggerit que no hi ha evidència d'interferència entre els anticossos materns induïts per les vacunes dTpa i la immunització amb les vacunes DTPa en els lactants^{301,304,318-321}.

Actualment, la immunització de l'embarassada és considerada l'estratègia més eficaç per prevenir la tosferina en els lactants nounats que encara no poden ser

vacunats, per davant d'altres estratègies com la immunització dels contactes propers, observant-se una bona correlació entre les concentracions de IgG després de la vacunació materna i les observades en el cordó umbilical³²². En les seves guies, els CDC recomanen l'ús de les vacunes dTpa durant cada embaràs amb l'administració d'una dosi entre les setmanes 27 i 36 de gestació, preferiblement durant la primera part d'aquest període per tal de maximitzar la resposta d'anticossos materns i la transferència passiva d'aquests a l'infant. D'altra banda, posen èmfasi en el fet que l'ús de les vacunes dTpa després del part no és l'òptim, ja que es perd l'efecte d'immunització al lactant, el qual queda vulnerable enfront de la infecció i les complicacions greus de la malaltia³²³. A Europa, segons dades de l'any 2019, la vacunació de la dona embarassada està en vigor a divuit països, diferint entre ells els temps gestacionals en què s'administra. Per exemple, en països com Àustria, Liechtenstein, Suïssa o Luxemburg, la immunització de l'embarassada està indicada a partir de la setmana 13 de l'embaràs mentre que a Dinamarca aquesta s'administra a partir de la setmana 32 de gestació²⁵⁷.

iv. Cobertures vacunals

La cobertura vacunal és un dels indicadors utilitzats per avaluar i monitorar els programes de vacunació utilitzats. L'OMS ha estimat una cobertura vacunal enfront de la tosferina a escala mundial per a les tres primeres dosis en infants menors d'un any del 85% l'any 2019, sent superior al 90% en la majoria de països. Els països amb cobertures vacunals inferiors al 80% es troben principalment a l'Àfrica, Sud-amèrica i Sud-est asiàtic (Figura 12)³²⁴.

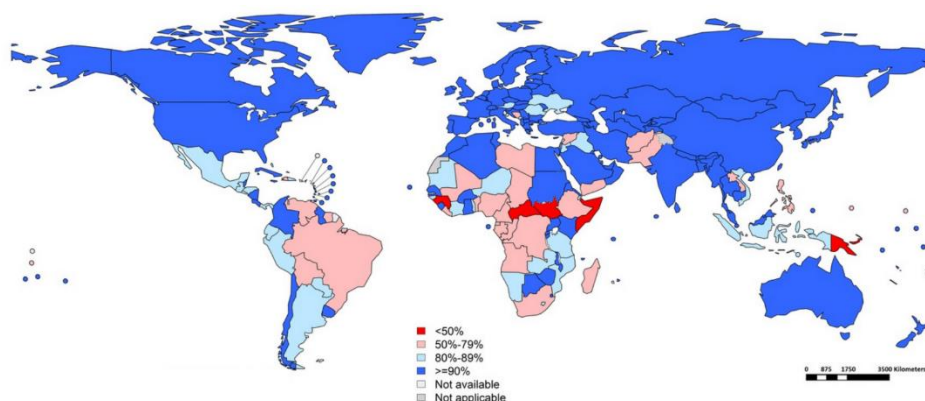


Figura 12. Cobertura vacunal estimada per l'any 2019 a escala mundial per a la immunització primària enfront de la tosferina. **Figura modificada de la *World Health Organization: Immunization, Vaccines and Biologicals Programme. Pertussis [Internet]. Geneva (Switzerland): The Organization; [updated 2020 Aug14]***¹²¹. "https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/pertussis/en/"

A Espanya la cobertura vacunal de la immunització primària es manté per sobre del 95% des de fa més de vint anys, d'ençà que l'any 1999 va ser del 95,1%. Pel que fa a la immunització de record, la cobertura vacunal de la primera dosi ha oscil·lat entre el 89,5% i el 95,5% en el període 1998-2019, mentre que la cobertura vacunal de la segona dosi de record ha oscil·lat entre el 81,1% i el 91,6% des de l'any 2005³²⁵.

Els programes d'immunització de l'embarassada es van iniciar a Espanya l'any 2014 en funció de la situació epidemiològica i la disponibilitat de les vacunes en cada comunitat autònoma, aprovant-se la recomanació l'any 2015. Des de l'any 2016 la immunització de l'embarassada es realitza en totes les comunitats autònomes, amb una cobertura nacional per l'any 2016 del 81,6%, amb un rang de 52%-88,6% entre les catorze comunitats autònomes que van aportar dades. El percentatge de dones embarassades que van rebre la vacuna dTPa en el conjunt d'Espanya durant l'any 2019 ha estat del 83,6%, registrant-se una cobertura vacunal del 82,8% a Catalunya aquell mateix any^{147,325}.

8. Immunitat

Més de cent anys després que Bordet i Gengou identifiquessin *B. pertussis* com l'agent causal de la tosferina, encara existeixen aspectes que es desconeixen en relació a com el microorganisme causa la malaltia o els mecanismes pels quals la immunitat de l'hoste o la vacunació confereixen protecció a la infecció³²⁶.

i. Immunitat natural

Tal com s'ha comentat prèviament, *B. pertussis* expressa múltiples factors de virulència que, o bé contribueixen directament a la seva patogènesi, o bé tenen un efecte immunomodulador sobre l'hoste. La interfície entre la resposta immune innata i l'adaptativa és clau pel reconeixement de *B. pertussis* i el control de la infecció que produeix (Figura 13). Durant el procés d'infecció natural, el reconeixement dels antígens bacterians per part dels receptors de les cèl·lules epitelials de la mucosa i de les cèl·lules immunitàries innates, com ara, els macròfags i les cèl·lules dendrítiques, condueixen a l'activació d'una cascada immunològica que inclou l'alliberació de molècules proinflamàtores, com són algunes interleuquines (IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-12, IL-23), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) i l'interferó de tipus 1 (IFN-I), les quals actuen en processos com la protecció enfront de la disseminació sistèmica o l'activació de la fagocitosi, així com molècules antiinflamàtores (IL-10). Les cèl·lules B i les cèl·lules T CD4+ són les principals cèl·lules efectores que brinden protecció enfront de les infeccions per *B. pertussis*. Les cèl·lules T CD4+, a més del seu paper en la producció d'anticossos, proporcionen també protecció a través d'un mecanisme independent d'anticossos³²⁶. Això es va observar a finals dels anys 90 quan es va demostrar la producció de citocines per part de les cèl·lules T productores d'interferó gamma (IFN- γ) a sang perifèrica en nens que s'havien recuperat d'un quadre de tosferina³²⁷. La rellevància d'aquestes cèl·lules va ser definida per l'observació que els clons de cèl·lules T CD4+ de memòria

generats a partir de les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (CMSP) en adults prèviament infectats, secretaven IFN- γ , induïen activitat antimicrobiana a les cèl·lules fagocítiques i facilitaven l'opsonització per part de les cèl·lules B. Això suggeria que les cèl·lules T CD4+ contribuïen a la protecció de la colonització per *B. pertussis* a través de mecanismes dependents d'IFN- γ ³²⁸. Addicionalment, avenços més recents en l'estudi de les respostes de tipus Th17 han ampliat la comprensió de la resposta immune cel·lular enfront de la tosferina. La producció de citocina IL-23 per part de les cèl·lules dendrítiques durant la infecció per *B. pertussis*, promotora de l'acció de les cèl·lules Th17, va suggerir la importància de la resposta Th17 en la protecció després de la infecció^{329,330}. Estudis duts a terme en models babuïns van aportar més proves de la rellevància de les respostes Th1 i Th17 enfront de la infecció i colonització per *B. pertussis*, observant-se fortes respostes de tipus Th1 i Th17 que van resultar en la protecció contra els signes clínics de la malaltia³³¹⁻³³³. A banda, s'ha constatat que la inducció de les cèl·lules de memòria residents als teixits (Tmr) productores d'IFN- γ i/o IL-17 observades en els pulmons de ratolins després de la infecció, juga un paper important en la memòria a llarg termini després de la infecció per *B. pertussis* en el model murí. Addicionalment, s'ha detectat en models animals la ràpida expansió de les cèl·lules Tmr al teixit pulmonar després de la reinfecció³³⁴⁻³³⁶.

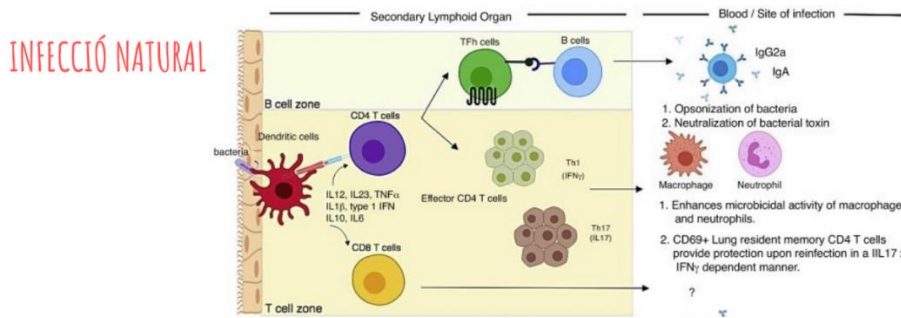


Figura 13. Procés immunològic induït per la infecció natural de *B. pertussis*. Figura modificada de Parul Kapil *et al.* 2019³²⁶.

ii. Immunitat vehiculada per vacunes

Els treballs que han comparat les respostes immunològiques induïdes per la infecció per *B. pertussis* i per la immunització amb les vacunes DTPw i les vacunes DTPa han demostrat que l'estimulació del sistema immunològic per part de les vacunes DTPa és diferent del de la infecció natural i la immunització a través de les vacunes DTPw (Figura 13 i 14)^{266,281,326,337}. Els estudis immunològics desenvolupats al llarg dels últims vint anys suggereixen que el paper que juga la immunitat cel·lular és essencial per la resposta immunitària enfront de la tosferina que s'origina a conseqüència de la immunització amb les vacunes antipertússiques, siguin DTPw o DTPa^{327,338–340}.

Els estudis comparatius de les dues vacunes demostren que, tant les vacunes DTPw com les vacunes DTPa indueixen fortes respostes d'anticossos enfront dels antígens de *B. pertussis*. Les vacunes DTPa, les quals estan formulades amb un únic adjuvant i amb un conjunt limitat d'antígens, estimulen un perfil de resposta immunitària diferent, sent més restringida que les respostes originades per les vacunes DTPw o la infecció natural, amb les quals, l'organisme s'enfronta a una àmplia gamma d'antígens i adjuvants. Per una banda, els individus que han rebut les vacunes DTPw presenten alts títols d'anticossos de les subclasses IgG1, IgG2 i IgG3, amb la producció marginal de IgG4 mentre que aquells individus que han rebut les vacunes

DTPa mostren una resposta esbiaixada d'anticossos, amb la producció d'elevats títols d'anticossos IgG1 i IgG4, el qual és un primer mecanisme per explicar la menor eficàcia de les vacunes DTPa en comparació amb les vacunes DTPw (Figura 14). Els anticossos IgG4 no són capaços d'activar el sistema del complement, de manera que condueixen a una resposta inflamatòria subòptima. Les evidències apunten a que cada una de les dosis de vacuna DTPa rebuda fa augmentar la producció de IgG4, fet que sembla estar relacionat amb la tendència que la protecció conferida per les vacunes DTPa després de cada dosis de reforç és menor^{330,341,342}.

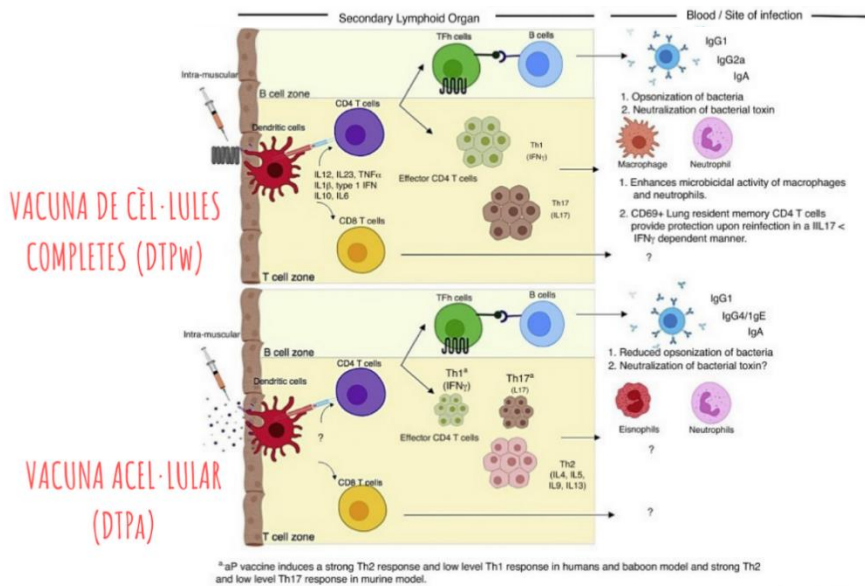


Figura 14. Immunitat induïda per la immunització amb les vacunes DTPw i DTPa. Figura modificada de Parul Kapil *et al.* 2019³²⁶.

D'altra banda, pel que fa a la resposta immune cel·lular, els individus vacunats amb les vacunes DTPw o DTPa presenten diferències evidents en la polarització d'aquesta, de manera que les cèl·lules T CD4+ d'aquells individus que han rebut les vacunes DTPw produeixen elevats nivells d'IFN- γ i IL-17, associats a una resposta limfocitària de tipus Th1 i Th17, respectivament, mentre que les cèl·lules T CD4+

d'aquells individus que han rebut les vacunes DTPa expressen alts nivells d'IL-4 i IL-5 i baixes quantitats d'IFN- γ , associats a una resposta limfocitària de tipus Th2 (Figura 14)³⁴³. Com que les citocines Th1 juguen un paper important en la immunitat enfront de la tosferina, aquesta troballa explica que tant la infecció natural com les vacunes DTPw ofereixin una millor protecció en comparació a les vacunes DTPa^{327,344}. La contribució relativa de les respostes cel·lulars Th1, Th2 i Th17 a la protecció vehiculada per les vacunes difereix lleugerament entre espècies. En ratolins, la vacunació DTPa indueix la producció d'IL-4, IL-5 i IL-17 per part dels limfòcits T CD4+, d'acord amb la polarització d'una resposta de tipus Th2/Th17, mentre que la vacunació DTPw indueix una resposta de tipus Th1/Th17, amb la consegüent producció d'IFN- γ i IL-17^{330,339,345}. El paper de les cèl·lules Th1 i Th17 en l'eliminació de *B. pertussis* a través de la producció d'IFN- γ i IL-17 ha estat àmpliament demostrat en estudis que han utilitzat ratolins deficients en citocines i receptors específics, demostrant-se el motiu d'una immunitat més curta induïda per les vacunes DTPa en comparació amb la immunitat derivada de la infecció natural o la immunització amb les vacunes DTPw³⁴⁶. En babuïns, la vacunació DTPa va donar com a resultat, fortes respostes de tipus Th2, conferint protecció enfront de la malaltia simptomàtica, però sense aconseguir prevenir la colonització asimptomàtica, el transport o la transmissió als animals cohabitants, posant-se en dubte la generació d'una immunitat col·lectiva, mentre que la vacunació DTPw va induir fortes respostes de tipus Th1/Th17, conferint protecció enfront de la malaltia i l'eliminació ràpida de la infecció^{333,347}. En humans, després de la immunització amb vacunes DTPw o després de la infecció natural es generen nivells moderats o alts d'IFN- γ . Contràriament, després de la immunització amb les vacunes DTPa es produeixen alts nivells d'IL-4 i IL-5, la qual cosa reforça que la vacunació DTPa indueix fortes respostes de tipus Th2 en humans, fenomen similar al descrit en el model babuí^{338,348,349}. Tot i que hi ha una carència en la inducció de la resposta de tipus Th17 en humans després de la immunització infantil amb vacunes DTPa, un estudi recent ha demostrat la presència

d'elevats nivells d'IFN- γ i IL-17 després de la revacunació amb DTPa en aquells infants que havien rebut vacunes DTPw durant la primovacunació i alts nivells d'IL-4 i IL-5 després de la revacunació amb DTPa en aquells infants que havien sigut immunitzats amb vacunes DTPa durant la primovacunació. A més, la protecció després de les dosis de reforç és més curta en aquelles persones que han rebut DTPa en la primovacunació, explicant-se d'aquesta manera l'augment de la incidència de tosferina observada entre els adolescents i els adults^{342,350,351}. Concretament, els estudis il·lustren la importància d'administrar les vacunes DTPw durant la primovacunació dels individus, ja que s'ha observat que aquest grup és el que ha presentat una menor incidència de la malaltia, independentment del tipus de vacuna utilitzada en les dosis de record d'aquests individus³⁵².

La infecció natural per part de *B. pertussis* evoca una resposta immune tant a les mucoses com a nivell sistèmic mentre que les vacunes, que s'injecten per via intramuscular, indueixen una resposta a nivell sistèmic. Com que *B. pertussis* és un patògen que es localitza estrictament a les mucoses i només causa infecció fora del sistema respiratori de forma excepcional en pacients altament immunodeprimits, aquesta diferència és rellevant alhora de controlar la infecció a nivell immunològic. L'hàbitat de *B. pertussis*, localitzat estrictament a nivell de mucoses, suggereix que la immunitat de les mucoses és essencial per tal de prevenir la colonització i la transmissió de *B. pertussis*. A conseqüència d'això, les estratègies preventives com la immunització a través de vacunes DTPa, les quals no indueixen una resposta a nivell de mucoses, poden prevenir el desenvolupament de la malaltia però no poden evitar la infecció ni la transmissió. Estudis duts a terme amb animals han demostrat que la infecció natural s'associa a una forta resposta de IgA secretora a les vies respiratòries superiors i inferiors, així com la inducció de les cèl·lules T_H1, especialment aquelles que produeixen IL-17, la qual cosa es correlaciona a una protecció persistent enfront de la colonització de la nasofaringe^{336,353}. Addicionalment, de forma recent s'ha descrit que la IL-17 i les cèl·lules CD69+ CD4+

que secreten IFN- γ s'expandeixen a través del tracte respiratori després de l'exposició de ratolins immunitzats amb vacunes DTPw a *B. pertussis*, fenomen que no s'ha observat amb les vacunes DTPa. El conjunt d'observacions suggereixen que la falta d'una resposta immune a les mucoses després de la immunització amb vacunes DTPa podria explicar la seva menor eficàcia en comparació amb les vacunes DTPw, així com la protecció de curta durada que presenten en comparació a la les vacunes DTPw o a la infecció natural^{327,339,340,354}. Aquestes observacions fan plausible que l'estat de portador asimptomàtic juga un paper essencial en la transmissió i circulació de *B. pertussis* i que, juntament amb la disminució de la durada de la protecció d'aquells individus vacunats amb vacunes DTPa, han contribuït a condicionar l'actual epidemiologia de la tosferina^{333,355}. Encara que la protecció de grup induïda per les vacunes DTPa és qüestionable, són necessaris estudis addicionals que avaluin altres models i proporcionin evidències convinents sobre la immunitat col·lectiva generada per les vacunes DTPa enfront de la tosferina.

L'associació que es fa del canvi de vacuna amb el ressorgiment de la tosferina, combinada amb una major comprensió de les diferències entre la immunitat conferida per les vacunes DTPw i la conferida per les vacunes DTPa, subjecta la hipòtesi que l'augment en la incidència de la tosferina és, en part, una conseqüència del reemplaçament de les vacunes DTPw per les vacunes DTPa. Altres factors que poden estar influïnt en l'actual epidemiologia de la malaltia és l'acumulació d'individus susceptibles en bosses de subimmunització així com la presència de respostes immunes variables en alguns grups com ara, les dones embarassades o els adolescents. Per aquesta raó, s'ha suggerit l'addició d'un lligand del *toll-like receptor 4* (TLR4) com a potent adjuvant, entre d'altres, com una estratègia per millorar les respostes de tipus Th1 i Th17 en les immunitzacions amb vacunes DTPa. Altres opcions que s'han plantejat per millorar la immunogenicitat i la seguretat de les vacunes antipertússiques són el desenvolupament de noves vacunes DTPa amb múltiples components, inclosos nous components antigènics com l'AC-Hly,

l'exploració de noves vies d'administració com la via intranasal o la via cutània o el retorn a les vacunes DTPw, aquestes amb el component LPS disminuït o detoxificat^{330,340,356,357}.

9. Desenvolupament de noves vacunes

De forma recent, s'han realitzat múltiples intents per tal de millorar les vacunes enfront de la tosferina, entre els quals s'han contemplat diverses estratègies, des de millorar les vacunes DTPa actuals o buscar noves vacunes DTPw, fins a provar formulacions completament noves, com les vesícules de membrana externa (OMVs) i les vacunes vives atenuades. Addicionalment, també s'han buscat noves vies de vacunació com a alternativa a la via intramuscular, com són les vies intranasal i cutània³⁵⁸⁻³⁶².

Un dels nous enfoc per la vacunació enfront de la tosferina és l'ús de OMVs derivades de *B. pertussis*, les quals contenen múltiples antígens del microorganisme, incorporen propietats adjuvants i es poden preparar com una formulació liofilitzada estable. Per tal de garantir una protecció òptima, les vacunes basades en OMVs es preparen a partir de cultius de *B. pertussis* en fase Bvg+, quan el microorganisme produeix una major quantitat de factors de virulència. Es tracta d'una vacuna no replicant que es presenta com un candidat prometedor i atractiu, el qual proporciona una protecció significativa enfront de la colonització pulmonar per *B. pertussis* en ratolins després de la immunització intraperitoneal i subcutània, a nivells similars als proporcionats per les vacunes DTPw. La resposta immune protectora que indueixen les OMVs es caracteritza per ser una resposta mixta Th1/Th2/Th17, a més d'induir una àmplia resposta d'anticossos enfront de múltiples antígens com el BrkA, la PRN, el Vag8 i el LPS. A més, la vacunació amb OMVs indueix respostes inflamatòries més lleus en comparació a les originades per les vacunes DTPw, la qual cosa indica un millor perfil de seguretat de les OMVs. Tot i així per tal de millorar-ho,

es va disminuir la seva endotoxicitat mitjançant l'expressió del gen *pagL* de *B. bronchiseptica* a la soca de *B. pertussis* utilitzada per la preparació de les OMVs. Aquest codifica un lípid A 3-desacilasa, el qual elimina el grup acil del lipooligosacàrid de *B. pertussis*, resultant en una disminució de la inducció de citocines pro inflamatòries i del reclutament de neutròfils sense afectar el potencial protector de les OMVs enfront de la colonització pulmonar de *B. pertussis*^{341,363-370}.

Es va observar que la immunització intranasal de ratolins amb OMVs va induir fortes respostes immunitàries a nivell de mucoses, amb la producció de IgA nasal i pulmonar, així com de IgA resident als pulmons i citocines pulmonars de tipus Th1 i Th17. De la mateixa manera, també va resultar en una millor eliminació de *B. pertussis* que la observada per la vacunació cutània. Pel que fa a l'administració de les OMVs per via intraperitoneal en ratolins, aquesta va induir la producció de cèl·lules CD4⁺ T_H1 productores de IFN- γ i IL-17 a nivell pulmonar, les quals es van expandir després de la infecció per *B. pertussis*, podent explicar la protecció a llarg termini induïda per les OMVs^{371,372}. A dia d'avui, aquests candidats basats en les OMVs només s'han provat en models murins i no hi ha informació sobre el seu potencial en altres models animals, com és el babuí. De la mateixa manera tampoc han entrat en la fase de desenvolupament clínic³⁶⁰.

La única vacuna nova enfront de la tosferina que es troba actualment en fase de desenvolupament clínic és la vacuna viva atenuada BPZE1³⁷². Es tracta d'una vacuna d'administració via intranasal, de la qual es busca que sigui capaç de conferir una protecció eficaç i duradora a nivell de les mucoses, similar a la protecció induïda per la infecció natural^{353,373}. El primer treball que va parlar d'una vacuna viva atenuada contra la tosferina es va publicar l'any 1990. En aquest es descrivia l'atenuació de *B. pertussis* deguda a una mutació que afectava la biosíntesis d'aminoàcids aromàtic per la inactivació del gen *aroA* mitjançant la inserció d'un gen de resistència a kanamicina. Després de l'administració d'aquesta soca aerosolitzada en el model

murí en repetides ocasions, es va observar la producció d'anticossos sèrics enfront de *B. pertussis*, encara que a nivell baixos, així com es va eliminar d'una forma ràpida *B. pertussis* del pulmó³⁷⁴. Per tal de millorar la immunogenicitat de la soca de *B. pertussis* atenuada es va construir un mutant *aroQ*, el qual es va descriure que persistia un xic més en els pulmó dels ratolins que el mutant *aroA*, i pel que, una sola dosi intranasal de 109 unitats formadores de colònies (UFC) va resultar en la producció d'anticossos i una bona resposta de citocines enfront de *B. pertussis*, així com a la protecció contra la colonització quan el model murí va ser exposat a 108 UFC de *B. pertussis* virulenta³⁷⁵.

No obstant això, la soca BPZE1 presenta una atenuació segons un altre enfoc, la qual va en direcció a factors de virulència del microorganisme, en particular a tres toxines de *B. pertussis*. Específicament a la soca BPZE1 se li ha eliminat la DNT, se li ha reemplaçat el gen *ampG* per aquest mateix gen de *Escherichia coli*, la qual cosa condueix a una reducció del nivells de TCT i finalment, se li ha modificat el gen *ptx* per tal que aquest codifiqui una PTX genèticament desintoxicada. Després de l'administració nasal, la soca BPZE1 va persistir en els pulmó del model murí durant gairebé tant de temps com la soca de *B. pertussis* virulenta, sense induir inflamació ni patologia pulmonar. Addicionalment, es va observar com, una sola dosi va ser suficient per induir fortes respostes d'anticossos sèrics i cèl·lules T CD4+ de tipus Th1 i una immunitat innata potent, així com per produir IgA secretada i cèl·lules CD4+ Tmr productores de IL-17 en el teixit nasal, observant-se una protecció robusta a llarg termini enfront de la colonització nasal i pulmonar^{353,376-378}. Al llarg dels anys, BPZE1 ha estat sotmesa a una exhaustiva avaluació de seguretat, durant la qual s'ha estudiat aspectes com que no causés pèrdua de pes, patologia pulmonar o la mort dels models murins, que no es disseminés fora del tracte respiratori o la seva estabilitat genètica després de setmanes de passes successius, observant-se que la soca mantenia totes les característiques genètiques originals³⁷⁸⁻³⁸⁰. Actualment, se sap que la fórmula liofilitzada desenvolupada de la vacuna és estable després de més

de dos anys d'emmagatzematge entre -20 i +22 °C³⁸¹. En el model babuí juvenil, BPZE1 ha demostrat la inducció d'elevats títols d'IgG sèrica i IgA enfront dels antígens de *B. pertussis*, protegint els animals de la malaltia després de la infecció a dosis altes amb una soca de *B. pertussis* clínica. A banda, va demostrar ser eficaç en la disminució de la càrrega bacteriana de la nasofaringe, observant-se que els babuïns vacunats amb 1010 UFC de BPZE1 reduïen la càrrega bacteriana un 99,99% en comparació amb els babuïns control no vacunats. L'observació de la capacitat de protecció enfront de la colonització de la nasofaringe després de l'exposició ofereix una perspectiva única de bloquejar la circulació de *B. pertussis*, podent arribar a contribuir a la reducció de la incidència de la malaltia³⁸². A dia d'avui, BPZE1 es troba a la fase de desenvolupament clínic, havent completat dos estudis de fase I duts a terme a Suècia amb adults humans voluntaris no vacunats prèviament contra la tosferina ni amb episodis d'infecció natural per *B. pertussis* passats coneguts. Aquests han demostrat que BPZE1 és segura i immunògena en humans joves sans, sent capaç de colonitzar de forma transitòria el tracte respiratori humà i induir respostes d'anticossos enfront d'antígens de *B. pertussis* després d'una sola administració via nasal en aquells individus sense anticossos protectors previs, especialment quan s'han administrat les dosis més elevades provades^{383,384}. Tots els subjectes vacunats amb BPZE1 van mostrar fortes respostes d'anticossos específics enfront de *B. pertussis*, observant-se un augment significatiu en almenys un dels paràmetres següents: IgG (resposta exclusiva de IgG1 i IgG3), IgA i cèl·lules B de memòria pels antígens de *B. pertussis*, produint-se un perfil d'anticossos més ampli enfront de *B. pertussis* en comparació amb els anticossos produïts per la immunitat generada per les vacunes DTPa, uns anticossos enfront dels antígens inclosos en aquestes. A més, BPZE1 va mostrar una millor inducció d'anticossos opsonitzants, els quals estimulen la producció d'espècies reactives d'oxigen en els neutròfils, millorant-ne la funció bactericida. Addicionalment, les cèl·lules T específiques van mostrar un fenotip Th1, contrari al fenotip Th2 induït per les vacunes DTPa. És per

això que BPZE1 presenta perspectives prometedores de poder millorar l'eficàcia vacunal i la protecció enfront de la transmissió de *B. pertussis*³⁷³. Actualment es troben en marxa un parell d'estudis de fase II amb una dosi de 109 UFC d'una formulació de BPZE1 liofilitzada, estabilitzada i administrada com un aerosol nasal, del que s'espera que proporcioni una prova de concepte de que pot arribar a ser la vacunació nasal amb BPZE1, induint immunitat a nivell de mucoses i prevenint la infecció en humans³⁸¹.

Adicionalment, degut a que les respostes immunològiques a les fimbries presenten una gran contribució a la protecció enfront de *B. pertussis*, paral·lelament s'ha construït un derivat de BPZE1, anomenat BPZE1f3, el qual a diferència del primer, que només produeix fimbries del serotip 2, produeix ambdós serotips fimbrials. D'aquesta manera, amb la vacunació amb BPZE1f3 s'indueix la producció d'anticossos enfront FIM2 i FIM3 en proporcions similars, observant-se que la vacunació de ratolins amb BPZE1f3, en comparació amb la vacunació amb BPZE1, proporciona una protecció significativament més forta enfront dels aïllats de *B. pertussis* que tan sols produeixen FIM3³⁸⁵.

10. Altres espècies del gènere *Bordetella* productores de tosferina

i. *Bordetella holmesii*

Bordetella holmesii es va descriure per primera vegada l'any 1995 pels CDC, rebent el nom en honor a Barry Holmes, qui fou un microbiòleg anglès important per les seves contribucions en la caracterització, classificació i identificació de patògens inusuals i bacteris oportunistes. Inicialment, les primeres quinze soques identificades es van assignar dins del gènere *Bordetella* segons els resultats dels seus perfils d'àcids grassos, els estudis de parentesc de l'ADN, la seqüenciació de l'ARNr 16S i l'anàlisi del seu contingut de guanina i citosina (G+C), resultats dels quals van indicar que es tractava d'una única espècie no descrita prèviament. Totes elles s'havien aïllat

originàriament d'hemocultius de pacients de nou estats diferents dels EUA, un pacient de Suïssa i un altre d'Àrabia Saudita, entre les quals, la primera havia estat aïllada d'un pacient de 37 anys esplènic de l'estat de Nova York, als EUA i datava de l'any 1983. És per això que, *B. holmesii* es va descriure inicialment com un agent responsable de bacterièmia i altres malalties invasives, com l'artritis o l'endocarditis, entre d'altres, especialment en pacients esplènics i immunocompromesos^{27,386}.

Cinc anys després de la seva primera descripció, quan *B. holmesii* es va aïllar de mostres respiratòries obtingudes de pacients amb simptomatologia respiratòria, es va documentar que *B. holmesii* també podia causar els símptomes típics d'un quadre de tosferina en individus sans. Posteriorment, es va informar per primera vegada que la majoria de tècniques d'ús freqüent en aquell moment pel diagnòstic de *B. pertussis*, les quals consistien en la detecció de la seqüència IS481, no eren específiques d'espècie. Això és degut a que, tot i que en un menor nombre de còpies, la IS481 es troba també present en el genoma de *B. holmesii*, observant-n'hi un nombre variable entre prop de deu i fins a gairebé cinquanta còpies. D'aquesta manera, es constata el diagnòstic erroni de la infecció respiratòria originada per *B. holmesii* com a *B. pertussis*^{132,208}. A partir de llavors, nombrosos grups es van centrar en desenvolupar proves diagnòstiques capaces de discriminar ambdues espècies. Algunes de les recomanacions que es van proposar per tal d'augmentar l'especificitat de les proves moleculars utilitzades pel diagnòstic de la tosferina van ser les d'incloure dianes específiques de *B. holmesii* com el gen que codifica la proteïna RecA (*recA*) o la seqüència h-IS1001 (Veure apartat 5)¹³². D'altra banda, molts autors van començar a re-analitzar de forma retrospectiva aquelles mostres respiratòries positives per *B. pertussis* a fi de determinar en quina mesura *B. holmesii* estava contribuint a l'augment del nombre de casos de tosferina observat a escala global. Estudis realitzats arreu han informat que *B. holmesii* podria ser l'agent causal d'entre el 0% i el 29% dels quadres simptomàtics similars a la tosferina⁵¹. La prevalença més elevada fins ara descrita es va comunicar a un estudi realitzat durant el brot de

tosferina a Ohio durant l'any 2010, on *B. holmesii* es va identificar en aproximadament un terç de les infeccions confirmades per *Bordetella*³⁸⁷.

En quant a la seva patogenicitat, *B. holmesii* presenta un sistema de regulació dels factors de virulència que presenta certes similituds amb el sistema de dos components BvgAS de *B. pertussis* però que difereix significativament, tractant-se d'un sistema que presenta més similituds amb el que posseeix *B. avium*. Pel que fa als factors patogènics clàssics de *Bordetella*, produeix una toxina molt similar a la FHA regulada pel locus *bvgAS*. També produeix LPS, component essencial de la membrana externa, tot i que l'expressió d'aquest difereix del que es troba en les altres espècies del gènere. Probablement la seva expressió, la qual compta amb l'antigen O, està relacionada amb el gran potencial invasiu de *B. holmesii*. Contràriament, no produeix moltes de les toxines o estructures de superfície associades a *B. pertussis*, com la PTX, la AC-Hly, el T3SS, la PRN o les FIM. Per últim, es desconeix si *B. holmesii* presenta o no càpsula, tot i que si aquest fos el cas, la seva presència podria arribar a explicar el major risc que tenen els pacients immunocompromesos de patir un infecció invasiva per *B. holmesii*^{50,388-394}.

Les manifestacions clíniques d'una infecció respiratòria originada per *B. holmesii* són molt similars a les de la tosferina, incloent febre lleu, tos paroxística, gall inspiratori i vòmit post-tussigen. La malaltia causada per *B. holmesii* també inclou les fases catarral, paroxística i de convalescència com un quadre típic de tosferina per *B. pertussis*, encara que *B. holmesii* està associada a presentacions clíniques menys greus i menys perllongades en el temps, possiblement degut a la manca de certs factors de virulència en aquesta espècie^{24,387,395}.

A dia d'avui, no es disposa de recomanacions basades en l'evidència respecte al tractament de la infecció per *B. holmesii*. Les proves de susceptibilitat *in vitro* de *B. holmesii* a diversos antibiòtics mostren com les cefalosporines de tercera generació no serien òptimes per tractar *B. holmesii*, sent la ceftazidima la millor opció entre els

antibiòtics d'aquesta classe. Contràriament, s'ha informat de la resistència de *B. holmesii* a ceftriaxona, cefotaxima i trimetoprim-sulfametoxazole. Tant els carbapenems com les fluoroquinolones han demostrat ser eficaços *in vitro*, els quals sovint són suggerits com el tractament més eficaç per a la infecció per *B. holmesii*. Per últim, pel que fa als macròlids, alguns resultats mostren com l'eritromicina presenta una activitat menor contra *B. holmesii* en comparació amb l'activitat que presenta aquest antibiòtic enfront de *B. pertussis*. Tot i això, la gran majoria de casos d'infecció respiratòria per *B. holmesii* són tractats amb un macròlid, tractament de primera elecció per un cas de tosferina, com si es tractés d'una infecció per *B. pertussis*. Això és degut a que els pacients que presenten símptomes similars a una tosferina són, en moltes ocasions, diagnosticats de forma errònia com a infectats per *B. pertussis* o a que els clínics inicien el tractament de forma empírica amb un macròlid davant la sospita d'infecció respiratòria per qualsevol espècie del gènere *Bordetella*. No obstant això, els macròlids poden no ser la millor opció per tractar *B. holmesii*, fet que es podria convertir en un problema si no es realitza de forma correcta la distinció entre les dues espècies^{48,51,227}.

D'altra banda, tal i com s'ha demostrat en un model animal, ni les vacunes DTPw ni les vacunes DTPa confereixen protecció suficient enfront de *B. holmesii*. Concretament, un estudi realitzat a Massachusetts va demostrar que, encara que les respostes immunes de cèl·lules T induïdes tant per les vacunes DTPw com per les vacunes DTPa reaccionarien de forma creuada amb *B. holmesii*, els anticossos específics induïts per la immunització amb les vacunes antipertússiques, no es van unir de forma eficaç a *B. holmesii*, degut a que la majoria d'antígens que reconeixen els anticossos contra *B. pertussis* són absents en *B. holmesii* o bé aquests presenten diferències, com és el cas de la FHA. Tot això suggereix la inducció d'una resposta immune creuada deficient per part de les vacunes utilitzades en la immunització enfront de *B. pertussis*²⁶³. A tall d'exemple, en un brot de tosferina que va tenir lloc a Ohio entre els anys 2010 i 2011, es va observar que el 60% dels pacients infectats

amb *B. holmesii* havien estat prèviament vacunats, en comparació amb el 44% dels pacients infectats amb *B. pertussis*³⁸⁷.

ii. *Bordetella parapertussis*

Pearl Kendrick i Grace Eldering van aïllar *Bordetella parapertussis* per primera vegada l'any 1938, com una causa d'infeccions similars a la tosferina. En comparació amb *B. pertussis*, *B. parapertussis* està involucrada amb molta menys freqüència amb la malaltia, sent responsable d'entre un 2% i un 20% dels casos de tosferina, generalment causant una malaltia respiratòria menys greu. Tot i això, *B. parapertussis* és considerat un agent causal de la tosferina, podent produir brots de la malaltia^{14,396,397}. En molt rares ocasions, *B. parapertussis* també s'ha relacionat amb la producció d'infecció sistèmica, comunicant-se escassos casos en pacients que presentaven altres malalties subjacents^{397,398}.

B. parapertussis comprèn dos llinatges diferents, essent un d'ells restringit pels humans (*B. parapertussis_{hu}*) i l'altre, exclusivament oví (*B. parapertussis_{ov}*). L'anàlisi filogenètic de *B. pertussis* y *B. parapertussis_{hu}* va indicar que les dues espècies, les quals es troben estretament relacionades en l'adaptació als humans, van evolucionar de forma independent des d'un ancestre comú de *B. bronchiseptica*⁵⁰. Addicionalment, la població de *B. parapertussis_{hu}* és genèticament molt homogènia^{399,400}.

En quant a la seva patogenicitat, a diferència de *B. pertussis*, *B. parapertussis* no expressa la PTX degut a l'acumulació de mutacions a la regió promotora del conjunt de gens que la codifiquen⁴⁰¹. De la mateixa manera, encara que *B. parapertussis* presenta els gens que codifiquen les proteïnes fimbrials FIM2 i FIM3, aquestes, tal i com s'ha determinat per mètodes proteòmics, no s'expressen^{103,402}. D'altra banda, el LPS de *B. parapertussis* presenta les cadenes laterals d'antigen O, la qual cosa li confereix protecció enfront de immunitat vehiculada pel complement, considerant-

se un important factor de virulència del microorganisme⁷⁷. Contràriament, *B. parapertussis* presenta la majoria de determinants de virulència que posseeix *B. pertussis* com són la PRN, la FHA, la DNT, la AC-Hly, la TCT i el T3SS, així com el sistema regulador BvgAS¹⁷.



OBJECTIUS

ESTUDI 1. Caracterització de l'epidemiologia molecular i la diversitat antigènica d'aïllats clínics de *Bordetella pertussis* causants de tosferina.

Algunes de les causes per les quals es postula que la tosferina ha reemergit al llarg de les últimes dècades als països industrialitzats han sigut l'ús generalitzat de les vacunes acel·lulars, les quals són menys immunògenes i generadores d'una resposta immune de durada limitada, juntament amb l'aparició i adaptació de nous clons de *B. pertussis* capaços d'evadir amb major eficiència la immunitat conferida per les vacunes acel·lulars utilitzades.

En aquest context, el present treball té com a objectiu realitzar una caracterització de l'epidemiologia molecular i la diversitat antigènica dels aïllats clínics de *B. pertussis* productors de tosferina que han circulat en el nostre context geogràfic al llarg dels últims trenta anys. Per això s'ha estudiat una col·lecció d'aïllats de *B. pertussis* obtinguts al Servei de Microbiologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron procedents de mostres clíniques de pacients amb un quadre de tosferina i que han sigut atesos a hospitals i Centres d'Atenció Primària de Catalunya entre els anys 1986 i 2015.

Els objectius específics que en deriven són:

- 1.1. Determinar l'estructura poblacional dels aïllats de *B. pertussis* obtinguts de pacients amb un quadre de tosferina, estudiant la seva diversitat clonal al llarg del temps.
- 1.2. Identificar els canvis evolutius en el contingut antigènic de *B. pertussis* aïllades de pacients amb un quadre de tosferina.
- 1.3. Estudiar l'impacte que ha pogut tenir l'ús de les vacunes antipertússiques en l'evolució i l'adaptació de les poblacions de *B. pertussis* circulants, posant el focus en la contribució que ha tingut el recanvi de vacuna en la selecció de les poblacions actuals.

ESTUDI 2. Emergència de *Bordetella holmesii* com agent productor de tosferina a Barcelona.

B. holmesii va ser descrita l'any 1995 com una causa infreqüent de bacterièmia i altres malalties invasives en individus amb immunosupressió. No obstant això, posteriorment es va identificar en mostres respiratòries de pacients amb símptomes de tosferina, reconeixent-se com un agent etiològic emergent d'aquesta malaltia. Avui en dia, s'han descrit brots importants d'infecció respiratòria associada a un quadre pertussoide causat per *B. holmesii*, així com una tendència a l'alça en la prevalença d'aquest microorganisme com agent causal de tosferina.

En aquest context, el present treball té com a objectiu identificar si *B. holmesii* és un agent causant de tosferina en el nostre medi, avaluant-ne la prevalença i evolució al llarg dels últims anys, així com identificant les característiques clíniques dels pacients que pateixen una infecció respiratòria per aquest microorganisme. Per això, s'ha estudiat una col·lecció de mostres respiratòries recollides al Servei de Microbiologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron i en diversos Centres d'Atenció Primària de l'àrea d'influència d'aquest hospital entre els anys 2013 i 2016, de pacients diagnosticats de tosferina, així com les seves característiques clíniques-epidemiològiques.

Els objectius específics que en deriven són:

- 2.1. Identificar si *B. holmesii* és un agent productor de tosferina en el nostre medi i descriure l'evolució de la seva prevalença al llarg dels últims anys.
- 2.2. Determinar el paper de *B. holmesii* en l'epidemiologia de la tosferina.
- 2.3. Identificar les característiques clíniques-epidemiològiques dels pacients que desenvolupen tosferina per *B. holmesii*.

ESTUDI 3. Identificació i caracterització de *Bordetella pertussis* deficient en pertactina a Espanya.

Al llarg dels últims anys s'ha posat de manifest en diversos països l'emergència de *B. pertussis* que ha deixat d'expressar alguns dels antígens inclosos en les composicions vacunals acel·lulars, sent la pertactina l'antigen que amb major freqüència s'ha vist afectat. Aquestes soques mantenen la virulència i la capacitat per produir la malaltia, compromentent la immunitat generada per les vacunes que actualment s'utilitzen, així com la seva eficàcia.

En aquest context, el present treball té com a objectiu estudiar l'existència d'aïllats clínics de *B. pertussis* causants de tosferina que no expressen l'antigen de la pertactina, així com les seves característiques genètiques i l'evolució de la seva dinàmica poblacional al llarg dels últims trenta anys en relació amb el tipus de vacunes emprades. Per això, s'ha estudiat una col·lecció d'aïllats de *B. pertussis* obtinguts al Servei de Microbiologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron procedents de mostres clíniques de pacients amb un quadre de tosferina i que han estat atesos a hospitals i Centres d'Atenció Primària de Catalunya entre els anys 1986 i 2018. Addicionalment, s'ha estudiat una col·lecció d'aïllats de *B. pertussis* procedents de mostres clíniques de pacients amb un quadre de tosferina que han sigut atesos a hospitals de La Comunidad de Madrid, Castilla la Mancha i Castilla y León.

Els objectius específics que en deriven són:

- 3.1. Determinar la producció de pertactina de *B. pertussis* aïllades de pacients amb un quadre de tosferina.
- 3.2. Identificar les causes genètiques associades a la pèrdua d'expressió de pertactina en aquells aïllats en els quals no es detecta la seva producció.
- 3.3. Elaborar una anàlisi filogenòmica per identificar l'estructura poblacional de *B. pertussis* deficientes en pertactina, estimant la data de la seva aparició,

distribució i evolució i relacionant-ho amb l'impacte que la introducció de les vacunes acel·lulars ha pogut tenir en l'adaptació i la circulació d'aquestes poblacions.



RESULTATS

ESTUDI 1. Caracterització de l'epidemiologia molecular i la diversitat antigènica d'aïllats clínics de *Bordetella pertussis* causants de tosferina.

Population Dynamics and antigenic drift of *Bordetella pertussis* following whole cell vaccine replacement, Barcelona, Spain, 1986-2015

Alba Mir-Cros, Albert Moreno-Mingorance, M. Teresa Martín-Gómez, Gema Codina, Thais Cornejo-Sánchez, Mireia Rajadell, Diego Van Esso, Carlos Rodrigo, Magda Campins, Mireia Jané, Tomàs Pumarola, Anna Fàbrega, Juan José González-López

Emerging Microbes & Infections 2019, 8:1, 1711-1720

DOI: 10.1080/22221751.2019.1694395

2019 Journal Impact Factor: 5.776 (Q1)

BREU RESUM DELS RESULTATS

Entre els factors associats al ressorgiment de la tosferina, té una especial rellevància la capacitat d'adaptació de *B. pertussis* a la immunitat conferida per les vacunes DTPa. Per tal de comprendre el procés evolutiu i adaptatiu de *B. pertussis*, en el present treball es va avaluar l'impacte de l'estratègia de transició de les vacunes DTPw i les vacunes DTPa sobre la dinàmica poblacional de *B. pertussis* a Barcelona mitjançant l'estudi d'un total de 339 aïllats clínics de *B. pertussis* productors de tosferina recollits al llarg del període 1986-2015. La relació genètica entre els aïllats de *B. pertussis* es va determinar mitjançant electroforesi en camp polsant (*pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) i l'anàlisi de les seqüències repetides en tàndem de diversos locus (*multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis*, MLVA), mentre que la deriva antigènica es va estudiar mitjançant la seqüenciació dels gens

codificants de la PTX (*ptxA*) i del seu promotor (*ptxP*), de la PRN (*prn*) i de la FIM3 (*fim3*), així com a través de la serotipificació fimbrial per la tècnica ELISA.

D'acord amb els resultats obtinguts, es va observar un canvi en l'estructura poblacional de *B. pertussis* així com en el seu perfil antigènic coincidint temporalment amb la introducció de les vacunes DTPa al nostre medi. Quatre dels cinc perfils de PFGE més prevalents durant l'ús de les vacunes DTPw van ser reemplaçats per nous perfils després de la introducció de les vacunes DTPa. Únicament un perfil va persistir tant en el període que es van utilitzar les vacunes DTPw com en el que es van utilitzar les vacunes DTPa. No obstant això, amb la introducció progressiva de les vacunes DTPa l'any 1998, van emergir tres nous perfils, els quals es van convertir en predominants. Addicionalment, un últim perfil es va observar com a emergent a partir de l'any 2007, durant el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa. El tipus de MLVA (MT) 27 va ser el genotip dominant, observant-se un marcat augment de la seva freqüència, incrementant del 25% al 79,3% després del reemplaçament de les vacunes DTPw.

En relació amb la tipificació dels antígens vacunals dels aïllats estudiats, l'única forma antigènica que s'ha mantingut invariable al llarg de tot el període d'estudi és la corresponent a la de la PTX. Així, s'ha observat com la variant *ptxA1*, la qual el corresponent antigen no està inclòs en les vacunes DTPa, estava present en el 100% dels aïllats tant durant el període d'ús de les DTPw com durant el període d'ús de les vacunes DTPa. Encara que no s'ha observat un recanvi antigènic en la variant al·lèlica de la PTX circulant, coincidint amb la introducció de les vacunes DTPa, s'ha detectat una expansió del promotor *ptxP3*, el qual va passar d'observar-se en el 5% dels aïllats durant el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPw a detectar-se en el 97,7% dels aïllats durant el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa. La presència del promotor de la PTX de tipus 3 s'ha relacionat amb l'increment de l'expressió de la PTX, observant-se una producció d'1,62 vegades superior d'aquest antigen per part dels aïllats que el presenten, respecte d'aquells aïllats que posseeixen la variant al·lèlica

salvatge (*ptxP1*). Adicionalment, els resultats de la tipificació van demostrar l'existència d'una expansió de les noves formes al·lèliques *prn2* i *fim3-2*, les quals no codifiquen les formes antigèniques que estan incloses en les composicions vacunals DTPa. Concretament, el principal recanvi antigènic que es va observar va ser el corresponent a la forma al·lèlica *prn2*, la qual es va detectar en el 3,7% dels aïllats obtinguts durant el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPw, mentre que durant el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa, aquesta va passar a estar present en el 97,7% dels aïllats. Per la seva banda, la forma al·lèlica *fim3-2* es va observar per primera vegada durant el període de transició de les vacunes DTPw a les vacunes DTPa, detectant-se una proporció similar entre les variants *fim3-1* i *fim3-2* d'ençà que les vacunes DTPa s'utilitzen de forma exclusiva (46,9% i 53,1%, respectivament). Per últim, els resultats de la serotipificació fimbrial van mostrar que, encara que el 72,6% dels aïllats van expressar el serotip fimbrial FIM3 i aquest ha sigut el predominant durant tots els períodes d'estudi, es va detectar una reemergència del serotip fimbrial FIM2 en el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa, passant d'un 0% durant el període de transició de les vacunes DTPw a les vacunes DTPa, a un 25,7% durant el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa.

Així, els perfils electroforètics predominants durant el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPw (perfils VH5, VH7, VH8 i VH12) van presentar majoritàriament (58,8%) la combinació al·lèlica *ptxA1/ptxP1/prn1/fim3-1*, observant-se aquesta en el 42,6% dels aïllats de l'esmentat període. Posteriorment, els perfils electroforètics predominants durant el període de transició entre les vacunes DTPw i DTPa (perfils VH19, VH20 i VH22) van presentar tots ells la combinació al·lèlica *ptxA1/ptxP3/prn2/fim3-2*, detectant-se en el 56,3% dels aïllats del període. Finalment, encara que la combinació al·lèlica *ptxA1/ptxP3/prn2/fim3-2* es va detectar en el 49,1% dels aïllats del període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa, l'emergència de la combinació al·lèlica *ptxA1/ptxP3/prn2/fim3-1* es va observar en el 46,3% dels aïllats, associant-se aquest fenomen al reemplaçament dels perfils

circulants pels perfils que van predominar a partir de la segona meitat del període (perfils VH2 i VH26), els quals es van relacionar amb la presència de l'al·lel *fim3-1*. Pel que fa al serotip fimbrial, els perfils electroforètics que van predominar durant el període de transició de les vacunes DTPw a les vacunes DTPa es van associar principalment al serotip fimbrial FIM3 (92,2%), mentre que els perfils electroforètics pels quals van ser reemplaçats a partir de la segona meitat del període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa, es van relacionar majoritàriament amb el serotip fimbrial FIM2 (63,5%). Aquesta observació recolza l'emergència del serotip fimbrial FIM2 com a mecanisme adaptatiu de *B. pertussis* per deixar d'expressar la forma al·lèlica *fim3-1*, la qual codifica el tipus d'antigen de fimbria 3 inclòs en algunes de les composicions vacunals DTPa.

El conjunt de resultats va ser consistent amb els descrits per altres treballs realitzats en països on l'ús de les vacunes DTPa ha sigut extensiu des de finals dels anys noranta, com són la majoria de països europeus, els EUA i el Canadà, on els perfils electroforètics detectats amb major prevalença en un període similar de vint anys coincideixen amb els que han circulat de forma majoritària en el nostre medi. A més, tant el MT27 com la combinació al·lèlica *ptxA1/ptxP3/prn2* s'ha observat de forma extensiva en aquests mateixos països, així com a Austràlia, suggerint el paper de les vacunes DTPa en l'expansió de les actuals poblacions de *B. pertussis*. Contràriament, en països com Polònia, on se segueixen utilitzant les vacunes DTPw, s'han observat perfils electroforètics diferents, així com una major prevalença d'altres MT, tals com el MT29 i el MT70, posseïdors de la combinació al·lèlica *ptxA1/ptxP1/prn1*.

Així doncs, els resultats d'aquest estudi confirmen l'existència de canvis poblacionals i recanvis antigènics en els aïllats de *B. pertussis* circulants en el nostre medi, probablement condicionats per la introducció de les vacunes DTPa.



Population dynamics and antigenic drift of *Bordetella pertussis* following whole cell vaccine replacement, Barcelona, Spain, 1986–2015

Alba Mir-Cros, Albert Moreno-Mingorance, M. Teresa Martín-Gómez, Gema Codina, Thais Cornejo-Sánchez, Mireia Rajadell, Diego Van Esso, Carlos Rodrigo, Magda Campins, Mireia Jané, Tomàs Pumarola, Anna Fàbrega & Juan José González-López

To cite this article: Alba Mir-Cros, Albert Moreno-Mingorance, M. Teresa Martín-Gómez, Gema Codina, Thais Cornejo-Sánchez, Mireia Rajadell, Diego Van Esso, Carlos Rodrigo, Magda Campins, Mireia Jané, Tomàs Pumarola, Anna Fàbrega & Juan José González-López (2019) Population dynamics and antigenic drift of *Bordetella pertussis* following whole cell vaccine replacement, Barcelona, Spain, 1986–2015, *Emerging Microbes & Infections*, 8:1, 1711–1720, DOI: [10.1080/22221751.2019.1694395](https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1694395)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1694395>



© 2019 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, on behalf of Shanghai Shangyixun Cultural Communication Co., Ltd



[View supplementary material](#)



Published online: 26 Nov 2019.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 213



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)

Population dynamics and antigenic drift of *Bordetella pertussis* following whole cell vaccine replacement, Barcelona, Spain, 1986–2015

Alba Mir-Cros ^{a,b,*}, Albert Moreno-Mingorance ^{a,b,*}, M. Teresa Martín-Gómez ^a, Gema Codina ^a,
Thais Cornejo-Sánchez ^a, Mireia Rajadell^{a,b}, Diego Van Esso^c, Carlos Rodrigo ^d, Magda Campins ^e,
Mireia Jané^f, Tomàs Pumarola ^{a,b}, Anna Fàbrega ^{a,g,†} and Juan José González-López ^{a,b,†}

^aDepartment of Clinical Microbiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ^bDepartment of Microbiology and Genetics, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ^cPrimary Care Health Centre Service 'Muntanya', Catalan Institute of Health, Barcelona, Spain; ^dDepartment of Paediatrics, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ^eDepartment of Preventive Medicine and Epidemiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ^fPublic Health Agency of Catalonia, Barcelona, Spain; ^gFaculty of Health Sciences, University of Vic – Central University of Catalonia (UVic-UCC), Manresa, Spain

ABSTRACT

Among the factors associated with the resurgence of whooping cough, special emphasis has been given to pathogen adaptation after the introduction of the acellular vaccine (ACV). To assess the impact of the vaccine transition strategy from whole-cell vaccine (WCV) to ACV on population dynamics of *Bordetella pertussis* in Barcelona (Spain), we studied 339 isolates collected from 1986 to 2015 by PFGE and multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA). Additionally, allelic variants for the pertussis toxin and its promoter, pertactin, type 3 fimbriae and fimbrial serotyping were assessed to determine its antigenic drift. A shift was observed in the *B. pertussis* population as well as in its antigenic profile concurrently with the introduction of ACV in Barcelona. Four out of the five most prevalent PFGE profiles were replaced by new profiles following the ACV introduction. MLVA type 27 was the dominant genotype, and its frequency increased from 25% to 79.3% after WCV replacement. Antigen typing demonstrated the emergence of *prn2*, *ptxP3*, *fim3-2* and a shift from the fimbriae 3 to the fimbriae 2 serotypes after the ACV introduction. Our findings support the presence of population and antigenic dynamic changes in *B. pertussis* likely driven by the introduction of ACV.

ARTICLE HISTORY Received 20 June 2019; Revised 17 October 2019; Accepted 6 November 2019

KEYWORDS Whooping cough; PFGE; MLVA; antigenic variants; pertussis vaccine





Introduction

Whooping cough, or pertussis, is an acute human upper respiratory tract infection caused by *Bordetella pertussis*, a highly communicable airborne Gram-negative coccobacillus. The pertussis immunization programme was first introduced in Spain in 1965, with the administration of a whole cell vaccine (WCV). Later, in 1998 an acellular vaccine (ACV) progressively replaced the WCV vaccination programme with the aim of improving vaccine safety. Finally, since 2005 ACV is the only vaccine administered to the Spanish population [1]. In Catalonia, the vaccination programme against pertussis follows the same programme (Table 1).

Despite extensive vaccination campaigns and high immunization rates (86% for global primary vaccination in 2018), the incidence of whooping cough significantly reemerged during the first decade of the


twenty-first century, not only in Spain and Europe but also worldwide. This unfavourable situation has led to pertussis becoming the leading vaccine-preventable disease in industrialized countries, and hence, a global public health problem [2–5].

Pertussis normally presents a classical cyclic pattern with epidemic waves occurring every 3–5 years interspersed with periods of a lower incidence rate. However, at present, the number of cases is higher than in previous decades [6]. The reemergence of pertussis in Spain is particularly well supported by recent epidemiological data. The incidences reported for the inter-epidemic years from 2001 to 2010 ranged from 0.7 to 1.9 cases/100,000 population. However, despite having a vaccination coverage of 96.5% in infants younger than 12 months, the incidence rates observed after the last two epidemic waves (2011 and 2015) remained high even during interepidemic periods (>5 cases/

CONTACT Juan José González-López  jgonzal@vhebron.net  Department of Clinical Microbiology, Hospital Vall d'Hebron, Pg.Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain; Anna Fàbrega  anna.fabrega@vhir.org  Department of Clinical Microbiology, Hospital Vall d'Hebron, Pg.Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain

*These authors contributed equally to this article.

†These senior authors contributed equally to this article.

 Supplemental data for this article can be accessed <https://10.1080/22221751.2019.1694395>

© 2019 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, on behalf of Shanghai Shangyixun Cultural Communication Co., Ltd
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. Pertussis vaccination programme used in Catalonia (Spain) since 1965.

Year	Primary doses			Booster doses		
	Vaccine type	Schedule	Pertussis components	Vaccine type	Schedule	Pertussis components
1965	DTPw	2 doses between 3 months and 3 years	Inactivated whole cell	NA	No booster	NA
1967	DTPw	3 doses between 3 months and 3 years	Inactivated whole cell	NA	No booster	NA
1975	DTPw	3, 5, 7 months	Inactivated whole cell	NA	No booster	NA
1996	DTPw	2–3, 4–5, 6–7 months	Inactivated whole cell	DTPw	15–18 months	Inactivated whole cell
1998–1999	DTPw	2, 4, 6 months	Inactivated whole cell	DTPa	18 months 4–6 years	PT, FHA, PRN
2000	DTPw/DTPa	2, 4, 6 months	Inactivated whole cell or PT, FHA, PRN	DTPa	18 months 4–6 years	PT, FHA, PRN
2002	DTPa	2, 4, 6 months	PT, FHA, PRN	DTPa	18 months 4–6 years	PT, FHA, PRN
2011	DTPa	2, 4, 6 months	PT, FHA, PRN	DTPa/ dTpa	18 months (DTPa), 4–6 years (dTpa)	PT, FHA, PRN or PT, FHA, PRN, FIM2, FIM3 ^a
2014	DTPa	2, 4, 6 months	PT, FHA, PRN	DTPa/ dTpa	18 months (DTPa), 6 years (dTpa)	PT, FHA, PRN or PT, FHA, PRN, FIM2, FIM3 ^a
2014 ^b	NA	NA	NA	dTpa	between 27 through 36 weeks of pregnancy	PT, FHA, PRN or PT, FHA, PRN, FIM2, FIM3

Notes: NA: not applicable; DTPw: diphtheria-tetanus-whole cell pertussis vaccine; DTPa: diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine; dTpa: diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine with reduced antigenic load of diphtheria, tetanus and pertussis; PT: pertussis toxin; FHA: filamentous haemagglutinin; PRN: pertactin; FIM2: type 2 fimbriae; FIM3: type 3 fimbriae. These data have been collected from Campins M, et al [11] and personal communication.

^aThe composition containing pertussis fimbrial antigens is used in some cases for the fifth dose.

^bIntroduction of maternal pertussis vaccination.

100,000 population). Of note was the increase reported during the last epidemic wave in 2015 which showed a maximum incidence of almost 18 cases/100,000 population [7]. The figures reported in Catalonia have followed a similar trend albeit with an even more pronounced progression, with an incidence of 49 cases/100,000 population in 2015 [8].

The resurgence of whooping cough may be related to increased awareness and improved diagnostic tools, although the special emphasis has been given to waning immunity, particularly associated with the introduction of ACV and pathogen adaptation [9,10]. ACV contains a combination of different antigens including pertussis toxin (PT), pertactin (PRN) and filamentous haemagglutinin (FHA), and in some vaccines, type 2 and type 3 fimbriae (FIM2 and FIM3) [2]. Nevertheless, the immunologic protection conferred by ACV is not as enduring as that previously observed for WCV [11]. The current allelomorph profile of the ACV antigens includes *ptxA2/ptxA4*, *prn1/prn7*, *fhaB1*, *fim2-1* and *fim3-1* [12]. The naturally-driven antigenic divergence, together with the impact exerted by the ACV vaccine has likely played a key role in the selection of new antigenic variants, which is in keeping with the increased frequencies of the allelic variants *ptxA1*, *prn2*, and *fim3-2* seen in countries where ACV has been extensively used [2,4,13]. Another bacterial adaptation event associated with the resurgence of this pathogen is the selection of a new PT promoter type. In 2009 the new *ptxP3* variant was characterized in relation to increased toxin production levels and was shown to have rapidly replaced the previous predominant *ptxP1* allele [14,15].

The main objective of this study was to shed new light on the impact of the introduction of ACV on the evolution and adaptation of *B. pertussis* isolates over a 30-year period in Spain, particularly

those collected in the metropolitan area of Barcelona before, during and after the WCV replacement by ACV. This characterization was achieved by molecular epidemiology analysis of clinical isolates together with a study of the vaccine antigen variants of the pathogen.

Materials and methods

Bacterial isolates and study period

A total of 339 non-duplicate *B. pertussis* clinical isolates were collected at the Hospital Vall d’Hebron (Barcelona, Spain). All the isolates were recovered from cultures of nasopharyngeal samples collected from patients diagnosed with pertussis, excluding isolates of the studies of contacts. The isolates were collected from patients with different vaccination status: vaccinated, unvaccinated and partially vaccinated (Table S1, Supplementary Information).

The isolates were collected over 30 years, from 1986 to 2015. The study period was divided into three parts on the basis of the vaccine type/s used for routine vaccination in our setting: (i) period 1 (1986–1997; *n* = 82 isolates) was defined by the single use of WCV; period 2 (1998–2003; *n* = 82 isolates) was the transition period as WCV was used only for primary vaccination whereas ACV was used in boosters; and period 3 (2007–2015, *n* = 175 isolates), when ACV completely replaced WCV. Additionally, 10 previously characterized strains (B3313, B1900, B1706, B1917, B2726, B0366, B0549, B0610, B1916 and B3230) were included in the present study for comparison in the clonal relatedness studies. These strains have been described as being the most representative clones (PFGE profiles and MLVA types) circulating in several European countries during the period 1998–2015 [16–18].

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

The genetic relatedness of all the *B. pertussis* isolates included in the present study was determined using DNA fingerprint by PFGE, which was performed as described previously [19]. The DNA fingerprint profiles were analysed with the GelCompare II v.4.6 software (Applied Maths) using the arithmetic UPGMA as a group method with a band tolerance of 1% and an optimization setting of 1%. Underrepresented PFGE profiles ($n < 5$ isolates) were grouped as “others”.

Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)

Strain relatedness was also studied using MLVA typing analysis as described previously [20]. A subset of representative strains belonging to different PFGE profiles and time periods was selected for our MLVA comparison ($n = 72$). Accordingly, one isolate was selected from each of the less representative PFGE profiles (29 PFGE profiles, 29 isolates). For the most prevalent PFGE profiles (9 PFGE profiles, 43 isolates), 3 isolates were selected from each time period (1 from the beginning, one from the middle and 1 from the end of each period). In the case of PFGE profiles partially represented in a time period, available isolates were selected. Each locus was amplified by PCR and the resulting fragments analysed as described previously [20]. MLVA types (MT) were assigned using the MLVA typing tool (<https://www.mlva.net/bpertussis/default.asp>).

Antigenic variants

A total of 231 strains belonging to different PFGE profiles were included in the characterization of antigenic variants: a subset of representative strains ($n = 56$) was selected for periods 1 and 2 whereas all strains collected during period 3 were analysed ($n = 175$). Among the genes encoding virulence factors included in the ACV, the A subunit of the pertussis toxin (*ptxA*), pertactin (*prn*) and type 3 fimbriae (*fim3*) were studied using PCR-based sequencing as described previously [21,22]. Additionally, the promoter type of pertussis toxin (*ptxP*) was also studied [14].

Fimbrial serotyping

Fimbriae 2 (FIM2) and 3 (FIM3) serotyping of all 339 *B. pertussis* isolates included in the present study were performed by the indirect ELISA method as described previously [23,24]. Monoclonal antibodies (06/124; FIM2, and 06/128; FIM3) were obtained from the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) and the reference strains Tohama I (FIM2),

B1900 (FIM3) and B3313 (FIM2 and FIM3) were used as positive controls.

Statistical analysis

PFGE profiles and MLVA types diversity were calculated based on the ratio between the PFGE profiles or MLVA types identified by the total number of isolates. The Simpson diversity index (SDI) was calculated based on the formula $SDI = 1 - \sum n(n-1)/N(N-1)$ where n indicates the number of individual PFGE profiles or MLVA types identified and N indicates the number of all PFGE profiles or MLVA types observed [18].

Results

Study periods

All the isolates recovered in the present study ($n = 339$) were grouped into three study periods taking into account the gradual WCV replacement: period 1 (1986–1997, $n = 82$) was defined as WCV administration alone; period 2 (1998–2003, $n = 82$) was the vaccine transition period, and period 3 (2007–2015, $n = 175$) was characterized as exclusive ACV administration.

Molecular typing: PFGE

The genetic relatedness of the 339 isolates was evaluated by PFGE. The results identified a total of 38 different PFGE profiles (Table S1, Supplementary Information). Of these, 19, 10 and 18 PFGE profiles from periods 1, 2 and 3, respectively were identified.

VH2 was the only PFGE profile detected along the entire period (1986–2015), with a remarkable gap in the epidemic year 2000 and the following interepidemic years 2001–2002 (Figure 1). Additionally, a replacement of PFGE profiles was observed across the three periods, being more notable from period 1 to period 2. In period 1 (1986–1997, WCV) the PFGE profiles most frequently detected were VH2 (23.2%), VH8 (17.1%), VH5 (14.6%), VH12 (12.2%) and VH7 (7.3%). The introduction of ACV during period 2 (1998–2003) correlated with the emergence of VH19 (40.2%) and VH20 (36.6%), which were only marginally detected (1.2%) during period 1. Finally, in period 3 (2007–2015, ACV) PFGE profiles VH19 (28.6%), VH26 (24.6%), VH2 (18.3%) and VH22 (8%) were the most prevalent. During this last period, VH19 was the most frequent PFGE profile before the epidemic year 2011 (from 2007 to 2010, 48.6%; from 2011 to 2015, 15.2%), whereas progressive replacement by PFGE profiles VH26 and VH2 was observed from 2011 onwards (from 2007 to 2010, 10% and 11.4%, respectively; from 2011 to 2015, 34.3% and 22.9%, respectively) (Figure 1).

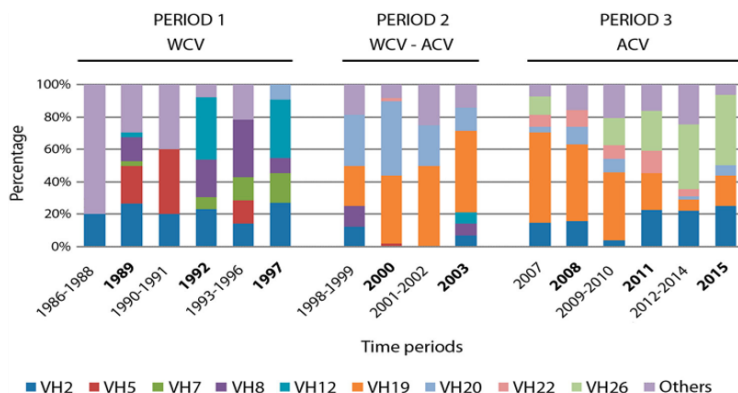


Figure 1. Temporal distribution of PFGE profiles of *B. pertussis* circulating in the metropolitan area of Barcelona from 1986 to 2015. WCV: Whole cell vaccine; ACV: Acellular vaccine; Bold-face type is used to indicate epidemic years.

The PFGE profiles of clinical isolates obtained from several European countries from 1998 to 2015 were compared [16–18]. The results showed that the predominant European PFGE profiles BpSR3, BpSR5, BpSR10, BpSR11 and BpSR12 were respectively indistinguishable from VH26, VH22, VH2, VH19 and VH20 reported in this study, (Figure S2, Supplementary Information). General trends were similarly observed in both geographical areas (Europe and Spain) (Table 2): (i) BpSR11 (VH19) was the predominant profile during the period 1998–2005 (27–40%) and showed decreased prevalence in recent years (15–29%); (ii) BpSR10 (VH2) was less prevalent during the period 1998–2005 but has increased since 2006 (from 8% to 27% in Europe, from 4% to 18% in Spain); (iii) BpSR5 (VH22) has shown a similar low prevalence in both studies since its first detection in 1998 (1–11%); and (iv) BpSR3 (VH26) remained undetected from 1986 to 2003 but rapidly became one of the most prevalent types during the period 2007–2015 (22–29% in both areas). On the contrary, the greatest difference was seen for the PFGE profile BpSR12 (VH20). It was one of the most prevalent types in Spain (37%) from 1998 to 2003, thereafter it showed a remarkable decrease (4%) and was only

a minor profile (4–7%) in Europe throughout the study period.

Molecular typing: MLVA

MLVA typing was performed in 72 isolates selected as being representative of each PFGE profile (28, 16 and 28 isolates from each period, respectively) (Table S1, Supplementary Information). Overall, 13 different MLVA types (MTs) were found: 11, 4 and 4 MTs were detected during periods 1, 2 and 3, respectively. Among these, MT27 was the most prevalent type (56.9%) and clearly showed an increasing frequency: 25% during period 1, 68.8% during period 2 and 79.3% in the third period (Figure 2). Less representative MTs were MT16, MT28, MT60, MT70, MT95, MT101 and MT158, which were detected in more than one isolate with a prevalence per period ranging from 6.3% to 18.8%. Among these, MT28 was the only MT detected throughout the three periods (7.1%, 6.3% and 7.1%, respectively). The remaining MTs were exclusive of period 1 (MT70, MT16 and MT95), exclusive of period 3 (MT101) or present in both periods 1 and 2 (MT60 and MT158). Finally, five MTs were represented by

Table 2. PFGE profiles of *B. pertussis* circulating in the metropolitan area of Barcelona from 1986 to 2015 compared to PFGE profiles circulating in European countries from 1998 to 2015.

HVH PFGE profile	Time periods			European Equivalent PFGE profile ^a	Time periods			
	1986–1997 <i>n</i> = 82	1998–2003 <i>n</i> = 82	2007–2015 <i>n</i> = 175		EUpert I (1998–2001) <i>n</i> = 102	EUpert II (2004–2005) <i>n</i> = 154	EUpert III (2007–2009) <i>n</i> = 140	EUpert IV (2012–2015) <i>n</i> = 265
VH2	23	4	18	BpSR10	8	10	21	27
VH19	0	40	29	BpSR11	27	30	13	15
VH20	1	37	4	BpSR12	4	7	4	4
VH22	0	1	8	BpSR5	6	8	11	5
VH26	0	0	25	BpSR3	0	8	22	29
Total	24	82	84	Total	45	63	71	80

Note: Values are %.

^aThese data have been collected from EUpert studies [16–18].

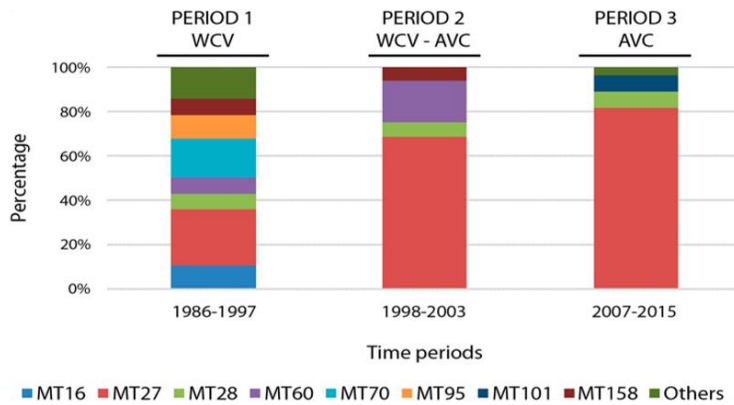


Figure 2. MLVA types of *B. pertussis* circulating in the metropolitan area of Barcelona from 1986 to 2015. WCV: Whole cell vaccine; ACV: Acellular vaccine.

single isolates: MT32, MT133, MT135 and MT146 from period 1 and MT30 from period 3 (3.6% individual prevalence per period).

Comparative genetic diversity

The comparison of the genetic diversity among the three study periods based on differences in percentages of PFGE profiles and MTs showed a gradual decrease over time (Table 3). Thus, the diversity of the PFGE profiles identified decreased from 23.2% in period 1, to 12.2% in period 2, and to 10.3% in period 3. A similar and more evident decrease was seen for the MLVA-types, from 39.3% in period 1, to 25% in period 2, and to 14.3% in period 3. The Simpson’s diversity indexes calculated for each study period showed no differences in the transition from WCV to ACV on analysing the PFGE profiles (0.88 period 1, 0.70 period 2 and 0.82 period 3), whereas differences were noted when MLVA was taken into consideration (0.89 period 1, 0.52 period 2, and 0.33 period 3).

ACV impact on the evolution of antigen variants and fimbrial serotype

Allelic variant analysis was carried out in a selection of isolates to assess the prevalence and evolution of

Table 3. Percentage of PFGE profiles and MLVA types identified and Simpson diversity index calculated for PFGE and MLVA in the three study periods.

Method	Genetic diversity analysis	Time periods		
		1986–1997	1998–2003	2007–2015
PFGE	Diversity (%)	23.2	12.2	10.3
	Simpson diversity index	0.88	0.70	0.82
MLVA	Diversity (%)	39.3	25	14.3
	Simpson diversity index	0.89	0.52	0.33

the most frequently studied vaccine components (PT, PRN and FIM3) among the *B. pertussis* population from Barcelona over the last 30 years (Figure 3). The promoter type of the pertussis toxin (*ptxP*) was also studied. A total of 231 isolates were analysed (40 belonging to period 1, 16 to period 2, and 175 to period 3).

Regarding the *ptxA* gene, our results revealed that all the isolates analysed carried the *ptxA1* allele (Figure 3 (A)). In contrast, an important shift was observed concerning the promoter type. *PtxP1* was the most prevalent type while WCV was administered (period 1, 87.5%; period 2, 12.5%) but became undetectable when ACV was the only type of vaccine used in Spain (period 3) (Figure 3(B)). An inverse correlation was seen for the new *ptxP3* variant associated with higher PT production levels. It was first detected in 1996 (5%, period 1) and rapidly became the predominant allele (87.5% and 97.7% for periods 2 and 3, respectively). This predominance was seen in all the PFGE profiles analysed with the exception of VH5, a PFGE profile almost exclusive of period 1, as the only VH5 isolate collected in 2000 and analysed here harboured the *ptxP1* variant. Other less prevalent promoter types (2.3–2.5%) were observed in period 1 (*ptxP5*, *ptxP10* and *ptxP11*) and period 3 (*ptxP15*).

The pertactin gene allele distribution proved to be heterogeneous during period 1. Specifically, *prn1* and *prn3* were the most frequently detected (42.5% and 20%, respectively), while a lower frequency of *prn2* was detected (3.7%). Nonetheless, the *prn2* allele became the most predominant after the introduction of ACV, reaching a prevalence of 87.5% in period 2 and 97.7% in period 3 (Figure 3(C)).

Finally, regarding the *fim3* genotype, our results showed that all the isolates studied in period 1 carried the *fim3-1* variant, whereas a similar prevalence of

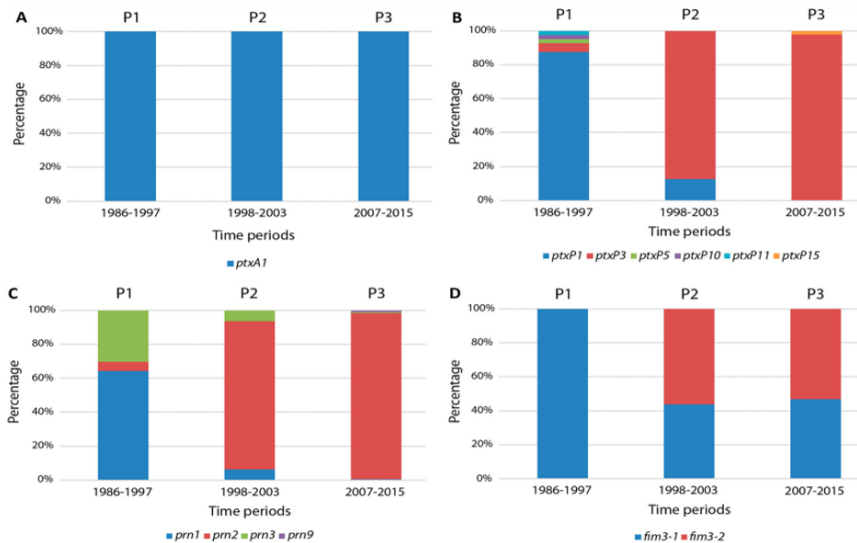


Figure 3. Antigen variants detected in *B. pertussis* circulating in the metropolitan area of Barcelona from 1986 to 2015. (A) Pertussis toxin. (B) Pertussis toxin promoter type. (C) Pertactin. (D) Type 3 fimbriae. P1: exclusive use of whole cell vaccine; P2: transition from whole cell vaccine to acellular vaccine; P3: exclusive use of acellular vaccine.

fim3-1 and *fim3-2* variants were detected in periods 2 (43.8% and 56.3%, respectively) and 3 (46.9% and 53.1%, respectively) (Figure 3(D)). Intriguingly, from 2011 onwards *fim3-1* showed a progressive reemergence to again become the most predominant variant over *fim3-2* (data not shown). Thus, the 2 most prevalent allelic combinations detected in the present study during the most recent years were defined by isolates carrying the same allelic composition for *ptxA1*, *ptxP3* and *prn2*, while only differing in the allele encoding FIM3 (Figure 4).

Regarding fimbrial serotyping, overall 72.6% of the isolates had FIM3, 20.9% FIM2 and 3.2% FIM2/3. Additionally, 11 isolates (3.2%) were deficient for FIM2 and FIM3. The distribution of the serotypes per periods revealed that there was a significant increase of FIM3 isolates during the transition from WCV to ACV (57.3% during period 1, 90.2% during period 2; $P < .05$) while FIM2 decreased dramatically (31.7% during period 1, 0% during period 2; $P < .05$). However, once the ACV was completely introduced (period 3), a progressive decrease of FIM3 isolates

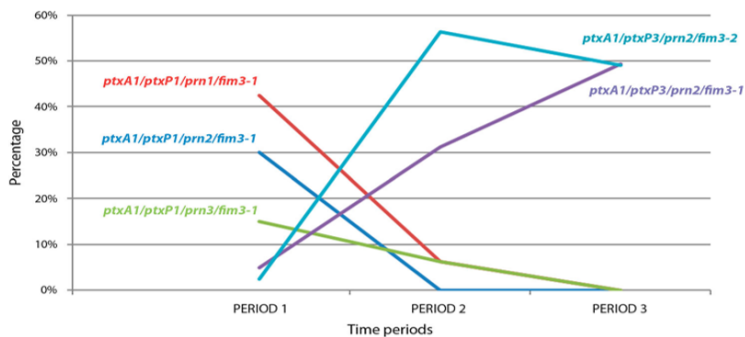


Figure 4. Temporal evolution of the most prevalent antigenic profiles observed in *B. pertussis* circulating in the metropolitan area of Barcelona from 1986 to 2015. Period 1: exclusive use of whole cell vaccine; Period 2: transition from whole cell vaccine to acellular vaccine; Period 3: exclusive use of acellular vaccine.

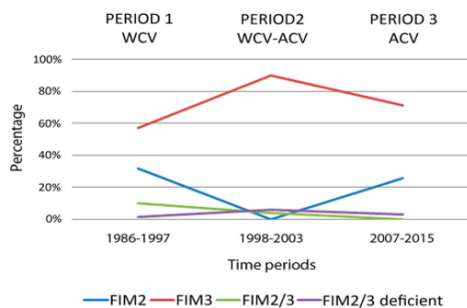


Figure 5. Evolution of fimbrial serotypes in *B. pertussis* isolates circulating in the metropolitan area of Barcelona from 1986 to 2015. WCV: Whole cell vaccine; ACV: Acellular vaccine.

was detected (71.4%) as long as FIM2 isolates gradually reemerged (25.7%) (Figure 5). During period 1 (WCV), all FIM2 and FIM3 isolates were associated with a *fim3-1* genotype, while during period 2 (transition from WCV to ACV) 46.2% and 53.8% of the FIM3 isolates studied belonged to *fim3-1* and *fim3-2* genotypes, respectively. Finally, in period 3 (ACV), all the FIM2 isolates had the *fim3-1* genotype while both genotypes were identified (71.2% *fim3-2* and 28.8% *fim3-1*) for FIM3 isolates. There was no correlation among serotypes and vaccinated, non-vaccinated and partially vaccinated patients ($P > .05$).

Combining the analysis of PFGE profiles and fimbrial serotype, most of the FIM2 isolates belonged to PFGE profiles VH26 and VH2 (42.3% and 18.3%, respectively) while most of the FIM3 isolates belonged to PFGE profiles VH19, VH2 and VH20 (32.1%, 15.4% and 14.2%, respectively). Regarding the most common PFGE profiles, isolates belonging to VH2 and VH26 included positive isolates for the FIM2 (24.1% and 69.8%, respectively) and also the FIM3 (70.4% and 27.9%, respectively) serotypes, whereas PFGE profiles VH19, VH20 and VH22 were almost exclusively FIM3 (95.2%, 92.1% and 100%, respectively). There was no significant association between FIM2/3, or FIM2 and FIM3 deficient isolates and specific PFGE profiles (Table S1, Supplementary Information).

Discussion

Changes in the *B. pertussis* population have been reported worldwide [2–4,13]. Nonetheless, there are no data related to Spanish strains. In this study, 339 *B. pertussis* isolates collected in Barcelona during the period 1986–2015 were analysed to assess the molecular evolution of this pathogen. Moreover, the global impact of the vaccine transition strategy from WCV to ACV was assessed by integrating data from molecular typing and antigenic variance. The results of this study show a clear shift in the *B. pertussis* population

as well as in its antigenic profile concurrent with the introduction of ACV, as noted in other countries.

Only isolates showing the VH2 PFGE profile were found to persist throughout the entire study period. Isolates belonging to PFGE profiles VH8, VH5 and VH12, which were predominant during the years in which WCV was the only vaccine administered, were almost completely replaced by the newly appearing profiles VH19, VH20 and VH22, which became dominant once ACV remained as the only vaccine in use. Finally, PFGE profile VH26 appeared in 2007 and has become the most prevalent profile since 2011. These results are largely consistent with the most prevalent PFGE profiles detected in Europe within the same 30-year time frame [2,16–18]. Our findings are also in agreement with the predominant PFGE profiles circulating in the US since 2000 [3]. Overall, these results reinforce the successful intercountry dissemination of *B. pertussis* lineages not only among neighbouring countries but also among overseas territories with similar vaccination policies. However, slight variations in the prevalence of the distribution of some PFGE profiles were noted on comparing local and European isolates. Specifically, the PFGE profile VH20 was one of the most prevalent types in Barcelona from 1998 to 2003 (37%) but showed a noteworthy decrease from 2007 to 2015 (4%). On the contrary, its equivalent European PFGE profile (BpSR12) was only a minor profile in Europe during the whole study period (4–7%). This fact highlights the need for regional studies to fully understand population dynamics within and across territories. Probably, the introduction of whole-genome sequence in future studies may shed new light on the understanding of the evolution and rate of lineage mixing within areas.

Next, we assessed whether there are epidemiological differences between epidemic and inter-epidemic periods. The percentage of minority PFGE profiles was clearly increased in the latter, particularly for period 1 and less pronounced in period 2. It is of interest that the VH12 PFGE profile was only detected during the epidemic years 1989, 1992 and 1997. These results suggest that some epidemic waves might be related to particular clones sharing specific characteristics, what could contribute to increased dissemination potential.

The MLVA results supported the PFGE findings regarding temporal trends and dynamic changes in the population structure of *B. pertussis* in Barcelona over time. A trend to a lower diversity of MTs was observed in concurrence with the switch in vaccines, mainly due to the growing dominance of MT27 (25% during WCV administration from 1986 to 1997, to 79.3% once ACV was completely implemented). Similar figures have been reported across Europe as well as in the US and Australia since the introduction of ACV [2,13,18,25]. In contrast, the prevalence of MT27 is

marginal in countries in which WCV is still used, or has been used until only recently, such as in China (6% in period 2012–2013), Poland (2.9% in period 1959–2013) or the Philippines (not detected) [26–28].

Apart from changes in the bacterial epidemiological profiles, we also assessed the impact of the introduction of ACV on the allelic selection of vaccine-related virulence determinants. We found that all the isolates collected across the entire study period were *ptxA1*, in agreement with previous reports in which *ptxA1* was described as being the most prevalent variant at the end of the 1960s immediately after the introduction of the WCV [9]. Consequently, as the PT variants included in the ACV are encoded by *ptxA2* and *ptxA4* alleles, a protective effect against *ptxA1* is no longer expected.

On the contrary, two remarkable antigenic shifts were found: the first was related to the new PT promoter variant *ptxP3*, and the second to the *prn2* allele. Strains carrying the *ptxP3* variant have been characterized by increased toxin production levels and higher virulence potential [14]. Moreover, such strains have been associated with the reemergence of the pathogen in most parts of the world since the 1990s, concomitant to a shift towards older age groups [13,14,29]. The abrupt replacement of *ptxP1* by *ptxP3* seen in period 2 was paralleled by a similar change in the prevalence of PRN variants, with *prn2* becoming dominant after almost completely displacing *prn1*. This is in the line of previous reports showing a similar shift towards a clear dominance of the *prn2* allele after the introduction of ACV, which includes the allelic variants *prn1* and *prn7* which were most frequently detected before the withdrawal of WCV [9,18].

Lastly, we also completed the antigenic profile of our isolates by the characterization of the FIM3 genotype, which is absent in some commercially available ACVs. To date, two alleles have been reported as being the most prevalent: *fim3-1* and *fim3-2*. The results of our study show that all the strains analysed from period 1 only carried the *fim3-1* variant, whereas a substantial decrease was subsequently observed towards a similar proportion (43.8% for period 2 and 46.9% for period 3). Nonetheless, since 2011 *fim3-1* has shown a progressive reemergence towards the predominant variant. Similar results have been reported in Dutch isolates which showed a transitory increased prevalence of *fim3-2* strains which reverted a few years later [30]. Although overall most of the isolates were FIM3 (72.6%), on stratifying the results according to the vaccine administered once ACV was introduced, a progressive shift from FIM3 to FIM2 was observed, even though most of ACV compositions used in our area do not contain any fimbrial antigen (Table 1). Similar results were reported in different European countries, such as Denmark and Finland, where ACV does not contain fimbrial components and FIM2

isolates were the most prevalent from 2012 to 2015. Conversely, FIM3 isolates were predominant during the period 2012–2015 in France, United Kingdom and Sweden, although the ACV contained fimbrial components only in the first two [18]. Therefore, factors other than the type of fimbrial antigen contained in the vaccine may be involved in the serotype shift. On the other hand, comparing the association of fimbrial serotype with PFGE profiles we observed that, as previously found in the EUpert III and IV studies, isolates belonging to VH19 (BpSR11), VH20 (BpSR12) and VH22 (BpSR5) PFGE profiles were mostly associated with FIM3 regardless of the period in which they were isolated. However, during the transition from WCV to ACV, all VH2 (BpSR10) and VH26 (BpSR3) isolates were FIM3 while a shift towards the FIM2 serotype was observed once the ACV was fully implemented [17,18].

According to the results of the present study, the alleles detected in the most prevalent isolates circulating in our population since 2011, and at least until 2015, were as follows: *ptxA1* for the pertussis toxin, which is regulated by a *ptxP3* type promoter, *prn2* for pertactin and *fim3-1* for serotype 3 fimbriae. The corresponding shifts in the antigenic profile of the strains can be partially correlated with PFGE profile replacement, particularly in period 3: the PFGE profile VH19 (mainly *ptxA1*, *ptxP3*, *prn2*, *fim3-2*) has been replaced by VH26 (mainly *ptxA1*, *ptxP3*, *prn2*, *fim3-1*). These results suggest that the absence of uniformity in vaccine composition has failed to counteract the dissemination of *fim3-1* isolates. Dissemination of VH26 could be supported by a bacterial advantage provided by this fimbrial allele or by another virulence trait specific of this clone. Conversely, VH2 (mainly *ptxA1*, *prn2*, *fim3-1*) was detected throughout three study periods, and several factors may have influenced its continuous detection: no selective pressure on pertactin together with an inner adaptation ability, highlighting that the same PFGE profile acquired the widely disseminated *ptxP3* variant. Thus, the adaptive plasticity of *B. pertussis* facilitates the diversity and selection of the most appropriate clones in addition to an evolving ability to integrate chromosomal changes in the same clone.

In conclusion, these results support the presence of dynamic changes in the *B. pertussis* population as well as in its antigenic profile in Barcelona (Spain) over a 30-year time period, with a trend towards homogenization following the introduction of the ACV. Our findings suggest that the use of the ACV has likely driven the population changes and antigenic shift of *B. pertussis*.

Acknowledgments

We are grateful to Marjolein Van Gent from the National Institute for Public Health and the Environment (RIVM,

Bilthoven, the Netherlands) for kindly providing us the reference European *B. pertussis* isolates used in this study. We like to thank Victor Llorens, Adelaida Ferrer and Juliana Esperalba from Hospital Vall d'Hebron for their contribution in the creation of the *B. pertussis* isolates collection and for their technical advice.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the “Ministerio de Economía y Competitividad”, “Instituto de Salud Carlos III”, and cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF) “A Way to Achieve Europe” (Spanish Network for Research in Infectious Diseases [grant number RD16/0016/0003], “Fondo de Investigación Sanitaria [grant number FIS P118/ 00703]). AMC is supported by the “Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris i de Recerca, Generalitat de Catalunya” [grant number 2018FI_B_00855].

ORCID

- Alba Mir-Cros  <http://orcid.org/0000-0003-4827-9824>
- Albert Moreno-Mingorance  <http://orcid.org/0000-0002-3073-5046>
- M. Teresa Martín-Gómez  <http://orcid.org/0000-0001-8119-8749>
- Gema Codina  <http://orcid.org/0000-0002-5313-5086>
- Thais Cornejo-Sánchez  <http://orcid.org/0000-0002-1350-0413>
- Carlos Rodrigo  <http://orcid.org/0000-0003-1140-2585>
- Magda Campins  <http://orcid.org/0000-0002-8841-6195>
- Tomàs Pumarola  <http://orcid.org/0000-0002-5171-7461>
- Anna Fàbrega  <http://orcid.org/0000-0002-3866-2291>
- Juan José González-López  <http://orcid.org/0000-0003-2419-5909>

References

- [1] Campins M, Moreno-Pérez D, Gilde Miguel A, et al. Whooping cough in Spain. Current epidemiology, prevention and control strategies. Recommendations by the pertussis working group. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2013;31(4):240–253.
- [2] van Gent M, Heuvelman CJ, van der Heide HG, et al. Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998–2012. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(4):821–830.
- [3] Cassidy PK, Skoff TH, Jawahir S, et al. Changes in predominance of pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Bordetella pertussis* isolates, United States, 2000–2012. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(3):442–448.
- [4] Miyaji Y, Otsuka N, Toyozumi-Ajisaka H, et al. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008–2010 pertussis epidemic in Japan. *PLoS One.* 2013;8(10):e77165. doi:10.1371/journal.pone.0077165.
- [5] World Health Organization. Immunization, vaccines and biologicals: pertussis. 2018 [cited 2019 Apr 15]. http://www.who.int/immunization/monitoring_survei

llance/burden/vpd/surveillance_type/passive/pertussis/en/.

- [6] Kilgore PE, Salim AM, Zervos MJ, et al. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(3):449–486.
- [7] Instituto de Salud Carlos III. Enfermedades de declaración obligatoria. Informes anuales. 2018 [cited 2019 Apr 15]. <https://eng.isciii.es/eng.isciii.es/Que Hacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Paginas/Informes.html>.
- [8] Canal Salut. Butlletí Epidemiològic de Catalunya (BEC). 2018 [cited 2019 Apr 15]. http://canalsalut.gencat.cat/ca/actualitat/llista_butlletins/salut_publica/butlleti_epidemiologic_de_catalunya/.
- [9] Mooi FR, van der Maas NAT, de Melker HE. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation – two sides of the same coin. *Epidemiol Infect.* 2014;142(4):685–694.
- [10] He Q, Mertsola J. Factors contributing to pertussis resurgence. *Future Microbiol.* 2008;3(3):329–339.
- [11] Ausiello CM, Cassone A. Acellular pertussis vaccines and pertussis resurgence: revise or replace? *MBio.* 2014;5(3):e01339–e01314.
- [12] Octavia S, Maharjan RP, Sintchenko V, et al. Insight into evolution of *Bordetella pertussis* from comparative genomic analysis: evidence of vaccine-driven selection. *Mol Biol Evol.* 2011;28(1):707–715.
- [13] Octavia S, Sintchenko V, Gilbert GL, et al. Newly emerging clones of *Bordetella pertussis* carrying prn2 and ptxP3 alleles implicated in Australian pertussis epidemic in 2008–2010. *J Infect Dis.* 2012;205(8):1220–1224.
- [14] Mooi FR, van Loo IHM, van Gent M, et al. *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(8):1206–1213.
- [15] Lam C, Octavia S, Bahrame Z, et al. Selection and emergence of pertussis toxin promoter ptxP3 allele in the evolution of *Bordetella pertussis*. *Infect Genet Evol.* 2012;12(2):492–495.
- [16] Hallander H, Advani A, Riffelmann M, et al. *Bordetella pertussis* strains circulating in Europe in 1999 to 2004 as determined by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 2007;45(10):3257–3262.
- [17] Advani A, Hallander HO, Dalby T, et al. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Bordetella pertussis* isolates circulating in Europe from 1998 to 2009. *J Clin Microbiol.* 2013;51(2):422–428.
- [18] Barkoff A-M, Mertsola J, Pierard D, et al. Surveillance of circulating *Bordetella pertussis* strains in Europe during 1998–2015. *J Clin Microbiol.* 2018;56(5):e01998–17.
- [19] Advani A, Donnelly D, Hallander H. Reference system for characterization of *Bordetella pertussis* pulsed-field gel electrophoresis profiles. *J Clin Microbiol.* 2004;42(7):2890–2897.
- [20] Schouls LM, van der Heide HGJ, Vauterin L, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Dutch *Bordetella pertussis* strains reveals rapid genetic changes with clonal expansion during the late 1990s. *J Bacteriol.* 2004;186(16):5496–5505.
- [21] Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, et al. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect Immun.* 1998;66:670–675.

- [22] Tsang RSW, Lau AKH, Sill ML, et al. Polymorphisms of the fimbria *fim3* gene of *Bordetella pertussis* strains isolated in Canada. *J Clin Microbiol.* 2004;42(11):5364–5367.
- [23] Tsang RSW, Sill ML, Advani A, et al. Use of monoclonal antibodies to serotype *Bordetella pertussis* isolates: comparison of results obtained by indirect whole-cell enzyme-linked immunosorbent assay and bacterial microagglutination methods. *J Clin Microbiol.* 2005;43(5):2449–2451.
- [24] Heikkinen E, Xing DK, Ölander R-M, et al. *Bordetella pertussis* isolates in Finland: serotype and fimbrial expression. *BMC Microbiol.* 2008;8(1):162.
- [25] Bowden KE, Williams MM, Cassidy PK, et al. Molecular epidemiology of the pertussis epidemic in Washington State in 2012. *J Clin Microbiol.* 2014;52(10):3549–3557.
- [26] Du Q, Wang X, Liu Y, et al. Direct molecular typing of *Bordetella pertussis* from nasopharyngeal specimens in China in 2012–2013. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(7):1211–1214.
- [27] Mosiej E, Krysztopa-Grzybowska K, Polak M, et al. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis of *Bordetella pertussis* isolates circulating in Poland in the period 1959–2013. *J Med Microbiol.* 2017;66(6):753–761.
- [28] Galit SRL, Otsuka N, Furuse Y, et al. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* in the Philippines in 2012–2014. *Int J Infect Dis.* 2015;35:24–26.
- [29] Schmidtke AJ, Boney KO, Martin SW, et al. Population diversity among *Bordetella pertussis* isolates, United States, 1935–2009. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(8):1248–1255.
- [30] van Gent M, Bart MJ, van der Heide HGJ, et al. Small mutations in *Bordetella pertussis* are associated with selective sweeps. *PLoS One.* 2012;7(9):e46407. doi:10.1371/journal.pone.0046407.

ESTUDI 2. Emergència de *Bordetella holmesii* com agent productor de tosferina a Barcelona.

Emergence of *Bordetella holmesii* as a causative agent of whooping cough, Barcelona, Spain

Alba Mir-Cros, Gema Codina, M. Teresa Martín-Gómez, Anna Fàbrega, Xavier Martínez, Mireia Jané, Diego Van Esso, Thais Cornejo, Carlos Rodrigo, Magda Campins, Tomàs Pumarola, Juan José González-López

Emerging Infectious Diseases 2017, 23:11, 1856-1859

DOI: 10.3201/eid2311.170960

2017 Journal Impact Factor: 7.422 (D1)

BREU RESUM DELS RESULTATS

A més de *B. pertussis*, altres espècies del gènere *Bordetella* poden causar una infecció de les vies respiratòries amb quadres clínics similars als produïts per *B. pertussis*. Aquest és el cas de *B. holmesii*, una espècie recentment identificada com a agent etiològic de tosferina. Durant molts anys, el diagnòstic molecular de la tosferina s'ha realitzat mitjançant la detecció de l'element IS481. No obstant això, aquesta diana s'ha identificat no només en el genoma de *B. pertussis* sinó també en el genoma de *B. holmesii*. Aquest fet ha posat de manifest l'existència de diagnòstics erronis de l'agent causal de la tosferina, infradiagnosticant-se els casos originats per altres espècies del gènere *Bordetella*. Per tal d'entendre la contribució de *B. holmesii* en l'epidemiologia de la tosferina en el nostre medi, en el present treball es va avaluar el seu paper com agent productor de tosferina a Barcelona. Per això, es van estudiar un total de 391 mostres nasofaríngees de pacients diagnosticats d'aquesta malaltia al llarg del període 2013-2016 mitjançant l'ús de la diana IS481. Per tal de

confirmar l'espècie del gènere *Bordetella* responsable de la infecció es va utilitzar una RT-PCR múltiple, la qual es va dissenyar amb encebadors específics per a la detecció de *B. pertussis* (promotor de l'operó de la PTX, *ptxAPr*) i *B. holmesii* (gen *recA*, *Bh-RecA*). Addicionalment, per aquelles mostres amb un resultat de RT-PCR positiu, es va confirmar la identificació de l'espècie a través de la seqüenciació del gen *nrdA*, el qual permet la discriminació de les diferents espècies del gènere *Bordetella*.

D'acord amb els resultats obtinguts, es va descriure per primera vegada la detecció de *B. holmesii* com a causa de tosferina a Espanya, amb una prevalença del 3,9% l'any 2015 i duplicant-se fins a arribar al 8,8% l'any 2016. En el 62,5% dels casos positius per *B. holmesii*, aquest microorganisme es va detectar com a únic agent atribuïble al quadre clínic, mentre que en el 37,5% dels casos restants, es va identificar en combinació amb altres espècies del gènere *Bordetella* (83,3% *B. pertussis* i 16,7% *B. parapertussis*).

Pel que fa a les característiques clíniques-epidemiològiques dels pacients amb un quadre clínic de tosferina causat per *B. holmesii*, no es van observar diferències significatives destacables en relació amb aquells casos els quals eren causats per *B. pertussis*, pel que fa a l'edat dels pacients, la presència de febre, gall inspiratori, paroxismes o tos de més de catorze dies, així com la necessitat d'hospitalització. No obstant això, es va observar una tendència per part de *B. holmesii* a infectar infants d'edat més avançada (*B. holmesii*: mediana d'edat de 9 anys i rang de 4-40 anys; *B. pertussis*: mediana d'edat de 5,5 anys i rang de 0,08-74 anys). Pel que fa a l'estat vacunal dels individus que desenvolupen tosferina per *B. holmesii*, el 87,5% dels pacients incloïa una mediana de 5 dosis de vacunes antipertússiques rebudes en el moment del diagnòstic, amb una mediana de 4,5 anys transcorreguts des de l'última dosi rebuda (rang 0,7-14,1 anys). Finalment, quant a la vinculació de *B. holmesii* a esdeveniments epidemiològics de rellevància per a la seva transmissió, es va

identificar que en el 87,5% dels casos positius per aquest microorganisme, els casos estaven vinculats a un brot, inclosos brots en l'àmbit escolar (85,7%) i brots en el context familiar (35,7%).

En relació amb la terapèutica antimicrobiana dels pacients infectats per *B. holmesii*, quinze dels setze pacients identificats en aquest estudi van ser tractats amb azitromicina i en cap d'ells es van evidenciar complicacions o recidives després de la seva administració. Malgrat que actualment no es disposen de recomanacions clares de quina ha de ser la terapèutica d'elecció per tractar un pacient amb tosferina produïda per *B. holmesii* i que diversos estudis apunten a una menor activitat dels macròlids en comparació a altres agents antimicrobians, les dades observades apunten al fet que l'ús de l'azitromicina podria ser, a priori, considerat com un tractament efectiu. No obstant això, donat el reduït nombre de casos identificats fins al moment, es fa necessari continuar monitorant l'efectivitat d'aquest antimicrobià per tractar les infeccions respiratòries produïdes per *B. holmesii*.

Així doncs, aquestes troballes posen de manifest l'emergència de *B. holmesii* com a agent causal de tosferina en el nostre entorn. Aquest fet demostra la necessitat d'adaptar les eines diagnòstiques utilitzades actualment per a la identificació de l'agent causal d'aquesta malaltia amb l'objectiu de poder fer un diagnòstic precís, així com determinar la incidència real dels diferents agents etiològics de la tosferina. Tot això, a més, serà essencial per a poder identificar i implementar les mesures terapèutiques i preventives adequades, conèixer la contribució que les espècies de *Bordetella* tenen en l'epidemiologia de la tosferina i poder establir de forma precisa l'eficàcia de les vacunes enfront de la infecció per *B. pertussis*.

Emergence of *Bordetella holmesii* as a Causative Agent of Whooping Cough, Barcelona, Spain

Alba Mir-Cros, Gema Codina,
M. Teresa Martín-Gómez, Anna Fàbrega,
Xavier Martínez, Mireia Jané, Diego Van Esso,
Thais Cornejo, Carlos Rodrigo, Magda Campins,
Tomàs Pumarola, Juan José González-López

We describe the detection of *Bordetella holmesii* as a cause of whooping cough in Spain. Prevalence was 3.9% in 2015, doubling to 8.8% in 2016. This emergence raises concern regarding the contribution of *B. holmesii* to the reemergence of whooping cough and the effectiveness of the pertussis vaccine.

Whooping cough is a highly contagious respiratory disease, primarily caused by *Bordetella pertussis* (1). Other species, such as *B. parapertussis* and *B. holmesii*, have been recognized as causes of a syndrome that clinically resembles that of whooping cough (1,2). Pertussis is the term used for the disease specifically caused by *B. pertussis*, whereas pertussis-like illness or syndrome is more appropriately used when referring to the other etiologic agents. *B. holmesii*, a poorly studied pathogen, was originally identified in 1995 as a rare cause of bacteremia (3). Since then, it has been related to other invasive diseases, especially in asplenic and immunosuppressed patients and in healthy people with pertussis-like symptoms (4).

Microbiologic diagnosis of whooping cough by molecular tests provides a higher sensitivity and promptness than culture techniques, with PCR being the method most commonly used in clinical laboratories (5). Most molecular diagnostic kits used to detect *B. pertussis* target insertion sequence IS481, which is present in high copy numbers in the *B. pertussis* genome (6). However, IS481 is not a

specific target of *B. pertussis* because it is also found in other *Bordetella* species, including *B. holmesii*, leading to underestimation of this pathogen in this clinical scenario (6).

To date, several cases of *B. holmesii* associated with pertussis-like illness have been reported in North and South America, Asia, Africa, and Europe (4). Additionally, 2 important outbreaks of *B. holmesii* infection associated with pertussis-like illness were detected in France and Ohio (7,8). Recent reports of the detection of positive cases of *B. holmesii* infection in the Netherlands (9), which previous analysis had failed to identify (10), reinforce the emergence of this pathogen. To our knowledge, the presence of this microorganism in Spain has not been documented. We report the emergence of *B. holmesii* as a causative agent of whooping cough in the metropolitan area of Barcelona, Spain.

The Study

We evaluated 391 nasopharyngeal samples from patients from the metropolitan area of Barcelona who had a clinical and laboratory-confirmed diagnosis of whooping cough during January 2013–December 2016 at the Hospital Vall d'Hebron. All the samples were positive by the IS481-based SmartBp/Bpp (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) real-time PCR and thus were considered positive for *B. pertussis*.

We reevaluated all the samples by using species-specific multiplex real-time PCR (10). This method detects the promoter of the pertussis toxin operon (*ptxAPr*), which is specific for *B. pertussis*, and the *recA* gene (*Bh-RecA*), specific for *B. holmesii*. To corroborate the identification of *B. holmesii*, we further analyzed all the *Bh-RecA* RT-PCR-positive samples by sequencing an internal fragment of the housekeeping gene encoding the ribonucleoside-diphosphate reductase α chain (*nrDA*), which is useful for discriminating among the different species of *Bordetella* (11), and the *Bh-RecA* gene. The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the hospital.

Among the 391 nasopharyngeal samples analyzed, 380 (97.2%) were confirmed positive for *B. pertussis* and 16 (4.1%) for *B. holmesii*. Among the *B. holmesii*-positive samples, 5 were positive for *B. pertussis* and *B. holmesii* and 1 for *B. parapertussis*, *B. holmesii*, and *Streptococcus pyogenes* (Figure).

Author affiliations: Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain (A. Mir-Cros, G. Codina, M.T. Martín-Gómez, A. Fàbrega, X. Martínez, T. Cornejo, C. Rodrigo, M. Campins, T. Pumarola, J.J. González-López); Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona (A. Mir-Cros, G. Codina, C. Rodrigo, M. Campins, T. Pumarola, J.J. González-López); Public Health Agency of Catalonia, Barcelona (M. Jané); Primary Care Health Centre Service 'Muntanya,' Barcelona (D. Van Esso)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2311.170960>

B. holmesii and Whooping Cough, Barcelona, Spain

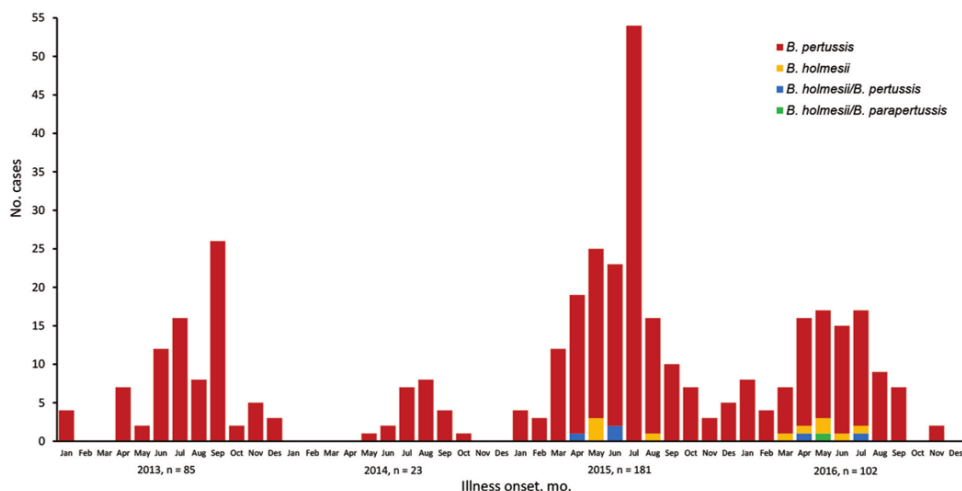


Figure. Timeline distribution of the 391 whooping cough cases diagnosed at the Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain, 2013–2016, showing *Bordetella* species detected.

None of the *B. holmesii*-positive cases was detected during 2013–2014. In total, 7 cases were reported in 2015, corresponding to 3.9% of whooping cough cases diagnosed in 2015, and the remaining 9 cases were reported in 2016, accounting for 8.8% of the cases diagnosed during that year (Figure).

Ten (62.5%) of the 16 *B. holmesii*-positive patients were female; the median age was 9 years (range 1–40 years), and 87.5% were pediatric patients (<14 years). Fourteen cases were detected in the context of a school-related (85.7%) or family (35.7%) outbreak; 3 of these cases were detected in both kinds of outbreaks.

Vaccination status was available for 14 of the 16 patients. Of these, all cases occurred in children 14 months to 14 years of age who had received a median of 5 doses of pertussis vaccine (range 2–5 doses) according to the current vaccination program (5 doses, administered at 2, 4, and 6 months and at 1.5 and 6 years of age). The median time since the last vaccination was 4.5 years (range 0.7–14.1 years) (Table 1). No cases of complications or malignant pertussis-like disease occurred. Information about antimicrobial therapy received was available for 15 patients, all of whom had been treated with

Table 1. Demographic, clinical, and epidemiologic characteristics of 16 patients with diagnosed whooping cough associated with *Bordetella holmesii* infection, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain, 2015–2016*

Patient no.	Age, y/sex	No. vaccine doses received	Date last vaccine dose received	Diagnosis date	Treatment	Co-infections	Outbreak relatedness	Site of exposure
1	10/F	5	2010 Mar 16	2015 Apr 17	AZM	<i>B. pertussis</i>	Yes	School
2	12/F	5	2008 Jul 18	2015 May 5	AZM	ND	Yes	School†
3	9/F	5	2011 Dec 12	2015 May 13	AZM	ND	Yes	School†
4	13/F	5	2007 Oct 23	2015 May 25	AZM	ND	Yes	School†
5	12/F	5	2008 Sep 6	2015 Apr 6	AZM	<i>B. pertussis</i>	Yes	School
6	28/F	UNK	UNK	2015 Apr 6	AZM	<i>B. pertussis</i>	Yes	Home
7	4/F	4	2012 Mar 8	2015 Aug 14	AZM	ND	Yes	School and home
8	9/M	5	2012 Oct 18	2016 Sep 3	UNK	ND	Yes	School
9	1/M	2	2015 Jun 8	2016 April 13	AZM	<i>B. pertussis</i>	Yes	Home
10	8/M	5	2012 Jun 26	2016 Apr 21	AZM	ND	Yes	School and home
11	6/M	4	2011 Aug 8	2016 Mar 5	AZM	<i>B. parapertussis</i> / <i>S. pyogenes</i>	Yes	School
12	40/F	UNK	UNK	2016 Sep 5	AZM	ND	UNK	UNK
13	14/F	3	2002 Aug 5	2016 May 24	AZM	ND	No	–
14	5/F	4	2012 Mar 2	2016 Sep 6	AZM	ND	Yes	School and home
15	9/M	5	2013 Sep 10	2016 Nov 7	AZM	ND	Yes	School
16	6/M	4	2011 Feb 16	2016 Jul 28	AZM	<i>B. pertussis</i>	Yes	School

*AZM, azithromycin; ND, not detected; UNK, unknown.

†These 3 patients' illnesses were related to the same school outbreak.

DISPATCHES

Table 2. Comparison of demographic, vaccination-related, and clinical characteristics between patients with *Bordetella pertussis* and *B. holmesii* infection, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain, 2015–2016*

Characteristic	<i>B. pertussis</i> , n = 40	<i>B. holmesii</i> , n = 10	p value
Median age (range), y	5.5 (0.08–74)	9 (4–40)	0.07
Median pertussis vaccine doses received (range)	4 (0–5)	5 (3–5)	0.21
Median time from last pertussis vaccine dose received to date of diagnosis (range), y	1.92 (0.08–11.70)	3.82 (1.03–14.05)	0.1
Fever, no. (%)	5 (12.5)	1 (10)	1
Whoop, no. (%)	9 (22.5)	1 (10)	0.66
Paroxysms, no. (%)	4 (10)	1 (10)	1
Cough ≥14 d, no. (%)	12 (30)	4 (40)	0.7
Hospitalized, no. (%)	4 (10)	0	0.57

*Differences were assessed for significance using the chi-squared exact test (in comparison with independent qualitative variables) and the Mann-Whitney U-test (for quantitative variables; no normality was observed in data distribution). We selected a randomized sample of confirmed *B. pertussis* cases with a 4:1 relation with *B. holmesii*-infected patients as a comparison group. p values <0.05 were considered statistically significant at the 95% CI level.

azithromycin, and no patient experienced therapeutic failure or relapse.

No statistical differences were observed between age, clinical features, and vaccination status among the case-patients with *B. holmesii* and *B. pertussis* infections (Table 2). However, *B. holmesii* infections tended to be more prevalent in older children (median age 9 vs. 5.5 years; p = 0.07) compared with *B. pertussis* infections.

Conclusions

B. holmesii is an underdiagnosed emerging respiratory pathogen that triggers clinical manifestations similar to those caused by *B. pertussis* (1). In this retrospective study, we detected 10 cases in which *B. holmesii* was found to be the only putative agent of a pertussis-like infection and 6 cases in which *B. holmesii* was co-detected with another causative agent of whooping cough. We observed no differences in the demographics, clinical features, and vaccination status among patients infected by *B. holmesii* and *B. pertussis*, but a trend toward higher involvement of *B. holmesii* infections was observed in older children, as reported previously (7,8).

We found that 4.1% of the respiratory samples from patients with laboratory-confirmed whooping cough during 2013–2016 were positive for *B. holmesii*, for which detection was reported from April 2015 onward. The number of positive cases of *B. holmesii* infection doubled from 3.9% in 2015 to 8.8% in 2016. Of note, 2015 was considered the year with the highest incidence of whooping cough since the introduction of the acellular vaccine in Spain. In the autonomous community of Catalonia, incidence (cases/100,000 inhabitants) was 13.3 for 2013, 14.8 for 2014, 48.9 for 2015, and 24.6 for 2016 (http://canalsalut.gencat.cat/ca/actualitat/llista_butlletins/salut_publica/butlleti_epidemiologic_de_catalunya).

Even in the absence of clear recommendations to treat pertussis-like respiratory infections caused by *B. holmesii*, several studies have reported controversial results about a possible lower activity of macrolides

compared with other antimicrobial agents (4,12). Unfortunately, because we could not recover the bacterial isolates, we were unable to perform antimicrobial drug susceptibility testing. However, no evidence of complications or relapses was observed in any patient after treatment with azithromycin.

B. holmesii lacks most of the antigens present in the pertussis acellular vaccine or the proteins produced differ phenotypically (4). This situation, together with the lack of protection against replication observed in immunized mice (13), suggests the absence of cross-protection against *B. holmesii* infections. In our study, most of the patients had received the complete immunization schedule of 5 doses (Table 1). Thus, the increasing trend of whooping cough might be attributed not only to *B. pertussis* adaptation to the introduction of the acellular pertussis vaccine, decreased vaccine efficacy, or waning immunity, as previously reported (14,15), but also to the emergence of secondary pathogens, such as *B. holmesii*, which the pertussis vaccine might not prevent.

Our study describes the emergence of *B. holmesii* as a causative agent of whooping cough in Spain. Accurate diagnosis of the causative agent of this disease is crucial to determine the real incidence and prevalence of the microbial species involved, to assess its contribution to the epidemiology of whooping cough, to evaluate whether specific antimicrobial drug treatments should be implemented and, in terms of public health, to assess the efficacy of the pertussis vaccine.

Acknowledgments

We are grateful to Pere Simon for providing part of the epidemiologic information. We are also grateful to Nicole Guiso for kindly providing a *B. holmesii* isolate, which was used as the positive control for the PCR experiments.

Ms. Cros-Mir is a PhD student working at the Microbiology Group of the Hospital Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain. Her research interests are the epidemiology and molecular characterization of *Bordetella pertussis* and other related species.

References

- Pittet LF, Posfay-Barbe KM. *Bordetella holmesii*: still emerging and elusive 20 years on. *Microbiol Spectr*. 2016;4.
- Ferrer A, Calicó I, Manresa JM, Andreu A, Moraga F, Valle I. Microorganisms isolated in cases of pertussis-like syndrome [in Spanish]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2000;18:433–8.
- Weyant RS, Hollis DG, Weaver RE, Amin MF, Steigerwalt AG, O'Connor SP, et al. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J Clin Microbiol*. 1995;33:1–7.
- Pittet LF, Emonet S, Schrenzel J, Siegrist C-A, Posfay-Barbe KM. *Bordetella holmesii*: an under-recognised *Bordetella* species. *Lancet Infect Dis*. 2014;14:510–9. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70021-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70021-0)
- Loeffelholz MJ, Thompson CJ, Long KS, Gilchrist MJ. Comparison of PCR, culture, and direct fluorescent-antibody testing for detection of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol*. 1999;37:2872–6.
- Williams MM, Taylor TH Jr, Warshauer DM, Martin MD, Valley AM, Tondella ML. Harmonization of *Bordetella pertussis* real-time PCR diagnostics in the United States in 2012. *J Clin Microbiol*. 2015;53:118–23. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02368-14>
- Njamkepo E, Bonacorsi S, Debryne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N. Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *J Clin Microbiol*. 2011;49:4347–8. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01272-11>
- Rodgers L, Martin SW, Cohn A, Budd J, Marcon M, Terranella A, et al. Epidemiologic and laboratory features of a large outbreak of pertussis-like illnesses associated with cocirculating *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis*—Ohio, 2010–2011. *Clin Infect Dis*. 2013;56:322–31. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis888>
- Mooi FR, Bruisten S, Linde I, Reubsæet F, Heuvelman K, van der Lee S, et al. Characterization of *Bordetella holmesii* isolates from patients with pertussis-like illness in the Netherlands. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;64:289–91. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00911.x>
- Antila M, He Q, de Jong C, Aarts I, Verbakel H, Bruisten S, et al. *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis. *J Med Microbiol*. 2006;55:1043–51. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46331-0>
- Spilker T, Leber AL, Marcon MJ, Newton DW, Darrah R, Vandamme P, et al. A simplified sequence-based identification scheme for *Bordetella* reveals several putative novel species. *J Clin Microbiol*. 2014;52:674–7. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02572-13>
- Kilgore PE, Salim AM, Zervos MJ, Schmitt H-J. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29:449–86. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00083-15>
- Zhang X, Weyrich LS, Lavine JS, Karanikas AT, Harvill ET. Lack of cross-protection against *Bordetella holmesii* after pertussis vaccination. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:1771–9. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1811.111544>
- Ausiello CM, Cassone A. Acellular pertussis vaccines and pertussis resurgence: revise or replace? *MBio*. 2014;5:e01339-14. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01339-14>
- Clark TA. Changing pertussis epidemiology: everything old is new again. *J Infect Dis*. 2014;209:978–81. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiu001>

Address for correspondence: Juan José González-López, Department of Clinical Microbiology, Hospital Vall d'Hebron, Pg Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain; email: jjgonzal@vhebron.net; Anna Fàbrega, Department of Clinical Microbiology, Hospital Vall d'Hebron, Pg Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain; email: anna.fabrega@vhir.org

RESULTATS ADDICIONALS

ESTUDI 3. Identificació i caracterització de *Bordetella pertussis* deficient en pertactina a Espanya.BREU RESUM DELS RESULTATS

Entre els processos d'adaptació de *B. pertussis* a la immunitat conferida per les vacunes DTPa s'ha identificat l'emergència de soques que deixen d'expressar els antígens inclosos en les composicions vacunals DTPa. Un dels esdeveniments més rellevants és la pèrdua de l'expressió de la PRN. Segons resultats prèviament comunicats per altres autors, aquestes soques mantenen la virulència, així com la capacitat de causar malaltia, en tant que pot veure's compromesa l'eficàcia de les vacunes DTPa que s'utilitzen actualment⁴⁰³⁻⁴⁰⁵. En el present treball es va avaluar l'expressió de la PRN d'una col·lecció de soques de *B. pertussis* aïllades a Espanya, mitjançant l'estudi d'un total de 342 aïllats clínics de *B. pertussis* productors de tosferina recollits al llarg del període 1986-2018 a quatre comunitats autònomes d'aquest país. L'expressió antigènica de la PRN es va estudiar mitjançant ELISA, mentre que, tant la identificació de les causes genètiques responsables de la pèrdua de l'expressió, així com la relació de parentesc entre els aïllats es va determinar mitjançant l'aplicació de la seqüenciació de genomes complets (*whole genome sequencing*, WGS). Addicionalment, es va realitzar un estudi filogenòmic per tal d'identificar l'evolució de l'estructura poblacional del conjunt d'aïllats estudiats.

D'acord amb els resultats obtinguts, es descriu per primera vegada l'emergència de *B. pertussis* deficientes en l'expressió de PRN a Espanya, així com els mecanismes genètics implicats en la pèrdua de la producció d'aquest antigen. En global, els aïllats deficientes en PRN van representar el 27,2% del total, els quals es van identificar únicament durant el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa, sent notòria la seva

presència des de l'any 2011 en endavant. Es van identificar set mecanismes diferents com a responsables de la pèrdua d'expressió de la PRN, dels quals la deleció entre les posicions -292 i 1340 del gen de la PRN (*prn::del(-292, 1340)*) es va observar en el 58,1% dels aïllats que no expressaven l'esmentat antígen vacunal. Altres mecanismes observats van ser la inserció de la seqüència IS481 entre les posicions 1613^1614 i 2735^2736, sigui en posició directa o en posició indirecta (23,7%), la deleció d'una G a la posició 1494 (*prn::499STOP-delG1494*), la qual condiona un canvi en la pauta de lectura i l'aparició d'un codó STOP a l'aminoàcid 499 (6,5%), la inversió d'un fragment d'aproximadament 22 kb a la posició -74 del promotor (*prn::promoter_inv(-74)*) (5,4%) i la deleció entre les posicions -614 i -75 del promotor (*prn::del(-614, -75)*) (1,1%). Tant la deleció *prn::499STOP-delG1494* com la *prn::del(-614, -75)* van ser descrites per primera vegada en aquest estudi.

L'anàlisi filogenòmica va situar l'ancestre comú més recent del subgrup d'aïllats deficients en PRN a causa de la mutació *prn::del(-292, 1340)* l'any 2007, durant el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa. Aquest fet suggereix que la pressió selectiva exercida per l'ús d'aquest tipus de vacunes podria haver afavorit l'emergència i disseminació d'aquest mecanisme, fins a convertir-se en el mecanisme relacionat amb la pèrdua d'expressió de la PRN observat amb més freqüència entre els aïllats recollits del període 2013-2018 en el nostre medi. Contràriament, no s'ha observat un únic ancestre comú pels aïllats de *B. pertussis* deficients en PRN a causa de la inserció de la IS481 en el gen de la PRN, trobant-se aquests distribuïts de forma aleatòria en diverses branques al llarg de la filogènia de *B. pertussis*.

Així doncs, el conjunt de troballes destaquen l'aparició i circulació d'aïllats de *B. pertussis* que no expressen PRN, un dels antígens més immunògens inclosos a la majoria de les composicions vacunals utilitzades en els programes sistemàtics de vacunacions de molts dels països industrialitzats. L'emergència d'aquest tipus de

soques està condicionada majoritàriament per l'aparició i disseminació exitosa d'un llinatge posseïdor d'una gran deleció del gen codificant d'aquest antigen. Aquest fet podria suposar un important mecanisme d'adaptació i evasió, per part de *B. pertussis*, de la immunitat conferida per les vacunes DTPa, a conseqüència de la pressió selectiva exercida pel seu ús.

Identification and characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Spain.

Bordetella pertussis is the main causative agent of pertussis, an acute human upper respiratory tract infection. Vaccination is currently the most effective strategy for the prevention and control of this disease. However, despite extensive vaccination campaigns and high immunization rates, pertussis has resurged in the last twenty years and outbreaks of the disease have currently occurred worldwide. The evolution of circulating bacteria to vaccine-immunity-evasive phenotypes is one of the main causes postulated for the change of pertussis epidemiology. In Spain, pertussis immunization with whole-cell vaccine (WCV) was progressively replaced during the period 1998 to 2005 by the acellular vaccine (ACV), which contains a combination of several antigens. Despite vaccines and vaccination programs might be different between countries, the 3-component ACV, containing pertussis toxin (Pt), filamentous hemagglutinin (Fha) and pertactin (Prn) is largely used for pertussis immunization in many countries, including Spain (Table 1).

In 2007, after the introduction of ACV, Prn-deficient isolates were firstly observed in France and subsequently detected in different countries that have adopted ACV around the world (1–5). Prn-negative strains have demonstrated a greater ability to colonise ACV-immunised animals than Prn-positive strains. Thus, the expansion of strains Prn-negative in human populations vaccinated with Prn-containing vaccines indicates that such strains apparently have a selective advantage in these populations (6).

In this study we investigate the prevalence of Prn-negative *B. pertussis* strains in Spain, elucidating whether the ACV replacement might have an impact on these results. The main objective was to study the selection of Prn-negative strains analyzing the *B. pertussis* population dynamics in Spain since ACV introduction.

Table 1. Changes on pertussis vaccination program used in Spain in the period 1986-2018*.

Year	Primary doses			Booster doses		
	Vaccine type	Schedule	Pertussis components	Vaccine type	Schedule	Pertussis components
1975	DTPw	3, 5, 7 months	Inactivated whole cell	NA	No booster	NA
1996	DTPw	2-3, 4-5, 6-7 months	Inactivated whole cell	DTPw	15-18 months	Inactivated whole cell
1998-1999	DTPw	2-3, 4-5, 6-7 months	Inactivated whole cell	DTPa	18 months	Pt, Fha, Prn
2001	DTPw	2, 4, 6 months	Inactivated whole cell	DTPa	18 months, 4-6 years	Pt, Fha, Prn
2004	NA	NA	NA	dTpa	Health workers caring for newborns	Pt, Fha, Prn or Pt, Fha, Prn, Fim2, Fim3 ^a
2005	DTPa	2, 4, 6 months	Pt, Fha, Prn	DTPa	18 months, 4-6 years	Pt, Fha, Prn
2012	DTPa	2, 4, 6 months	Pt, Fha, Prn	DTPa/dTpa	18 months (DTPa), 4-6 years (dTpa)	Pt, Fha, Prn or Pt, Fha, Prn, Fim2, Fim3 ^a
2013	DTPa	2, 4, 6 months	Pt, Fha, Prn	DTPa/dTpa	18 months (DTPa), 6 years (dTpa)	Pt, Fha, Prn or Pt, Fha, Prn, Fim2, Fim3 ^a

2014/2015^c	NA	NA	NA	dTpa	Between 27-28 through 32-36 weeks of pregnancy	Pt, Fha, Prn or Pt, Fha, Prn, Fim2, Fim3 ^a
2017	DTPa	2, 4, 11 months	Pt, Fha, Prn	DTPa/dTpa ^d	6 years	Pt, Fha, Prn or Pt, Fha, Prn, Fim2, Fim3 ^a

* NA: not applicable; DTPw: diphtheria-tetanus-whole cell pertussis vaccine; DTPa: diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine; dTpa: diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine with reduced antigenic load of diphtheria, tetanus and pertussis; Pt: pertussis toxin; Fha: filamentous haemagglutinin; Prn: pertactin; Fim2: type 2 fimbriae; Fim3: type 3 fimbriae.

^aThe 5-component ACV, which also contains type 2 and type 3 fimbrial antigens (Fim2 and Fim3), is used in some cases of booster doses.

^bIntroduction of health workers vaccination.

^cIntroduction of maternal pertussis vaccination.

^dDTPa vaccine is administered to children vaccinated on the 2+1 schedule when they reach the age of 6 years. Children vaccinated with 3+1 schedule receive dTpa vaccine.

The Study

A total of 342 non-duplicate *B. pertussis* clinical isolates collected from 1986 to 2018 at four Spanish hospitals from different geographical locations were studied (Supplementary information, page 247). All the isolates were recovered from cultures of nasopharyngeal samples collected from patients diagnosed with pertussis, excluding isolates of the studies of contacts. The study period was divided into 3 parts based on the vaccine type/s used for routine vaccination in our setting: i) period 1 (1986-1997; n=46 isolates) was defined by the single use of WCV; period 2 (1998-2005; n=51 isolates) was the transition period as ACV; and period 3 (2006-2018, n=245 isolates), when ACV completely replaced WCV. The isolates were collected from patients with different vaccination status: vaccinated, unvaccinated and partially vaccinated.

Prn-production was evaluated by indirect whole-cell enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using a monoclonal specific anti-Prn antibody (97/558, NIBSC), as previously described (Supplementary information, page 247)

(7). A partially random set of 184 isolates, including all Prn-negative isolates detected through ELISA, was sequenced using MiSeq system (Illumina, San Diego). The Bayesian phylogenetic reconstruction was obtained with BEAST v1.10.4, using GTR substitution model, strict clock and coalescent constant population. (Supplementary information, page 247).

Temporal distribution of Prn-negative *B. pertussis*

Among the 342 isolates analyzed, 93 (27.2%) were found to lack Prn production. The temporal distribution of the Prn-negative strains according to the study-period showed that no Prn-negative isolates were found within period 1 (1986-1997, 0/46 isolates) and period 2 (1998-2005, 0/51 isolates), while during period 3, when ACV was exclusively administered, 38% of *B. pertussis* were prn non-producing isolates (2006-2018, 93/245 isolates). (Figure 1). A significant increase in the frequency of Prn-negative isolates was observed from period 2 to period 3 ($p < 0.0001$).

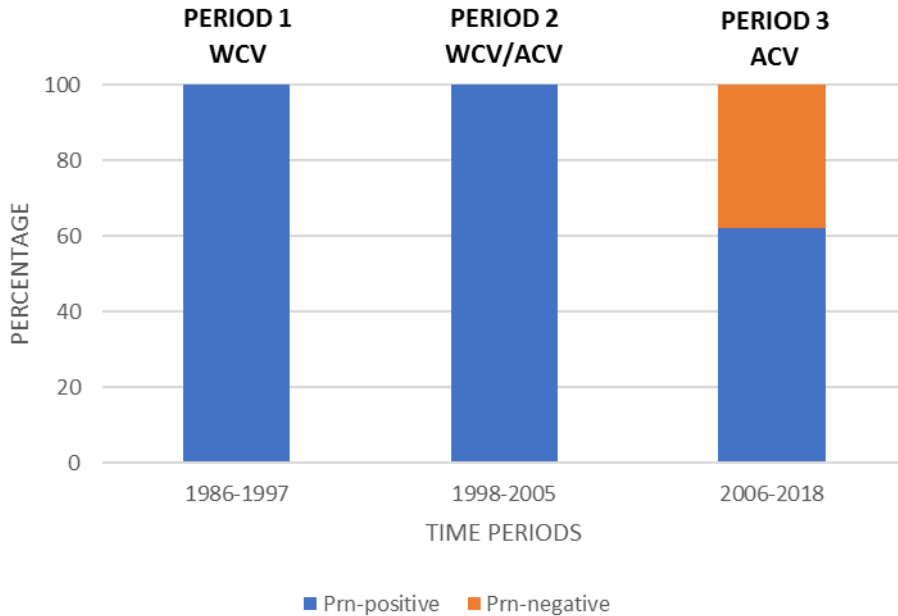


Figure 1. Temporal distribution of the occurrence of Prn-negative *B. pertussis* isolates in Spain from 1986 to 2018.

The temporal distribution of Prn-negative isolates during period 3 is shown in Figure 2. The first Prn-negative *B. pertussis* was isolated in 2007. Within that year, the prevalence of Prn-negative *B. pertussis* reached 29.4% of the total isolates collected. The number of Prn-negative isolates progressively increased from 2009 to 2015, reaching the highest prevalence in 2015, the last epidemic year of the disease in our environment, when the 71.4% of the *B. pertussis* isolates obtained did not expressed this antigen. Thereafter, the prevalence of Prn-negative isolates decreased the following

years, being the 33.3% of the isolates collected during 2018 deficient in the production of this antigen.

Molecular mechanisms of pertactin-deficiency

Seven different types of mechanisms involved in the non-Prn expression were identified within the 93 Prn-negative isolates. Among them, the previously described partial deletion of the promoter and the Prn gene located in positions -292 and 1340 (*prn::del(-292, 1340)*) was found in 58.1% of the Prn-negative isolates

(n=54). This mutation was observed for the first time in one isolate collected in 2009 (Figure 2). However, it was not until 2011 when this mutation became the most prevalent, remaining as the most frequently detected mechanism of pertactin deficient until 2018, except for year 2012. Within 2011 and 2018, the highest prevalence of *prn::del(-292, 1340)* mutation was found in 2014, when 100% of the Prn-negative isolates possessed this mutation (Figure 2). The second most common mechanism of Prn production deficiency was the IS481 insertion at position 1613^1614 in reverse orientation (*prn::IS481-1613rev*). This mutation was identified in the 12.9% of the Prn-negative isolates, (n=12) being firstly identified in 2010 and remaining as a mechanism of Prn deficiency over the following years except in the year 2014, when it was not found in any of the collected isolates (Figure 2). Punctually, other causes of non-Prn production were identified, including a G deletion at position 1494 leading to a stop codon in the amino acid 499 (*prn::499STOP-delG1494*, 6 isolates, 6.5%), the insertion of IS481 element at position 1613^1614 in forward orientation (*prn::IS481-1613fwd*, 5 isolates, 5.4%), the insertion

of IS481 element at position 2735^2736 in reverse orientation (*prn::IS481-2735rev*, 5 isolates, 5.4%), a large inversion of ~22kb at position -74 of the Prn promoter, conditioning a promoter rearrangement (*prn::promoter_inv(-74)*, 5 isolates, 5.4%) and a deletion upstream of the Prn gene affecting the Prn promoter, specifically located between positions -614 and -75 (*prn::promoter_del(-614, -75)*, 1 isolate, 1.1%). Among these, *prn::499STOP-delG1494* and *prn::promoter_del(-614, -75)* were mutations described for the first time in this study. Finally, it was not possible to identify the genetic mechanism underlying Prn-deficiency on five isolates (5.4%), as no mutation in the Prn promoter nor the structural gene was identified. All of them were collected during 2007.

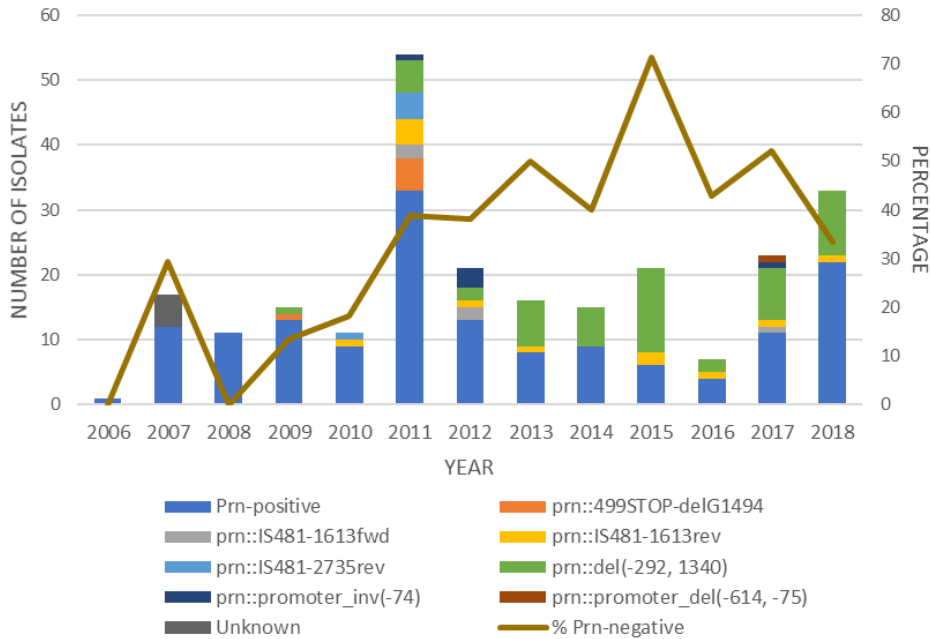


Figure 2. Temporal distribution of Prn-negative isolates and temporal trend of molecular mechanisms of Prn deficiency observed in Prn-negative *B. pertussis* isolates in Spain during the period 3, 2006-2018.

Phylogenetic analysis

Bayesian evolution analysis conducted with BEAST estimated the mean evolutionary rate of *B. pertussis* as 2.7×10^{-7} substitutions/site/year (95% highest posterior density 2.4×10^{-7} to 3×10^{-7} substitutions/site/year), corresponding to 1.1 substitutions/genome/year. Bayesian model comparison confirmed that GTR substitution model, strict clock and coalescent constant population were the best fitting for the alignment. To gain insight into the *B. pertussis* population

dynamics in Spain, a Bayesian phylogenetic reconstruction was conducted with a selection of 184 isolates including the 93 Prn-negative isolates and 91 Prn-positive isolates randomly collected during all the time period. According to the type 3 fimbriae allele and the genetic identity of the isolates, three different clades were defined within the phylogenetic tree (Figure 3; Clade I, Clade II and Clade III).

Clade I included 13 isolates obtained between 1986 and 1999 and one

additional isolate collected in 2014. Among them, the 100% carried the *ptxA1* allele and the *ptxP1* PTX promoter, while for Prn, 38.5% encoded *prn2*, 38.5% *prn3* and 23.1% *prn1*. Regarding fimbrial genotyping, 92.3% carried *fim2-1* and 7.7% *fim2-2*, and 100% encoded *fim3-1*. Overall, 84.6% presented the *ptxA1/ptxP1/fim2-1/fim3-1* allelic combination. Concerning fimbrial serotyping, 46.2% were Fim3, 38.5% Fim2 and 15.4% Fim2/3. No Prn-negative isolates were observed among isolates belonging to this clade.

Clade II included 64 isolates collected between 1998 and 2018, the 90.6% of them containing the *ptxA1/ptxP3/prn2/fim2-1/fim3-2* allelic combination. Regarding fimbrial serotyping, 96.9% of Clade II isolates expressed Fim3, none expressed Fim2, and 3.1% expressed both type of fimbria simultaneously (Fim2/3). BEAST analysis estimated the time to the most recent common ancestor (MRCA) of Clade II isolates in 1989 [95% HPD 1987-1992], nine years before the first isolate belonging to this clade were obtained (November 1998). Regarding Prn-production, 37.5% of isolates from this Clade were Prn-negative (n=24). Of these,

54.2% (n=13) showed a mutation associated to any of the described IS481 insertions at position 1613, being distributed in different branches within the clade. Among these isolates, a cluster of six isolates possessing the *prn::IS481-1613rev* mutation was identified. They were obtained between 2011 and 2017 in Barcelona (range of 1-11 SNPs of difference among them). Additionally, 25% (n=6) of the Prn-negative isolates within Clade II shared the *prn::499STOP-delG1494* mutation, all of them were genetically closely related, as they clustered together (range of 0-4 SNPs of difference among them). They were collected in Barcelona, and all but one was obtained between March and September of 2011. No epidemiological link was identified among patients from which these isolates were obtained. Finally, one Prn-negative isolate found in Clade II showed the *prn::promoter_del(-614, -75)* mutation. All Prn-negative isolates from this clade, including *prn::IS481-1613*, *prn::499STOP-delG1494* and *prn::promoter_del(-614, -75)* mutations, presented Fim3 serotype. Among the Prn-producing isolates of this clade, 95% of them expressed Fim3 while

the remaining 5% expressed Fim2/3 serotype.

Clade III consisted of 107 isolates collected between 2005 and 2018, 87.9% of them presenting the *ptxA1/ptxP3/prn2/fim2-1/fim3-1* allelic combination. Regarding fimbrial serotype, 72% of the isolates of this clade expressed Fim2 and 28% Fim3. BEAST analysis situated the MRCA of Clade III isolates in 1995 [95% HPD 1992-1998], ten years before the first isolate belonging to this clade were collected (July 2005). Regarding Prn-production, 64.5% of isolates of this clade were Prn-negative (n=69). Of these, the 78.3% (n=54) possessed the *prn::del(-292, 1340)* mutation, originating a large cluster of isolates (range of 0-19 SNPs of difference among them) which were obtained between 2009 and 2018 in Barcelona, Madrid and Salamanca (estimated divergence dating in 2007 [95% HPD 2005-2008]). Additionally, two other minor clusters of Prn-negative isolates with a same mechanism of Prn deficiency were identified into Clade III. The first one, included the 7.2% (n=5) of the Prn-negative isolates within the clade (range of 0-5 SNPs of difference among them), all shared the *prn::IS481-2735rev* mutation,

and were collected between 2010 and 2011 in Barcelona, Madrid and Salamanca (estimated diverge dating in 2009 [95% HPD 2007-2010]). The second one, included the 7.2% (n=5) of the Prn-negative isolates within the clade (range of 3-20 SNPs of difference among them), had the *prn::promoter_inv(-74)* mutation and were obtained between 2011 and 2017 in Barcelona, Madrid and Salamanca (estimated divergence dating in 2008 [95% HPD 2006-2010]). Finally, 4 isolates (5.8%) of Prn-negative isolates of this clade, showed a mutation associated to any of the described insertions of *IS481* at position 1613, all of them distributed randomly at different branches along the clade. Combining the deficiency of Prn and fimbrial serotype, *prn::del(-292, 1340)* isolates were associated with Fim2 expression whereas *prn::IS481-2735rev* and *prn::promoter_inv(-74)* isolates were related with Fim3 serotype. Finally, 50% of Prn-negative isolates of Clade III presenting the *prn::IS481-1613* mutation expressed Fim2 and 50% possessed Fim3 serotype. Among the Prn-producing isolates of this clade, 55.3% expressed Fim2 serotype and 44.7% Fim3. In general, in Clade III, Fim2 isolates replaced the previously predominant

fimbrial serotype Fim3 from 2013, coinciding with the increment of frequency of Prn-negative isolates (Figure 4).

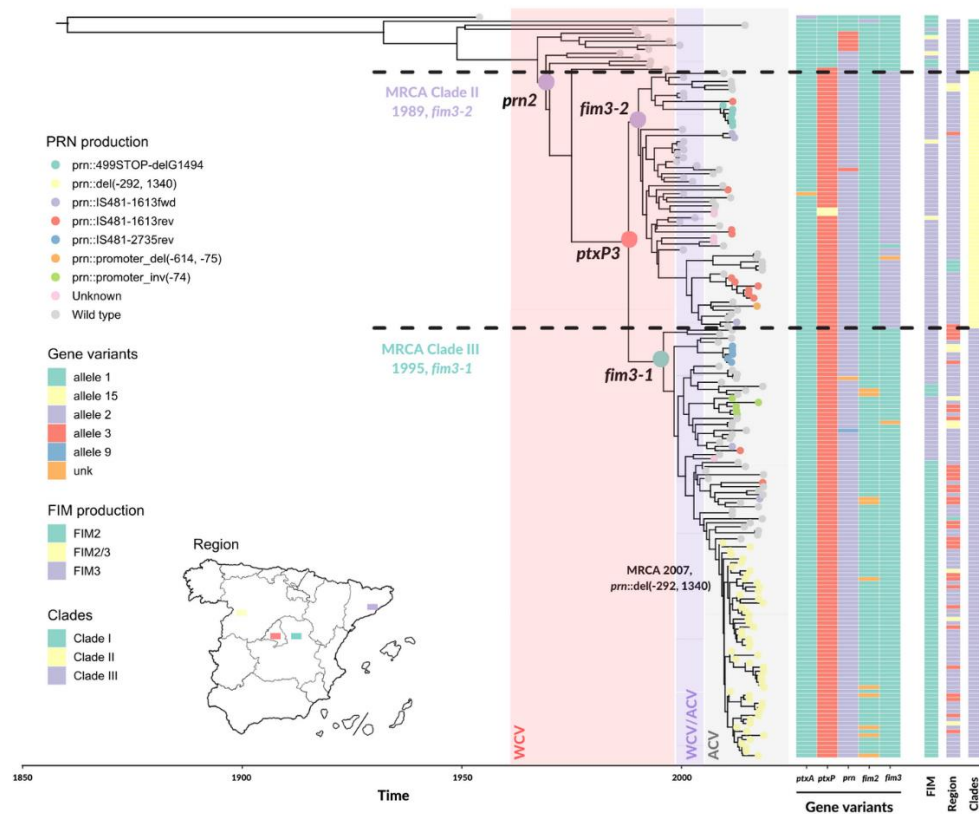


Figure 3. Bayesian phylogenetic reconstruction of 184 *B. pertussis* isolates collected in Spain between period 1986–2018 and the reference Tohama I (GenBank accession no. NZ_CP031787). Shaded regions indicate time periods of WCV, WCV/ACV and ACV use. PRN production are represented for each isolate with colored dots at the end of the tree branches. Alleles of *ptxA*, *ptxP*, *prn*, *fim2* and *fim3* are indicated for each isolate on the right, as detailed in the key. Additionally, data related to the expression (serotyping) of Fim2/Fim3 is also indicated for each isolate. MRCA, most recent common ancestor; WCV, whole cell vaccine; ACV, acellular vaccine; FIM, fimbrial serotype.

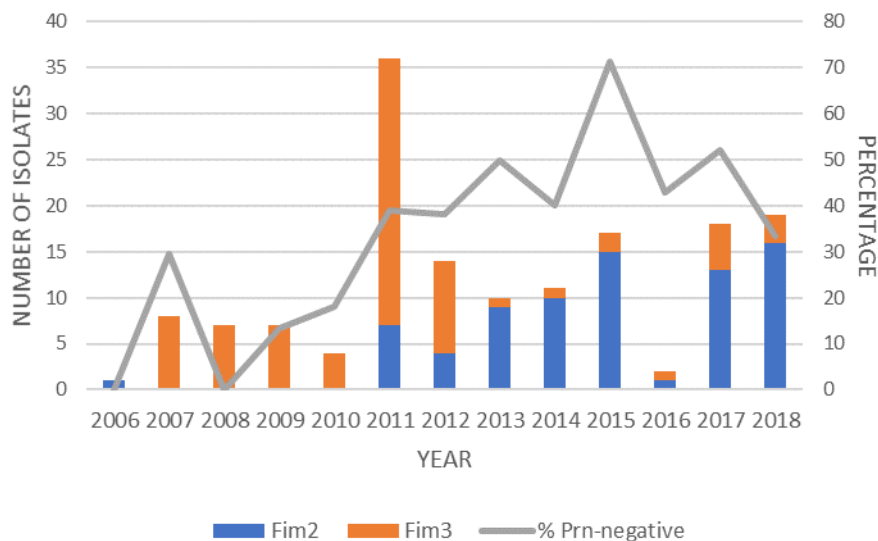


Figure 4. Evolution of fimbrial serotypes and Prn-negative frequency of *B. pertussis* isolates collected in Spain between period 2006-2018.

Discussion

Prn-negative isolates has been reported in several countries with a large history of ACV immunization with Prn component. In this study we report the emergence of Prn deficient isolates in Spain, concurrently with the introduction of ACV as noted in other countries (4,8,9).

In Spain, the ACV booster vaccination was introduced in the late 1990s and the ACV primary vaccination in the early 2000s. We identified the first Prn-negative isolate in 2007. Since then, an increase in

the prevalence of these isolates was detected from 2011 (maximum prevalence of 71.4% in the year 2015 and minimum prevalence of 33.3% in the year 2018), suggesting that the use of the ACV has likely driven and antigenic shift of *B. pertussis*.

Different studies supported that the emergence of Prn-negative isolates is dependent on the timing since the introduction of ACV containing Prn in its composition (2,8). An increase of Prn-negative isolates was observed in Japan,

the United States (US) or Australia after the introduction of ACV. Thus, in Japan, ACV was introduced for the first time in 1981 and a 41% of Prn-negative isolates were detected between 2005-2007. Similarly, in the US, where ACV was introduced in 1991, 85% of *B. pertussis* were Prn-negative during the period 2011-2013, while in Australia, the proportion of Prn-negative reached the 78% in 2012, after the introduction of ACV in 1997 (4,10,11). However, a study conducted in Japan revealed a surprising decrease in the prevalence of Prn-deficient *B. pertussis* to below 10% in the period 2014-2016. The most likely explanation for this fact was the effect of the introduction in 2012 of ACV not including the Prn component. This observation supports the hypothesis that Prn-negative isolates are selected on response to the host immunity against Prn (10).

In Europe, where ACV were introduced at the end of the 90s in several countries, the proportion of Prn-negative isolates increased in the period 2012-2015 (8). However, in countries where monocomponent vaccines (including only pertussis toxin) or WCV were used, Prn-negative isolates were also observed. An

example of this are Denmark or Poland, in were 14.8% of isolates collected between 2012 and 2015 and 15.4% of isolates from 2010 to 2016, respectively were Prn-negative (8,12). Probably, the inter-country circulation of these isolates among neighbor countries in which ACV vaccine is used would explain the dissemination of Prn-negative isolates in these countries. Contrary, no or few Prn-negative isolates were detected in countries like Iran or Argentina, where WCV is used in primary vaccination, as there may be less selection pressure and less advantage for Prn-deficient strains to emerge in a WCV immunized population (13,14).

Unlike other antigens of *B. pertussis* also included in ACV compositions, Prn is the main determinant of virulence that has experienced the vaccine pressure. Prn is a highly immunogenic autotransporter that plays an important role in the adhesion to cell membrane of the host (15). However, Prn-deficient strains show higher invasion ability of human monocyte-derived dendritic cells (moDCs), increasing the production of pro-inflammatory cytokines by these cells. These observations suggest an immunomodulatory role for Prn (16,17). In this sense, many studies have

shown that Prn-deficient isolates cause classical pertussis symptoms, including prolonged cough (1,9,11). Additionally, Prn-deficient isolates showed increased survival in mice vaccinated with ACV compared to Prn-expressing isolates, suggesting that Prn-negative isolates may have a selective advantage in ACV immunized population (6,11,18).

The emergence of Prn-deficient *B. pertussis* isolates in Spain has not been due to a clonal event emergence and dissemination, as no single common ancestor has been found for these isolates. Diverse mechanisms of *prn* gene disruption originated in different lineages distributed throughout the phylogeny of *B. pertussis*. This same phenomenon has also been described in United States, Japan, Australia and some European countries (2,19-21).

Seven different genetic mechanisms responsible of the Prn-deficiency in *B. pertussis* were identified in our study. The *prn::del(-292, 1340)* was the most prevalent mechanism of disruption observed (58.1%). We detected this mutation, that encoded a deletion of ~1.6kb, for the first time in 2017 (22). Surprisingly, although being identified in

isolates from other countries, as far as we know it has not been detected as a major mechanism of Prn deficiency as we have observed in Spain. This deletion has been recently described in the US in one isolate obtained in 2016 and has been reported in the 5.9% and 2.9% of the isolates of Slovenia or Australia in studies conducted in 2006-2017 and 2013-2017, respectively (19,22,23). As far as we know, no other description of *prn::del(-292, 1340)* isolates has been made to date.

In our study we have seen that isolates carrying the *prn::del(-292, 1340)* mutation cluster together in the *B. pertussis* phylogeny and that divergence dating places their most recent common ancestor in 2007. This is within the period of ACV usage in Spain, suggesting that ACV implementation might have induce Prn-immune pressure towards the selection of this kind of Prn deficient *B. pertussis* strains in our environment. Although its great prevalence, the genetic distance they possess (0-19 SNPs of difference among them), the fact that they are found in different regions of Spain and within different years (2009 to 2018), suggest that its high prevalence is not due to an event of outbreak-related dissemination. Therefore, the expansion

of this isolates in our geographic area and not in other countries could be understood as a successful diffusion at regional level of these lineage of isolates. It will be necessary to continue monitoring their prevalence and evolution.

The second cause of Prn deficiency that we have found is the IS481 insertion (23.7%) at different sites along the Prn gene (at positions 1613^1614 and 2735^2736) either in forward or reverse orientation. In contrast to our findings, this is the most frequently detected mechanism of Prn deficiency in the studies performed until that moment by other authors. This is the case of recent studies conducted in Australia, Europe and the US where the 88.6%, the 48.5% and the 47.4% of the *B. pertussis* collected showed IS481 as the main mechanism involved in non-Prn production (8,19,20).

The *prn::promoter_inv(-74)* mutation, found in the 5.4% of Prn-negative isolates has also been detected in a low prevalence in a study conducted in the US (7%) (22). However, it has been observed in 27.3% of the Prn-negative isolates included in a European multicenter study, being globally the second most prevalent mutation detected (8). Finally, mutations

prn::499STOP-delG1494 and *prn::promoter_del(-614, -75)* were found among the 6.5% and 1.1% of the Prn-negative isolates, respectively. As far as we know, this would be the first description of this kind of mutation among Prn-negative *B. pertussis*. We detected *prn::promoter_del(-614, -75)* in only one isolate obtained in 2007, while *prn::499STOP-delG1494* was detected in six isolates collected in the period 2009-2011 in Barcelona. Within the phylogeny these isolates are found in a genetically closely related cluster and as no epidemiological link was identified among patients from which they were obtained, short-term hidden transmission events might be involved in their dissemination.

This study has revealed that the fimbrial serotype of the *B. pertussis* circulating strains has shifted throughout the years. Previous studies have shown that Fim3 serotype were more prevalent in Europe at the beginning of the ACV era, especially in those countries in which the ACV that was used did not include fimbrial antigens among its components (24,25). However, isolates expressing Fim2 gradually reemerged posteriorly. This fact suggests that the change in frequency from Fim3 to Fim2 is most likely originated by the

immune response induced because of the natural infection caused by *B. pertussis* with different fimbriae genotypes (26–28). In this study, no clear association was observed between fimbrial serotype and Prn-production. However, comparing the fimbrial serotype with Prn-deficiency we observed that, Prn-negative isolates collected at the beginning of ACV period (2007-2012) were mostly associated with Fim3. In the same way, Prn-negative isolates collected in the last years of ACV period (2013-2018) were mostly associated with Fim2, concurring with the observed fimbrial serotype shift in the circulating *B. pertussis* population. Coinciding with the fimbrial serotype shift, the isolates with the *prn::del(-292, 1340)* mutation emerged. This fact may suggest a possible link between both characteristics, which could suppose an adaptive advantage of the isolates to

escape the protection conferred by pertussis vaccines.

In conclusion, concurring with the introduction of ACV in our country, the first non-Prn producing strains emerged. Several mechanisms are responsible for this phenomenon, the main one being the mutation-mediated *prn::del(-292, 1340)*, which is not the most frequently cause of loss of Prn expression in other countries in our environment, suggesting that other factors may have contributed to dissemination of Prn-negative isolates. These results underscore the importance of long-term surveillance of *B. pertussis* antigen production to identify the role that the different pathogen adaptation mechanism may have in the emergence of pertussis.

References

1. Bouchez V, Brun D, Cantinelli T, Dore G, Njamkepo E, Guiso N. First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing Pertussis Toxin or Pertactin. *Vaccine*. 2009 Oct 9;27(43):6034–41.
2. Zeddeman A, van Gent M, Heuvelman CJ, van der Heide HG, Bart MJ, Advani A, et al. Investigations into the emergence of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in six European countries, 1996 to 2012. *Euro Surveill*. 2014 Aug 21;19(33).
3. Otsuka N, Han H-J, Toyozumi-Ajisaka H, Nakamura Y, Arakawa Y, Shibayama K, et al. Prevalence and Genetic Characterization of Pertactin-Deficient *Bordetella pertussis* in Japan. *PLoS One*. 2012 Feb 14;7(2):e31985.
4. Lam C, Octavia S, Ricafort L, Sintchenko V, Gilbert GL, Wood N, et al. Rapid Increase in Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* Isolates, Australia. *Emerg Infect Dis*. 2014 Apr;20(4):626–33.
5. Pawloski LC, Queenan AM, Cassiday PK, Lynch AS, Harrison MJ, Shang W, et al. Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clin Vaccine Immunol*. 2014 Feb;21(2):119–25.
6. Safarchi A, Octavia S, Luu LDW, Tay CY, Sintchenko V, Wood N, et al. Pertactin negative *Bordetella pertussis* demonstrates higher fitness under vaccine selection pressure in a mixed infection model. *Vaccine*. 2015 Nov 17;33(46):6277–81.
7. Barkoff A-M, Guiso N, Guillot S, Xing D, Markey K, Berbers G, et al. A rapid ELISA-based method for screening *Bordetella pertussis* strain production of antigens included in current acellular pertussis vaccines. *Journal of Immunological Methods*. 2014 Jun;408:142–8.
8. Barkoff A-M, Mertsola J, Pierard D, Dalby T, Hoegh SV, Guillot S, et al. Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates: evidence of increased circulation in Europe, 1998 to 2015. *Euro Surveill*. 2019 Feb;24(7).
9. Williams MM, Sen K, Weigand MR, Skoff TH, Cunningham VA, Halse TA, et al. *Bordetella pertussis* Strain Lacking Pertactin and Pertussis Toxin. *Emerging Infect Dis*. 2016 Feb;22(2):319–22.
10. Hiramatsu Y, Miyaji Y, Otsuka N, Arakawa Y, Shibayama K, Kamachi K. Significant Decrease in Pertactin-Deficient *Bordetella pertussis* Isolates, Japan. *Emerging Infect Dis*. 2017 Apr;23(4):699–701.
11. Martin SW, Pawloski L, Williams M, Weening K, DeBolt C, Qin X, et al. Pertactin-negative *Bordetella pertussis* strains: evidence for a possible selective advantage. *Clin Infect Dis*. 2015 Jan 15;60(2):223–7.

12. Polak M, Zasada AA, Mosiej E, Krysztopa-Grzybowska K, Witkowski L, Rzczkowska M, et al. Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in Poland—a country with whole-cell pertussis primary vaccination. *Microbes Infect.* 2018 Dec 21;
13. Safarchi A, Octavia S, Nikbin VS, Lotfi MN, Zahraei SM, Tay CY, et al. Genomic epidemiology of Iranian *Bordetella pertussis*: 50 years after the implementation of whole cell vaccine. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):1416–27.
14. Carriquiriborde F, Regidor V, Aispuro PM, Magali G, Bartel E, Bottero D, et al. Rare Detection of *Bordetella pertussis* Pertactin-Deficient Strains in Argentina. *Emerging Infect Dis.* 2019 Nov;25(11):2048–54.
15. 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 Apr;18(2):326–82.
16. Stefanelli P, Fazio C, Fedele G, Spensieri F, Ausiello CM, Mastrantonio P. A natural pertactin deficient strain of *Bordetella pertussis* shows improved entry in human monocyte-derived dendritic cells. *New Microbiol.* 2009 Apr;32(2):159–66.
17. Hovingh ES, Mariman R, Solans L, Hijdra D, Hamstra H-J, Jongerius I, et al. *Bordetella pertussis* pertactin knock-out strains reveal immunomodulatory properties of this virulence factor. *Emerg Microbes Infect.* 2018 Mar 21;7(1):39.
18. Hegerle N, Dore G, Guiso N. Pertactin deficient *Bordetella pertussis* present a better fitness in mice immunized with an acellular pertussis vaccine. *Vaccine.* 2014 Nov 20;32(49):6597–600.
19. Xu Z, Octavia S, Luu LDW, Payne M, Timms V, Tay CY, et al. Pertactin-Negative and Filamentous Hemagglutinin-Negative *Bordetella pertussis*, Australia, 2013–2017. *Emerging Infect Dis.* 2019 Jun;25(6):1196–9.
20. Weigand MR, Williams MM, Peng Y, Kania D, Pawloski LC, Tondella ML, et al. Genomic Survey of *Bordetella pertussis* Diversity, United States, 2000–2013. *Emerging Infect Dis.* 2019 Apr;25(4):780–3.
21. Zomer A, Otsuka N, Hiramatsu Y, Kamachi K, Nishimura N, Ozaki T, et al. *Bordetella pertussis* population dynamics and phylogeny in Japan after adoption of acellular pertussis vaccines. *Microb Genom.* 2018 May 17;4(5).
22. Weigand MR, Peng Y, Cassiday PK, Loparev VN, Johnson T, Juieng P, et al. Complete Genome Sequences of *Bordetella pertussis* Isolates with Novel Pertactin-Deficient Deletions. *Genome Announc.* 2017 Sep 14;5(37).

23. Kastrin T, Barkoff A-M, Paragi M, Vitek MG, Mertsola J, He Q. High prevalence of currently circulating *Bordetella pertussis* isolates not producing vaccine antigen pertactin in Slovenia. *Clin Microbiol Infect*. 2019 Feb;25(2):258–60.
24. Elomaa A, Advani A, Donnelly D, Antila M, Mertsola J, Hallander H, et al. Strain Variation among *Bordetella pertussis* Isolates in Finland, Where the Whole-Cell Pertussis Vaccine Has Been Used for 50 Years. *J Clin Microbiol*. 2005 Aug;43(8):3681–7.
25. Gorringe AR, Vaughan TE. *Bordetella pertussis* fimbriae (Fim): relevance for vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2014 Oct;13(10):1205–14.
26. van Gent M, Heuvelman CJ, van der Heide HG, Hallander HO, Advani A, Guiso N, et al. Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998-2012. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Apr;34(4):821–30.
27. Barkoff A-M, Mertsola J, Pierard D, Dalby T, Vermedal Hoegh S, Guillot S, et al. Surveillance of circulating *Bordetella pertussis* strains in Europe during 1998-2015. *J Clin Microbiol*. 2018 Feb 28;56(5):e01998-17.
28. Mir-Cros A, Moreno-Mingorance A, Martín-Gómez MT, Codina G, Cornejo-Sánchez T, Rajadell M, et al. Population dynamics and antigenic drift of *Bordetella pertussis* following whole cell vaccine replacement, Barcelona, Spain, 1986-2015. *Emerg Microbes Infect*. 2019;8(1):1711–20.



DISCUSSIÓ

Al llarg dels últims anys, la incidència de la tosferina ha patit una marcada tendència a l'alça, observant-se una reemergència de la malaltia de forma generalitzada a nivell mundial des de mitjans dels anys noranta, malgrat la implementació d'extenses campanyes de vacunació i les elevades taxes d'immunització. Actualment, la tosferina és considerada una de les malalties que es poden prevenir per vacunació amb una de les taxes de prevalença més elevades en els països desenvolupats, trobant-se en una situació d'endèmia perllongada, amb pics epidèmics cíclics cada 3-5 anys i incidències creixents. És per això que, a dia d'avui, la tosferina és considerada encara un dels grans reptes pels sistemes de Salut Pública.

Algunes de les causes que es postulen que poden haver contribuït a la reemergència de la tosferina al llarg de les últimes dècades són l'ús de noves eines diagnòstiques, entre les que s'inclou la incorporació de les tècniques de diagnòstic molecular, la major sospita clínica de la malaltia, la presència de quadres clínics difosos, així com la presència de portadors asimptomàtics i les millores introduïdes en els sistemes de vigilància i notificació. Addicionalment altres variables que es considera que poden haver-hi influït són la cobertura vacunal subòptima, especialment en les dosis de record, l'ús de vacunes menys immunògenes, les quals generen respostes immunes menys perllongades en el temps, l'adaptació de *B. pertussis* a la immunitat induïda per les vacunes DTPa actualment utilitzades, mitjançant estratègies com el recanvi antigènic o la pèrdua d'expressió d'antígens inclosos en les composicions vacunals utilitzades i, finalment, l'emergència de nous agents causals de la tosferina com és, *B. holmesii*. La contribució relativa de tots aquests factors a la reemergència de la tosferina entre finals del segle XX i principis del segle XXI com una important amenaça per a la salut global és, en l'actualitat, objectiu de debat entre els experts.

ESTUDI 1. Caracterització de l'epidemiologia molecular i la diversitat antigènica d'aïllats clínics de *Bordetella pertussis* causants de tosferina.

Una de les principals característiques que presenten les poblacions de *B. pertussis* és el constant recanvi, el qual aporta dinamisme a la circulació del microorganisme i capacitat d'adaptació per part d'aquest a la immunitat poblacional del moment⁴⁰⁶. Els recanvis poblacionals en *B. pertussis* s'han identificat arreu, sent un dels objectius principals d'estudi per part de nombrosos autors des de la introducció de les vacunes DTPa⁴⁰⁷⁻⁴¹⁰. No obstant, no hi ha treballs que estudiïn l'evolució al llarg dels anys de les poblacions de *B. pertussis* a nivell espanyol, desconeixent-se, per tant, l'impacte del recanvi vacunal en la seva circulació i adaptació.

Els resultats obtinguts en el present estudi, en el qual es van analitzar un total de 339 aïllats clínics de *B. pertussis* productors de tosferina recollits a Barcelona durant el període 1986 i 2015, mostren com, coincidint temporalment amb el període d'introducció de les vacunes DTPa en el nostre medi, hi va haver un recanvi evident en l'estructura poblacional de *B. pertussis*, així com en el seu perfil antigènic.

1.1. Estructura poblacional dels aïllats de *B. pertussis* obtinguts de pacients amb un quadre de tosferina, estudi de la diversitat clonal al llarg del temps.

Pel que fa a l'estructura de les poblacions de *B. pertussis* circulants, tan sols els aïllats que van presentar el perfil electroforètic VH2, determinat pel sistema de tipificació d'electroforesi de camp polsant (PFGE), es van observar de forma més o menys constant al llarg de tot el període d'estudi. Contràriament, quatre dels cinc perfils de PFGE més prevalents durant l'ús de les vacunes DTPw van ser reemplaçats per nous perfils després de la introducció de les vacunes DTPa. Així, els aïllats pertanyents als perfils electroforètics VH8, VH5, VH12 i VH7, els quals es van detectar com a majoritaris (juntament amb el perfil VH2) durant els anys en què s'utilitzaven

exclusivament les vacunes DTPw per immunitzar a la població (1986-1997), amb unes freqüències del 17,1%, 14,6%, 12,2% i 7,3%, respectivament, es van veure reemplaçats pels posteriorment apareguts perfils electroforètics VH19, VH20 i VH22, dominadors a partir de la introducció progressiva de les vacunes DTPa i el seu posterior ús únic, amb unes freqüències al període 1998-2003 del 40,2%, 36,6% i 1,2%, respectivament, i unes freqüències al període 2007-2015 del 28,6%, 4% i 8%, respectivament. Addicionalment, en l'era de les vacunes DTPa, el perfil electroforètic VH26, detectat per primera vegada a l'any 2007, amb una freqüència global per al període 2007-2015 del 24,6%, va esdevenir el més prevalent a partir de l'any 2011 i fins la finalització de l'estudi l'any 2015.

Totes aquestes troballes són en gran mesura consistents amb els resultats obtinguts per altres autors en països del nostre entorn. Concretament, un conjunt d'estudis que es van realitzar a nivell europeu, els quals van recollir l'anàlisi d'aïllats de *B. pertussis* obtinguts en diversos països amb polítiques de vacunació similars entre els anys 1998 i 2015, mostren com els perfils de PFGE amb major prevalença detectats a Europa en un període similar de gairebé 20 anys, coincideixen amb els que es van mencionar com a majoritaris en la nostra àrea d'estudi. Els perfils de PFGE predominants a Europa BpSR3, BpSR5, BpSR10, BpSR11 i BpSR12 corresponen, respectivament, als perfils VH26, VH22, VH2, VH19 i VH20, descrits en el present estudi. D'aquesta manera, el perfil europeu BpSR11 (VH19), observat com a predominant durant el període de transició entre les vacunes DTPa i DTPw (27-30%, 1998-2005), va ser reemplaçat pels perfils BpSR10 (VH2) i BpSR3 (VH26) en el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa (21-27% per BpSR10 i 22-29% per BpSR3, 2007-2015)⁴¹⁰⁻⁴¹³. Contràriament, a Polònia, on se segueixen utilitzant les vacunes DTPw, gairebé la meitat dels aïllats recollits en el període 1998-2001 van pertànyer al perfil BpSR23 (46%), el qual no es va observar com a perfil predominant en cap altre país europeu en el període d'estudi 1998-2012. Posteriorment, durant el període 2002-2006, i a falta de dades per al període 2007-2012, els perfils POLR6 i POLR8, propis

de Polònia, van ser els perfils majoritàriament observats, ambdós amb una freqüència del 29%⁴⁰⁸.

Fora d'Europa, un estudi dut a terme als EUA, el qual inclou aïllats recollits entre els anys 2000 i 2012, suggereix un recanvi similar entre les poblacions de *B. pertussis* dels EUA i Europa, detectant-se el perfil CDC013 (BpSR11) com a més prevalent en el període 2000-2009 (41%) i el perfil CDC002 (BpSR3) com a majoritari en el període 2010-2012 (25%)^{406,409}. Altres estudis a escala mundial que han aportat dades en aquest sentit es van desenvolupar en països com el Canadà o la Xina. Resultats descrits a Canadà en l'estudi d'una col·lecció d'aïllats recollida entre els anys 1998 i 2006, període posterior a la introducció de les vacunes DTPa entre els anys 1997-1998, aquests van expressar majoritàriament tres perfils de PFGE, idèntics als perfils europeus BpSR11, BpSR5 i BpSR12, trobats freqüentment després de la introducció de les vacunes DTPa a Europa⁴¹⁴. A la Xina, encara que les vacunes DTPa de dos components amb PTX i FHA es van introduir a partir de l'any 1995 i es van incloure al programa d'immunització a l'any 2007, les vacunes DTPw s'han seguit utilitzant anys després en la majoria de províncies degut als costos i a la disponibilitat limitada de les vacunes DTPa. Reflectint aquest ús continu de les vacunes DTPw, entre els aïllats estudiats en el període 2012-2013, els perfils de PFGE detectats amb major freqüència van ser el BpSR23 i el BpFINR9, observats durant l'ús de les vacunes DTPw a Europa, entre les dècades dels anys setanta i vuitanta, i molt rarament observats actualment, excepte en el cas prèviament esmentat de Polònia, on el perfil BpSR23 es va detectar en el 46% dels aïllats entre els anys 1998 i 2001⁴¹⁵⁻⁴¹⁷.

Aplicant l'anàlisi del PFGE, s'han definit fins ara un total de set clústers de *B. pertussis* (I-VII), els quals s'utilitzen per agrupar per similitud els diferents perfils de PFGE^{410-413,418,419}. En funció d'aquests, els aïllats de *B. pertussis* recollits a Europa, als EUA i a Canadà entre els anys 1998 i 2015, coincidint amb el període d'introducció de les vacunes DTPa i el posterior període del seu ús exclusiu en aquests territoris, van

pertànyer majoritàriament al clúster IV, incloent els tres subclústers IV α , IV β i IV γ , als quals pertanyen els cinc perfils de PFGE descrits com a majoritaris en el present estudi^{409,410,412-414}. Al contrari, estudis similars duts a terme en països on l'ús de les vacunes DTPw ha sigut extensiu al llarg de la primera dècada dels anys 2000, com ara a Polònia o a la Xina, van mostrar resultats lleugerament diferents. A Polònia, els aïllats estudiats entre els anys 2000 i 2007 van pertànyer principalment al clúster III, tot i que posteriorment, durant el període 2010-2016, es va observar el recanvi poblacional i el predomini del clúster IV, possiblement afavorit per l'alt ús de vacunes DTPa comercials a Polònia, així com per la seva proximitat fronterera amb països que inclouen les vacunes DTPa en els seus calendaris sistemàtics de vacunacions des de finals dels anys noranta i principis dels anys 2000^{408,420}. El clúster III, representat per la soca Bp134 (BpSR23), es caracteritza per ser un grup que inclou la majoria d'aïllats de *B. pertussis* que han circulat a Europa en èpoques prèvies a la dècada dels anys noranta, majoritàriament durant els anys setanta, coincidint amb l'ús de les vacunes DTPw^{416,417}. Així mateix, a la Xina, dos treballs descriuen que el clúster III també va ser el més freqüentment observat al llarg de diversos anys estudiats, entre els que s'inclouen els períodes 1963-1986, 1997-2005 i 2012-2013^{415,421}.

Tot i la gran homogeneïtat en la distribució mundial dels llinatges de *B. pertussis*, especialment en aquells territoris que apliquen calendaris de vacunació similars, s'observen petites variacions interregionals en la prevalença de la distribució d'alguns perfils de PFGE detectats en el present estudi. És el cas del perfil VH20, el qual ha sigut un dels tipus majoritaris a Barcelona en el període de transició entre les vacunes DTPw i les vacunes DTPa (36,6%, 1998-2003), mostrant posteriorment una notable disminució en el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa (4%, 2007-2015). Contràriament, aquest mateix perfil de PFGE, l'equivalent europeu del qual és el BpSR12, va ser un dels perfils menys freqüent a Europa entre els majoritaris, no observant-se en més del 4-7% dels aïllats estudiats en el període 1998-2015^{410-413,419}. Aquest fet destaca la necessitat de realitzar més estudis a nivell regional a fi de

comprendre el detall de la dinàmica poblacional de *B. pertussis*, tant dins d'un mateix territori com entre territoris.

Avaluant la distribució dels perfils de PFGE entre els anys epidèmics i els períodes interepidèmics de tosferina, s'observa un lleuger increment dels perfils minoritaris durant els períodes interepidèmics de la malaltia, així com la detecció de perfils concrets exclusivament detectats al llarg dels anys epidèmics, com és el cas del perfil VH12, tan sols observat en el nostre entorn els anys 1989, 1992, 1997, 2003, els quals són, tots quatre, anys epidèmics de tosferina a Espanya durant el període d'ús de les vacunes DTPw i el període de transició entre les vacunes DTPw i DTPa. Aquest conjunt d'observacions suggereixen que algunes onades epidèmiques podrien estar relacionades amb la circulació de llinatges que presenten certes característiques amb poder d'una major capacitat de difusió.

A grans trets, els resultats reforcen l'èxit de la difusió global dels llinatges de *B. pertussis* entre aquells països amb polítiques de vacunació similars, així com el pes que exerceix el tipus de vacuna utilitzat en cada territori i, a conseqüència, el tipus d'immunitat que aquestes confereixen a la població^{409,410,414}.

Adicionalment, l'estudi de l'estructura poblacional mitjançant el sistema de tipificació per *multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis* (MLVA), el qual es basa en l'anàlisi de les seqüències repetides en tàndem (VNTR) de diversos *locus*, recolza les troballes observades de la tipificació dels aïllats de *B. pertussis* per PFGE, tant pel que fa a les tendències temporals en la circulació de llinatges com en els canvis dinàmics en l'estructura poblacional de *B. pertussis* en el nostre entorn. Els resultats observats reflecteixen un descens de la diversitat dels MT coincidint amb la introducció de les vacunes DTPa als calendaris sistemàtics de vacunacions del nostre país entre els anys 1998 i 2005. Concretament, s'ha detectat una tendència a la homogeneïtzació de les poblacions circulants, especialment deguda al domini creixent del genotip MT27, el qual es va identificar en el 25% dels aïllats estudiats en

el període d'ús de les vacunes DTPw (1986-1997) i fins en el 79,3% dels aïllats del període 2007-2015, en el qual les vacunes DTPa es trobaven completament implementades en el nostre entorn. La diversitat genètica calculada mitjançant l'índex de Simpson per la població tenint en compte els MT observats en cada un dels períodes estudiats mostra un clar descens, passant de ser del 0,89 en el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPw a ser del 0,33 en el període en què aquestes van ser completament reemplaçades per les vacunes DTPa.

En aquest mateix sentit, tendències i xifres similars es van recollir en diversos estudis realitzats a altres països d'Europa arran de la introducció generalitzada de les vacunes DTPa. Diversos estudis en l'àmbit europeu mostren com, tant el nombre com la freqüència dels MT va disminuir en aquelles poblacions vacunades amb DTPa. Un estudi dut a terme al Regne Unit, en el que s'inclouen aïllats recollits des de l'era prevacunal fins a l'ús de les vacunes DTPa, passant per la introducció de la vacunació amb les vacunes DTPw (1920-2006), descriu canvis en la diversitat genètica influïts pels canvis inclosos en els programes vacunals. Així doncs, s'observa, en general, una disminució de la diversitat genètica després de la introducció de la immunització amb les vacunes DTPw, calculada mitjançant la modificació de Hunter i Gaston de l'índex de diversitat de Simpson a partir dels tipus diferents de MLVA observats. Aquesta va ser de 0,88 a l'era prevacunal i de 0,69 després de la introducció de les vacunes DTPw, augmentat fins a 0,84 en el període epidèmic 1977-1986, durant el qual van tenir lloc pics epidèmics importants i es va observar una disminució en les cobertures vacunals. Posteriorment, aquesta diversitat es va veure disminuïda fins a ser de 0,52 amb la introducció de les primeres dosis de vacunes DTPa i de 0,5 després del reemplaçament total de les vacunes DTPw. Aquesta pèrdua de diversitat genètica va anar acompanyada del reemplaçament dels MT circulants, sent especialment destacable l'emergència del MT27, el qual va representar el 70% dels aïllats del període 2002-2006, seguit del MT16 en una proporció molt inferior d'aïllats. Aquest va reemplaçar els tipus prèviament dominants com el MT10 en l'era prevacunal i els

MT29 i MT70 en el període d'ús de les vacunes DTPw⁴²². En aquest sentit, pel que fa als diversos MT observats, durant els períodes previs d'ús exclusiu de les vacunes DTPw i de transició entre les vacunes DTPw i DTPa, els resultats d'un treball realitzat als Països Baixos entre els anys 1992 i 2000 indiquen que els MT27 i MT29 van ser els perfils dominants durant aquests anys, trobant-se a part, molts altres MT de baixa freqüència⁴²³. Resultats semblants es van observar a un estudi publicat a Suècia amb aïllats recollits fins l'any 2004, el qual informa de la presència dels MT27 i MT29 com a majoritaris juntament amb la detecció de molts MT minoritaris⁴²⁴. Posteriorment, coincidint amb la introducció generalitzada de les vacunes DTPa, la freqüència del MT27 va augmentar fins arribar a suposar el perfil de més del 80% dels aïllats europeus durant el període 2002-2012, seguit del MT28 (7%) i observant-se addicionalment, la gairebé desaparició del MT29, anteriorment comú. Tot i això, en països com Finlàndia, el tipus predominant durant el període 2007-2012 ha sigut el MT78 amb una prevalença del 53%, la qual cosa demostra lleugeres discordances en la circulació de les poblacions de *B. pertussis* entre països⁴⁰⁸. Recentment, en un estudi europeu dut a terme entre els anys 2012 i 2015, situa la freqüència del MT27 entre les 265 soques recollides en nou països en més del 80%, convertint-se en un tipus dominant també a Finlàndia durant aquest període. En aquest mateix estudi, destaca una situació curiosa, és el cas de Dinamarca, on gairebé el 50% dels aïllats van presentar el MT27 mentre que els altres tipus, en els que s'inclou el MT28 (30%), van constituir l'altre meitat dels aïllats. Aquesta situació és curiosa, doncs en aquest país les vacunes DTPa utilitzades són monocomponents, amb tan sols la PTX com a únic antigen present en les seves composicions. Per mirar d'esbrinar si les vacunes DTPa monocomponents exerceixen una pressió selectiva menor o diferent a les vacunes DTPa de dos o més components, seria necessari realitzar estudis amb enfoc més discriminants. D'aquesta manera, es podria mirar d'esclarir si els resultats esmentats es deuen a que hi ha pocs estudis recopilats en aquest sentit o bé són fruit d'ajustos genòmics de *B. pertussis* que li permeten escapar de la immunitat adquirida

per la vacuna DTPa monocomponent en aquest país⁴¹⁰. Finalment, a Grècia, el 83% dels aïllats analitzats durant el anys 2010-2015, han presentat de forma consistent el MT27⁴²⁵.

Fora d'Europa, també s'ha observat un recanvi a favor del MT27 en aquells països que han inclòs les vacunes DTPa en els seus calendaris de vacunacions. Al Japó, el MT186, dominant en el període 2002-2007, va ser desplaçat com a més freqüent pel MT27 a partir de l'any 2008, a Austràlia, el MT27 va representar el 46% del aïllats del període 2008-2010, per davant del MT214 (13%) i als EUA, el MT27 va mostrar un predomini similar que a Europa, suposant més del 75% dels aïllats recollits entre 2012-2013, seguit del MT158 (15%)^{407,426,427}.

Contràriament, els MT observats majoritàriament en aquells països que mantenen la vacunació amb les vacunes DTPw o aquestes s'hi han utilitzat fins fa poc, són diferents. És el cas per exemple, de Polònia, la Xina o Filipines, on la freqüència del MT27 és marginal o ni tan sols s'hi ha detectat⁴²⁸. A Polònia, el MT27 es va detectar puntualment (9%) en el període 1998-2001 però no en el període 2002-2006, quan els perfils dominants han sigut el MT29 i el MT70, amb un 57% i un 14% de prevalença, respectivament. Globalment, en un estudi d'aïllats polonesos recollits en el període 1959-2013, el MT27 va suposar tan sols els 3% de les observacions^{408,429}. No obstant això, a partir de l'any 2010, les característiques poblacionals dels aïllats de *B. pertussis* circulants a Polònia van canviar, esdevenint similars a les observades prèviament en d'altres països amb programes de vacunació que inclouen les vacunes DTPa. D'aquesta manera el perfil MT27 va suposar el 73% dels aïllats recollits entre els anys 2010-2016 a Polònia. Això podria ser degut a l'increment de forma recent de l'ús de vacunes DTPa comercials a Polònia, així com a la proximitat geogràfica amb països que utilitzen de forma extensa aquest tipus de vacunes⁴³⁰. A la Xina, sense trobar-se un MT dominant, els tipus MT91, MT136 i MT152 es van identificar en

freqüències similars a partir de l'any 1997 mentre que el MT55 es va observar clarament com el majoritari en els anys 2012-2013^{415,431,432}.

En resum, queda palès que la vacunació amb DTPa ha tingut un efecte clar a llarg termini sobre la presència del MT27, trobant-se diferències també en la presència d'altres tipus de MT entre països que utilitzen les vacunes DTPa i països que utilitzen les vacunes DTPw. La tendència de les poblacions de *B. pertussis* cap a l'homogeneïtzació és notòria, així com al canvi en el patró de distribució dels tipus poblacionals, procés liderat per la irrupció i creixement del MT27 en aquells països que inclouen les vacunes DTPa en els calendaris sistemàtics de vacunacions i que presenten xifres elevades de cobertura vacunal, ampliant el seu domini sobre la resta de MT circulants. Aquest descens en la diversitat genètica reforça el concepte de selecció d'un subconjunt de poblacions circulants per part de la immunitat poblacional adquirida amb la vacunació^{410,422}.

1.2. Canvis evolutius en el contingut antigènic de *B. pertussis* aïllades de pacients amb un quadre de tosferina.

A banda dels canvis en l'estructura poblacional de *B. pertussis*, en el present estudi s'ha avaluat l'impacte de la introducció de les vacunes DTPa en la selecció al·lèlica dels determinants de virulència inclosos en les vacunes utilitzades. Per això, s'ha dut a terme un genotipat per PCR i seqüenciació dels gens codificants de la PTX (*ptxA*), de la PRN (*prn*) i de la FIM3 (*fim3*), així com del promotor de la PTX (*ptxP*).

En relació amb la tipificació dels antígens vacunals dels aïllats de *B. pertussis* estudiats, s'ha observat com, d'acord amb estudis previs, l'única forma antigènica que s'ha mantingut invariable al llarg de tot el període d'estudi, independentment del tipus de vacuna utilitzada, és la corresponent a la de la PTX. Així doncs, el 100% dels aïllats recollits durant el període complet 1986-2015 han presentat l'al·lel *ptxA1*

per la PTX, variant més prevalent des de finals dels anys seixanta, quan va reemplaçar, immediatament després la introducció de les vacunes DTPw, les variants prèviament observades *ptxA2* i *ptxA4*⁸⁸. En conseqüència, es tracta d'una variant codificant d'un tipus d'antigen diferent a les que es troben incloses a les composicions vacunals DTPa, les quals contenen les variants de PTX codificades pels al·lells *ptx2* i *ptx4*, no esperant-se el mateix efecte protector enfront de la variant *ptxA1* ni observant-se un recanvi al·lèlic per aquest antigen coincidint amb la introducció de les vacunes DTPa en el nostre entorn. Encara que no s'ha observat un recanvi antigènic en la variant al·lèlica de la PTX circulant, coincidint amb la introducció de les vacunes DTPa, s'ha detectat una expansió del promotor *ptxP3*, el qual s'ha detectat per primera vegada l'any 1996 (5% en el període 1986-1997 durant l'administració de les vacunes DTPw) i ràpidament ha reemplaçat la variant *ptxP1*, prèviament dominant (87,5% en el període 1986-1997). Així doncs, la variant *ptxP3* s'ha detectat en el 87,5% i en el 97,7% dels aïllats durant els períodes de transició entre les vacunes DTPw i DTPa (1998-2003) i d'ús exclusiu de les vacunes DTPa (2007-2015), respectivament. La presència del promotor de la PTX de tipus 3 s'ha relacionat amb l'increment de l'expressió de la PTX, descrivint-se una producció de 1,62 vegades superior d'aquest antigen per part dels aïllats que el presenten, respecte d'aquells aïllats que posseeixen la variant al·lèlica salvatge (*ptxP1*)⁴³³.

Addicionalment, els resultats de la tipificació de la resta d'al·lells han demostrat l'existència d'una expansió de les noves formes *prn2* i *fim3-2* coincidint amb la introducció de les vacunes DTPa, les quals no codifiquen les formes antigèniques que es troben incloses en aquestes composicions vacunals. Concretament el principal recanvi antigènic que s'ha observat va ser el corresponent a la forma al·lèlica *prn2*, la qual ha desplaçat per complet la variant prèviament dominant *prn1* (42,5% en el període 1986-1997) i s'ha convertit en majoritària, observant-se en el 3,7% dels aïllats del període 1986-1997 i en el 87,5% i 97,7% dels aïllats dels períodes 1998-2003 i 2007-2015, respectivament. Aquest fenomen s'ha observat posteriorment a

la introducció de les vacunes DTPa, les quals inclouen les variants al·lèliques *prn1* i *prn7* per la PRN, observades com a dominants durant l'ús de les vacunes DTPw⁴³⁴.

En aquest mateix sentit, resultats semblats s'han observat en diversos estudis realitzats a Europa, demostrant-se una freqüència creixent des de l'any 1998 de les poblacions circulants de *B. pertussis* que presenten el genotip *ptxA1/ptxP3/prn2*, amb una prevalença d'aquests aïllats superior al 90% des de mitjans de la primera dècada dels anys 2000^{408,410}. A Polònia, on s'utilitzen les vacunes DTPw per immunitzar a la població, es va observar el mateix recanvi al·lèlic en els antigens vacunals, tot i que aquest, de la mateixa manera que es va observar el canvi en l'estructura poblacional de *B. pertussis* per PFGE i MLVA, es va començar a intuir a partir de l'any 2010. Així doncs, els al·lèls *ptxP1* i *prn1*, dominants a Polònia durant diverses dècades, es van veure reemplaçats pels al·lèls *ptxP3* i *prn2* en més del 95% dels aïllats estudiats en el període 2010-2016, els quals van presentar també l'al·lel *ptxA1* per a la PTX⁴²⁰. Troballes similars a les observades a Europa s'han fet en països d'altres continents on les vacunes DTPa són extensament utilitzades, com als EUA i Austràlia. Als EUA, durant l'era de les vacunes DTPw, els aïllats van presentar majoritàriament el genotip *ptxA1-2/ptxP1/prn1*, ocorrent posteriorment un recanvi al·lèlic a favor de les variants *ptxP3* i *prn2* dels anys vuitanta, les quals van esdevenir majoritàries a partir de l'any 1996 coincidint amb el període de transició de les vacunes DTPa (>90%), així com l'aparició de la variant *ptxA1* a principis dels anys setanta. No obstant això, és destacable que, amb la introducció de la recomanació de l'administració d'una dosi de record entre els adolescents i els adults amb les vacunes dTpa, s'han tornat a observar aïllats puntuals que presenten els al·lèls *ptxA2*, *ptxP1* i *prn1*, no observats des del període 1991-1996^{427,435,436}. A Austràlia, els estudis també han indicat una disminució de la diversitat de genotips, així com l'actual predomini del genotip *ptxA1/ptxP3/prn2*, el qual es va observar en el 84% dels aïllats estudiats en el període 2008-2010⁴²⁶. Al Japó, un dels primers països a introduir les vacunes DTPa a l'any 1981, la freqüència dels al·lèls *ptxA1*, *ptxP3* i *prn2* ha

augmentant progressivament des de principis dels anys noranta, encara que els al·lels *ptxA2*, *ptxP1* i *prn1* es van observar en prop del 30% dels aïllats estudiats entre els anys 2011-2014, originant-se dos llinatges diferents entre els aïllats circulants^{407,437}. Genotips amb les variants *ptxP3* i *prn2* han sigut també majoritaris a Cambodja, on se segueixen utilitzant les vacunes DTPw a dia d'avui, tot i que en el període 2014-2016, es va observar una emergència de les variants *ptxP1* i *prn1* en un grup d'aïllats considerable, associades a la presència del MT29⁴³⁸. De la mateixa manera que al Japó i a Cambodja, i a diferència de les tendències observades a Europa o als EUA, els aïllats recollits recentment (2016-2017) a l'àrea de Shanghai van mostrar dos perfils al·lèlics diferents, detectant-se el que denominen el perfil "occidental" *ptxP3/prn2* i el perfil "xino/japonès" *ptxP1/prn1* en el 41% i el 59% dels aïllats, respectivament. Estudis previs mostren com els aïllats circulants recollits en els períodes 1953-2005 i 2012-2013 presentaven les variants *ptxP1* i *prn1*. Cal tenir en compte que les vacunes DTPa s'han anat introduint a la Xina de forma gradual des dels anys 2006-2007, restant pendent d'observar-se la tendència del genotip *ptxP3/prn2* a l'actualitat^{244,421,432}. Finalment, estudis addicionals duts a terme en països on s'utilitzen avui en dia les vacunes DTPw mostren certes diferències. Mentre que a Filipines les variants *ptxP1* i *prn1* es van observar com les majoritàries en el període 2012-2014, a Perú i a l'Iran, els aïllats que van expressar els al·lels *ptxP3* i *prn2* van predominar durant els anys 2012 i 2008-2015, respectivament^{428,439,440}.

Algunes de les vacunes DTPa comercialitzades actualment contenen entre els seus components antigènics la FIM3, concretament la variant codificada per la forma al·lèlica *fim3-1*. Els resultats de la caracterització del genotip de la FIM3 de les soques recollides en el present estudi, han revelat com tots els aïllats analitzats en el període 1986-1997 (DTPw) han presentat la variant *fim3-1*, i que no és fins el període de transició entre les vacunes DTPw i DTPa quan emergeix la variant antigènica *fim3-2*, identificant-se els al·lels *fim3-1* i *fim3-2* en el 43,8% i el 56,3% dels aïllats del període 1998-2003, respectivament, i en el 46,9% i el 53,1% dels aïllats del període 2007-

2015, respectivament. Encara que la presència d'ambdues formes al·lèliques s'ha mantingut en proporcions similars entre els anys 1998 y 2015, des de l'any 2011 en endavant, l'al·lel *fim3-1* ha tornat a ressorgir fins a considerar-se la variant predominant entre els aïllats més recents.

En relació a aquest ressorgiment de la variant *fim3-1*, els resultats descrits de forma global en un estudi a nivell europeu són consistents amb els nostres, ja que 71,7% dels aïllats estudiats durant el període 2012-2015 van presentar el genotip *fim3-1* (27,2% *fim3-2*). Prèviament, durant el període 1998-2012, els resultats a nivell europeu van situar la presència de l'al·lel *fim3-1* entre el 41% i el 56% dels aïllats (42%-59% *fim3-2*). Per països, a Bèlgica, Dinamarca, Finlàndia, Itàlia, Holanda i Noruega, on s'utilitzen vacunes DTPa que no presenten el component fimbrial, l'al·lel *fim3-1* es va observar en el 78,9%, 88,9%, 78,6%, 75%, 75% i 84,4% dels aïllats del període 2012-2015, respectivament. Contràriament, a França i el Regne unit, on s'utilitzen en algunes ocasions les vacunes DTPa de cinc components que inclouen les FIM, i juntament amb Suècia, els al·lells *fim3-1* i *fim3-2* es van detectar en una proporció similar, observant-se l'al·lel *fim3-1* en el 48,3%, 56,7% i 58,6% dels aïllats del mateix període^{408,410}. De la mateixa manera, a Holanda, s'han comunicat resultats similars, observant-se un augment transitori de la prevalença de la variant *fim3-2* durant el període d'introducció progressiva de les vacunes DTPa, presentant-se en aproximadament el 65% dels aïllats. Posteriorment, en el mateix estudi es va descriure la reversió de la forma antigènica *fim3-2* a favor de la variant *fim3-1*, observada en prop del 100% dels aïllats del període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa⁴³⁴. Contràriament, a Polònia, la variant antigènica *fim3-1* es va observar com a predominant durant tots els períodes estudiats, observant-se en el 82%, 100% i 76,9% dels aïllats estudiats entre els períodes 1998-2001, 2002-2006 i 2010-2016, respectivament, no observant-se la reemergència antigènica de *fim3-1* prèviament esmentada en països que utilitzen les vacunes DTPa^{408,430}.

Pel que fa a l'estudi del serotip fimbrial, de forma global, s'ha identificat com la majoria d'aïllats han expressat el serotip FIM3 (72,6%), sent aquest predominant durant tots els períodes d'estudi. Tot i això, i malgrat que la majoria de composicions vacunals utilitzades al nostre entorn no contenen cap antigen fimbrial, especialment aquelles utilitzades en la primovacunació, s'han observat diferències en la distribució dels serotips entre els diversos períodes d'estudi. Així doncs, l'expressió de la FIM3 s'ha observat en el 57,3% (31,7% FIM2) dels aïllats del període d'ús exclusiu de les vacunes DTPw, en el 90,2% (0% FIM2) dels aïllats del període de transició de les vacunes DTPw i les vacunes DTPa i en el 71,4% (25,7% FIM2) dels aïllats del període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa. Relacionant el serotip i el genotip fimbrial, destaca com, durant el període d'ús de les vacunes DTPw, tots els aïllats s'han associat al genotip *fim3-1*, independentment del seu serotip fimbrial. Des de la introducció de les vacunes DTPa, el serotip FIM3 s'ha relacionat amb ambdues formes al·lèliques *fim3-1* i *fim3-2*, mentre que, curiosament, el serotip FIM2 s'ha associat exclusivament a la presència de la variant fimbrial *fim3-1*. En conjunt, els resultats observats han reflectit l'increment de la presència de la forma fimbrial FIM3 coincidint amb la introducció de les vacunes DTPa, així com la posterior reemergència de la forma FIM2, relacionant-se aquesta amb la reemergència de la variant al·lèlica *fim3-1* durant el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa. Per tal d'intentar comprendre aquest fenomen, alguns autors han suggerit que el serotip de les soques incloses a les vacunes DTPw, així com la presència del component fimbrial en algunes vacunes DTPa utilitzades, ha pogut propiciar els recanvis constants de serotip en les poblacions de *B. pertussis* que han circulat al llarg dels anys¹⁰².

En aquest sentit, alguns estudis han comunicat resultats que reforcen aquesta idea. En un estudi dut a terme a Suècia entre els anys 1970 i 2003, on van descriure que el serotip FIM3 es va detectar de forma majoritària (70%) durant l'era de les vacunes DTPw, les quals contenien una soca que expressava FIM2, mentre que el serotip FIM2 es va trobar predominantment 58-64% al llarg d'un període de disset anys de

supressió de la vacunació generalitzada (1979-1996). Finalment, FIM3 es va convertir altra vegada en el serotip més prevalent (>60%) durant l'era d'introducció de les vacunes DTPa, arribant a observar-se en el 98% dels aïllats del període 2002-2003⁴¹⁷. Posteriorment, en un estudi dut a terme a nivell europeu, el serotip FIM3 es va descriure com a majoritari durant el període d'ús de les vacunes DTPa, observant-se en el 82,7% dels aïllats del període 1998-2012⁴⁰⁸. Recentment, en un estudi multicèntric europeu, s'ha descrit que, en conjunt, fins el 45,3% dels aïllats recollits en el període 2012-2015 van expressar el serotip FIM2. Per països, es va observar com, en alguns d'aquells on s'utilitzen les vacunes DTPa sense el component fimbrial, com ara a Dinamarca o Finlàndia, els aïllats FIM2 van ser més prevalents en aquest període (81,5% i 78,6% d'aïllats FIM2, respectivament) que en aquells països on s'utilitzen les vacunes DTPa que inclouen el component fimbrial, com per exemple a França i al Regne Unit (93,1% i 63,3% d'aïllats FIM3, respectivament)⁴¹⁰. Per la seva banda, a Polònia s'ha descrit com, en contrast amb els resultats publicats a Suècia, el serotip FIM2 va ser el dominant, estant present en el 86,5% dels aïllats del període 1998-2006. Aquesta observació és deguda, probablement, segons indiquen els autors, a que les vacunes DTPw poloneses inclouen soques que expressen ambdues variants fimbrials, la FIM2 i la FIM3^{408,417}. Finalment, al Japó, on s'utilitzen vacunes DTPa que no contenen el component Fim3 però sí el component Fim2 en algunes ocasions, s'ha observat un domini similar que a Europa dels aïllats FIM3, observant-se una prevalença d'aquest serotip fimbrial en més del 87% dels aïllats estudiats del període 2002-2012⁴⁰⁷.

Així, globalment, el conjunt de resultats exposats reforcen, de forma general, la hipòtesi que el serotip fimbrial de les soques o les variants antigèniques fimbrials inclosos en les composicions vacunals DTPw i DTPa, respectivament, podrien estar involucrats de forma directa en els recanvis de serotip fimbrial observats en les poblacions de *B. pertussis* circulants. Tot i això, s'especula que altres factors podrien estar també relacionats amb aquest fenomen, entre els que s'inclouen, per una

banda els brots, els quals podrien impulsar el recanvi de serotip fimbrial degut a que indueixen un reforç de la immunitat entre la població¹⁰². D'altra banda, també s'apunta que FIM3 sembla expressar-se en una major quantitat a la superfície de *B. pertussis* en comparació amb l'expressió de FIM2, la qual cosa podria explicar un cert avantatge per part dels aïllats FIM3 alhora d'evadir la resposta immune generada per una població altament immunitzada. Això, podria explicar el predomini de FIM3 en aquells països on l'ús de les vacunes DTPa és extensiu i generalitzat⁴⁴¹.

1.3. Impacte que ha pogut tenir l'ús de les vacunes antipertússiques en l'evolució i l'adaptació de les poblacions de *B. pertussis* circulants, posant el focus en la contribució que ha tingut el recanvi de vacuna en la selecció de les poblacions actuals.

Les vacunes DTPw, introduïdes entre la dècada dels anys quaranta i la dècada dels anys seixanta, han estat reemplaçades per les vacunes DTPa en la majoria dels països industrialitzats a finals del segle XX i principis del segle XXI. A Europa, l'única excepció és Polònia on, encara que les vacunes DTPa estan disponibles de forma comercial, avui en dia se segueixen utilitzant les vacunes DTPw per a la vacunació de la població enfront de la tosferina⁴³⁰. No obstant això, en molts països en vies de desenvolupament, les vacunes DTPw són extensament utilitzades per la seva relació cost-eficàcia⁴⁴².

Donat que l'home es l'únic hoste de *B. pertussis*, l'ús de les vacunes enfront d'aquest microorganisme seria una de les causes que amb major probabilitat hauria contribuït a l'adquisició de noves variants antigèniques que li permetessin evadir amb major eficiència la protecció que aquestes confereixen. Això es recolza en el fet que, des de la introducció de la vacunació sistemàtica de forma generalitzada enfront de la tosferina, s'ha observat l'aparició de variants al·lèliques diferents a les que presenten

les soques vacunals utilitzades per la producció de les vacunes DTPw o a les variants antigèniques incloses a les composicions vacunals DTPa^{422,435,443}.

La pressió selectiva exercida per les vacunes DTPa utilitzades actualment s'ha pogut constatar amb els resultats observats en el present estudi, els quals, reforcen l'aparició i circulació d'uns perfils de PFGE i uns tipus de MLVA associats a l'ús d'aquest tipus de vacunes. Aquests són, principalment, els perfils electroforètics pertanyents al clúster IV (VH2, VH19, VH20, VH22 i VH26), així com el MT27. En aquest sentit, entre els països industrialitzats que utilitzen actualment les vacunes DTPa, s'ha identificat la circulació d'aïllats de *B. pertussis* que presenten les mateixes característiques poblacionals, evidenciant-se la presència d'aquests mateixos perfils electroforètics i MT com a predominants en la major part dels països d'Europa, així com als EUA. Contràriament, els perfils de PFGE i els tipus de MLVA dels aïllats de *B. pertussis* difereixen en aquells països que inclouen les vacunes DTPw en els seus calendaris sistemàtics de vacunacions, com és el cas de Polònia o la Xina. En aquests països, la circulació de poblacions de *B. pertussis* amb perfils electroforètics pertanyents al clúster III (BpSR23), així com el predomini dels MT29, MT55 o MT70, han evidenciat la pressió selectiva exercida per les vacunes actuals en aquells països on les vacunes DTPa han reemplaçat l'ús de les vacunes DTPw. A més, aquest fet s'ha evidenciat d'una forma destacada en països com Polònia, on de forma recent s'ha descrit un increment en l'ús de les vacunes DTPa, detectant-se a conseqüència un inici de desplaçament dels perfils de PFGE i els tipus de MLVA propis durant l'ús de les vacunes DTPw pels mateixos que circulen a la majoria de països que han estat utilitzant les vacunes DTPa des de finals dels anys 90^{406,408,410,420}.

Antigènicament, tal i com s'ha descrit anteriorment, les poblacions de *B. pertussis* actuals, han evolucionat fins a presentar majoritàriament el genotip *ptxA1/ptxP3/prn2*, i fins ara, tant les vacunes DTPw com les vacunes DTPa han influït en aquesta tendència. L'emergència, primer, i l'expansió de l'al·lel *ptxA1* als anys

seixanta, després de la introducció de les vacunes DTPw i, posteriorment, el domini de les variants *prn2* i *ptxP3* coincidint amb la introducció de les vacunes DTPa han estat els principals canvis que han condicionat els trets característics de les actuals poblacions de *B. pertussis*, desplaçant per complet les variants prèviament majoritàries. El resultat de la distribució generalitzada d'aïllats de *B. pertussis* amb aquests genotips és la presència d'unes variants al·lèliques dels antigens inclosos a les composicions vacunals actualment utilitzades que escapen a la immunitat conferida per les vacunes DTPa, associant-se la circulació de forma majoritària del genotip *ptxA1/ptxP3/prn2* entre els aïllats de *B. pertussis* estudiats a la majoria de països europeus, als EUA i Austràlia^{434,435,444}. En general, els canvis al·lèlics de *ptxA* i *prn* s'han associat a desplaçaments antigènics selectius, els quals han implicat un efecte significatiu en les aptituds de les poblacions de *B. pertussis*, mostrant-se una major capacitat de colonització tant en ratolins no vacunats com en ratolins vacunats per part dels aïllats que van presentar les formes antigèniques *ptxA1* i *prn2*, reforçant-se la importància d'aquests canvis a nivell biològic⁴⁴⁵⁻⁴⁴⁹. Concretament, la presència del promotor *ptxP3*, associat a una major expressió del gen *ptxA*, garanteix als aïllats que el presenten una major producció de PTX, augmentant la seva virulència i capacitat d'immunosupressió. A més, s'ha demostrat en un model d'infecció en ratolí com els aïllats *ptxP3* són millors colonitzadors. A conseqüència, les poblacions circulants de *B. pertussis* presenten el potencial, no només d'evadir els efectes protectors de les vacunes DTPa, si no també la capacitat d'augmentar la gravetat de la malaltia en una doble habilitat d'adaptació per part del microorganisme que contribueix a una major aptitud d'aquest^{426,448,450,451}.

Finalment, tal i com s'ha mencionat anteriorment, els gens fimbrials de *B. pertussis* estan subjectes a la variació de fase, de manera que els aïllats poden presentar gens silenciosos. L'aparició, en el present estudi i en consonància amb els resultats descrits en estudis realitzats en el nostre entorn, de l'al·lel *fim3-2* coincidint amb la introducció de les vacunes DTPa ha generat una selecció clonal. Aquesta ha fet que

la variant antigènica *fim3-2* estigui majoritàriament associada al serotip fimbrial FIM3, el qual s'ha convertit en molt més predominant des de la introducció de les vacunes DTPa. No obstant això, la reemergència recent de la variant *fim3-1* associada al serotip fimbrial FIM2, una vegada les vacunes DTPa han estat completament implementades, recolza la idea de que es podria tractar d'un mecanisme adaptatiu de *B. pertussis* per tal de deixar d'expressar la forma al·lèlica *fim3-1*, la qual codifica el tipus antigènic de FIM3 inclòs en algunes de les composicions vacunals DTPa actualment utilitzades^{410,434,443}.

Així doncs, l'ús constant i perllongat de soques vacunals sense cap modificació antigènica ha pogut contribuir a la gran expansió d'aquestes poblacions més adaptades a la immunitat conferida per les vacunes actualment utilitzades. En general, la presència d'aquestes poblacions s'ha associat a la reemergència del patògen a la major part del món des de la dècada dels anys noranta, així com a l'increment progressiu en el nombre de casos observat des de llavors.

ESTUDI 2. Emergència de *Bordetella holmesii* com agent productor de tosferina a Barcelona.

B. holmesii és una espècie recentment identificada com a agent etiològic de la tosferina. La identificació de *B. pertussis* mitjançant tècniques d'amplificació d'àcids nucleics en mostres clíniques es realitza principalment mitjançant la detecció per PCR de la seqüència IS481. No obstant això, aquesta diana es troba present tant en *B. pertussis* com en *B. holmesii*. Aquest fet ha posat de manifest l'existència de diagnòstics erronis de l'agent causal de la tosferina, infradiagnosticant-se els casos originats per altres espècies del gènere *Bordetella*, entre les que s'inclou *B. holmesii*. Això pot tenir un efecte directe en la vigilància epidemiològica dels sistemes de salut pública així com l'avaluació de l'eficàcia de la vacuna de la tosferina emprada^{25,209,452}.

Malgrat el recent reconeixement de *B. holmesii* com un important patogen respiratori amb potencial per causar brots comunitaris, es desconeix la seva prevalença real, i la comprensió de la seva epidemiologia és limitada^{25,51,227,387}.

Els resultats obtinguts en el present estudi, en el qual es van analitzar un total de 391 mostres respiratòries de pacients diagnosticats de tosferina a Barcelona durant el període 2013-2016, mostren com, l'emergència de *B. holmesii* associada a quadres clínics de tosferina podria tenir un paper important en l'epidemiologia de la malaltia, així com una certa contribució en el ressorgiment d'aquesta.

2.1. *B. holmesii* com un agent productor de tosferina en el nostre medi, evolució de la seva prevalença al llarg dels últims anys.

En el present estudi, mitjançant l'ús d'una RT-PCR múltiple específica d'espècie, s'ha detectat que el 4,1% (n=16) de les mostres respiratòries dels pacients diagnosticats de tosferina al llarg del període 2013-2016 han sigut positives a *B. holmesii*. La distribució dels casos positius de *B. holmesii* en el present estudi ha sigut del 3,9%

l'any 2015 i del 8,8% l'any 2016, duplicant-se en aquest segon any. Encara que no s'observen diferències estadísticament significatives en aquest increment, s'observa això sí, una clara tendència a l'alça dels casos positius a *B. holmesii* entre els anys 2015 i 2016. Fins ara, són pocs els estudis en tot el món que han cercat *B. holmesii* en mostres respiratòries de pacients amb quadres de tosferina. Els resultats dels mateixos es recullen a la Taula 6.

Taula 6. Resum de la prevalença de *B. holmesii* recollida en estudis previs*.

País	Prevalença de <i>B. holmesii</i>	Prevalença de coinfecció de <i>B. holmesii</i> amb una altra <i>Bordetella</i> spp.	Anys
Finlàndia i Holanda	0%	0%	1992-2003
Massachusetts, EUA	0,3% (cultiu)	No consta	1994-1998
Ontario, Canadà	0,7%	No consta	2007-2008
Tunísia	0%	0%	2007-2016
New South Wales, Austràlia	5,7%	0%	2008-2016
França	6,8%	0%	2009-2010
Argentina	0,6%	No consta	2010
Xile	5,4% i 11,1%	No consta	2010-2011
Japó	17,1%	0%	2010-2011
Ohio, EUA	29,3% i 15,2%	2,4% i 1%	2010-2011
EUA	0,4%	0,1%	2012-2013
Japó	0%	0%	2013-2014
Casablanca, Marroc	3,1% casos índex 1,7% contactes estrets	36,5% casos índex 18,6% contactes estrets	2013-2015
Barcelona, Espanya†	2,6%	1,5%	2013-2016
Casablanca, Marroc	4,7% casos índex 12,9% contactes estrets	7,8% casos índex 4,3% contactes estrets	2015-2017

* Dades de Mia Antila *et al.* 2006, W. Katherine Yih *et al.* 1999, J. L. Guthrie *et al.* 2010, Ikam Ben Fraj *et al.* 2019, Winkie Fong *et al.* 2018, Elisabeth Njamkepo *et al.* 2011, D. Bottero *et al.* 2013, Carolina Miranda *et al.* 2012, Carolina Miranda *et al.* 2013, Hajime Kamiya *et al.* 2012, Loren Rodgers *et al.* 2013, Kevin B. Spicer *et al.* 2014, Brunilís Burgos-Rivera *et al.* 2015, K. Kamachi *et al.* 2015, Khalid Katfy *et al.* 2017 i Khalid Katfy *et al.* 2020^{23,24,227,387,395,453-463}.

† Dades del present estudi.

Els primers treballs en descriure la presència de *B. holmesii* es van dur a terme als EUA i a Canadà entre els anys 1994 i 2008, detectant-se en ambdós casos una prevalença inferior al 1%^{24,454}. Treballs posteriors, duts a terme a partir de l'any 2008 en països com Austràlia, França, Argentina, Xile, els EUA o Marroc, van demostrar que la prevalença de *B. holmesii* ha seguit sent baixa, situant-se de forma homogènia per sota del 7%^{23,395,456-458,460,462,463}. No obstant això, són destacables els valors de prevalença de *B. holmesii* al Japó i a Ohio durant dos brots de tosferina ocorreguts entre els anys 2010-2011 a ambdues regions, on entre el 17,1% i el 29,3% dels casos es van atribuir a la infecció per *B. holmesii*^{227,387,459}. Addicionalment, són destacables les primeres deteccions de *B. holmesii* en infecció respiratòria a Holanda l'any 2009, on prèviament no s'havia identificat, reforçant l'aparició i emergència del patogen^{453,464}. Finalment, altres països han descrit de forma recent els primers casos d'infecció respiratòria per *B. holmesii*, com és el cas d'Iran, on aquests es van observar per primera vegada l'any 2015⁴⁶⁵.

Entre les mostres positives per *B. holmesii* del present estudi, en un 62,5% (n=10), *B. holmesii* va resultar ser l'únic agent causal atribuïble al quadre de tosferina, mentre que en el 37,5% restant (n=6), *B. holmesii* es va detectar en combinació amb un altre agent causal de la tosferina; *B. pertussis* (83,3%) i *B. parapertussis* (16,7%). Així doncs, globalment la prevalença de *B. holmesii* com a únic agent causal atribuïble al quadre simptomàtic ha sigut del 2,6%, mentre que la prevalença d'aquest microorganisme en coinfecció amb una altra espècie del gènere *Bordetella* ha sigut del 1,5%. La coinfecció de *B. holmesii* amb altres agents etiològics s'ha observat també de forma puntual en altres estudis (Taula 6)^{227,387,460,462,463}. Així, a Ohio (EUA) es van identificar coinfeccions en el 1% i el 2,4% dels casos identificats durant el brot de tosferina ocorregut entre els anys 2010-2011 en dos treballs diferents, respectivament^{227,387}. D'altra banda, són destacables els elevats valors de coinfecció de *B. holmesii* amb una altra espècie del gènere *Bordetella* descrits en dos treballs

realitzats a Casablanca, on en aquests la prevalença ascendeix fins al 36,5% pel període 2013-2015 i al 7,8% pel període 2015-2017^{462,463}.

2.2. Paper de *B. holmesii* en l'epidemiologia de la tosferina.

El present estudi descriu l'aparició a Espanya de *B. holmesii* com a agent causal de la tosferina. Tot i no detectar-se la presència d'aquest microorganisme en mostres respiratòries obtingudes durant els anys 2013 i 2014, la seva emergència l'any 2015 suposa la primera evidència de la seva circulació en el nostre país. Aquesta primera descripció de la circulació de *B. holmesii* l'any 2015, ha coincidit amb l'últim any epidèmic de la tosferina a Espanya, i també a Catalunya, durant el qual es van registrar els valors d'incidència més alts observats des de la introducció de les vacunes DTPa i fins a dia d'avui. Concretament, la incidència de la tosferina a Espanya l'any 2015 va ser de 18 casos per cada 100.000 habitants, mentre que a Catalunya, aquesta va ascendir fins als 49,2 casos per cada 100.000 habitants. Pels anys 2013 i 2014, durant els quals no s'ha detectat la presència de *B. holmesii* i per l'any 2016, quan la prevalença de *B. holmesii* ha duplicat la observada durant l'any 2015, les xifres d'incidència a Catalunya es van situar als 13,3, 14,8 i 26,3 casos per cada 100.000 habitants, respectivament.

Per la seva banda, els alts valors de prevalença de *B. holmesii* sense coinfecció descrits a Miyazaki, al Japó i a Ohio, als EUA (17,1% i 29,3%, respectivament), coincideixen amb dos brots de tosferina observats a les respectives ciutats de Nobeoka City (Japó) i Franklin Country (EUA) entre els anys 2010-2011^{387,466}. Concretament la incidència de la tosferina descrita a Ohio en aquell període va ser de 80 casos per cada 100.000 habitants³⁸⁷.

Finalment, els valors de prevalença de *B. holmesii* descrits a Casablanca, al Marroc, durant el període 2013-2015, especialment per aquells casos de coinfecció entre

aquest microorganisme i una altra espècie del gènere *Bordetella* (el 36,5% de les mostres van ser positives per *B. holmesii* i *B. pertussis* de forma simultània per als casos índex i el 18,6% ho van ser entre els contactes estrets), coincideixen amb un increment dels casos de tosferina observats al país des de principis de l'any 2012, tal i com indiquen els autors. De fet, un segon estudi realitzat pels mateixos autors entre els anys 2015-2017, va descriure un descens en la prevalença de coinfecció entre *B. holmesii* i *B. pertussis*, sent aquesta del 7,8% pels casos índex i del 4,3% pels seus contactes estrets. Els autors atribueixen aquesta observació al fet que en aquest darrer estudi, i a diferència del primer, es van mostrejar tots els contactes domiciliaris, independentment de si presentaven simptomatologia o no. No obstant això, la prevalença de *B. holmesii* sense coinfecció observada en ambdós treballs va mostrar un augment, passant de ser, en el cas dels casos índex, del 3,1% en el període 2013-2015, al 4,7% entre els anys 2015-2017, respectivament^{462,463}.

Les evidències de l'emergència de *B. holmesii* a nivell global coincidint amb el període de reemergència de la tosferina, determinen que és important conèixer la incidència real i la prevalença de les diverses espècies involucrades en les epidèmies de tosferina per tal d'avaluar si *B. holmesii* és o pot esdevenir un problema de salut pública. La presència de *B. holmesii* sense coinfecció amb altres espècies del gènere *Bordetella* és significativa, especialment en la major part d'estudis duts a terme des de l'any 2008 en endavant. Aquest fet indica que, els casos que hi pugui haver ocults en el context epidemiològic actual de la tosferina podrien afectar la vigilància de *B. pertussis*, tant pel que fa al control de l'eficàcia vacunal com alhora d'escollir les opcions terapèutiques per als pacients. El conjunt d'estudis duts a terme a escala global revela la circulació simultània de *B. pertussis* i *B. holmesii* d'una forma constant des de principis del segle XXI, posant de manifest la importància de realitzar les proves adequades per a tal de poder fer un diagnòstic precís de l'agent causal de la tosferina, així com poder mantenir la vigilància contínua de l'epidemiologia de la malaltia^{25,51}.

2.3. Característiques clíniques-epidemiològiques dels pacients que desenvolupen tosferina per *B. holmesii*.

Comparant les característiques demogràfiques, les variables clíniques i l'estat vacunal entre els pacients infectats per *B. holmesii* i els pacients infectats per *B. pertussis*, no s'han observat diferències significatives en relació a l'edat dels pacients, la presència de febre, gall inspiratori, paroxismes o tos de més de catorze dies, així com la necessitat de requerir d'hospitalització. No obstant això, pel que fa a l'edat dels pacients, tot i no considerar-se una diferència significativa, s'observa una tendència de *B. holmesii* a infectar a infants d'edat més avançada, amb una mediana d'edat entre els infectats amb *B. holmesii* de 9 anys (rang 4-40 anys), mentre que la mediana d'edat entre els infectats amb *B. pertussis* ha sigut de 5,5 anys (0,08-74 anys), observant-se un *p*-valor entre ambdós grups de 0,07. Aquesta mateixa tendència ha quedat palesa amb dades aportades per altres treballs, confirmant-se una major prevalença de *B. holmesii* entre els adolescents i adults. En aquest sentit, el 91% del pacients infectats amb *B. holmesii* en l'estudi dut a terme a Massachusetts entre els anys 1994-1998 van pertànyer al grup de 11 a 29 anys, així com la majoria dels individus en els quals se'ls va detectar *B. holmesii* entre els anys 2008-2016 a Austràlia, sense especificar-se el percentatge, tenien entre 11 i 18 anys^{24,456}. Tanmateix, en l'estudi dut a terme a França entre els anys 2009-2010 s'apunta que el 20,3% dels pacients majors de 9 anys van ser positius a *B. holmesii*⁴⁶⁷. En context de brot, com és el cas descrit al Japó entre els anys 2010 i 2011, el 80% dels infectats amb *B. holmesii* tenien entre 6 i 15 anys. Per la seva, a Ohio en el mateix període 2010-2011, el 63% dels casos de *B. holmesii* es van donar en pacients d'entre 11 i 18 anys, suposant això que el 76,9% dels individus majors de 14 anys van ser positius per *B. holmesii*^{227,387,466}.

Pel que fa a la vinculació de *B. holmesii* amb esdeveniments epidemiològics de rellevància per a la seva transmissió, en el present estudi s'ha identificat que el 87,5%

dels casos positius per aquest microorganisme van estar vinculats a un brot, incloent brots en l'àmbit escolar (85,7%) i brots en un context familiar (35,7%). En aquest mateix sentit, per al 83,3% dels casos positius per *B. holmesii* al Japó durant l'any 2011 es va identificar un mateix vincle epidemiològic, observant-se una relació dels casos amb un mateix centre de secundària⁴⁶⁶.

Tot i no disposar de recomanacions clares alhora de tractar les infeccions respiratòries causades per *B. holmesii*, diversos estudis apunten, encara que entremig d'una certa controvèrsia, a una menor activitat dels macròlids en comparació a altres agents antimicrobians i a diferència de l'efectivitat d'aquests enfront de *B. pertussis*^{6,25,51}. Tot i això, encara que en el present estudi *B. holmesii* es va detectar de forma retrospectiva mitjançant tècniques d'amplificació d'àcids nucleics i, per tant, no es van poder realitzar les proves de susceptibilitat a antimicrobians, quinze dels setze pacients identificats van ser tractats amb azitromicina i per a cap cas es van evidenciar complicacions o recidives després de la seva administració. De la mateixa manera, al Japó, tots els pacients van ser tractats amb azitromicina i en tots els casos es va observar una recuperació completa⁴⁶⁶. A Ohio, els autors descriuen que després de l'administració d'azitromicina o claritromicina, la tos dels pacients es va resoldre més ràpidament que entre aquells pacients infectats per *B. pertussis*. Addicionalment, les proves de susceptibilitat a antimicrobians en algun dels aïllats de *B. holmesii* van mostrar com aquests van ser susceptibles a azitromicina ($<0,12 \mu\text{g/ml}$), encara que la susceptibilitat per *B. pertussis* va ser menor ($<0,04 \mu\text{g/ml}$)^{227,387}. Així doncs, l'aparent eficàcia d'aquests antibiòtics recolza l'ús dels macròlids pel tractament de qualsevol de les etiologies de la tosferina.

B. holmesii no posseeix la majoria d'antígens presents a les composicions vacunals DTPa utilitzades enfront de la infecció per *B. pertussis*. En el cas d'aquelles proteïnes homòlogues que comparteixen ambdues espècies, com és el cas de la FHA, la seva

estructura i composició difereix substancialment de la de *B. pertussis*, fent que els anticossos produïts després de la vacunació no la reconeguin. Encara que s'ha observat que les vacunes antipertússiques indueixen una resposta immunològica de cèl·lules T que tindria reactivitat creuada amb *B. holmesii*, la falta d'una bona resposta d'anticossos, fa pensar que *B. holmesii* escaparia a la immunitat conferida per les vacunes utilitzades enfront de la tosferina^{25,51}. Aquests fets, juntament amb l'absència de protecció enfront de la replicació bacteriana observada en ratolins immunitzats, suggereix una menor protecció per part de les vacunes DTPa cap a les infeccions produïdes per *B. holmesii*²⁶³. En aquest sentit, durant el brot de tosferina de Ohio entre 2010 i 2011, el 60% dels pacients del grup d'edat de 11 a 18 anys amb infecció per *B. holmesii* havien sigut immunitzats amb vacunes de reforç enfront de la tosferina, en comparació amb el 44% dels pacients infectats amb *B. pertussis*³⁸⁷. En el present estudi, la gran majoria (87,5%) dels pacients havien completat la immunització enfront de la tosferina amb una mediana de 5 dosis rebudes en el moment del diagnòstic i una mediana de 4,5 anys transcorreguts des de l'última dosi rebuda (rang 0,7-14,1 anys). És per això que, l'emergència de *B. holmesii* com agent causal de la tosferina, infecció que les vacunes antipertússiques no poden prevenir eficaçment, podria ser un element que ha contribuït a l'increment del nombre de casos de tosferina observats en la situació de reemergència de la malaltia.

Tot i el conjunt de resultats exposats, són necessaris estudis addicionals que ajudin a esclarir aspectes microbiològics relacionats amb el microorganisme, com és un millor coneixement dels seus factors de virulència, així com a tenir una major coneixença dels aspectes clínics de la malaltia que produeix i la seva epidemiologia, inclosa la seva relació amb les altres espècies del gènere *Bordetella*. Entre aquests, serà important dilucidar les raons per les quals hi ha un nombre considerable de casos de coinfecció, i per què els adolescents i els adults presenten una major prevalença de *B. holmesii* en comparació amb altres grups d'edat, així com tenir una

major comprensió de la seva patogenicitat, incloent-hi el seu potencial invasiu que pugui fer augmentar el risc de malaltia invasiva en pacients vulnerables.

ESTUDI 3. Identificació i caracterització de *Bordetella pertussis* deficient en pertactina a Espanya.

Al llarg dels darrers anys, certs canvis en l'expressió dels antigens inclosos en les composicions vacunals DTPa comunament utilitzades s'han observat després de la introducció d'aquestes de forma generalitzada. Concretament, la principal pressió selectiva s'ha observat per la PRN, doncs destaca l'aparició a nivell global d'aïllats de *B. pertussis* que han deixat de produir-la^{403,468,469}. La PRN és un membre de la família d'autotransportadors, la qual juga un paper en l'adhesió del microorganisme a la membrana cel·lular de l'hoste⁴⁷⁰. Els mecanismes que causen aquesta pèrdua en la producció de PRN són molts i diversos, la majoria dirigits per la inserció de seqüències, delecions, insercions o canvis puntuals de nucleòtids o pèrdues de part del gen, els quals poden afectar tant al gen *prn* com al seu promotor⁴⁷¹⁻⁴⁷³.

Els resultats obtinguts en el present estudi, en el qual es van estudiar un total de 342 aïllats clínics de *B. pertussis* productors de tosferina a Espanya al llarg del període 1986-2018, durant el qual s'han utilitzat diverses composicions vacunals antipertússiques i diferents programes de vacunació, mostren l'emergència i increment de la circulació d'aïllats de *B. pertussis* deficientes en la producció de PRN des de la introducció de les vacunes DTPa.

3.1. Producció de pertactina de *B. pertussis* aïllades de pacients amb un quadre de tosferina.

Pel que fa a la producció de PRN entre les poblacions de *B. pertussis* circulants, en el present estudi, tots els aïllats recollits durant l'ús de les vacunes DTPw (1986-1997) així com els recollits durant el període de transició entre les vacunes DTPw i les vacunes DTPa (1998-2005) han resultat ser productors de PRN. A partir de llavors, durant el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa (2006-2018), el 38% dels aïllats s'han identificat com a no productors de PRN, sent significatiu el seu increment entre

el segon i el tercer període. Aquesta mateixa tendència en l'emergència i circulació d'aïllats de *B. pertussis* no productors de PRN s'ha descrit a nivell global en diversos treballs, l'aparició dels quals s'ha comunicat en països amb una àmplia trajectòria en l'ús generalitzat de les vacunes DTPa que inclouen la PRN en les seves composicions. El primer treball que va comunicar la circulació de *B. pertussis* deficients en PRN es va publicar a França l'any 2009, en el que es van descriure aïllats no productors de PRN obtinguts l'any 2007⁴⁰³. Poc després i impulsats pel reemplaçament vacunal de forma extensiva a nivell mundial, els aïllats PRN negatius es van observar en diversos indrets, entre els que s'inclouen tant països europeus com Austràlia, el Japó o els EUA^{468,469,471,472,474}.

En el present estudi, els primers aïllats de *B. pertussis* PRN negatius s'han observat l'any 2007, detectant-se un increment en la circulació d'aquests a partir de l'any 2011. Concretament, la prevalença més alta s'ha observat l'any 2015 (71,4%), coincidint amb l'últim any epidèmic de la malaltia en el nostre entorn, mentre que l'any 2018 s'ha detectat un descens en la circulació dels aïllats deficients en PRN (33,3%). Aquesta observació indica que caldrà continuar estudiant la tendència en la circulació d'aquests aïllats al llarg dels pròxims anys per tal de comprendre la seva evolució més recent.

En conjunt, els resultats suggereixen una expansió dels aïllats de *B. pertussis* no productors de PRN arran de la pressió selectiva impulsada per les vacunes actualment utilitzades. En aquest sentit, són varis els estudis que recolzen l'emergència d'aïllats deficients en PRN en una associació dependent amb el temps transcorregut des de la introducció de les vacunes DTPa. A Europa, on aquestes vacunes es va introduir entre finals dels anys noranta i principis dels anys 2000 a la majoria de països, la presència dels aïllats de *B. pertussis* PRN negatius es va veure incrementada entre els anys 2012-2015, comunicant-se una prevalença d'aquests aïllats del 6,4% i del 3,4% en els períodes prèviament estudiats 2007-2009 i 2007-

2012, respectivament, i del 24,9% en període recent 2012-2015^{475,476}. De la mateixa, una gran proporció d'aïllats PRN negatius s'han observat en països com Austràlia o als EUA, on les vacunes DTPa es van introduir al llarg dels anys noranta, o al Japó, on aquestes es van utilitzar per primera vegada a principis dels anys vuitanta. A Austràlia, la freqüència d'aïllats de *B. pertussis* que han deixat d'expressar la PRN va ser del 5,1% l'any 2008, augmentant abruptament fins al 77,8% l'any 2012. Recentment, un últim treball realitzat en aquest país al llarg del període 2013-2017, va descriure com el 89,7% dels aïllats estudiats es van identificar com PRN negatius^{243,472}. Per una banda, als EUA, el conjunt d'aïllats estudiats, entre els quals s'inclouen aïllats recollits de dos brots ocorreguts a Califòrnia i Washington als anys 2010 i 2012, respectivament, van evidenciar un augment en la freqüència dels aïllats PRN negatius també en un context de brot, passant del 12,1% l'any 2010 al brot de Califòrnia al 72,7% dos anys després al brot de Washington. En aquest mateix treball, pel que fa als aïllats obtinguts en el mateix període però no relacionats en cap situació de brot, el 37,4% es van identificar com a deficients en PRN⁴⁷³. Addicionalment, els resultats d'un treball que combina aïllats de *B. pertussis* obtinguts de vuit estats diferents dels EUA entre els anys 2011 i 2013, van situar en un 85% la freqüència d'aïllats no productors de PRN⁴⁰⁵. D'altra banda, al Japó, després de comunicar-se una prevalença del 41% pels aïllats de *B. pertussis* PRN negatius en el període 2005-2007, es va observar de forma posterior, una sorprenent disminució, situant-se aquests per sota del 10% entre els anys 2014-2016. En aquest sentit, els autors expliquen aquest comportament arran de la introducció de les vacunes DTPa sense el component PRN al Japó l'any 2012, veient-se reforçada la hipòtesi que els aïllats de *B. pertussis* que deixen d'expressar la PRN són favorablement seleccionats en funció de la immunitat poblacional enfront d'aquest antigen vacunal⁴⁷⁷. De forma més recent, els aïllats deficients en PRN també s'han identificat a Eslovènia, on la freqüència d'aquests va passar de ser 0% al període 2006-2011 a ser del 89,5% entre els anys 2014-2017⁴⁷⁸. Finalment, a Canadà, on

l'emergència d'aquests aïllats a Ontàrio es remunta l'any 2011, observant-se una circulació posterior creixent fins l'any 2016 (70,8%), es va descriure un descens de la circulació dels aïllats de *B. pertussis* deficients en PRN l'any 2017 (46,2%)^{479,480}.

Malgrat que la presència dels aïllats de *B. pertussis* deficients en PRN sembla ser dependent de l'ús de les vacunes DTPa durant la vacunació sistemàtica enfront de la tosferina, aquests aïllats s'han observat de forma recent en països com Dinamarca o Polònia, on s'utilitzen les vacunes DTPa monocomponents que no inclouen la PRN i les vacunes DTPw, respectivament. Provablement la circulació d'aquests aïllats entre països del seu entorn, així com un avantatge en el procés de colonització i en la capacitat per produir infecció per part d'aquests en persones vacunades explicaria la seva presència en aquests països. Cal destacar també que a Polònia, segons estimacions locals, l'ús de les vacunes DTPa comercials va suposar un 60% l'any 2013^{430,476}. Contràriament, a dia d'avui, no s'han detectat o s'han detectat escassos aïllats de *B. pertussis* deficients en PRN en països com Iran o Argentina, on les vacunes DTPw se segueixen utilitzant en l'actualitat, observant-se una menor pressió selectiva per part de les poblacions immunitzades amb DTPw^{481,482}.

En resum, el conjunt de troballes indiquen que l'ús de les vacunes DTPa de forma sistemàtica és suficient per seleccionar aquells aïllats de *B. pertussis* deficients en l'expressió de PRN, afavorint-se la seva circulació entre països propers^{430,476}. Entre els diferents antigens vacunals presents a les composicions DTPa, la PRN és el determinant de virulència que ha rebut la principal pressió selectiva, doncs els aïllats deficients en PTX o en FHA s'han descrit de forma molt puntual arreu del món^{403,404,483,484}. Són diversos els estudis que han intentat dilucidar els avantatges que podrien presentar les poblacions de *B. pertussis* que no expressen la PRN respecte a aquelles poblacions que conserven la producció de l'esmentat antigen. Entre aquests, s'ha observat com les soques de *B. pertussis* deficients en PRN presenten una major capacitat d'invasió de les cèl·lules dendrítiques derivades dels

monòcits humans, fet que fa augmentar la producció de citocines pro inflammatòries per part d'aquestes, suggerint-se un possible paper modulador de la PRN sobre la resposta immune. Així, aquestes observacions apuntarien a que aquests aïllats poden arribar a desencadenar respostes immunològiques més exagerades^{485,486}. Addicionalment, els aïllats deficientes en PRN han mostrat una major supervivència en ratolins vacunats amb vacunes DTPa en comparació amb aquells aïllats de *B. pertussis* productors de PRN^{487,488}. Finalment, s'apunta que aquests aïllats no perdrien la seva capacitat virulenta, essent capaços de causar els símptomes clàssics d'un quadre de tosferina⁴⁰³⁻⁴⁰⁵.

3.2. Causes genètiques associades a la pèrdua d'expressió de pertactina en aquells aïllats en els que no es detecta la seva producció.

Els mecanismes que originen la pèrdua de PRN en *B. pertussis* són molts i diversos. Les primeres troballes incloïen la inserció de l'element IS481 a la regió 2 del gen *prn* i una deleció de 84 pb entre les posicions 26^109 de la SS^{403,468,469}. A partir de l'increment de la prevalença dels aïllats deficientes en PRN, una sèrie de mecanismes es van anar convertint també en els més prevalents, especialment la presència de la IS481 inserida en diverses posicions del gen *prn* (245^246, 1613^1614, 2735^2736), sigui en posició directa com en posició inversa. Altres mecanismes identificats com a responsables de la pèrdua d'expressió de la PRN inclouen deleccions en el promotor, la SS i part del gen *prn* (-2090^478, -1513^145, -292^1340, -283^40, 26^109, 32^80, 666^667, 2020^2023), la inversió de 22 kb en la regió promotora (-20892^75), la inserció de l'element IS1002 entre les posicions 1613^1614, mutacions puntuals que condueixen a codons STOP (223STOP: C>T, 1273STOP: C>T, 2077STOP: G>T), la interrupció del promotor (-162: G>A), l'adició d'un sol nucleòtid (1185: G), la deleció d'un sol nucleòtid (631^632: T) i la deleció sencera del gen *prn*. Tot i això, se segueixen sense trobar algunes de les causes relacionades amb la deficiència de la

PRN en alguns dels aïllats que no expressen l'esmentat antigen, no observant-se mutacions ni el gen estructural *prn* ni en el seu promotor⁴⁰⁶.

La inserció de la IS481 segueix sent, a dia d'avui, el mecanisme principal pel qual es produeix la deficiència de PRN a nivell mundial. No obstant això, altres mecanismes estan augmentant. Un cas curiós és el del Japó, on tan sols dos mecanismes són prevalents, la inserció de la IS481 i la deleció de 84 pb en la SS, sent aquesta segona mutació la majoritàriament observada en aquell país^{437,469,477}. Tots els mecanismes que s'han descrit a dia d'avui que estan relacionats amb la pèrdua d'expressió de la PRN en *B. pertussis* es presenten a la Taula 7.

Taula 7. Mecanismes responsables de la deficiència en pertacina en *B. pertussis**.

Mecanisme	Posició en el gen <i>prn</i> o en el seu promotor	País, període (%)
Inserció de l'element IS481	<i>prn2</i> ::245^246	EUA, 2000-2013 (15,8%)
		Canadà, 2011-2012 (8,3%)
		Japó, 1995-2009 (27,3%)
	<i>prn2</i> ::1613^1614	EUA, 2000-2013 (47,4%)
		Eslovènia, 2006-2017 (94,1%)
		Espanya, 2006-2018 (18,3%)
		Austràlia, 2008-2012 (74%)
		Canadà, 2011-2012 (58,3%)
		Europa, 2012-2015 (48,5%)
		Austràlia, 2013-2017 (88,6%)
<i>prn2</i> ::2735^2736	EUA, 1994-2012 (2,9%)	

		EUA, 2000-2013 (1,8%)
Inserció de l'element IS1002	<i>prn2::1613^1614</i>	Espanya, 2006-2018 (5,4%)†
		Austràlia, 2008-2012 (6,3%)
Inversió de 22 kb	-20892^-75 (promotor)	Austràlia, 2013-2017 (5,7%)
		EUA, 1994-2012 (5,2%)
		EUA, 2000-2013 (7%)
		Espanya, 2006-2018 (5,4%)†
STOP: C>T	<i>prn2::223</i>	EUA, 2012-2013 (9,8%)
		Europa, 2012-2015 (27,3%)
		EUA, 2000-2013 (1,8%)
		Europa, 2012-2015 (12,1%)
		Austràlia, 2013-2017 (1,4%)
STOP: G>T	<i>prn2::2077</i>	EUA, 2000-2013 (1,8%)
		EUA, 1994-2012 (1,3%)
		EUA, 1994-2012 (0,7%)
Inserció d'un nucleòtid, G	<i>prn2::1185</i>	EUA, 2000-2013 (21,1%)
		Canadà, 2011-2012 (8,3%)
Deleció d'un nucleòtid, T	<i>prn2::631^632</i>	Europa, 2012-2015 (1,5%)
Deleció d'un nucleòtid, G	<i>prn2::1494^1495</i>	EUA, 1994-2012 (0,7%)
Deleció	-2090^-478 (promotor)	Austràlia, 2008-2012 (1%)
		Europa, 2012-2015 (6,1%)
		Espanya, 2006-2018 (6,5%)†
		EUA, 1994-2012 (0,7%)
		EUA, 2012-2013 (1,1%)
	<i>prn2::-1513^145</i>	Primera descripció als EUA, 2011
	-614^-75 (promotor)	Espanya, 2006-2018 (1,1%)†
	<i>prn2::-292^1340</i>	Eslovènia, 2006-2017 (5,9%)

		Espanya, 2006-2018 (58,1%)†
		Austràlia, 2013-2017 (2,9%)
		Primera descripció als EUA, 2016
	<i>prn2</i> ::-283 [^] -40 (promotor)	Primera descripció als EUA, 2013
		EUA, 1994-2012 (1%)
		Japó, 1995-2009 (72,7%)
	<i>prn1</i> ::26 [^] 109 (SS)	EUA, 2000-2013 (3,5%)
		EUA, 2012-2013 (1,1%)
	<i>prn2</i> ::32 [^] 80 (SS)	
	<i>prn2</i> ::2020 [^] 2023	Austràlia, 2013-2017 (1,4%)
	<i>prn2</i> ::666 [^] 667	Primera descripció als EUA, 2016
		Austràlia, 2008-2012 (2,1%)
Deleció sencera del gen	Δprn	
		Europa, 2012-2015 (3%)
Disrupció: G>A	-162 (promotor)	Canadà, 2011-2012 (8,3%)
		EUA, 1994-2012 (0,3%)
		Espanya, 2006-2018 (5,4%)†
Desconegut	NA	Austràlia, 2008-2012 (16,7%)
		Canadà, 2011-2012 (16,7%)
		Europa, 2012-2015 (1,5%)

* *prn2*, al·lel 2 del gen de la pertactina; IS481, seqüència d'inserció 481; IS1002, seqüència d'inserció 1002; A, adenina; C, citosina; G, guanina; T, timina; kb, kilobase; ^, posició on es troba localitzat el mecanisme; SS, seqüència senyal; STOP, codó stop; >, mutació; Δ , deleció; NA, no aplica. **Dades de Michael R. Weigand *et al.* 2019, Raymond S.W. Tsang *et al.* 2014, Nao Otsuka *et al.* 2012, Tamara Kastrin *et al.* 2019, Connie Lam *et al.* 2014, Alex-Mikael Barkoff *et al.* 2019, Zheng Xu *et al.* 2019, L.C. Pawloski *et al.* 2014, Katherine E. Bowden *et al.* 2014 i Michael R. Weigand *et al.* 2017**^{469,472,473,476,478,479,484,489-491}.

† Dades del present estudi.

En el present estudi, un total de set de mecanismes s'han identificat com a responsables de la pèrdua de PRN entre els aïllats recollits al nostre país, cinc dels

quals ja s'havien descrit prèviament (Taula 7). D'aquests, destaca la presència d'una gran deleció en el 58,1% dels aïllats, la qual afecta part del promotor i part del gen *prn* (*prn*::del(-292, 1340)), observant-se per primera vegada en un aïllat recollit l'any 2009. Posteriorment, al llarg del període 2011-2018, aquest mecanisme va convertir-se en el més prevalent observat de forma anual entre els aïllats deficients en PRN, amb una prevalença d'entre el 23,8% i el 100% els anys 2013 i 2014, respectivament. Sorprenentment, aquesta mutació, tot i ser la més prevalent en el nostre entorn, s'ha descrit de forma puntual en treballs recents realitzats als EUA, on es fa la seva primera descripció l'any 2016, a Austràlia, descrivint-se en el 2,9% dels aïllats estudiats entre 2013 i 2017 o a Eslovènia, observant-se en el 5,9% dels aïllats del període 2006-2017^{478,484,491}.

Com a segon mecanisme més comú s'ha identificat la inserció de l'estructura IS481 a les posicions 1613^1614 i 2735^2736, tant en sentit directe com revers, en el 23,7% dels aïllats (18,3% a la posició 1613^1614 i 5,4% a la posició 2735^2736). Així, la inserció d'aquest element en la posició 1613^1614 en sentit invers ha suposat el 12,9% dels aïllats deficients en PRN del període 2006-2018, mentre que la seva inserció a la posició 1613^1614 de forma directa, així com a la posició 2735^2736 de forma inversa, han representat cadascuna el 5,4% dels aïllats no productors de PRN d'aquest mateix període. Pel que fa a la distribució dels aïllats que han presentat aquest mecanisme de disrupció del gen *prn*, tan sols els aïllats amb la presència de la IS481 a la posició 1613^1614 de forma inversa s'han observat al llarg de tot el període d'estudi, detectant-se per primera vegada l'any 2010 i suposant el 50% dels aïllats deficients en PRN d'aquell any. A partir de llavors, aquest mecanisme s'ha observat entre el 9,1% dels aïllats negatius en PRN de l'any 2018 i el 33,3% dels aïllats deficients en PRN de l'any 2015. La pèrdua d'expressió de la PRN conduïda per aquest mecanisme s'ha trobat àmpliament distribuïda arreu del món. Per una banda, la inserció de la IS481 a la posició 1613^1614 s'ha identificat com a mecanisme més prevalent entre els aïllats deficients en PRN de molts dels treballs realitzats en aquest

sentit. De fet, la seva presència en el 18,3% dels aïllats PRN-negatius en el present estudi, el situa, com l'estudi en què s'ha detectat en menor prevalença. Així, es va detectar en el 27,3% dels aïllats PRN-negatius detectats entre els anys 1995 i 2009 a Japó i en el 47,4%, 58,3% i 48,5% dels aïllats deficients en PRN identificats als EUA, Canadà i Europa en els períodes 2000-2013, 2011-2012, 2012-2015, respectivament^{469,476,479,489}. Així mateix, es va detectar amb prevalences superiors a Eslovènia entre els anys 2006 i 2017 (94,1%) i Austràlia en els períodes 2008-2012 i 2013-2017 (74% i 88,6%, respectivament)^{472,478,484}. D'altra banda, la inserció de la IS481 entre les posicions 2735-2736 s'ha detectat també, més enllà del present estudi (5,4%), en el 2,9% i 1,8% dels aïllats deficients en PRN observats en dos estudis realitzats als EUA en els períodes 1994-2012 i 2000-2013, respectivament^{473,489}.

Altres mutacions observades en menor mesura en el present estudi han inclòs la inversió de 22 kb en la zona del promotor (*prn::promoter_inv(-74)*) en el 5,4% dels aïllats PRN-negatius, no detectant-se de forma constant al llarg de tot el període. Aquest mateix mecanisme es va observar en freqüències similars en tres estudis realitzats als EUA durant els períodes 1994-2012, 2000-2013 i 2012-2013 (5,2%, 7% i 9,8%, respectivament)^{473,489,490}. Contràriament, a nivell europeu aquest mecanisme es va detectar en el 27,3% dels aïllats deficients en PRN identificats al llarg del període 2012-2015, prevalença notablement superior a la observada en el present estudi a nivell espanyol⁴⁷⁶. Finalment, un parell de mutacions s'han descrit per primera vegada entre els aïllats del present estudi, les qual són la deleció d'un sol nucleòtid a la posició 1494 resultant en la presència d'un codó stop a l'aminoàcid 499 (*prn::499STOP-delG1494*) i la deleció entre les posicions -614 i -75 del promotor (*prn::promoter_del(-614, -75)*), observant-se en el 6,5% i l'1,1% dels aïllats, respectivament. La primera s'ha identificat per primera vegada en un aïllat de l'any 2009 i en cinc aïllats més recollits tots ells l'any 2011, suposant el mecanisme observat en el 23,8% dels aïllats d'aquest any. Posteriorment, no s'ha tornat a detectar la seva presència en cap dels aïllats més recents. Per la seva banda, la

deleció en part del promotor (*prn::promoter_del(-614, -75)*) s'ha detectat en un únic aïllat obtingut l'any 2017.

3.3. Anàlisi filogenòmica per identificar l'estructura poblacional de *B. pertussis* deficients en pertactina, estimant la data de la seva aparició, distribució i evolució i relacionant-ho amb l'impacte que la introducció de les vacunes acel·lulars ha pogut tenir en l'adaptació i circulació d'aquestes poblacions.

S'ha descrit que l'adaptació de *B. pertussis* a l'ésser humà al llarg de la seva història ha implicat una evolució important en forma de coll d'ampolla en les poblacions del microorganisme, associant-se a aquest procés la pèrdua i la inactivació d'una quantitat considerable de gens degut a la presència de les IS o a altres mutacions en el genoma de *B. pertussis*, el qual és un procés observat amb freqüència entre els bacteris que presenten hostes restringits^{103,492}. No obstant això, i contràriament al que es podria esperar, amb la introducció de la vacunació enfront de la tosferina i a la pressió selectiva exercida per aquesta, no hi ha hagut evidències d'una pèrdua de la diversitat en la població global de *B. pertussis*, representada per la mida efectiva de la població. Aquest fenomen, que no s'ha observat en estudis geogràficament més restringits^{422,493,494}, s'ha descrit en un treball que va estudiar una col·lecció d'un total de 343 aïllats recollits al llarg dels sis continents entre els anys 1920 i 2010, en el que es va determinar l'estructura de la població circulant de *B. pertussis* a escala global utilitzant la seqüenciació dels genomes complets. En aquest es van descriure diversos esdeveniments que han fet augmentar la mida efectiva de la població de *B. pertussis*, i per tant, la seva diversitat. Aquests són l'emergència i expansió de les variants *ptxA1* i *ptxP3* per a la PTX i el seu promotor en primer lloc, aparició de les quals s'estima en els períodes 1921-1932 i 1974-1977, abans de la introducció de les vacunes i durant l'ús de les vacunes DTPw, respectivament. Posteriorment, l'aparició

de la variant *fim3-2*, emergència de la qual s'estima que ha tingut lloc entre els anys 1986 i 1989, és considerat un tercer esdeveniment implicat en l'augment de la diversitat poblacional de *B. pertussis*. Pel que fa al gen *prn*, l'aparició de l'al·lel *prn2* es situa també durant el període d'ús de les vacunes DTPw, estimant-se la seva emergència pròxima l'any 1970. Aquests resultats, en conjunt, suggereixen una selecció i diversificació dels llinatges de *B. pertussis* que escapen de la immunitat conferida per les vacunes antipertussiques, els quals han mostrat una propagació molt ràpida a escala global. Així doncs, s'ha descrit una divergència genètica en la població mundial de *B. pertussis* a conseqüència de la selecció immune impulsada per les vacunes, especialment per a les variants no vacunals *prn2* i *fim3-2*, així com la variant del promotor *ptxP3*, les quals tenen el seu origen durant l'ús extens de les vacunes DTPw. No obstant això, en aquest treball no s'han descrit aïllats deficients en PRN, presumiblement perquè aquests han assolit freqüències significatives en un període posterior al que s'ha analitzat en el mateix, aparició del quals sembla estar associada a la introducció de les vacunes DTPa⁴⁴³.

La reconstrucció filogenètica en el present estudi d'un conjunt d'aïllats que han circulat a Espanya entre els anys 1986 i 2018, entre els quals s'inclouen aïllats productors de PRN i aïllats deficients en la producció d'aquesta, ha revelat la circulació majoritària de dos clades de *B. pertussis*, els quals han suposat els principals causants de tosferina en el nostre entorn al llarg dels últims trenta anys. Aquests es caracteritzen per presentar diferències en l'al·lel que codifica l'antigen vacunal FIM3. Per una banda, s'ha identificat un primer clade (Clade II) d'aïllats que codifiquen majoritàriament l'al·lel *fim3-2* i expressen el serotip fimbrial FIM3 (96,9%), el qual inclou aïllats recollits en el període 1998-2018 que presenten principalment la combinació al·lèlica *ptxA1/ptxP3/prn2/fim2-1/fim3-2* (90,6%). D'altra banda, s'ha descrit un segon clade (Clade III) d'aïllats recollits entre els anys 2005 i 2018, coincidint amb període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa, que codifiquen majoritàriament l'al·lel *fim3-1* i expressen predominantment el serotip

fimbrial FIM2 (72%), els quals presenten principalment la combinació al·lèlica *ptxA1/ptxP3/prn2/fim2-1/fim3-1* (87,9%). L'anàlisi bayesià de l'evolució ha estimat l'aparició de l'ancestre comú d'ambdós clades als anys 1989 i 1995, respectivament, durant l'ús de les vacunes DTPw a Espanya. Aquests resultats són consistents amb els descrits anteriorment, els quals van assenyalar l'aparició de la variant *fim3-2* poc abans de l'any 1990, coincidint encara amb l'ús de les vacunes DTPw de forma generalitzada⁴⁴³. Un estudi filogenètic i de dinàmica poblacional realitzat de forma similar amb la població de *B. pertussis* que va circular entre els anys 1982 i 2014 al Japó, primer país en adoptar la vacunació enfront de la tosferina amb les vacunes DTPa, va descriure la circulació consistent de dues poblacions diferenciades pels al·lèls dels principals factors de virulència. En aquest treball els autors van situar l'ancestre comú de les variants *ptxA1*, *ptxP3* i *prn2* entre els anys 1950 i 1980 durant l'ús de les vacunes DTPw al Japó mentre que van estimar l'aparició de la variant *fim3-2* al voltant de l'any 1990, quan les vacunes DTPa ja s'utilitzaven al Japó des de feia alguns anys⁴³⁷.

En el present estudi, els aïllats de *B. pertussis* no productors de PRN s'han detectat per primera vegada l'any 2007, veient-se incrementada la seva prevalença des de l'any 2011 en endavant. Aquests s'han distribuït en tots dos clades, suposant el 37,5% dels aïllats del Clade II i el 64,5% dels aïllats del Clade III. Mentre que els aïllats de *B. pertussis* deficients en PRN portadors de la mutació *prn::499STOP-del1494* s'han agrupat en el Clade II (associant-se al genotip fimbrial *fim3-2*), els aïllats de *B. pertussis* deficients en PRN portadors de les mutacions *prn::del(-292, 1340)*, *prn::IS481-2735rev* i *prn::promoter_inv(-74)* s'han agrupat en el Clade III (associant-se al genotip fimbrial *fim3-1*), donant lloc a quatre clústers d'aïllats de *B. pertussis* que han evolucionat de forma convergent cap a la pèrdua d'expressió de la PRN. La major associació dels aïllats de *B. pertussis* deficients en PRN a l'al·lèl *fim3-1* ha estat descrita també en d'altres treballs^{437,489}. Per altra banda, destaca com, per a totes aquestes mutacions, l'ancestre comú més recent identificat s'ha situat entre els anys

2007 i 2009, durant el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa. Al Japó, els aïllats deficients en PRN van aparèixer a mitjans de la dècada dels anys noranta, observant-se aïllats deficients per la inserció de la IS481 en la posició 1598 (equivalent a la posició 1613 de l'al·lel *prn2*) i aïllats deficients per la deleció entre els nucleòtids 26 i 109 de la SS del gen *prn*. L'anàlisi filogenètic va situar l'origen d'ambdues mutacions l'any 1990, quan al Japó ja feia uns anys que s'havia introduït l'ús de les vacunes DTPa⁴³⁷. Addicionalment, l'aparició, en el present estudi, d'aïllats deficients en PRN degut a la inserció de la IS481 entre les posicions 1613 i 1614 del gen *prn*, el quals no s'han vist agrupats filogenèticament de forma homogènia, reforça la idea d'una emergència no clonal dels aïllats PRN negatius, els quals s'han originat i han originat diferents llinatges. En aquest sentit, resultats similars s'han descrit en estudis realitzats als EUA, Japó, Austràlia o alguns països europeus^{475,484,489,495}.

Per últim, és sorprenent la gran disseminació del clúster d'aïllats *ptxA1/ptxP3/prn2/fim2-1/fim3-1* deficients en PRN per la possessió de la mutació *prn::del(-292, 1340)*, el qual està format pel 58,1% dels aïllats que no expressen PRN. Aquest ha sigut l'únic mecanisme relacionat amb la pèrdua de la PRN que s'ha associat de forma homogènia a l'expressió del serotip fimbrial FIM2. L'ancestre comú d'aquest grup s'ha situat l'any 2007, coincidint amb l'inici del període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa, observant-se el primer aïllat l'any 2009. A partir d'aquí, els aïllats que han presentat aquesta mutació han circulat de forma majoritària fins a convertir-se en predominants entre els anys 2013 i 2018. El conjunt d'observacions reforça la idea que la possessió d'ambdues característiques (*prn::del(-292, 1340)* i FIM2) per part dels aïllats d'aquest exitós clúster podria haver afavorit la seva disseminació al llarg dels últims anys, presentant un avantatge selectiu enfront de la immunitat conferida per les vacunes DTPa utilitzades.

En resum, els resultats suggereixen que la pressió selectiva de les vacunes DTPw hauria influït en l'aparició de les variacions al·lèliques de la PTX i el seu promotor, de

la PRN i de la FIM3, mentre que, posteriorment, la pressió exercida per les vacunes DTPa hauria induït l'emergència dels aïllats deficients en l'expressió de la PRN.



CONCLUSIONS

1. Des de finals dels anys vuitanta i fins a l'actualitat diverses poblacions de *B. pertussis* causants de tosferina han circulat en el nostre medi. D'aquesta forma, coincidint amb la introducció de l'ús de les vacunes DTPa, les quals van reemplaçar les vacunes DTPw, l'estructura poblacional, així com les característiques antigèniques de *B. pertussis* han experimentat un recanvi, en el que es podria considerar un procés adaptatiu d'aquest microorganisme a conseqüència de l'ús de les vacunes DTPa. Aquest fet es constata al:

- 1.1. Identificar que el 80% dels perfils de PFGE que van circular majoritàriament durant l'ús de les vacunes DTPw han sigut reemplaçats per nous perfils després de la implementació de la immunització amb les vacunes DTPa.
- 1.2. Observar l'emergència del MT27, el qual s'ha identificat en el 79,3% dels aïllats de *B. pertussis* estudiats durant el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa.
- 1.3. Constatar l'emergència i disseminació de les formes al·lèliques *ptxA1* i *prn2*, les quals no codifiquen les formes antigèniques incloses en les composicions vacunals DTPa i s'han trobat en el 97,7% dels aïllats de *B. pertussis* estudiats durant l'ús exclusiu d'aquest tipus de vacunes.
- 1.4. Detectar l'adquisició i disseminació del promotor de la PTX de tipus 3 (*ptxP3*) entre els aïllats de *B. pertussis* durant el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa (97,7%), condicionant una major expressió de la PTX, concretament de la seva variant 1, la qual és diferent de la continguda a les vacunes DTPa.
- 1.5. Evidenciar l'aparició de la forma al·lèlica *fim3-2* coincidint amb la introducció de les vacunes DTPa, la qual ha circulat en una proporció molt

similar des de llavors amb la forma al·lèlica *fim3-1* (53,1% vs. 46,9%, respectivament).

1.6. Identificar la presència de la forma al·lèlica *fim3-1* juntament amb l'increment del serotip fimbrial FIM2 en el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa, el que suggereix l'adquisició d'una estratègia adaptativa per part de *B. pertussis* per deixar d'expressar la variant al·lèlica de FIM3 inclosa en algunes de les composicions vacunals DTPa utilitzades avui en dia.

2. Un element addicional que podria haver contribuït a la capacitat d'evadir la immunitat conferida per les vacunes DTPa per part de *B. pertussis* és l'aparició i disseminació d'aïllats no productors de PRN. Aquesta troballa se sustenta en el fet que:

2.1. S'ha detectat per primera vegada la circulació d'aïllats deficients en PRN a Espanya, els quals s'han identificat únicament durant el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa. Des de llavors, el 38% de les soques han sigut no productores de PRN, observant-se un increment progressiu de la seva prevalença al llarg dels últims anys.

2.2. S'han identificat diverses mutacions associades a la pèrdua de l'expressió de la PRN, no obstant això, l'emergència i expansió dels aïllats no productors d'aquest antigen al nostre país és causat per la disseminació majoritària (58,1%) d'aïllats que posseeixen la deleció *prn::del(-292, 1340)*, la qual abasta tant part del promotor com del seu gen estructural.

2.3. L'anàlisi filogenòmica de les soques no productores de PRN ha revelat que l'ancestre comú més recent de les soques posseïdores de la mutació *prn::del(-292, 1340)* se situa l'any 2007, durant el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa. Aquest fet suggereix que la pressió selectiva exercida per

aquest tipus de vacunes podria haver afavorit l'emergència i expansió dels aïllats deficients en PRN en el nostre medi.

2.4. S'ha observat la presència de la IS481 inserida en el gen *prn* com a segon mecanisme més freqüent relacionat amb la pèrdua de producció de PRN (23,7%). Els aïllats que posseeixen l'esmentat mecanisme es troben distribuïts de forma aleatòria al llarg de tota la filogènia de *B. pertussis*.

2.5. Encara que en baixa freqüència, addicionalment s'ha descrit per primera vegada la presència de les mutacions *prn*::499STOP-delG1494 (6,5%) i *prn*::promoter_del(-614, -75) (1,1%), com a nous mecanismes associats a la deficiència de PRN en *B. pertussis* en el nostre medi.

3. *B. holmesii* pot ser considerat un nou agent causal de tosferina a Espanya, contribuint a l'increment del nombre de casos d'aquesta malaltia en el nostre medi.

En aquest sentit:

3.1. En el 3,9% i el 8,8% dels casos de tosferina diagnosticats als anys 2015 i 2016, respectivament, en el Servei de Microbiologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron s'hi va detectar *B. holmesii*.

3.2. No s'han identificat diferències significatives en relació amb les característiques clíniques-epidemiològiques entre els casos produïts per *B. holmesii* i els produïts per *B. pertussis*.

3.3. L'azitromicina va ser un tractament efectiu per tractar els casos de tosferina produïda per *B. holmesii*, ja que no s'han evidenciat complicacions o recidives després de la seva administració.

3.4. S'ha posat de manifest la necessitat d'adaptar les eines diagnòstiques emprades actualment per a la identificació de l'agent causal de la tosferina

amb l'objectiu de poder fer un diagnòstic precís, determinar la incidència real i la contribució que juguen els diferents agents etiològics d'aquesta malaltia en la seva epidemiologia, així com poder establir de forma precisa l'eficàcia de les vacunes antipertússiques actualment utilitzades.

1. Since the late 1980s and up to the present day, several populations of *B. pertussis* producing whooping cough have circulated in our environment. Thus, concurrently with the introduction of the use of DTPa vaccines, which replaced the DTPw vaccines, the population structure, as well as the antigenic characteristics of *B. pertussis* have experienced a replacement, which could be considered an adaptive process of this microorganism as a consequence of the use of DTPa vaccines. This fact is confirmed by:

1.1. The 80% of PFGE profiles that mostly circulated during the use of DTPw vaccines have been replaced by new profiles after the implementation of immunisation with DTPa vaccines.

1.2. The emergence of MT27, which has been identified in 79.3% of *B. pertussis* isolates studied during the period of exclusive use of DTPa vaccines.

1.3. The emergence and dissemination of the allelic forms *ptxA1* and *prn2*, which do not encode the antigenic forms included in the DTPa vaccine compositions, and which are found in 97.7% of the *B. pertussis* isolates studied during the period of exclusive use of this type of vaccine.

1.4. The acquisition and dissemination of the type 3 promoter of the PTX (*ptxP3*) among *B. pertussis* isolates during the period of exclusive use of DTPa vaccines (97.7%), which conditions a higher expression of PTX, specifically of its variant 1, which is different from that contained in DTPa vaccines.

1.5. The appearance of the *fim3-2* allelic form coinciding with the introduction of DTPa vaccines, which has circulated in a very similar proportion with the *fim3-1* allelic form (53.1% vs 46.9%, respectively).

1.6. The presence of the allelic form *fim3-1* together with the increase of the fimbrial serotype FIM2 in the period of exclusive use of DTPa vaccines, which suggests the acquisition of an adaptive strategy by *B. pertussis* to non-

expressing the FIM3 allelic variant included in some of the DTPa vaccine compositions used today.

2. An additional element that could have contributed to the ability of *B. pertussis* to evade the immunity conferred by DTPa vaccines is the emergence and spread of PRN-negative isolates. This finding is based on the fact that:

2.1. For the first time, the circulation of PRN-deficient isolates has been detected in Spain, which have only been identified during the period of exclusive use of DTPa vaccines. Since then, 38% of the isolates have been non-producers of PRN, with a progressive increase in their prevalence over the last few years.

2.2. Several mutations associated with the loss of PRN expression have been identified, being the *prn::del(-292, 1340)* deletion the main responsible mechanism (58.1%).

2.3. Phylogenomic analysis of non-PRN producing strains has revealed that the most common ancestor of *prn::del(-292, 1340)* containing isolates is located in 2007, during the period of exclusive use of DTPa vaccines. This suggests that the selective pressure exerted by this type of vaccines may have favoured the emergence and expansion of PRN-deficient isolates in our environment.

2.4. The presence of the IS481 inserted into the *prn* gene has been observed as the second most common mechanism related to loss of PRN production (23.7%). The isolates that possess this mechanism are randomly distributed throughout the *B. pertussis* phylogeny.

2.5. Although at low frequency, the presence of the mutations *prn*::499STOP-delG1494 (6.5%) and *prn*::promoter_del(-614, -75) (1.1%) has been described for the first time as new mechanisms associated with PRN deficiency in *B. pertussis* in our environment.

3. *B. holmesii* can be considered a new causative agent of whooping cough in Spain, contributing to the increase in the number of cases of this disease in our environment. In this sense:

3.1. *B. holmesii* was detected in 3.9% and 8.8% of pertussis cases diagnosed in 2015 and 2016, respectively, in the Microbiology Department of the Vall d'Hebron University Hospital.

3.2. No significant differences were identified in relation to the clinical-epidemiological characteristics of the cases caused by *B. holmesii* and those caused by *B. pertussis*.

3.3. Azithromycin was an effective treatment against whooping cough caused by *B. holmesii*, as no complications or relapses were identified after its administration.

3.4. There is a need to adapt the diagnostic tools currently used for the identification of the causative agent of whooping cough in order to be able to make an accurate diagnosis, to determine the real incidence and the contribution of the different aetiological agents of this disease in its epidemiology, as well as being able to accurately establish the efficacy of the pertussis vaccines currently used.



REFERÈNCIES
BIBLIOGRÀFIQUES

1. Liang, Y., Salim, A. M., Wu, W. & Kilgore, P. E. Chao Yuanfang: Imperial Physician of the Sui Dynasty and an Early Pertussis Observer? *Open Forum Infect Dis* **3**, (2016).
2. Aslanabadi, A., Ghabili, K., Shad, K., Khalili, M. & Sajadi, M. M. Emergence of whooping cough: notes from three early epidemics in Persia. *Lancet Infect Dis* **15**, 1480–1484 (2015).
3. GUILLAUME de BAILLOU (1538-1616) CLINICIAN AND EPIDEMIOLOGIST. *JAMA* **195**, 957–957 (1966).
4. Guillaume De Baillou | History of Vaccines. /index.php/content/guillaume-de-baillou.
5. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1919. *NobelPrize.org* <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1919/summary/>.
6. Kilgore, P. E., Salim, A. M., Zervos, M. J. & Schmitt, H.-J. Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 449–486 (2016).
7. Leber, A. L. Pertussis: relevant species and diagnostic update. *Clin. Lab. Med.* **34**, 237–255 (2014).
8. Spilker, T. *et al.* A Simplified Sequence-Based Identification Scheme for Bordetella Reveals Several Putative Novel Species. *J Clin Microbiol* **52**, 674–677 (2014).
9. Ivanov, Y. V. *et al.* Identification and taxonomic characterization of Bordetella pseudohinzii sp. nov. isolated from laboratory-raised mice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **66**, 5452–5459 (2016).
10. Tazato, N. *et al.* Novel environmental species isolated from the plaster wall surface of mural paintings in the Takamatsuzuka tumulus: Bordetella muralis sp. nov., Bordetella tumulicola sp. nov. and Bordetella tumbae sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 4830–4838 (2015).
11. Vandamme, P. A. *et al.* Bordetella bronchialis sp. nov., Bordetella flabilis sp. nov. and Bordetella sputigena sp. nov., isolated from human respiratory specimens, and reclassification of Achromobacter sediminum Zhang *et al.* 2014 as Verticia sediminum gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 3674–3682 (2015).
12. Guiso, N. Bordetella pertussis and Pertussis Vaccines. *Clin Infect Dis* **49**, 1565–1569 (2009).
13. He, Q., Viljanen, M. K., Arvilommi, H., Aittanen, B. & Mertsola, J. Whooping cough caused by Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis in an immunized population. *JAMA* **280**, 635–637 (1998).
14. Cherry, J. D. & Seaton, B. L. Patterns of Bordetella parapertussis respiratory illnesses: 2008-2010. *Clin. Infect. Dis.* **54**, 534–537 (2012).
15. Elahi, S. *et al.* Infection with Bordetella parapertussis but not Bordetella pertussis causes pertussis-like disease in older pigs. *J Infect Dis* **198**, 384–392 (2008).
16. Cullinane, L. C., Alley, M. R., Marshall, R. B. & Manktelow, B. W. Bordetella parapertussis from lambs. *N Z Vet J* **35**, 175 (1987).

17. Bouchez, V. & Guiso, N. Bordetella pertussis, B. parapertussis, vaccines and cycles of whooping cough. *Pathog Dis* **73**, (2015).
18. Matic, N. A. & Bunce, P. E. Isolation of Bordetella bronchiseptica from blood and a pancreatic abscess. *J Clin Microbiol* **53**, 1778–1780 (2015).
19. Woolfrey, B. F. & Moody, J. A. Human infections associated with Bordetella bronchiseptica. *Clin Microbiol Rev* **4**, 243–255 (1991).
20. Belen, O., Campos, J. M., Cogen, P. H. & Jantusch, B. A. Postsurgical meningitis caused by Bordetella bronchiseptica. *Pediatr Infect Dis J* **22**, 380–381 (2003).
21. Hadley, K., Torres, A. M., Moran, J. & Schiller, B. Bordetella bronchiseptica peritonitis -- beware of the dog! *Perit Dial Int* **29**, 670–671 (2009).
22. Magyar, T., Chanter, N., Lax, A. J., Rutter, J. M. & Hall, G. A. The pathogenesis of turbinate atrophy in pigs caused by Bordetella bronchiseptica. *Vet Microbiol* **18**, 135–146 (1988).
23. Njamkepo, E. *et al.* Significant Finding of Bordetella holmesii DNA in Nasopharyngeal Samples from French Patients with Suspected Pertussis. *Journal of Clinical Microbiology* **49**, 4347–4348 (2011).
24. Yih, W. K. *et al.* Bordetella holmesii-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. *Emerging Infect. Dis.* **5**, 441–443 (1999).
25. Pittet, L. F., Emonet, S., Schrenzel, J., Siegrist, C.-A. & Posfay-Barbe, K. M. Bordetella holmesii: an under-recognised Bordetella species. *Lancet Infect Dis* **14**, 510–519 (2014).
26. Njamkepo, E., Delisle, F., Hagege, I., Gerbaud, G. & Guiso, N. Bordetella holmesii isolated from a patient with sickle cell anemia: analysis and comparison with other Bordetella holmesii isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* **6**, 131–136 (2000).
27. Weyant, R. S. *et al.* Bordetella holmesii sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1–7 (1995).
28. Raffel, T. R., Register, K. B., Marks, S. A. & Temple, L. Prevalence of Bordetella avium infection in selected wild and domesticated birds in the eastern USA. *J Wildl Dis* **38**, 40–46 (2002).
29. Spilker, T., Liwienski, A. A. & LiPuma, J. J. Identification of Bordetella spp. in respiratory specimens from individuals with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect* **14**, 504–506 (2008).
30. Harrington, A. T., Castellanos, J. A., Ziedalski, T. M., Clarridge, J. E. & Cookson, B. T. Isolation of Bordetella avium and novel Bordetella strain from patients with respiratory disease. *Emerg Infect Dis* **15**, 72–74 (2009).
31. Dorittke, C., Vandamme, P., Hinz, K. H., Schemken-Birk, E. M. & Wirsing von König, C. H. Isolation of a Bordetella avium-like organism from a human specimen. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **14**, 451–454 (1995).
32. Vandamme, P. *et al.* Bordetella hinzii sp. nov., isolated from poultry and humans. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 37–45 (1995).

33. Funke, G., Hess, T., von Graevenitz, A. & Vandamme, P. Characteristics of *Bordetella hinzii* strains isolated from a cystic fibrosis patient over a 3-year period. *J Clin Microbiol* **34**, 966–969 (1996).
34. Arvand, M., Feldhues, R., Mieth, M., Kraus, T. & Vandamme, P. Chronic cholangitis caused by *Bordetella hinzii* in a liver transplant recipient. *J Clin Microbiol* **42**, 2335–2337 (2004).
35. Fry, N. K. *et al.* A UK clinical isolate of *Bordetella hinzii* from a patient with myelodysplastic syndrome. *J Med Microbiol* **56**, 1700–1703 (2007).
36. Gadea, I. *et al.* *Bordetella hinzii*, a ‘new’ opportunistic pathogen to think about. *J Infect* **40**, 298–299 (2000).
37. Cookson, B. T. *et al.* Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, ‘*B. hinzii*’. *J Clin Microbiol* **32**, 2569–2571 (1994).
38. Register, K. B. *et al.* Draft Genome Sequences of Six *Bordetella hinzii* Isolates Acquired from Avian and Mammalian Hosts. *Genome Announc* **3**, (2015).
39. Vandamme, P. *et al.* *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* R uger and Tan 1983. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 849–858 (1996).
40. Daxboeck, F., Goerzer, E., Apfalter, P., Nehr, M. & Krause, R. Isolation of *Bordetella trematum* from a diabetic leg ulcer. *Diabetic Medicine* **21**, 1247–1248 (2004).
41. Almagro-Molto, M., Eder, W. & Schubert, S. *Bordetella trematum* in chronic ulcers: report on two cases and review of the literature. 489–494 <https://link.springer.com/article/10.1007/s15010-014-0717-y> (2015).
42. Le Coustumier, A., Njamkepo, E., Cattoir, V., Guillot, S. & Guiso, N. *Bordetella petrii* infection with long-lasting persistence in human. *Emerging Infectious Diseases* **17**, 612–618 (2011).
43. Nogi, M., Bankowski, M. J. & Pien, F. D. Septic Arthritis and Osteomyelitis Due to *Bordetella petrii*. *Journal of Clinical Microbiology* **53**, 1024–1027 (2015).
44. Ko, K. S. *et al.* New species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii* sp. nov., isolated from the purulent exudate of an epidermal cyst. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 2516–2519 (2005).
45. Fry, N. K., Duncan, J., Malnick, H. & Cockcroft, P. M. The first UK isolate of ‘*Bordetella ansorpii*’ from an immunocompromised patient. *Journal of Medical Microbiology* **56**, 993–995 (2007).
46. Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis*-*Bordetella parapertussis*. Update 2014. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/laboratory-manual-for-the-diagnosis-of-whooping-cough-caused-by-bordetella-pertussis-bordetella-parapertussis.-update-2014>.
47. Hoffman, C. L. *et al.* *Bordetella pertussis* Can Be Motile and Express Flagellum-Like Structures. *mBio* **10**, (2019).

48. Mattoo, S. & Cherry, J. D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* **18**, 326–382 (2005).
49. Jongerius, I., Schuijt, T. J., Mooi, F. R. & Pinelli, E. Complement evasion by *Bordetella pertussis* : implications for improving current vaccines. *J Mol Med* **93**, 395–402 (2015).
50. Linz, B. *et al.* Acquisition and loss of virulence-associated factors during genome evolution and speciation in three clades of *Bordetella* species. *BMC Genomics* **17**, 767 (2016).
51. Posfay-Barbe, K. M. & Pittet, L. F. *Bordetella holmesii*: Still Emerging and Elusive 20 Years On. in *Emerging infections 10* (eds. Scheld, W. M., Whitley, R. J. & Hughes, J. M.) 239–254 (American Society of Microbiology, 2016).
52. Pittman, M. Pertussis toxin: the cause of the harmful effects and prolonged immunity of whooping cough. A hypothesis. *Rev Infect Dis* **1**, 401–412 (1979).
53. Locht, C., Coutte, L. & Mielcarek, N. The ins and outs of pertussis toxin. *FEBS J* **278**, 4668–4682 (2011).
54. Saukkonen, K., Burnette, W. N., Mar, V. L., Masure, H. R. & Tuomanen, E. I. Pertussis toxin has eukaryotic-like carbohydrate recognition domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 118–122 (1992).
55. Nencioni, L. *et al.* Properties of the B oligomer of pertussis toxin. *Infect Immun* **59**, 4732–4734 (1991).
56. Weiss, A. A., Johnson, F. D. & Burns, D. L. Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2970–2974 (1993).
57. Witvliet, M. H., Burns, D. L., Brennan, M. J., Poolman, J. T. & Manclark, C. R. Binding of pertussis toxin to eucaryotic cells and glycoproteins. *Infect Immun* **57**, 3324–3330 (1989).
58. Smith, A. M., Guzmán, C. A. & Walker, M. J. The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 309–333 (2001).
59. Scanlon, K., Skerry, C. & Carbonetti, N. Role of Major Toxin Virulence Factors in Pertussis Infection and Disease Pathogenesis. *Adv Exp Med Biol* **1183**, 35–51 (2019).
60. Cloud-Hansen, K. A. *et al.* Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interactions. *Nat Rev Microbiol* **4**, 710–716 (2006).
61. Smith, A. M., Guzmán, C. A. & Walker, M. J. The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 309–333 (2001).
62. Luker, K. E., Tyler, A. N., Marshall, G. R. & Goldman, W. E. Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in pertussis. *Mol Microbiol* **16**, 733–743 (1995).
63. Luker, K. E., Collier, J. L., Kolodziej, E. W., Marshall, G. R. & Goldman, W. E. *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin and other muramyl peptides: distinct structure-activity relationships for respiratory epithelial cytopathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2365–2369 (1993).

64. Flak, T. A. & Goldman, W. E. Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell Microbiol* **1**, 51–60 (1999).
65. Melvin, J. A., Scheller, E. V., Miller, J. F. & Cotter, P. A. Bordetella pertussis pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol* **12**, 274–288 (2014).
66. Khelef, N., Sakamoto, H. & Guiso, N. Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by Bordetella pertussis to initiate infection. *Microb Pathog* **12**, 227–235 (1992).
67. Sakamoto, H., Bellalou, J., Sebo, P. & Ladant, D. Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem* **267**, 13598–13602 (1992).
68. Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A. & Danchin, A. Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of Bordetella pertussis. *EMBO J* **7**, 3997–4004 (1988).
69. Bouchez, V. *et al.* Characterization of Post-Translational Modifications and Cytotoxic Properties of the Adenylate-Cyclase Hemolysin Produced by Various Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis Isolates. *Toxins (Basel)* **9**, (2017).
70. Fukui-Miyazaki, A. *et al.* The Eukaryotic Host Factor 14-3-3 Inactivates Adenylate Cyclase Toxins of Bordetella bronchiseptica and B. parapertussis, but Not B. pertussis. *MBio* **9**, (2018).
71. Cowell, J. L., Hewlett, E. L. & Manclark, C. R. Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of Bordetella pertussis. *Infect Immun* **25**, 896–901 (1979).
72. Allen, A. G., Thomas, R. M., Cadisch, J. T. & Maskell, D. J. Molecular and functional analysis of the lipopolysaccharide biosynthesis locus wlb from Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica. *Mol Microbiol* **29**, 27–38 (1998).
73. Harvill, E. T. *et al.* Multiple roles for Bordetella lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. *Infect Immun* **68**, 6720–6728 (2000).
74. Caroff, M. *et al.* Structural variability and originality of the Bordetella endotoxins. *J. Endotoxin Res.* **7**, 63–68 (2001).
75. Ucieklak, K., Koj, S. & Niedziela, T. Conserved Structural Features of Core Oligosaccharides among the Lipopolysaccharides of Respiratory Pathogens from the Genus Bordetella Analyzed Exclusively by NMR Spectroscopy. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
76. Ucieklak, K., Koj, S. & Niedziela, T. Bordetella holmesii Lipopolysaccharide Hide and Seek Game with Pertussis: Structural Analysis of the O-Specific Polysaccharide and the Core Oligosaccharide of the Type Strain ATCC 51541. *Int J Mol Sci* **21**, (2020).
77. Zhang, X., Rodríguez, M. E. & Harvill, E. T. O antigen allows B. parapertussis to evade B. pertussis vaccine-induced immunity by blocking binding and functions of cross-reactive antibodies. *PLoS ONE* **4**, e6989 (2009).

78. Kerr, J. R., Rigg, G. P., Matthews, R. C. & Burnie, J. P. The Bpel locus encodes type III secretion machinery in *Bordetella pertussis*. *Microb Pathog* **27**, 349–367 (1999).
79. Fennelly, N. K. *et al.* *Bordetella pertussis* expresses a functional type III secretion system that subverts protective innate and adaptive immune responses. *Infect Immun* **76**, 1257–1266 (2008).
80. Medhekar, B., Shrivastava, R., Mattoo, S., Gingery, M. & Miller, J. F. *Bordetella Bsp22* forms a filamentous type III secretion system tip complex and is immunoprotective in vitro and in vivo. *Mol Microbiol* **71**, 492–504 (2009).
81. Nagamatsu, K. *et al.* *Bordetella* evades the host immune system by inducing IL-10 through a type III effector, BopN. *J Exp Med* **206**, 3073–3088 (2009).
82. Kamanova, J. *Bordetella* Type III Secretion Injectosome and Effector Proteins. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, 466 (2020).
83. Leininger, E. *et al.* Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 345–349 (1991).
84. Emsley, P., Charles, I. G., Fairweather, N. F. & Isaacs, N. W. Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature* **381**, 90–92 (1996).
85. Everest, P. *et al.* Role of the *Bordetella pertussis* P.69/pertactin protein and the P.69/pertactin RGD motif in the adherence to and invasion of mammalian cells. *Microbiology (Reading)* **142 (Pt 11)**, 3261–3268 (1996).
86. Inatsuka, C. S. *et al.* Pertactin Is Required for *Bordetella* Species To Resist Neutrophil-Mediated Clearance. *Infect Immun* **78**, 2901–2909 (2010).
87. Hellwig, S. M. M., Rodriguez, M. E., Berbers, G. A. M., van de Winkel, J. G. J. & Mooi, F. R. Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity. *J Infect Dis* **188**, 738–742 (2003).
88. Mooi, F. R., Van Der Maas, N. a. T. & De Melker, H. E. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin. *Epidemiol. Infect.* **142**, 685–694 (2014).
89. Diavatopoulos, D. A., Hijnen, M. & Mooi, F. R. Adaptive evolution of the *Bordetella* autotransporter pertactin. *J. Evol. Biol.* **19**, 1931–1938 (2006).
90. Aricò, B., Nuti, S., Scarlato, V. & Rappuoli, R. Adhesion of *Bordetella pertussis* to eukaryotic cells requires a time-dependent export and maturation of filamentous hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9204–9208 (1993).
91. Guédin, S. *et al.* Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem* **275**, 30202–30210 (2000).
92. Clantin, B. *et al.* The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6194–6199 (2004).

93. Inatsuka, C. S., Julio, S. M. & Cotter, P. A. Bordetella filamentous hemagglutinin plays a critical role in immunomodulation, suggesting a mechanism for host specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18578–18583 (2005).
94. Mazar, J. & Cotter, P. A. Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol Microbiol* **62**, 641–654 (2006).
95. McGuirk, P. & Mills, K. H. Direct anti-inflammatory effect of a bacterial virulence factor: IL-10-dependent suppression of IL-12 production by filamentous hemagglutinin from Bordetella pertussis. *Eur J Immunol* **30**, 415–422 (2000).
96. Locht, C., Bertin, P., Menozzi, F. D. & Renault, G. The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent Bordetella spp. *Mol Microbiol* **9**, 653–660 (1993).
97. Scheller, E. V. & Cotter, P. A. Bordetella filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential. *Pathog Dis* **73**, ftv079 (2015).
98. Nash, Z. M. & Cotter, P. A. Bordetella Filamentous Hemagglutinin, a Model for the Two-Partner Secretion Pathway. *Microbiol Spectr* **7**, (2019).
99. Hazenbos, W. L., van den Berg, B. M., Geuijen, C. W., Mooi, F. R. & van Furth, R. Binding of FimD on Bordetella pertussis to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases. *J Immunol* **155**, 3972–3978 (1995).
100. Geuijen, C. A., Willems, R. J. & Mooi, F. R. The major fimbrial subunit of Bordetella pertussis binds to sulfated sugars. *Infect Immun* **64**, 2657–2665 (1996).
101. Chen, Q., Decker, K. B., Boucher, P. E., Hinton, D. & Stibitz, S. Novel architectural features of Bordetella pertussis fimbrial subunit promoters and their activation by the global virulence regulator BvgA. *Mol Microbiol* **77**, 1326–1340 (2010).
102. Gorringe, A. R. & Vaughan, T. E. Bordetella pertussis fimbriae (Fim): relevance for vaccines. *Expert Rev Vaccines* **13**, 1205–1214 (2014).
103. Parkhill, J. *et al.* Comparative analysis of the genome sequences of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica. *Nat. Genet.* **35**, 32–40 (2003).
104. Finn, T. M. & Stevens, L. A. Tracheal colonization factor: a Bordetella pertussis secreted virulence determinant. *Mol Microbiol* **16**, 625–634 (1995).
105. Noofeli, M. *et al.* BapC autotransporter protein is a virulence determinant of Bordetella pertussis. *Microb Pathog* **51**, 169–177 (2011).
106. Bokhari, H., Bilal, I. & Zafar, S. BapC autotransporter protein of Bordetella pertussis is an adhesion factor. *J Basic Microbiol* **52**, 390–396 (2012).
107. Riaz, M. R., Siddiqi, A. R. & Bokhari, H. Structural and functional studies of BapC protein of Bordetella pertussis. *Microbiol Res* **174**, 56–61 (2015).

108. Barnes, M. G. & Weiss, A. A. BrkA protein of *Bordetella pertussis* inhibits the classical pathway of complement after C1 deposition. *Infect Immun* **69**, 3067–3072 (2001).
109. Marr, N., Shah, N. R., Lee, R., Kim, E. J. & Fernandez, R. C. *Bordetella pertussis* autotransporter Vag8 binds human C1 esterase inhibitor and confers serum resistance. *PLoS One* **6**, e20585 (2011).
110. Lesne, E. *et al.* Acellular Pertussis Vaccines Induce Anti-pertactin Bactericidal Antibodies Which Drives the Emergence of Pertactin-Negative Strains. *Front Microbiol* **11**, 2108 (2020).
111. Brookes, C. *et al.* *Bordetella pertussis* isolates vary in their interactions with human complement components. *Emerg Microbes Infect* **7**, 81 (2018).
112. Boulanger, A. *et al.* *Bordetella pertussis* fim3 gene regulation by BvgA: phosphorylation controls the formation of inactive vs. active transcription complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E526–535 (2015).
113. Moon, K. *et al.* The BvgAS Regulon of *Bordetella pertussis*. *mBio* **8**, (2017).
114. Cummings, C. A., Bootsma, H. J., Relman, D. A. & Miller, J. F. Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by *Bordetella* BvgAS. *J Bacteriol* **188**, 1775–1785 (2006).
115. Hot, D. *et al.* Differential modulation of *Bordetella pertussis* virulence genes as evidenced by DNA microarray analysis. *Mol Genet Genomics* **269**, 475–486 (2003).
116. Boulanger, A., Chen, Q., Hinton, D. M. & Stibitz, S. In vivo phosphorylation dynamics of the *Bordetella pertussis* virulence-controlling response regulator BvgA. *Mol Microbiol* **88**, 156–172 (2013).
117. Cotter, P. A. & Jones, A. M. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol* **11**, 367–373 (2003).
118. Decker, K. B., James, T. D., Stibitz, S. & Hinton, D. M. The *Bordetella pertussis* model of exquisite gene control by the global transcription factor BvgA. *Microbiology (Reading)* **158**, 1665–1676 (2012).
119. Scarlato, V., Aricò, B., Prugnola, A. & Rappuoli, R. Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J* **10**, 3971–3975 (1991).
120. Chen, Q. & Stibitz, S. The BvgASR virulence regulon of *Bordetella pertussis*. *Curr Opin Microbiol* **47**, 74–81 (2019).
121. WHO | Pertussis. WHO http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/pertussis/en/.
122. Forsyth, K. Pertussis, Still a Formidable Foe. *Clinical Infectious Diseases* **45**, 1487–1491 (2007).
123. Halperin, S. A. The control of pertussis--2007 and beyond. *N Engl J Med* **356**, 110–113 (2007).
124. Tan, T., Trindade, E. & Skowronski, D. Epidemiology of Pertussis. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **24**, S10 (2005).

125. Campins, M. *et al.* [Whooping cough in Spain. Current epidemiology, prevention and control strategies. Recommendations by the Pertussis Working Group]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **31**, 240–253 (2013).
126. de Greeff, S. C. *et al.* Seroprevalence of Pertussis in the Netherlands: Evidence for Increased Circulation of *Bordetella pertussis*. *PLoS One* **5**, (2010).
127. Quinn, H. E. & McIntyre, P. B. The impact of adolescent pertussis immunization, 2004-2009: lessons from Australia. *Bull World Health Organ* **89**, 666–674 (2011).
128. Crespo, I. *et al.* Epidemiology of pertussis in a country with high vaccination coverage. *Vaccine* **29**, 4244–4248 (2011).
129. Celentano, L. P. *et al.* Resurgence of pertussis in Europe. *Pediatr Infect Dis J* **24**, 761–765 (2005).
130. Zepp, F. *et al.* Rationale for pertussis booster vaccination throughout life in Europe. *Lancet Infect Dis* **11**, 557–570 (2011).
131. van der Maas, N. A. T. *et al.* Pertussis in the Netherlands, is the current vaccination strategy sufficient to reduce disease burden in young infants? *Vaccine* **31**, 4541–4547 (2013).
132. van der Zee, A., Schellekens, J. F. P. & Mooi, F. R. Laboratory Diagnosis of Pertussis. *Clin Microbiol Rev* **28**, 1005–1026 (2015).
133. Fernández-Cano, M. I., Armadans Gil, L., Martínez Gómez, X. & Campins Martí, M. Incidence of whooping cough in Spain (1997-2010): an underreported disease. *Eur J Pediatr* **173**, 721–726 (2014).
134. Crowcroft, N. S. *et al.* Severe and unrecognised: pertussis in UK infants. *Arch Dis Child* **88**, 802–806 (2003).
135. Yeung, K. H. T., Duclos, P., Nelson, E. A. S. & Hutubessy, R. C. W. An update of the global burden of pertussis in children younger than 5 years: a modelling study. *Lancet Infect Dis* **17**, 974–980 (2017).
136. Devine, M. J., Bellis, M. A., Tocque, K. & Syed, Q. Whooping cough surveillance in the north west of England. *Commun Dis Public Health* **1**, 121–125 (1998).
137. Jenkinson, D. Natural course of 500 consecutive cases of whooping cough: a general practice population study. *BMJ* **310**, 299–302 (1995).
138. Miller, E. *et al.* Serological evidence of pertussis in patients presenting with cough in general practice in Birmingham. *Commun Dis Public Health* **3**, 132–134 (2000).
139. Strebel, P. *et al.* Population-based incidence of pertussis among adolescents and adults, Minnesota, 1995-1996. *J Infect Dis* **183**, 1353–1359 (2001).
140. Haward, R. A. Scale of undernotification of infectious diseases by general practitioners. *Lancet* **1**, 873–874 (1973).

141. Jenkinson, D. Whooping cough: what proportion of cases is notified in an epidemic? *Br Med J (Clin Res Ed)* **287**, 185–186 (1983).
142. Cherry, J. D. Epidemiological, clinical, and laboratory aspects of pertussis in adults. *Clin Infect Dis* **28 Suppl 2**, S112–117 (1999).
143. Herwaldt, L. A. Pertussis in adults. What physicians need to know. *Arch Intern Med* **151**, 1510–1512 (1991).
144. Yaari, E. *et al.* Clinical manifestations of *Bordetella pertussis* infection in immunized children and young adults. *Chest* **115**, 1254–1258 (1999).
145. Pertussis - Annual Epidemiological Report for 2018. *European Centre for Disease Prevention and Control* <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/pertussis-annual-epidemiological-report-2018> (2020).
146. Annual Epidemiological Reports on pertussis. *European Centre for Disease Prevention and Control* <https://www.ecdc.europa.eu/en/pertussis/surveillance-and-disease-data/annual-epidemiological-reports>.
147. Situación de la Tosferina en España, 1998-2016.pdf. <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20AZ/TOSFERINA/Situaci%C3%B3n%20de%20la%20Tosferina%20en%20Espa%C3%B1a,%201998-2016.pdf>
148. https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20A-Z/TOSFERINA/Gr%C3%A1fico_%20tosferina_2019.pdf
149. Gil-Prieto, R. *et al.* Paediatric hospitalizations due to whooping cough in Spain (1997-2017). *Vaccine* **37**, 6342–6347 (2019).
150. Parcerisa, G. C., Mitjavila, L. R., Gutiérrez, C. F. & Checa, M. J. Resultats de la vigilància epidemiològica de la tos ferina (Catalunya, 2011-2018). 24.
151. Tanaka, M. *et al.* Trends in Pertussis Among Infants in the United States, 1980-1999. *JAMA* **290**, 2968–2975 (2003).
152. Fisman, D. N. *et al.* Pertussis resurgence in Toronto, Canada: a population-based study including test-incidence feedback modeling. *BMC Public Health* **11**, 694 (2011).
153. Skowronski, D. M. *et al.* The changing age and seasonal profile of pertussis in Canada. *J Infect Dis* **185**, 1448–1453 (2002).
154. Eshofonie, A. O., Lin, H., Valcin, R. P., Martin, L. R. & Grunenwald, P. E. An outbreak of pertussis in rural Texas: an example of the resurgence of the disease in the United States. *J Community Health* **40**, 88–91 (2015).
155. Fine, P. E. & Clarkson, J. A. Seasonal influences on pertussis. *Int J Epidemiol* **15**, 237–247 (1986).

156. De Greeff, S. C. *et al.* Seasonal patterns in time series of pertussis. *Epidemiol Infect* **137**, 1388–1395 (2009).
157. Wright, P. F. Pertussis in developing countries: definition of the problem and prospects for control. *Rev Infect Dis* **13 Suppl 6**, S528-534 (1991).
158. Préziosi, M.-P. *et al.* Epidemiology of pertussis in a West African community before and after introduction of a widespread vaccination program. *Am J Epidemiol* **155**, 891–896 (2002).
159. Muller, A. S., Leeuwenburg, J. & Voorhoeve, A. M. Pertussis in a rural area of Kenya: epidemiology and results of a vaccine trial. *Bull World Health Organ* **62**, 899–908 (1984).
160. pert.pdf.
161. Bhatti, M. M. *et al.* Eight-Year Review of Bordetella pertussis Testing Reveals Seasonal Pattern in the United States. *J Pediatric Infect Dis Soc* **6**, 91–93 (2017).
162. Hitz, D. A., Tewald, F. & Eggers, M. Seasonal Bordetella pertussis pattern in the period from 2008 to 2018 in Germany. *BMC Infect. Dis.* **20**, 474 (2020).
163. Fine, P. E. Herd immunity: history, theory, practice. *Epidemiol Rev* **15**, 265–302 (1993).
164. Kretzschmar, M., Teunis, P. F. M. & Pebody, R. G. Incidence and reproduction numbers of pertussis: estimates from serological and social contact data in five European countries. *PLoS Med* **7**, e1000291 (2010).
165. Vink, M. A., Bootsma, M. C. J. & Wallinga, J. Serial Intervals of Respiratory Infectious Diseases: A Systematic Review and Analysis. *Am J Epidemiol* **180**, 865–875 (2014).
166. Weber, D. J. & Rutala, W. A. Pertussis: an underappreciated risk for nosocomial outbreaks. *Infect Control Hosp Epidemiol* **19**, 825–828 (1998).
167. Halloran, M. E. Secondary Attack Rate. in *Encyclopedia of Biostatistics* (American Cancer Society, 2005). doi:10.1002/0470011815.b2a04049.
168. Uriona Tuma, S. M. *et al.* [Contact tracing of paediatric pertussis cases at a tertiary hospital in Barcelona, Spain]. *Med Clin (Barc)* **141**, 376–381 (2013).
169. Hewlett, E. L. & Edwards, K. M. Clinical practice. Pertussis--not just for kids. *N Engl J Med* **352**, 1215–1222 (2005).
170. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated recommendations for use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis (Tdap) vaccine from the Advisory Committee on Immunization Practices, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **60**, 13–15 (2011).
171. Gopal, D. P., Barber, J. & Toeg, D. Pertussis (whooping cough). *BMJ* **364**, l401 (2019).
172. WHO_SurveillanceVaccinePreventable_16_Pertussis_R1.pdf.
173. Signs and Symptoms of Whooping Cough (Pertussis) | CDC. <https://www.cdc.gov/pertussis/about/signs-symptoms.html> (2021).

174. Cornia, P. B., Hersh, A. L., Lipsky, B. A., Newman, T. B. & Gonzales, R. Does this coughing adolescent or adult patient have pertussis? *JAMA* **304**, 890–896 (2010).
175. von König, C. H. W., Halperin, S., Riffelmann, M. & Guiso, N. Pertussis of adults and infants. *Lancet Infect Dis* **2**, 744–750 (2002).
176. Wiley, K. E., Zuo, Y., Macartney, K. K. & McIntyre, P. B. Sources of pertussis infection in young infants: a review of key evidence informing targeting of the cocoon strategy. *Vaccine* **31**, 618–625 (2013).
177. Gil, A., Oyagüez, I., Carrasco, P. & González, A. Hospital admissions for pertussis in Spain, 1995–1998. *Vaccine* **19**, 4791–4794 (2001).
178. Wood, N., Quinn, H. E., McIntyre, P. & Elliott, E. Pertussis in infants: Preventing deaths and hospitalisations in the very young. *Journal of Paediatrics and Child Health* **44**, 161–165 (2008).
179. Baron, S. *et al.* Epidemiology of pertussis in French hospitals in 1993 and 1994: thirty years after a routine use of vaccination. *Pediatr Infect Dis J* **17**, 412–418 (1998).
180. Pertussis: Clinical Complications | CDC. <https://www.cdc.gov/pertussis/clinical/complications.html> (2021).
181. Halperin, S. A. *et al.* Epidemiological features of pertussis in hospitalized patients in Canada, 1991-1997: report of the Immunization Monitoring Program--Active (IMPACT). *Clin Infect Dis* **28**, 1238–1243 (1999).
182. Stojanov, S., Liese, J. & Belohradsky, B. H. Hospitalization and Complications in Children under 2 Years of Age with Bordetella pertussis Infection. *Infection* **28**, 106–110 (2000).
183. Crowcroft, N. S., Andrews, N., Rooney, C., Brisson, M. & Miller, E. Deaths from pertussis are underestimated in England. *Arch Dis Child* **86**, 336–338 (2002).
184. Pooboni, S. *et al.* Extracorporeal life support in pertussis. *Pediatric Pulmonology* **36**, 310–315 (2003).
185. Murray, E. L. *et al.* Characteristics of Severe Bordetella pertussis Infection Among Infants ≤ 90 Days of Age Admitted to Pediatric Intensive Care Units - Southern California, September 2009-June 2011. *J Pediatric Infect Dis Soc* **2**, 1–6 (2013).
186. Rocha, G., Soares, P., Soares, H., Pissarra, S. & Guimarães, H. Pertussis in the newborn: certainties and uncertainties in 2014. *Paediatr Respir Rev* **16**, 112–118 (2015).
187. Machado, M. B. & Passos, S. D. SEVERE PERTUSSIS IN CHILDHOOD: UPDATE AND CONTROVERSY - SYSTEMATIC REVIEW. *Rev Paul Pediatr* **37**, 351–362 (2019).
188. Cortese, M. M., Baughman, A. L., Zhang, R., Srivastava, P. U. & Wallace, G. S. Pertussis hospitalizations among infants in the United States, 1993 to 2004. *Pediatrics* **121**, 484–492 (2008).
189. Abu Raya, B. *et al.* Bordetella pertussis infection attenuates clinical course of acute bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* **32**, 619–621 (2013).

190. Zhang, R. & Deng, J. Clinical impact of respiratory syncytial virus infection on children hospitalized for pertussis. *BMC Infect Dis* **21**, 161 (2021).
191. van den Brink, G., Wishaupt, J. O., Douma, J. C., Hartwig, N. G. & Versteegh, F. G. A. Bordetella pertussis: an underreported pathogen in pediatric respiratory infections, a prospective cohort study. *BMC Infect Dis* **14**, 526 (2014).
192. De Serres, G. *et al.* Morbidity of pertussis in adolescents and adults. *J Infect Dis* **182**, 174–179 (2000).
193. Kretsinger, K. *et al.* Preventing tetanus, diphtheria, and pertussis among adults: use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccine recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and recommendation of ACIP, supported by the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC), for use of Tdap among health-care personnel. *MMWR Recomm Rep* **55**, 1–37 (2006).
194. Farizo, K. M. *et al.* Epidemiological features of pertussis in the United States, 1980–1989. *Clin Infect Dis* **14**, 708–719 (1992).
195. Pertussis | 2020 Case Definition. [/nndss/conditions/pertussis/case-definition/2020/](https://nndss/conditions/pertussis/case-definition/2020/).
196. EU case definitions. *European Centre for Disease Prevention and Control* <https://www.ecdc.europa.eu/en/surveillance-and-disease-data/eu-case-definitions>.
197. PROTOCOLOS DE LA RED NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA. 14.
198. https://canalsalut.gencat.cat/web/.content/_Professionals/Vigilancia_epidemiologica/documentos/arxiu/spdefimdo.pdf
199. Pertussis: Clinical Features | CDC. <https://www.cdc.gov/pertussis/clinical/features.html> (2021).
200. Pertussis Diagnosis Confirmation | CDC. <https://www.cdc.gov/pertussis/clinical/diagnostic-testing/diagnosis-confirmation.html> (2021).
201. Loeffelholz, M. J., Thompson, C. J., Long, K. S. & Gilchrist, M. J. Comparison of PCR, culture, and direct fluorescent-antibody testing for detection of Bordetella pertussis. *J Clin Microbiol* **37**, 2872–2876 (1999).
202. European Centre for Disease Prevention and Control. *External quality assurance scheme on PCR for for Bordetella identification and B. pertussis typing: as part of the EUpert Labnet surveillance network*. (Publications Office, 2014).
203. Bidet, P. *et al.* Real-time PCR measurement of persistence of Bordetella pertussis DNA in nasopharyngeal secretions during antibiotic treatment of young children with pertussis. *J Clin Microbiol* **46**, 3636–3638 (2008).
204. Diavatopoulos, D. A. *et al.* Characterization of a highly conserved island in the otherwise divergent Bordetella holmesii and Bordetella pertussis genomes. *J. Bacteriol.* **188**, 8385–8394 (2006).

205. van der Zee, A., Vernooij, S., Peeters, M., van Embden, J. & Mooi, F. R. Dynamics of the population structure of *Bordetella pertussis* as measured by IS1002-associated RFLP: comparison of pre- and post-vaccination strains and global distribution. *Microbiology (Reading, Engl.)* **142** (Pt 12), 3479–3485 (1996).
206. van der Zee, A., Mooi, F., Van Embden, J. & Musser, J. Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp.: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences. *J Bacteriol* **179**, 6609–6617 (1997).
207. Tatti, K. M., Sparks, K. N., Boney, K. O. & Tondella, M. L. Novel Multitarget Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of *Bordetella* Species in Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **49**, 4059–4066 (2011).
208. Loeffelholz, M. J., Thompson, C. J., Long, K. S. & Gilchrist, M. J. Detection of *Bordetella holmesii* using *Bordetella pertussis* IS481 PCR assay. *J Clin Microbiol* **38**, 467 (2000).
209. Tizolova, A., Guiso, N. & Guillot, S. Insertion sequences shared by *Bordetella* species and implications for the biological diagnosis of pertussis syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **32**, 89–96 (2013).
210. Guiso, N. *et al.* What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **30**, 307–312 (2011).
211. Tiwari, T., Murphy, T. V., Moran, J., & National Immunization Program, CDC. Recommended antimicrobial agents for the treatment and postexposure prophylaxis of pertussis: 2005 CDC Guidelines. *MMWR Recomm Rep* **54**, 1–16 (2005).
212. Nguyen, V. T. N. & Simon, L. Pertussis: The Whooping Cough. *Prim Care* **45**, 423–431 (2018).
213. Cimolai, N. Pharmacotherapy for *Bordetella pertussis* infection. II. A synthesis of clinical sciences. *Int J Antimicrob Agents* 106257 (2020) doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106257.
214. Cimolai, N. Pharmacotherapy for *Bordetella pertussis* infection. I. A synthesis of laboratory sciences. *Int J Antimicrob Agents* 106258 (2020) doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106258.
215. Commissioner, O. of the. Medicine and Pregnancy. *FDA* (2019).
216. Pertussis | Whooping Cough | Clinical | Treatment | CDC. <https://www.cdc.gov/pertussis/clinical/treatment.html> (2019).
217. EUCAST: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
218. CLSI Microbiology: Standards Resources & Subcommittees. *Clinical & Laboratory Standards Institute* <https://clsi.org/meetings/microbiology/>.
219. Langley, J. M., Halperin, S. A., Boucher, F. D., Smith, B., & Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC). Azithromycin is as effective as and better tolerated than erythromycin estolate for the treatment of pertussis. *Pediatrics* **114**, e96-101 (2004).

220. Lozada, L. E., Royall, M. J., Nylund, C. M. & Eberly, M. D. Development of pyloric stenosis after a 4-day course of oral erythromycin. *Pediatr Emerg Care* **29**, 498–499 (2013).
221. Honein, M. A. *et al.* Infantile hypertrophic pyloric stenosis after pertussis prophylaxis with erythromycin: a case review and cohort study. *Lancet* **354**, 2101–2105 (1999).
222. Mahon, B. E., Rosenman, M. B. & Kleiman, M. B. Maternal and infant use of erythromycin and other macrolide antibiotics as risk factors for infantile hypertrophic pyloric stenosis. *J Pediatr* **139**, 380–384 (2001).
223. Lund, M. *et al.* Use of macrolides in mother and child and risk of infantile hypertrophic pyloric stenosis: nationwide cohort study. *BMJ* **348**, g1908 (2014).
224. Morrison, W. Infantile hypertrophic pyloric stenosis in infants treated with azithromycin. *Pediatr Infect Dis J* **26**, 186–188 (2007).
225. Watkins, V. S., Polk, R. E. & Stotka, J. L. Drug interactions of macrolides: emphasis on dirithromycin. *Ann Pharmacother* **31**, 349–356 (1997).
226. Altunajji, S. M., Kukuruzovic, R. H., Curtis, N. C. & Massie, J. Antibiotics for whooping cough (pertussis). *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2007) doi:10.1002/14651858.CD004404.pub3.
227. Spicer, K. B. *et al.* Occurrence of 3 *Bordetella* species during an outbreak of cough illness in Ohio: epidemiology, clinical features, laboratory findings and antimicrobial susceptibility. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **33**, e162-167 (2014).
228. Ohtsuka, M. *et al.* Emergence of quinolone-resistant *Bordetella pertussis* in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 3147–3149 (2009).
229. Pertussis | Outbreaks | PEP Postexposure Antimicrobial Prophylaxis | CDC. <https://www.cdc.gov/pertussis/pep.html> (2019).
230. Alvarez, J. *et al.* Azithromycin to Prevent Pertussis in Household Contacts, Catalonia and Navarre, Spain, 2012-2013. *Emerg Infect Dis* **26**, 2678–2684 (2020).
231. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Erythromycin-resistant *Bordetella pertussis*--Yuma County, Arizona, May-October 1994. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **43**, 807–810 (1994).
232. Lewis, K. *et al.* Pertussis caused by an erythromycin-resistant strain of *Bordetella pertussis*. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **14**, 388–391 (1995).
233. Korgenski, E. K. & Daly, J. A. Surveillance and detection of erythromycin resistance in *Bordetella pertussis* isolates recovered from a pediatric population in the Intermountain West region of the United States. *J Clin Microbiol* **35**, 2989–2991 (1997).
234. Yao, S.-M. *et al.* Antimicrobial susceptibility testing of *Bordetella pertussis* in Taiwan prompted by a case of pertussis in a paediatric patient. *Journal of Medical Microbiology* **57**, 1577–1580 (2008).

235. Wang, Z. *et al.* Appearance of Macrolide-Resistant *Bordetella pertussis* Strains in China. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 5193–5194 (2013).
236. Shahcheraghi, F. *et al.* The First Macrolide-Resistant *Bordetella pertussis* Strains Isolated From Iranian Patients. *Jundishapur J Microbiol* **7**, (2014).
237. Mirzaei, B., Bameri, Z., Babaei, R. & Shahcheraghi, F. Isolation of High Level Macrolide Resistant *Bordetella pertussis* Without Transition Mutation at Domain V in Iran. *Jundishapur J Microbiol* **8**, (2015).
238. Yamaguchi, T., Kawasaki, Y., Katsukawa, C., Kawahara, R. & Kawatsu, K. The first report of isolation of macrolide-resistant *Bordetella pertussis* in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* (2020) doi:10.7883/yoken.JJID.2019.421.
239. Guillot, S. *et al.* Macrolide-Resistant *Bordetella pertussis* Infection in Newborn Girl, France. *Emerg Infect Dis* **18**, 966–968 (2012).
240. Wang, Z. *et al.* High prevalence of erythromycin-resistant *Bordetella pertussis* in Xi'an, China. *Clinical Microbiology and Infection* **20**, O825–O830 (2014).
241. Yang, Y. *et al.* Variation in *Bordetella pertussis* Susceptibility to Erythromycin and Virulence-Related Genotype Changes in China (1970-2014). *PLOS ONE* **10**, e0138941 (2015).
242. Kamachi, K. *et al.* Macrolide-Resistant *Bordetella pertussis*, Vietnam, 2016-2017. *Emerging Infect. Dis.* **26**, 2511–2513 (2020).
243. Xu, Z. *et al.* Genomic epidemiology of erythromycin-resistant *Bordetella pertussis* in China. *Emerg Microbes Infect* **8**, 461–470 (2019).
244. Fu, P., Wang, C., Tian, H., Kang, Z. & Zeng, M. *Bordetella pertussis* Infection in Infants and Young Children in Shanghai, China, 2016-2017: Clinical Features, Genotype Variations of Antigenic Genes and Macrolides Resistance. *Pediatr Infect Dis J* **38**, 370–376 (2019).
245. Li, L. *et al.* High Prevalence of Macrolide-Resistant *Bordetella pertussis* and ptxP1 Genotype, Mainland China, 2014-2016. *Emerging Infect. Dis.* **25**, 2205–2214 (2019).
246. Li, L.-J. *et al.* [Antimicrobial susceptibility and antigen genotypes of *Bordetella pertussis* strains isolated from neonates]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* **21**, 208–213 (2019).
247. Sintchenko, V., Brown, M. & Gilbert, G. L. Is *Bordetella pertussis* susceptibility to erythromycin changing? MIC trends among Australian isolates 1971-2006. *J Antimicrob Chemother* **60**, 1178–1179 (2007).
248. Fry, N. K., Duncan, J., Vaghji, L., George, R. C. & Harrison, T. G. Antimicrobial susceptibility testing of historical and recent clinical isolates of *Bordetella pertussis* in the United Kingdom using the Etest method. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **29**, 1183–1185 (2010).
249. Theofiles, A. G. *et al.* Pertussis outbreak, southeastern Minnesota, 2012. *Mayo Clin. Proc.* **89**, 1378–1388 (2014).

250. Lönnqvist, E., Barkoff, A.-M., Mertsola, J. & He, Q. Antimicrobial susceptibility testing of Finnish *Bordetella pertussis* isolates collected during 2006-2017. *J Glob Antimicrob Resist* (2018) doi:10.1016/j.jgar.2018.02.012.
251. Bartkus, J. M. *et al.* Identification of a Mutation Associated with Erythromycin Resistance in *Bordetella pertussis*: Implications for Surveillance of Antimicrobial Resistance. *J Clin Microbiol* **41**, 1167–1172 (2003).
252. Wang, Z. *et al.* Direct Detection of Erythromycin-Resistant *Bordetella pertussis* in Clinical Specimens by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 3418–3422 (2015).
253. Geier, D. & Geier, M. The true story of pertussis vaccination: a sordid legacy? *J Hist Med Allied Sci* **57**, 249–284 (2002).
254. Álvarez García, F. J. *et al.* Calendario de vacunaciones de la Asociación Española de Pediatría: recomendaciones 2021. *Anales de Pediatría* **94**, 53.e1-53.e10 (2021).
255. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social - Profesionales - Salud pública - Prevención de la salud - Vacunaciones - Programa vacunación - Histórico de Calendarios de Vacunación. <https://www.msbs.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/vacunaciones/calendario-y-coberturas/calendario/historicoCalendarios.htm>.
256. Revisión del programa de vacunación frente a tos ferina en España Ponencia de Programa y Registro de Vacunaciones. (2013).
257. Vaccine Scheduler | ECDC. <https://vaccine-schedule.ecdc.europa.eu/>.
258. Fichas Técnicas de Vacunas | Comité Asesor de Vacunas de la AEP. <https://vacunasaep.org/profesionales/fichas-tecnicas-vacunas>.
259. Cherry, J. D. *et al.* Antibody response patterns to *Bordetella pertussis* antigens in vaccinated (primed) and unvaccinated (unprimed) young children with pertussis. *Clin Vaccine Immunol* **17**, 741–747 (2010).
260. Hallander, H. O. & Gustafsson, L. Efficacy and effectiveness of acellular pertussis vaccines: a 20-year Swedish experience. *Expert Rev Vaccines* **8**, 1303–1307 (2009).
261. Salmaso, S. *et al.* Sustained efficacy during the first 6 years of life of 3-component acellular pertussis vaccines administered in infancy: the Italian experience. *Pediatrics* **108**, E81 (2001).
262. Tindberg, Y., Blennow, M. & Granström, M. A ten year follow-up after immunization with a two component acellular pertussis vaccine. *Pediatr Infect Dis J* **18**, 361–365 (1999).
263. Zhang, L., Prietsch, S. O. M., Axelsson, I. & Halperin, S. A. Acellular vaccines for preventing whooping cough in children. *Cochrane Database Syst Rev* CD001478 (2012) doi:10.1002/14651858.CD001478.pub5.
264. Simondon, F. *et al.* A randomized double-blind trial comparing a two-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal. *Vaccine* **15**, 1606–1612 (1997).

265. Jefferson, T., Rudin, M. & DiPietrantonj, C. Systematic review of the effects of pertussis vaccines in children. *Vaccine* **21**, 2003–2014 (2003).
266. Esposito, S. *et al.* Pertussis Prevention: Reasons for Resurgence, and Differences in the Current Acellular Pertussis Vaccines. *Front Immunol* **10**, 1344 (2019).
267. Harriman, K. & Healy, C. M. How Important Is the Type of Acellular Pertussis Vaccine? *Clin Infect Dis* **70**, 208–209 (2020).
268. Zhang, L., Prietsch, S. O. M., Axelsson, I. & Halperin, S. A. Acellular vaccines for preventing whooping cough in children. *Cochrane Database Syst Rev* CD001478 (2014) doi:10.1002/14651858.CD001478.pub6.
269. Decker, M. D. *et al.* Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: adverse reactions. *Pediatrics* **96**, 557–566 (1995).
270. Bartels, I., Jüngert, J., Lugauer, S., Stehr, K. & Heininger, U. Immunogenicity and reactogenicity of a single dose of a diphtheria–tetanus–acellular pertussis component vaccine (DTaP) compared to a diphtheria–tetanus toxoid (Td) and a diphtheria toxoid vaccine (d) in adults. *Vaccine* **19**, 3137–3145 (2001).
271. McIntyre, P. B. *et al.* High levels of antibody in adults three years after vaccination with a reduced antigen content diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine. *Vaccine* **23**, 380–385 (2004).
272. Van der Wielen, M. *et al.* A randomised controlled trial with a diphtheria-tetanus-acellular pertussis (dTpa) vaccine in adults. *Vaccine* **18**, 2075–2082 (2000).
273. Meyer, C. U. *et al.* Immunogenicity and reactogenicity of acellular pertussis booster vaccines in children: standard pediatric versus a reduced-antigen content formulation. *Hum Vaccin* **4**, 203–209 (2008).
274. Ward, J. I. *et al.* Efficacy of an acellular pertussis vaccine among adolescents and adults. *N Engl J Med* **353**, 1555–1563 (2005).
275. Chen, Z. & He, Q. Immune persistence after pertussis vaccination. *Hum Vaccin Immunother* **13**, 744–756 (2017).
276. Ausiello, C. M. & Cassone, A. Acellular pertussis vaccines and pertussis resurgence: revise or replace? *mBio* **5**, e01339-01314 (2014).
277. Schwartz, K. L. *et al.* Effectiveness of pertussis vaccination and duration of immunity. *CMAJ* **188**, E399–E406 (2016).
278. McGirr, A. & Fisman, D. N. Duration of pertussis immunity after DTaP immunization: a meta-analysis. *Pediatrics* **135**, 331–343 (2015).
279. Klein, N. P., Bartlett, J., Rowhani-Rahbar, A., Fireman, B. & Baxter, R. Waning protection after fifth dose of acellular pertussis vaccine in children. *N Engl J Med* **367**, 1012–1019 (2012).

280. Domenech de Cellès, M., Rohani, P. & King, A. A. Duration of Immunity and Effectiveness of Diphtheria-Tetanus-Acellular Pertussis Vaccines in Children. *JAMA Pediatr* **173**, 588–594 (2019).
281. Esposito, S. & Principi, N. Prevention of pertussis: An unresolved problem. *Hum Vaccin Immunother* **14**, 2452–2459 (2018).
282. Wendelboe, A. M., Van Rie, A., Salmaso, S. & Englund, J. A. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatr Infect Dis J* **24**, S58-61 (2005).
283. Tartof, S. Y. *et al.* Waning immunity to pertussis following 5 doses of DTaP. *Pediatrics* **131**, e1047-1052 (2013).
284. McNamara, L. A. *et al.* Reduced Severity of Pertussis in Persons With Age-Appropriate Pertussis Vaccination-United States, 2010-2012. *Clin Infect Dis* **65**, 811–818 (2017).
285. Wendelboe, A. M. *et al.* Transmission of Bordetella pertussis to young infants. *Pediatr Infect Dis J* **26**, 293–299 (2007).
286. Kowalzik, F. *et al.* Prospective multinational study of pertussis infection in hospitalized infants and their household contacts. *Pediatr Infect Dis J* **26**, 238–242 (2007).
287. Bisgard, K. M. *et al.* Infant pertussis: who was the source? *Pediatr Infect Dis J* **23**, 985–989 (2004).
288. Jardine, A. *et al.* Who gives pertussis to infants? Source of infection for laboratory confirmed cases less than 12 months of age during an epidemic, Sydney, 2009. *Commun Dis Intell Q Rep* **34**, 116–121 (2010).
289. Bertilone, C., Wallace, T. & Selvey, L. A. Finding the ‘who’ in whooping cough: vaccinated siblings are important pertussis sources in infants 6 months of age and under. *Commun Dis Intell Q Rep* **38**, E195-200 (2014).
290. Skoff, T. H. *et al.* Sources of Infant Pertussis Infection in the United States. *Pediatrics* **136**, 635–641 (2015).
291. Fedele, G. *et al.* Parents as source of pertussis transmission in hospitalized young infants. *Infection* **45**, 171–178 (2017).
292. Curran, D. Tdap vaccination in pregnancy: new guidance, new challenges. *N C Med J* **74**, 421–422 (2013).
293. Halperin, B. A. *et al.* Kinetics of the antibody response to tetanus-diphtheria-acellular pertussis vaccine in women of childbearing age and postpartum women. *Clin Infect Dis* **53**, 885–892 (2011).
294. Gkentzi, D. *et al.* Maternal vaccination against pertussis: a systematic review of the recent literature. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **102**, F456–F463 (2017).
295. Baxter, R., Bartlett, J., Fireman, B., Lewis, E. & Klein, N. P. Effectiveness of Vaccination During Pregnancy to Prevent Infant Pertussis. *Pediatrics* **139**, (2017).

296. Tomovici, A. *et al.* Humoral immunity 10 years after booster immunization with an adolescent and adult formulation combined tetanus, diphtheria, and 5-component acellular pertussis vaccine. *Vaccine* **30**, 2647–2653 (2012).
297. Healy, C. M., Rench, M. A. & Baker, C. J. Importance of timing of maternal combined tetanus, diphtheria, and acellular pertussis (Tdap) immunization and protection of young infants. *Clin Infect Dis* **56**, 539–544 (2013).
298. Pool, V., Tomovici, A., Johnson, D. R., Greenberg, D. P. & Decker, M. D. Humoral immunity 10 years after booster immunization with an adolescent and adult formulation combined tetanus, diphtheria, and 5-component acellular pertussis vaccine in the USA. *Vaccine* **36**, 2282–2287 (2018).
299. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated recommendations for use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, and acellular pertussis vaccine (Tdap) in pregnant women--Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **62**, 131–135 (2013).
300. Shakib, J. H. *et al.* Pertussis antibodies in postpartum women and their newborns. *J Perinatol* **30**, 93–97 (2010).
301. Hardy-Fairbanks, A. J. *et al.* Immune responses in infants whose mothers received Tdap vaccine during pregnancy. *Pediatr Infect Dis J* **32**, 1257–1260 (2013).
302. Amirthalingam, G. *et al.* Effectiveness of maternal pertussis vaccination in England: an observational study. *Lancet* **384**, 1521–1528 (2014).
303. Harriman, K. & Winter, K. Pertussis vaccine uptake during pregnancy: we need to do better in the U.S. *Prev Med* **67**, 320–321 (2014).
304. Donegan, K., King, B. & Bryan, P. Safety of pertussis vaccination in pregnant women in UK: observational study. *BMJ* **349**, g4219 (2014).
305. Dabrera, G. *et al.* A case-control study to estimate the effectiveness of maternal pertussis vaccination in protecting newborn infants in England and Wales, 2012–2013. *Clin Infect Dis* **60**, 333–337 (2015).
306. Winter, K., Nickell, S., Powell, M. & Harriman, K. Effectiveness of Prenatal Versus Postpartum Tetanus, Diphtheria, and Acellular Pertussis Vaccination in Preventing Infant Pertussis. *Clin Infect Dis* **64**, 3–8 (2017).
307. Fernandes, E. G. *et al.* The effectiveness of maternal pertussis vaccination in protecting newborn infants in Brazil: A case-control study. *Vaccine* **37**, 5481–5484 (2019).
308. Romanin, V. *et al.* Maternal Vaccination in Argentina: Tetanus, Diphtheria, and Acellular Pertussis Vaccine Effectiveness During Pregnancy in Preventing Pertussis in Infants <2 Months of Age. *Clin Infect Dis* **70**, 380–387 (2020).
309. Bellido-Blasco, J., Guiral-Rodrigo, S., Míguez-Santiyán, A., Salazar-Cifre, A. & González-Morán, F. A case-control study to assess the effectiveness of pertussis vaccination during pregnancy on newborns, Valencian community, Spain, 1 March 2015 to 29 February 2016. *Euro Surveill* **22**, (2017).

310. Uriarte, P. S., Rodríguez, S. S. J., Sancristobal, I. G. & Agirre, N. M. Effectiveness of dTpa vaccination during pregnancy in preventing whooping cough in infants under 3 months of age. Bizkaia, Basque Country, Spain. *Heliyon* **5**, e01207 (2019).
311. Saul, N. *et al.* Effectiveness of maternal pertussis vaccination in preventing infection and disease in infants: The NSW Public Health Network case-control study. *Vaccine* **36**, 1887–1892 (2018).
312. Eberhardt, C. S. *et al.* Maternal Immunization Earlier in Pregnancy Maximizes Antibody Transfer and Expected Infant Seropositivity Against Pertussis. *Clin Infect Dis* **62**, 829–836 (2016).
313. Abu-Raya, B. & Edwards, K. M. Optimizing the Timing of Vaccine Administration During Pregnancy. *JAMA* **321**, 935–936 (2019).
314. Adenda_TosFerinaEmbarazo.pdf.
315. Jiménez-Truque, N. & Edwards, K. M. Maternal pertussis immunization: can it help infants? *JAMA* **311**, 1736–1737 (2014).
316. Polewicz, M. *et al.* Influence of maternal antibodies on active pertussis toxoid immunization of neonatal mice and piglets. *Vaccine* **29**, 7718–7726 (2011).
317. Boyce, T. G. & Virk, A. While waiting for better pertussis vaccines, let's use the ones we have. *J Infect Dis* **211**, 1196–1197 (2015).
318. Englund, J. A. *et al.* The effect of maternal antibody on the serologic response and the incidence of adverse reactions after primary immunization with acellular and whole-cell pertussis vaccines combined with diphtheria and tetanus toxoids. *Pediatrics* **96**, 580–584 (1995).
319. Munoz, F. M. *et al.* Safety and immunogenicity of tetanus diphtheria and acellular pertussis (Tdap) immunization during pregnancy in mothers and infants: a randomized clinical trial. *JAMA* **311**, 1760–1769 (2014).
320. Kharbanda, E. O. *et al.* Maternal Tdap vaccination: Coverage and acute safety outcomes in the vaccine safety datalink, 2007-2013. *Vaccine* **34**, 968–973 (2016).
321. Vygen-Bonnet, S. *et al.* Safety and effectiveness of acellular pertussis vaccination during pregnancy: a systematic review. *BMC Infect Dis* **20**, 136 (2020).
322. Maertens, K. *et al.* The Effect of Maternal Pertussis Immunization on Infant Vaccine Responses to a Booster Pertussis-Containing Vaccine in Vietnam. *Clin Infect Dis* **63**, S197–S204 (2016).
323. Pregnancy and Vaccination: Prenatal Care Providers Toolkit | CDC. <https://www.cdc.gov/vaccines/pregnancy/hcp-toolkit/index.html> (2021).
324. World Health Organization. Immunization, Vaccines and Biologicals. Pertussis. http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/pertussis/en/.

325. https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/vacunaciones/calendario-y-coberturas/coberturas/docs/Todas_las_tablas.pdf
326. Kapil, P. & Merkel, T. J. Pertussis vaccines and protective immunity. *Curr Opin Immunol* **59**, 72–78 (2019).
327. Ryan, M. *et al.* Bordetella pertussis respiratory infection in children is associated with preferential activation of type 1 T helper cells. *J Infect Dis* **175**, 1246–1250 (1997).
328. Peppoloni, S. *et al.* Lymphokine secretion and cytotoxic activity of human CD4+ T-cell clones against Bordetella pertussis. *Infect Immun* **59**, 3768–3773 (1991).
329. Fedele, G. *et al.* Bordetella pertussis-infected human monocyte-derived dendritic cells undergo maturation and induce Th1 polarization and interleukin-23 expression. *Infect Immun* **73**, 1590–1597 (2005).
330. Ross, P. J. *et al.* Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to Bordetella pertussis: towards the rational design of an improved acellular pertussis vaccine. *PLoS Pathog* **9**, e1003264 (2013).
331. Warfel, J. M. & Merkel, T. J. Bordetella pertussis infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates. *Mucosal Immunol* **6**, 787–796 (2013).
332. Warfel, J. M., Beren, J., Kelly, V. K., Lee, G. & Merkel, T. J. Nonhuman primate model of pertussis. *Infect Immun* **80**, 1530–1536 (2012).
333. Warfel, J. M., Zimmerman, L. I. & Merkel, T. J. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 787–792 (2014).
334. Wilk, M. M. *et al.* Lung CD4 Tissue-Resident Memory T Cells Mediate Adaptive Immunity Induced by Previous Infection of Mice with Bordetella pertussis. *J Immunol* **199**, 233–243 (2017).
335. Masopust, D. & Soerens, A. G. Tissue-Resident T Cells and Other Resident Leukocytes. *Annu Rev Immunol* **37**, 521–546 (2019).
336. Allen, A. C. *et al.* Sustained protective immunity against Bordetella pertussis nasal colonization by intranasal immunization with a vaccine-adjuvant combination that induces IL-17-secreting TRM cells. *Mucosal Immunol* (2018) doi:10.1038/s41385-018-0080-x.
337. Diavatopoulos, D. A. *et al.* PERISCOPE: road towards effective control of pertussis. *The Lancet Infectious Diseases* **19**, e179–e186 (2019).
338. Ryan, M. *et al.* Distinct T-cell subtypes induced with whole cell and acellular pertussis vaccines in children. *Immunology* **93**, 1–10 (1998).

339. Higgins, S. C., Jarnicki, A. G., Lavelle, E. C. & Mills, K. H. G. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol* **177**, 7980–7989 (2006).
340. Edwards, K. M. & Berbers, G. A. M. Immune responses to pertussis vaccines and disease. *J Infect Dis* **209 Suppl 1**, S10-15 (2014).
341. Raeven, R. H. M. *et al.* Immunoproteomic Profiling of *Bordetella pertussis* Outer Membrane Vesicle Vaccine Reveals Broad and Balanced Humoral Immunogenicity. *J Proteome Res* **14**, 2929–2942 (2015).
342. da Silva Antunes, R. *et al.* Th1/Th17 polarization persists following whole-cell pertussis vaccination despite repeated acellular boosters. *J Clin Invest* **128**, 3853–3865 (2018).
343. Palazzo, R. *et al.* Persistence of T-cell immune response induced by two acellular pertussis vaccines in children five years after primary vaccination. *New Microbiol* **39**, 35–47 (2016).
344. Higgs, R., Higgins, S. C., Ross, P. J. & Mills, K. H. G. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunol* **5**, 485–500 (2012).
345. Brummelman, J. *et al.* Modulation of the CD4(+) T cell response after acellular pertussis vaccination in the presence of TLR4 ligation. *Vaccine* **33**, 1483–1491 (2015).
346. Fedele, G., Cassone, A. & Ausiello, C. M. T-cell immune responses to *Bordetella pertussis* infection and vaccination. *Pathog Dis* **73**, (2015).
347. Warfel, J. M., Zimmerman, L. I. & Merkel, T. J. Comparison of Three Whole-Cell Pertussis Vaccines in the Baboon Model of Pertussis. *Clin Vaccine Immunol* **23**, 47–54 (2016).
348. Mascart, F. *et al.* Modulation of the infant immune responses by the first pertussis vaccine administrations. *Vaccine* **25**, 391–398 (2007).
349. Mascart, F. *et al.* *Bordetella pertussis* infection in 2-month-old infants promotes type 1 T cell responses. *J Immunol* **170**, 1504–1509 (2003).
350. Lapidot, R. & Gill, C. J. The Pertussis resurgence: putting together the pieces of the puzzle. *Trop Dis Travel Med Vaccines* **2**, 26 (2016).
351. Klein, N. P. *et al.* Waning protection following 5 doses of a 3-component diphtheria, tetanus, and acellular pertussis vaccine. *Vaccine* **35**, 3395–3400 (2017).
352. Sheridan, S. L., Ware, R. S., Grimwood, K. & Lambert, S. B. Number and order of whole cell pertussis vaccines in infancy and disease protection. *JAMA* **308**, 454–456 (2012).
353. Solans, L. *et al.* IL-17-dependent SigA-mediated protection against nasal *Bordetella pertussis* infection by live attenuated BPZE1 vaccine. *Mucosal Immunol* **11**, 1753–1762 (2018).
354. Mills, K. H. G. & Gerdtts, V. Mouse and pig models for studies of natural and vaccine-induced immunity to *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis* **209 Suppl 1**, S16-19 (2014).

355. Althouse, B. M. & Scarpino, S. V. Asymptomatic transmission and the resurgence of *Bordetella pertussis*. *BMC Med* **13**, 146 (2015).
356. Cherry, J. D. Why do pertussis vaccines fail? *Pediatrics* **129**, 968–970 (2012).
357. Brummelman, J., Wilk, M. M., Han, W. G. H., van Els, C. A. C. M. & Mills, K. H. G. Roads to the development of improved pertussis vaccines paved by immunology. *Pathog Dis* **73**, ftv067 (2015).
358. Dewan, K. K., Linz, B., DeRocco, S. E. & Harvill, E. T. Acellular Pertussis Vaccine Components: Today and Tomorrow. *Vaccines (Basel)* **8**, (2020).
359. Hozbor, D. New Pertussis Vaccines: A Need and a Challenge. *Adv. Exp. Med. Biol.* (2019) doi:10.1007/5584_2019_407.
360. Loch, C. The Path to New Pediatric Vaccines against Pertussis. *Vaccines (Basel)* **9**, (2021).
361. Chasaide, C. N. & Mills, K. H. G. Next-Generation Pertussis Vaccines Based on the Induction of Protective T Cells in the Respiratory Tract. *Vaccines (Basel)* **8**, (2020).
362. Loch, C. Will we have new pertussis vaccines? *Vaccine* **36**, 5460–5469 (2018).
363. Bottero, D. *et al.* Characterization of the immune response induced by pertussis OMVs-based vaccine. *Vaccine* **34**, 3303–3309 (2016).
364. Hozbor, D. F. Outer membrane vesicles: an attractive candidate for pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines* **16**, 193–196 (2017).
365. Raeven, R. H. M. *et al.* The Role of Virulence Proteins in Protection Conferred by *Bordetella pertussis* Outer Membrane Vesicle Vaccines. *Vaccines* **8**, (2020).
366. Raeven, R. H. M. *et al.* *Bordetella pertussis* outer membrane vesicle vaccine confers equal efficacy in mice with milder inflammatory responses compared to a whole-cell vaccine. *Sci Rep* **6**, 38240 (2016).
367. Roberts, R. *et al.* Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. *Vaccine* **26**, 4639–4646 (2008).
368. Elizagaray, M. L. *et al.* Canonical and Non-canonical Inflammasome Activation by Outer Membrane Vesicles Derived From *Bordetella pertussis*. *Front Immunol* **11**, 1879 (2020).
369. Kanojia, G. *et al.* Development of a thermostable spray dried outer membrane vesicle pertussis vaccine for pulmonary immunization. *J Control Release* **286**, 167–178 (2018).
370. Asensio, C. J. A. *et al.* Outer membrane vesicles obtained from *Bordetella pertussis* Tohama expressing the lipid A deacylase PagL as a novel acellular vaccine candidate. *Vaccine* **29**, 1649–1656 (2011).
371. Raeven, R. H. M. *et al.* Intranasal immunization with outer membrane vesicle pertussis vaccine confers broad protection through mucosal IgA and Th17 responses. *Sci Rep* **10**, (2020).

372. Zurita, M. E. *et al.* A Pertussis Outer Membrane Vesicle-Based Vaccine Induces Lung-Resident Memory CD4 T Cells and Protection Against *Bordetella pertussis*, Including Pertactin Deficient Strains. *Front Cell Infect Microbiol* **9**, 125 (2019).
373. Lin, A. *et al.* Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 induces a broad antibody response in humans. *J Clin Invest* **130**, 2332–2346 (2020).
374. Roberts, M., Maskell, D., Novotny, P. & Dougan, G. Construction and characterization in vivo of *Bordetella pertussis* aroA mutants. *Infect Immun* **58**, 732–739 (1990).
375. Cornford-Nairns, R., Daggard, G. & Mukkur, T. Construction and preliminary immunobiological characterization of a novel, non-reverting, intranasal live attenuated whooping cough vaccine candidate. *J Microbiol Biotechnol* **22**, 856–865 (2012).
376. Mielcarek, N. *et al.* Live Attenuated *B. pertussis* as a Single-Dose Nasal Vaccine against Whooping Cough. *PLOS Pathogens* **2**, e65 (2006).
377. Feunou, P. F., Kammoun, H., Debie, A.-S., Mielcarek, N. & Loch, C. Long-term immunity against pertussis induced by a single nasal administration of live attenuated *B. pertussis* BPZE1. *Vaccine* **28**, 7047–7053 (2010).
378. Debie, A.-S. *et al.* Early Protection against Pertussis Induced by Live Attenuated *Bordetella pertussis* BPZE1 Depends on TLR4. *J Immunol* **203**, 3293–3300 (2019).
379. Feunou, P. F. *et al.* Genetic stability of the live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine candidate BPZE1. *Vaccine* **26**, 5722–5727 (2008).
380. Skerry, C. M. *et al.* A live attenuated *Bordetella pertussis* candidate vaccine does not cause disseminating infection in gamma interferon receptor knockout mice. *Clin Vaccine Immunol* **16**, 1344–1351 (2009).
381. Thalen, M. *et al.* Manufacture of a Stable Lyophilized Formulation of the Live Attenuated Pertussis Vaccine BPZE1. *Vaccines (Basel)* **8**, (2020).
382. Loch, C. *et al.* Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 protects baboons against *B. pertussis* disease and infection. Protection against *B. pertussis* in baboons. *J Infect Dis* (2017) doi:10.1093/infdis/jix254.
383. Thorstenson, R. *et al.* A phase I clinical study of a live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine-BPZE1; a single centre, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of BPZE1 given intranasally to healthy adult male volunteers. *PLoS One* **9**, e83449 (2014).
384. Jahnmatz, M. *et al.* Safety and immunogenicity of the live attenuated intranasal pertussis vaccine BPZE1: a phase 1b, double-blind, randomised, placebo-controlled dose-escalation study. *Lancet Infect Dis* **20**, 1290–1301 (2020).
385. Debie, A.-S. *et al.* Construction and evaluation of *Bordetella pertussis* live attenuated vaccine strain BPZE1 producing Fim3. *Vaccine* **36**, 1345–1352 (2018).

386. Tang, Y. W. *et al.* Bordetella holmesii-like organisms associated with septicemia, endocarditis, and respiratory failure. *Clin Infect Dis* **26**, 389–392 (1998).
387. Rodgers, L. *et al.* Epidemiologic and laboratory features of a large outbreak of pertussis-like illnesses associated with cocirculating Bordetella holmesii and Bordetella pertussis—Ohio, 2010–2011. *Clin Infect Dis* **56**, 322–331 (2013).
388. Gerlach, G., Janzen, S., Beier, D. & Gross, R. Functional characterization of the BvgAS two-component system of Bordetella holmesii. *Microbiology (Reading)* **150**, 3715–3729 (2004).
389. Link, S., Schmitt, K., Beier, D. & Gross, R. Identification and regulation of expression of a gene encoding a filamentous hemagglutinin-related protein in Bordetella holmesii. *BMC Microbiol* **7**, 100 (2007).
390. van den Akker, W. M. Lipopolysaccharide expression within the genus Bordetella: influence of temperature and phase variation. *Microbiology (Reading)* **144 (Pt 6)**, 1527–1535 (1998).
391. Planet, P. J. *et al.* Bordetella holmesii: initial genomic analysis of an emerging opportunist. *Pathog Dis* **67**, 132–135 (2013).
392. Tatti, K. M. *et al.* Draft genome sequences of Bordetella holmesii strains from blood (F627) and nasopharynx (H558). *Genome Announc* **1**, e0005613 (2013).
393. Bouchez, V. & Guiso, N. Bordetella holmesii : Comparison of Two Isolates from Blood and a Respiratory Sample. *Advances in Infectious Diseases* **03**, 123–133 (2013).
394. Gerlach, G., von Wintzingerode, F., Middendorf, B. & Gross, R. Evolutionary trends in the genus Bordetella. *Microbes Infect* **3**, 61–72 (2001).
395. Bottero, D. *et al.* Bordetella holmesii in children suspected of pertussis in Argentina. *Epidemiol Infect* **141**, 714–717 (2013).
396. Watanabe, M. & Nagai, M. Whooping cough due to Bordetella parapertussis: an unresolved problem. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2**, 447–454 (2004).
397. Wallihan, R. *et al.* Bordetella parapertussis bacteremia: two case reports. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **32**, 796–798 (2013).
398. Toubiana, J. *et al.* Bordetella parapertussis Bacteremia: Clinical Expression and Bacterial Genomics. *Open Forum Infect Dis* **6**, ofz122 (2019).
399. Bouchez, V., Brun, D., Dore, G., Njamkepo, E. & Guiso, N. Bordetella parapertussis isolates not expressing pertactin circulating in France. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 675–682 (2011).
400. Diavatopoulos, D. A. *et al.* Bordetella pertussis, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of B. bronchiseptica. *PLoS Pathog.* **1**, e45 (2005).
401. Aricò, B. & Rappuoli, R. Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. *J. Bacteriol.* **169**, 2847–2853 (1987).

402. Oviedo, J. M. *et al.* Shotgun proteomic analysis of *Bordetella parapertussis* provides insights into the physiological response to iron starvation and potential new virulence determinants absent in *Bordetella pertussis*. *J Proteomics* **206**, 103448 (2019).
403. Bouchez, V. *et al.* First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing Pertussis Toxin or Pertactin. *Vaccine* **27**, 6034–6041 (2009).
404. Williams, M. M. *et al.* *Bordetella pertussis* Strain Lacking Pertactin and Pertussis Toxin. *Emerging Infect. Dis.* **22**, 319–322 (2016).
405. Martin, S. W. *et al.* Pertactin-Negative *Bordetella pertussis* Strains: Evidence for a Possible Selective Advantage. *Clin Infect Dis* **60**, 223–227 (2015).
406. Barkoff, A.-M. & He, Q. Molecular Epidemiology of *Bordetella pertussis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* (2019) doi:10.1007/5584_2019_402.
407. Miyaji, Y., Otsuka, N., Toyozumi-Ajisaka, H., Shibayama, K. & Kamachi, K. Genetic Analysis of *Bordetella pertussis* Isolates from the 2008–2010 Pertussis Epidemic in Japan. *PLoS One* **8**, (2013).
408. van Gent, M. *et al.* Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998–2012. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **34**, 821–830 (2015).
409. Cassidy, P. K., Skoff, T. H., Jawahir, S. & Tondella, M. L. Changes in Predominance of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profiles of *Bordetella pertussis* Isolates, United States, 2000–2012. *Emerging Infect. Dis.* **22**, 442–448 (2016).
410. Barkoff, A.-M. *et al.* Surveillance of circulating *Bordetella pertussis* strains in Europe during 1998–2015. *J. Clin. Microbiol.* (2018) doi:10.1128/JCM.01998-17.
411. Caro, V. *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Bordetella pertussis* populations in various European countries with different vaccine policies. *Microbes Infect.* **7**, 976–982 (2005).
412. Hallander, H. *et al.* *Bordetella pertussis* Strains Circulating in Europe in 1999 to 2004 as Determined by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J Clin Microbiol* **45**, 3257–3262 (2007).
413. Advani, A. *et al.* Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis of *Bordetella pertussis* Isolates Circulating in Europe from 1998 to 2009. *J Clin Microbiol* **51**, 422–428 (2013).
414. Shuel, M. *et al.* Genetic analysis of *Bordetella pertussis* in Ontario, Canada reveals one predominant clone. *International Journal of Infectious Diseases* **17**, e413–e417 (2013).
415. Wang, Z. & He, Q. *Bordetella pertussis* Isolates Circulating in China Where Whole Cell Vaccines Have Been Used for 50 Years. *Clin. Infect. Dis.* **61**, 1028–1029 (2015).
416. Kallonen, T. & He, Q. *Bordetella pertussis* strain variation and evolution postvaccination. *Expert Review of Vaccines* **8**, 863–875 (2009).
417. Hallander, H. O., Advani, A., Donnelly, D., Gustafsson, L. & Carlsson, R.-M. Shifts of *Bordetella pertussis* variants in Sweden from 1970 to 2003, during three periods marked by different vaccination programs. *J Clin Microbiol* **43**, 2856–2865 (2005).

418. Advani, A., Donnelly, D. & Hallander, H. Reference system for characterization of *Bordetella pertussis* pulsed-field gel electrophoresis profiles. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 2890–2897 (2004).
419. Caro, V. *et al.* *Bordetella pertussis*, Finland and France. *Emerg Infect Dis* **12**, 987–989 (2006).
420. Polak, M. *et al.* Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in Poland—a country with whole-cell pertussis primary vaccination. *Microbes Infect* **21**, 170–175 (2019).
421. Zhang, L. *et al.* Effect of Vaccination on *Bordetella pertussis* Strains, China. *Emerg Infect Dis* **16**, 1695–1701 (2010).
422. Litt, D. J., Neal, S. E. & Fry, N. K. Changes in genetic diversity of the *Bordetella pertussis* population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 680–688 (2009).
423. Schouls, L. M., van der Heide, H. G. J., Vauterin, L., Vauterin, P. & Mooi, F. R. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Dutch *Bordetella pertussis* strains reveals rapid genetic changes with clonal expansion during the late 1990s. *J. Bacteriol.* **186**, 5496–5505 (2004).
424. Advani, A., Van der Heide, H. G. J., Hallander, H. O. & Mooi, F. R. Analysis of Swedish *Bordetella pertussis* isolates with three typing methods: characterization of an epidemic lineage. *Journal of Microbiological Methods* **78**, 297–301 (2009).
425. Petridou, E. *et al.* Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* in Greece, 2010–2015. *J Med Microbiol* **67**, 400–407 (2018).
426. Octavia, S. *et al.* Newly emerging clones of *Bordetella pertussis* carrying *prn2* and *ptxP3* alleles implicated in Australian pertussis epidemic in 2008–2010. *J. Infect. Dis.* **205**, 1220–1224 (2012).
427. Bowden, K. E. *et al.* Molecular Epidemiology of the Pertussis Epidemic in Washington State in 2012. *J Clin Microbiol* **52**, 3549–3557 (2014).
428. Galit, S. R. L. *et al.* Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* in the Philippines in 2012–2014. *International Journal of Infectious Diseases* **35**, 24–26 (2015).
429. Mosiej, E., Krysztopa-Grzybowska, K., Polak, M., Prygiel, M. & Lutyńska, A. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis of *Bordetella pertussis* isolates circulating in Poland in the period 1959–2013. *Journal of Medical Microbiology* **66**, 753–761 (2017).
430. Polak, M. *et al.* Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in Poland—a country with whole-cell pertussis primary vaccination. *Microbes Infect.* (2018) doi:10.1016/j.micinf.2018.12.001.
431. Xu, Y. *et al.* Genetic diversity and population dynamics of *Bordetella pertussis* in China between 1950–2007. *Vaccine* **33**, 6327–6331 (2015).
432. Du, Q. *et al.* Direct molecular typing of *Bordetella pertussis* from nasopharyngeal specimens in China in 2012–2013. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **35**, 1211–1214 (2016).
433. Mooi, F. R. *et al.* *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis* **15**, 1206–1213 (2009).

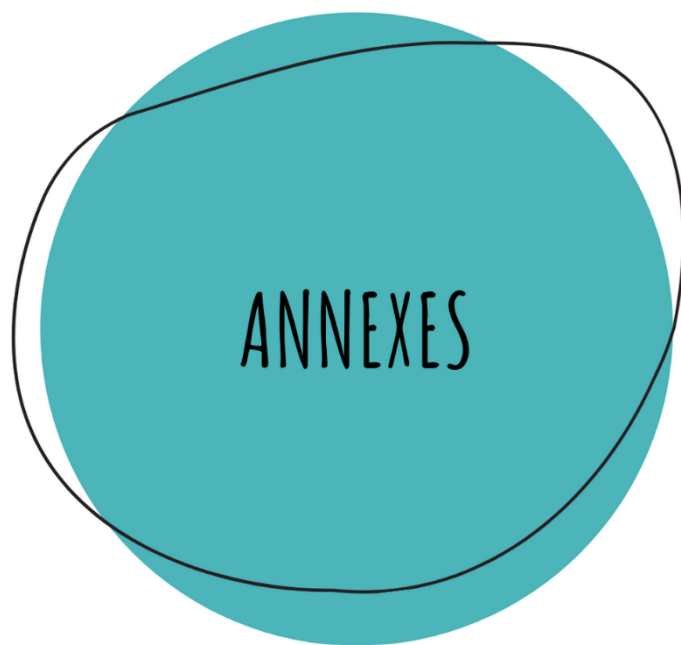
434. van Gent, M., Bart, M. J., van der Heide, H. G. J., Heuvelman, K. J. & Mooi, F. R. Small Mutations in *Bordetella pertussis* Are Associated with Selective Sweeps. *PLoS One* **7**, (2012).
435. Schmidtke, A. J. *et al.* Population Diversity among *Bordetella pertussis* Isolates, United States, 1935–2009. *Emerg Infect Dis* **18**, 1248–1255 (2012).
436. Cassidy, P. *et al.* Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935–1999. *J Infect Dis* **182**, 1402–1408 (2000).
437. Zomer, A. *et al.* *Bordetella pertussis* population dynamics and phylogeny in Japan after adoption of acellular pertussis vaccines. *Microb Genom* (2018) doi:10.1099/mgen.0.000180.
438. Moriuchi, T. *et al.* Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* in Cambodia determined by direct genotyping of clinical specimens. *Int J Infect Dis* **62**, 56–58 (2017).
439. Bailon, H., León-Janampa, N., Padilla, C. & Hozbor, D. Increase in pertussis cases along with high prevalence of two emerging genotypes of *Bordetella pertussis* in Perú, 2012. *BMC Infect. Dis.* **16**, 422 (2016).
440. Sadeghpour Heravi, F. *et al.* Strain variation and antigenic divergence among *Bordetella pertussis* circulating strains isolated from patients in Iran. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **37**, 1893–1900 (2018).
441. Heikkinen, E. *et al.* *Bordetella pertussis* isolates in Finland: Serotype and fimbrial expression. *BMC Microbiol* **8**, 162 (2008).
442. Mahmood, K., Pelkowski, S., Atherly, D., Sitrin, R. D. & Donnelly, J. J. Hexavalent IPV-based combination vaccines for public-sector markets of low-resource countries. *Hum Vaccin Immunother* **9**, 1894–1902 (2013).
443. Bart, M. J. *et al.* Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *mBio* **5**, e01074 (2014).
444. Lam, C. *et al.* Selection and emergence of pertussis toxin promoter ptxP3 allele in the evolution of *Bordetella pertussis*. *Infection, Genetics and Evolution* **12**, 492–495 (2012).
445. Bottero, D. *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms, and surfaceome analysis of vaccine and clinical *Bordetella pertussis* strains. *Clin Vaccine Immunol* **14**, 1490–1498 (2007).
446. King, A. J. *et al.* Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity. *Microbiology (Reading)* **147**, 2885–2895 (2001).
447. Watanabe, M. *et al.* Efficacy of pertussis components in an acellular vaccine, as assessed in a murine model of respiratory infection and a murine intracerebral challenge model. *Vaccine* **20**, 1429–1434 (2002).
448. Komatsu, E., Yamaguchi, F., Abe, A., Weiss, A. A. & Watanabe, M. Synergic effect of genotype changes in pertussis toxin and pertactin on adaptation to an acellular pertussis vaccine in the murine intranasal challenge model. *Clin Vaccine Immunol* **17**, 807–812 (2010).

449. van Gent, M. *et al.* Studies on Prn variation in the mouse model and comparison with epidemiological data. *PLoS One* **6**, e18014 (2011).
450. Bart, M. J. *et al.* Comparative genomics of prevaccination and modern *Bordetella pertussis* strains. *BMC Genomics* **11**, 627 (2010).
451. King, A. J. *et al.* 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 (2013).
452. Dalby, T. *et al.* Evaluation of PCR methods for the diagnosis of pertussis by the European surveillance network for vaccine-preventable diseases (EUVAC.NET). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **32**, 1285–1289 (2013).
453. Antila, M. *et al.* *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis. *J Med Microbiol* **55**, 1043–1051 (2006).
454. Guthrie, J. L., Robertson, A. V., Tang, P., Jamieson, F. & Drews, S. J. Novel duplex real-time PCR assay detects *Bordetella holmesii* in specimens from patients with Pertussis-like symptoms in Ontario, Canada. *J Clin Microbiol* **48**, 1435–1437 (2010).
455. Ben Fraj, I. *et al.* Pertussis epidemiology in Tunisian infants and children and characterization of *Bordetella pertussis* isolates: results of a 9-year surveillance study, 2007 to 2016. *J Med Microbiol* **68**, 241–247 (2019).
456. Fong, W., Timms, V., Holmes, N. & Sintchenko, V. Detection and incidence of *Bordetella holmesii* in respiratory specimens from patients with pertussis-like symptoms in New South Wales, Australia. *Pathology* **50**, 322–326 (2018).
457. Miranda, C., Porte, L. & García, P. *Bordetella holmesii* in nasopharyngeal samples from Chilean patients with suspected *Bordetella pertussis* infection. *J Clin Microbiol* **50**, 1505; author reply 1506 (2012).
458. Miranda, C. *et al.* [Presence of *Bordetella holmesii* in an outbreak of pertussis in Chile]. *Rev Chilena Infectol* **30**, 237–243 (2013).
459. Kamiya, H. *et al.* Transmission of *Bordetella holmesii* during Pertussis Outbreak, Japan. *Emerging Infectious Diseases* **18**, 1166–1169 (2012).
460. Burgos-Rivera, B. *et al.* Evaluation of Level of Agreement in *Bordetella* Species Identification in Three U.S. Laboratories during a Period of Increased Pertussis. *J Clin Microbiol* **53**, 1842–1847 (2015).
461. Kamachi, K. *et al.* Laboratory-based surveillance of pertussis using multitarget real-time PCR in Japan: evidence for *Bordetella pertussis* infection in preteens and teens. *New Microbes New Infect* **8**, 70–74 (2015).
462. Katfy, K. *et al.* Epidemiology of pertussis in Casablanca (Morocco): contribution of conventional and molecular diagnosis tools. *BMC Infect Dis* **17**, 348 (2017).

463. Katfy, K. *et al.* Pertussis in infants, in their mothers and other contacts in Casablanca, Morocco. *BMC Infect Dis* **20**, 43 (2020).
464. Mooi, F. R. *et al.* Characterization of *Bordetella holmesii* isolates from patients with pertussis-like illness in The Netherlands. *FEMS Immunol Med Microbiol* **64**, 289–291 (2012).
465. Lotfi, M. N., Nikbin, V. S., Nasiri, O., Badmasti, F. & Shahcheraghi, F. Molecular detection of *Bordetella holmesii* in two infants with pertussis-like syndrome: the first report from Iran. *Iran J Microbiol* **9**, 219–223 (2017).
466. Kamiya, H. *et al.* Transmission of *Bordetella holmesii* during pertussis outbreak, Japan. *Emerg Infect Dis* **18**, 1166–1169 (2012).
467. Njamkepo, E. *et al.* Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *J Clin Microbiol* **49**, 4347–4348 (2011).
468. Barkoff, A.-M. *et al.* Appearance of *Bordetella pertussis* Strains Not Expressing the Vaccine Antigen Pertactin in Finland. *Clin Vaccine Immunol* **19**, 1703–1704 (2012).
469. Otsuka, N. *et al.* Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. *PLoS One* **7**, e31985 (2012).
470. Mattoo, S. & Cherry, J. D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* **18**, 326–382 (2005).
471. Zeddeman, A. *et al.* Investigations into the emergence of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in six European countries, 1996 to 2012. *Euro Surveill.* **19**, (2014).
472. Lam, C. *et al.* Rapid Increase in Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* Isolates, Australia. *Emerg Infect Dis* **20**, 626–633 (2014).
473. Pawloski, L. C. *et al.* Prevalence and Molecular Characterization of Pertactin-Deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clin Vaccine Immunol* **21**, 119–125 (2014).
474. Queenan, A. M., Cassiday, P. K. & Evangelista, A. Pertactin-negative variants of *Bordetella pertussis* in the United States. *N. Engl. J. Med.* **368**, 583–584 (2013).
475. Zeddeman, A. *et al.* Investigations into the emergence of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in six European countries, 1996 to 2012. *Euro Surveill* **19**, (2014).
476. Barkoff, A.-M. *et al.* Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates: evidence of increased circulation in Europe, 1998 to 2015. *Euro Surveill.* **24**, (2019).
477. Hiramatsu, Y. *et al.* Significant Decrease in Pertactin-Deficient *Bordetella pertussis* Isolates, Japan. *Emerging Infect. Dis.* **23**, 699–701 (2017).
478. Kastarin, T. *et al.* High prevalence of currently circulating *Bordetella pertussis* isolates not producing vaccine antigen pertactin in Slovenia. *Clin. Microbiol. Infect.* **25**, 258–260 (2019).

479. Tsang, R. S. W. *et al.* Pertactin-negative *Bordetella pertussis* strains in Canada: characterization of a dozen isolates based on a survey of 224 samples collected in different parts of the country over the last 20 years. *International Journal of Infectious Diseases* **28**, 65–69 (2014).
480. Tsang, R. S. W. *et al.* The evolving nature of *Bordetella pertussis* in Ontario, Canada, 2009–2017: strains with shifting genotypes and pertactin deficiency. *Can. J. Microbiol.* **65**, 823–830 (2019).
481. Safarchi, A. *et al.* Genomic epidemiology of Iranian *Bordetella pertussis*: 50 years after the implementation of whole cell vaccine. *Emerg Microbes Infect* **8**, 1416–1427 (2019).
482. Carriquiriborde, F. *et al.* Rare Detection of *Bordetella pertussis* Pertactin-Deficient Strains in Argentina. *Emerging Infect. Dis.* **25**, 2048–2054 (2019).
483. Weigand, M. R. *et al.* Screening and Genomic Characterization of Filamentous Hemagglutinin-Deficient *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **86**, (2018).
484. Xu, Z. *et al.* Pertactin-Negative and Filamentous Hemagglutinin-Negative *Bordetella pertussis*, Australia, 2013–2017. *Emerging Infect. Dis.* **25**, 1196–1199 (2019).
485. Stefanelli, P. Pertussis: Identification, Prevention and Control. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1183**, 127–136 (2019).
486. Hovingh, E. S. *et al.* *Bordetella pertussis* pertactin knock-out strains reveal immunomodulatory properties of this virulence factor. *Emerg Microbes Infect* **7**, 39 (2018).
487. Hegerle, N. & Guiso, N. *Bordetella pertussis* and pertactin-deficient clinical isolates: lessons for pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines* **13**, 1135–1146 (2014).
488. Safarchi, A. *et al.* Pertactin negative *Bordetella pertussis* demonstrates higher fitness under vaccine selection pressure in a mixed infection model. *Vaccine* **33**, 6277–6281 (2015).
489. Weigand, M. R. *et al.* Genomic Survey of *Bordetella pertussis* Diversity, United States, 2000–2013. *Emerging Infect. Dis.* **25**, 780–783 (2019).
490. Bowden, K. E. *et al.* Molecular epidemiology of the pertussis epidemic in Washington State in 2012. *J Clin Microbiol* **52**, 3549–3557 (2014).
491. Weigand, M. R. *et al.* Complete Genome Sequences of *Bordetella pertussis* Isolates with Novel Pertactin-Deficient Deletions. *Genome Announc* **5**, (2017).
492. Moran, N. A. & Plague, G. R. Genomic changes following host restriction in bacteria. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 627–633 (2004).
493. Loo, I. H. M. van, Heuvelman, K. J., King, A. J. & Mooi, F. R. Multilocus Sequence Typing of *Bordetella pertussis* Based on Surface Protein Genes. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1994–2001 (2002).
494. Weber, C., Boursaux-Eude, C., Coralie, G., Caro, V. & Guiso, N. 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. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4396–4403 (2001).

495. Zomer, A. *et al.* Bordetella pertussis population dynamics and phylogeny in Japan after adoption of acellular pertussis vaccines. *Microb Genom* **4**, (2018).



ANNEXES

ANNEX 1. Material suplementari **Estudi 1: Caracterització de l'epidemiologia molecular i la diversitat antigènica d'aïllats clínics de *B. pertussis* productors de tosferina.**

Supplementary material, Table S1. Demographic, epidemiological and vaccine-related characteristics of the strains included in the study.

REF. STRAIN	DATE	GENDER	AGE	PERTUSSIS VACCINE DOSES RECEIVED	DATE OF LAST PERTUSSIS VACCINE DOSE	PFGE profile	MT	<i>ptxA</i>	<i>ptxP</i>	<i>prn</i>	<i>fim3</i>	Serotype
BP1	19.09.1986	UNK	UNK	UNK	NA	VH1						FIM3
BP2	02.01.1986	UNK	UNK	UNK	NA	VH2	27	1	1	2	1	FIM2/3
BP3	16.03.1987	UNK	UNK	UNK	NA	VH3	70	1	1	1	1	FIM3
BP4	04.12.1986	UNK	UNK	UNK	NA	VH1	95	1	1	1	1	FIM3
BP5	26.03.1987	UNK	UNK	UNK	NA	VH4	158	1	1	2	1	FIM3
BP6	25.04.1989	F	UNK	UNK	NA	VH5	133	1	1	1	1	FIM2
BP7	12.05.1989	F	1M	UNK	NA	VH6	135	1	1	1	1	FIM2
BP8	07.06.1989	M	4M	UNK	NA	VH7	146	1	1	1	1	FIM3
BP9	25.06.1989	M	3M	UNK	NA	VH5						FIM2/3
BP10	09.05.1989	M	1M	UNK	NA	VH6						FIM2
BP11	12.05.1989	F	2M	UNK	NA	VH8	27	1	1	3	1	FIM2
BP12	12.05.1989	M	1M	UNK	NA	VH6						FIM2
BP13	09.06.1989	M	4M	UNK	NA	VH9	70	1	5	3	1	FIM2
BP14	14.06.1989	M	1M	UNK	NA	VH10	70	1	1	3	1	FIM3
BP15	28.06.1989	F	3M	UNK	NA	VH11	27	1	1	2	1	FIM2

BP16	30.06.1989	M	2M	UNK	NA	VH8						FIM2
BP17	22.06.1989	F	1M	UNK	NA	VH5		1	1	1	1	FIM2/3
BP18	09.06.1989	F	1M	UNK	NA	VH12	28	1	1	1	1	FIM2
BP19	06.07.1989	F	3M	UNK	NA	VH5						FIM2/3
BP20	10.07.1989	M	2M	UNK	NA	VH2		1	1	2	1	FIM3
BP21	18.07.1989	F	1M	UNK	NA	VH2						FIM2
BP22	19.07.1989	F	3M	UNK	NA	VH8						FIM2
BP23	19.07.1989	F	9Y	UNK	NA	VH5						FIM3
BP24	20.07.1989	F	1M	UNK	NA	VH13	16	1	10	3	1	FIM2
BP25	27.07.1989	M	1M	UNK	NA	VH2						FIM3
BP26	28.07.1989	M	UNK	UNK	NA	VH14		1	1	2	1	FIM3
BP27	15.08.1989	F	UNK	UNK	NA	VH8						FIM2
BP28	29.08.1989	F	2M	UNK	NA	VH8						FIM2
BP29	29.08.1989	M	2M	UNK	NA	VH2	27	1	1	2	1	FIM2
BP30	10.08.1989	F	3M	UNK	NA	VH5						FIM2
BP31	13.08.1989	F	1M	UNK	NA	VH2						FIM3
BP32	26.08.1989	M	3M	UNK	NA	VH5						FIM2/3
BP33	30.09.1989	F	3Y	UNK	NA	VH2						FIM3
BP34	02.09.1989	F	1M	UNK	NA	VH5						FIM2
BP37	22.01.1990	M	3M	UNK	NA	VH15	70	1	1	1	1	FIM3
BP38	30.01.1990	F	UNK	UNK	NA	VH16	70	1	1	1	1	FIM2/3 negative
BP39	09.09.1989	M	1M	UNK	NA	VH2						FIM3
BP40	28.09.1989	F	5M	UNK	NA	VH6		1	1	1	1	FIM2
BP41	16.09.1989	M	6M	UNK	NA	VH14	27	1	1	2	1	FIM3
BP42	21.10.1989	M	13Y	UNK	NA	VH2						FIM3

BP43	27.12.1989	F	1M	UNK	NA	VH2						FIM3
BP44	09.01.1990	F	1M	UNK	NA	VH5						FIM2
BP45	31.07.1990	F	UNK	UNK	NA	VH2						FIM3
BP46	17.08.1990	M	2M	UNK	NA	VH5	1	1	1	1		FIM3
BP47	08.05.1992	F	3M	UNK	NA	VH2	1	1	3	1		FIM2/3
BP48	28.06.1992	M	7M	UNK	NA	VH8						FIM3
BP49	04.07.1992	F	4M	UNK	NA	VH12	1	1	3	1		FIM3
BP50	15.07.1992	M	2M	UNK	NA	VH12						FIM3
BP51	28.07.1992	M	4M	UNK	NA	VH8						FIM3
BP52	04.08.1992	M	5M	UNK	NA	VH2	1	1	2	1		FIM3
BP53	04.08.1992	F	5M	UNK	NA	VH8	16	1	1	1	1	FIM3
BP54	17.08.1992	F	UNK	UNK	NA	VH12						FIM3
BP55	27.08.1992	M	10M	UNK	NA	VH17	16	1	1	1	1	FIM3
BP56	30.08.1992	M	7M	UNK	NA	VH2						FIM2/3
BP57	30.08.1992	F	89Y	UNK	NA	VH12						FIM3
BP58	19.09.1992	F	1M	UNK	NA	VH12	158	1	1	2	1	FIM2
BP59	11.12.1992	F	1M	UNK	NA	VH7	27	1	1	2	1	FIM2
BP61	24.06.1994	M	UNK	UNK	NA	VH7						FIM2/3
BP62	14.09.1994	M	2M	UNK	NA	VH8						FIM3
BP63	19.09.1994	F	6Y	UNK	NA	VH8						FIM2
BP64	20.09.1994	F	2Y	UNK	NA	VH2						FIM2
BP65	28.09.1994	M	3M	UNK	NA	VH7	1	1	1	1		FIM3
BP66	14.07.1995	M	3M	UNK	NA	VH8	1	1	1	1		FIM3
BP67	17.08.1995	M	3M	UNK	NA	VH8						FIM3
BP68	27.09.1995	M	UNK	UNK	NA	VH5	32	1	1	3	1	FIM3

BP69	30.09.1995	F	5M	UNK	NA	VH5		1	1	1	1	FIM3
BP70	18.08.1996	F	4M	UNK	NA	VH18	28	1	3	2	1	FIM3
BP71	22.05.1996	F	2M	UNK	NA	VH2		1	11	2	1	FIM3
BP72	31.05.1996	M	5M	UNK	NA	VH1						FIM3
BP73	17.03.1996	F	5M	UNK	NA	VH8						FIM3
BP74	13.06.1996	F	8M	UNK	NA	VH18						FIM3
BP75	14.03.1997	M	3M	UNK	NA	VH8	60	1	1	3	1	FIM3
BP76	09.06.1997	F	4M	UNK	NA	VH2						FIM3
BP77	07.07.1997	M	1M	UNK	NA	VH12						FIM2
BP78	07.07.1997	F	2M	UNK	NA	VH7	95	1	1	1	1	FIM2
BP79	12.07.1997	F	3M	UNK	NA	VH7						FIM3
BP80	08.08.1997	M	UNK	UNK	NA	VH20	95	1	1	2	1	FIM3
BP81	19.08.1997	M	3M	UNK	NA	VH2						FIM3
BP82	27.08.1997	F	4M	UNK	NA	VH12						FIM2
BP83	27.08.1997	F	1M	UNK	NA	VH12	60	1	3	2	1	FIM3
BP85	02.12.1997	M	1M	UNK	NA	VH12						FIM3
BP86	11.12.1997	M	UNK	UNK	NA	VH2	27	1	1	2	1	FIM3
BP87	21.11.1998	F	7Y	UNK	NA	VH19	27	1	3	2	2	FIM3
BP88	04.12.1998	UNK	1M	UNK	NA	VH19						FIM3
BP89	14.01.1999	M	3M	UNK	NA	VH20						FIM3
BP90	15.01.1999	M	2M	UNK	NA	VH21	28	1	3	2	1	FIM2/3
BP91	18.01.1999	M	7Y	UNK	NA	VH20						FIM3
BP92	25.02.1999	F	5M	UNK	NA	VH8	60	1	1	3	1	FIM3
BP93	13.06.1999	F	6Y	UNK	NA	VH19						FIM3
BP94	07.07.1999	M	13Y	UNK	NA	VH2						FIM3

BP95	10.07.1999	F	1M	UNK	NA	VH2	60	1	3	2	1	FIM3
BP96	17.07.1999	M	5M	UNK	NA	VH23						FIM3
BP97	31.07.1999	M	2M	UNK	NA	VH8						FIM3
BP98	09.08.1999	M	6Y	UNK	NA	VH19						FIM3
BP99	10.08.1999	F	8M	UNK	NA	VH20	27	1	3	2	2	FIM3
BP100	11.08.1999	F	1M	UNK	NA	VH24						FIM2/3 negative
BP101	16.10.1999	M	5M	UNK	NA	VH20						FIM3
BP102	25.10.1999	F	UNK	UNK	NA	VH20						FIM3
BP103	24.01.2000	M	2M	UNK	NA	VH20						FIM3
BP104	01.02.2000	M	1M	0	NA	VH19						FIM3
BP105	23.02.2000	M	1M	0	NA	VH24						FIM3
BP106	02.03.2000	F	2M	UNK	NA	VH19						FIM3
BP107	20.03.2000	M	1M	0	NA	VH19						FIM3
BP108	21.03.2000	F	1M	0	NA	VH20						FIM3
BP109	25.01.2000	M	15D	0	NA	VH20						FIM3
BP111	28.04.2000	UNK	UNK	UNK	NA	VH20						FIM3
BP112	28.04.2000	M	2M	0	NA	VH20						FIM3
BP113	08.05.2000	F	7Y	5	02.07.1998	VH20						FIM3
BP114	18.05.2000	F	UNK	UNK	NA	VH20						FIM3
BP115	16.05.2000	F	UNK	UNK	NA	VH20						FIM3
BP116	16.05.2000	F	8Y	UNK	NA	VH19						FIM3
BP117	21.05.2000	M	3M	UNK	NA	VH19						FIM3
BP118	22.05.2000	M	1M	0	NA	VH19						FIM3
BP119	31.05.2000	M	1M	0	NA	VH20						FIM3
BP120	02.06.2000	M	3M	UNK	NA	VH19						FIM3

BP121	13.06.2000	F	2M	1	07.06.2000	VH20						FIM3
BP122	15.06.2000	M	6M	2	22.04.2000	VH20						FIM3
BP123	16.06.2000	M	7Y	5	02.06.1998	VH19						FIM3
BP124	15.06.2000	M	7Y	5	10.10.1998	VH20						FIM3
BP125	14.06.2000	M	14Y	UNK	NA	VH19						FIM3
BP126	16.06.2000	F	4M	2	30.05.2000	VH20						FIM3
BP127	19.06.2000	M	1Y	2	28.05.1999	VH20	27	1	3	2	2	FIM3
BP128	20.06.2000	M	10Y	UNK	NA	VH19						FIM3
BP129	23.06.2000	M	7Y	UNK	NA	VH19						FIM3
BP130	23.06.2000	F	UNK	UNK	NA	VH19						FIM3
BP131	23.06.2000	F	4Y	UNK	NA	VH19						FIM3
BP132	29.06.2000	F	2M	1	21.06.2000	VH20						FIM2/3
BP133	29.06.2000	M	1M	0	NA	VH19						FIM3
BP134	01.07.2000	F	2M	0	NA	VH19						FIM3
BP135	01.07.2000	M	UNK	UNK	NA	VH19						FIM3
BP137	03.07.2000	F	3Y	3	17.09.1997	VH20						FIM3
BP138	09.07.2000	F	4M	2	29.06.2000	VH24						FIM3
BP139	07.07.2000	F	2M	0	NA	VH20						FIM3
BP140	12.07.2000	M	3M	UNK	NA	VH22	27	1	3	2	2	FIM3
BP141	14.07.2000	M	6Y	5	05.11.1998	VH20						FIM3
BP142	19.07.2000	M	1M	0	NA	VH20						FIM3
BP143	27.07.2000	M	3M	0	NA	VH20						FIM3
BP144	29.07.2000	F	1Y	3	13.09.1999	VH19						FIM3
BP145	02.08.2000	F	3Y	4	15.04.1998	VH24	27	1	3	2	2	FIM3
BP146	03.08.2000	F	3M	UNK	NA	VH19						FIM3

BP147	01.08.2000	M	2M	0	NA	VH19	158	1	3	2	2	FIM3
BP148	12.08.2000	M	4Y	4	20.06.1997	VH19						FIM3
BP149	15.08.2000	F	2M	1	13.07.2000	VH20						FIM3
BP150	15.08.2000	M	1M	0	NA	VH5	27	1	1	1	1	FIM3
BP151	19.08.2000	M	1M	0	NA	VH20						FIM3
BP152	31.08.2000	M	4Y	4	25.09.1997	VH24						FIM3
BP154	02.03.2002	F	4M	UNK	NA	VH23	27	1	3	2	1	FIM3
BP155	03.08.2002	M	1Y	3	26.10.2001	VH20						FIM3
BP157	23.08.2002	M	2M	1	31.07.2002	VH19						FIM3
BP158	07.11.2002	F	UNK	UNK	NA	VH19						FIM3
BP159	08.01.2003	M	UNK	UNK	NA	VH19	27	1	3	2	2	FIM3
BP160	30.01.2003	F	6M	3	19.01.2003	VH20	27	1	3	2	2	FIM2/3
BP161	19.03.2003	UNK	UNK	UNK	NA	VH12	60	1	3	2	1	FIM3
BP162	18.03.2003	M	2M	0	NA	VH2	27	1	3	2	1	FIM3
BP163	30.04.2003	M	2M	UNK	NA	VH19						FIM3
BP164	07.05.2003	M	UNK	UNK	NA	VH8	27	1	3	2	2	FIM2/3 negative
BP165	22.05.2003	F	6Y	UNK	NA	VH19						FIM2/3 negative
BP166	23.05.2005	M	39Y	UNK	NA	VH19						FIM2/3 negative
BP167	03.06.2003	M	UNK	UNK	NA	VH20						FIM2/3 negative
BP168	17.06.2003	F	UNK	UNK	NA	VH19						FIM3
BP169	17.06.2003	F	UNK	UNK	NA	VH23						FIM3
BP171	21.06.2003	F	UNK	UNK	NA	VH19						FIM3
BP172	29.06.2003	F	32Y	UNK	NA	VH23						FIM3

BP173	03.07.2003	F	UNK	UNK	NA	VH19						FIM3
BP289	01.03.2007	F	1M	0	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP291	15.03.2007	M	1M	0	NA	VH19	27	1	3	2	2	FIM3
BP298	03.05.2007	F	1M	0	NA	VH25		1	3	2	2	FIM3
BP299	09.05.2007	UNK	1M	0	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP302	22.05.2007	M	1M	0	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP303	22.05.2007	M	2M	1	04.05.2007	VH25		1	3	2	2	FIM2/3 negative
BP304	29.05.2007	F	15Y	UNK	NA	VH19		1	15	2	2	FIM3
BP309	21.06.2007	F	15Y	UNK	NA	VH19		1	15	2	2	FIM3
BP310	18.06.2007	F	1M	0	NA	VH2		1	3	2	1	FIM3
BP311	22.06.2007	F	UNK	UNK	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP312	18.06.2007	F	48Y	UNK	NA	VH2		1	3	2	2	FIM3
BP313	21.06.2007	M	15Y	4	05.08.1993	VH19		1	15	2	2	FIM3
BP315	03.07.2007	F	UNK	UNK	NA	VH19		1	15	2	2	FIM2/3 negative
BP317	19.07.2007	F	2M	0	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP318	25.07.2007	M	13Y	UNK	NA	VH22		1	3	2	2	FIM3
BP319	03.08.2007	F	1M	0	NA	VH2		1	3	2	2	FIM3
BP320	13.08.2007	M	UNK	UNK	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP321	25.08.2007	F	2M	0	NA	VH26		1	3	2	1	FIM2/3 negative
BP323	29.08.2007	F	12Y	UNK	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP324	29.08.2007	F	UNK	UNK	NA	VH20		1	3	2	2	FIM3
BP325	29.08.2007	F	1Y	UNK	NA	VH26	27	1	3	2	1	FIM3
BP326	03.09.2007	M	2Y	UNK	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3

BP327	10.09.2007	F	3Y	UNK	NA	VH26		1	3	2	1	FIM3
BP328	10.09.2007	F	4Y	UNK	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP329	21.09.2007	F	1M	0	NA	VH2		1	3	2	2	FIM3
BP331	03.10.2007	M	5Y	4	19.05.2004	VH22		1	3	2	2	FIM3
BP332	21.10.2007	F	UNK	UNK	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP335	22.04.2008	F	1Y	UNK	NA	VH36		1	3	2	1	FIM3
BP337	08.05.2008	F	24D	0	NA	VH2		1	3	2	1	FIM3
BP339	23.06.2008	F	2Y	4	07.03.2007	VH27	27	1	3	2	2	FIM2/3 negative
BP340	28.06.2008	F	1M	0	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP341	02/07/2008	F	14Y	5	07.05.1999	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP343	05.07.2008	M	26D	0	NA	VH19		1	3	2	2	FIM2/3 negative
BP344	06.07.2008	F	2M	1	19.06.2008	VH22	27	1	3	2	2	FIM3
BP346	23.07.2008	M	2M	1	10.07.2008	VH19		1	3	3	2	FIM3
BP352	06.08.2008	F	UNK	UNK	NA	VH25	101	1	3	2	2	FIM3
BP353	13.08.2008	F	1M	0	NA	VH20	27	1	3	2	2	FIM3
BP354	16.08.2008	F	8M	3	20.06.2008	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP357	26.08.2008	F	4Y	4	06.10.2005	VH2		1	3	2	1	FIM3
BP358	28.08.2008	M	5Y	4	05.11.2004	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP360	25.08.2008	F	3Y	4	05.02.2007	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP362	30.08.2008	F	3M	1	13.07.2008	VH20		1	3	2	2	FIM3
BP363	09.09.2008	F	4M	UNK	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP364	11.09.2008	M	1M	0	NA	VH2	101	1	3	2	1	FIM3
BP365	23.09.2008	M	3M	1	18.08.2008	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP367	15.10.2008	F	1M	0	NA	VH22		1	3	2	2	FIM3

BP368	29.01.2009	M	2M	UNK	NA	VH26		1	3	2	1	FIM3
BP369	30.01.2009	F	17D	0	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP370	01.03.2009	M	1M	0	NA	VH2		1	3	2	2	FIM3
BP371	11.05.2009	M	UNK	UNK	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP373	04.06.2009	F	32Y	UNK	NA	VH22		1	3	2	2	FIM3
BP375	15.06.2009	M	3Y	4	03.01.2008	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP379	09.07.2009	M	3M	1	18.05.2009	VH25		1	3	2	2	FIM3
BP380	14.07.2009	F	14Y	5	27.09.2001	VH25		1	3	2	2	FIM3
BP381	31.07.2009	M	2M	1	06.07.2009	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP382	16.08.2009	F	1M	0	NA	VH20		1	3	2	2	FIM3
BP383	23.08.2009	F	1M	0	NA	VH28	27	1	3	2	2	FIM3
BP384	09.09.2009	M	3M	1	10.08.2009	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP387	22.01.2010	F	1M	0	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP388	29.01.2010	F	UNK	UNK	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP389	22.02.2010	F	UNK	UNK	NA	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP390	29.04.2010	F	2M	1	23.04.2010	VH20		1	3	2	2	FIM3
BP392	30.06.2010	M	3M	1	25.05.2010	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP395	05.07.2010	M	2M	0	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP398	19.07.2010	M	UNK	UNK	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP399	22.07.2010	M	1M	0	NA	VH22		1	3	2	2	FIM3
BP400	20.07.2010	F	1Y	3	01.09.2009	VH26		1	3	2	1	FIM3
BP401	28.07.2010	M	14Y	5	16.10.2001	VH32	27	1	3	2	2	FIM3
BP405	14.09.2010	M	1M	0	NA	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP406	23.09.2010	F	UNK	UNK	NA	VH29	27	1	3	2	2	FIM3
BP423	02.05.2011	M	8Y	5	17.09.2009	VH19		1	3	2	2	FIM3

BP424	03.05.2011	F	33Y	UNK	NA	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP425	12.05.2011	F	3M	1	24.03.2011	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP427	13.05.2011	M	8Y	5	27.11.2007	VH2		1	3	2	1	FIM3
BP428	12.05.2011	F	49Y	UNK	NA	VH22	27	1	3	2	2	FIM3
BP429	19.05.2011	M	3M	2	09.05.2011	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP432	18.05.2011	M	2Y	4	13.10.2010	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP433	26.05.2011	M	9Y	5	17.05.2007	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP434	27.05.2011	F	6Y	5	17.09.2010	VH30	27	1	3	2	2	FIM3
BP435	31.05.2011	M	10Y	5	14.04.2005	VH30		1	3	2	2	FIM3
BP436	01.06.2011	M	3M	1	08.04.2011	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP437	03.06.2011	M	3Y	4	07.08.2009	VH26		1	3	2	1	FIM3
BP438	06.06.2011	M	11Y	1	14.02.2005	VH31	27	1	3	2	1	FIM3
BP441	20.06.2011	M	2Y	3	05.02.2009	VH2		1	3	2	1	FIM3
BP442	27.06.2011	F	7Y	5	11.07.2007	VH30		1	3	2	2	FIM3
BP445	04.07.2011	M	5Y	4	22.11.2007	VH2		1	3	2	1	FIM3
BP446	08.07.2011	M	1M	0	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP447	06.07.2011	F	12Y	5	05.11.2004	VH32		1	3	2	2	FIM3
BP448	05.07.2011	F	61Y	UNK	NA	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP450	14.07.2011	F	1Y	3	24.08.2010	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP451	14.07.2011	F	53Y	UNK	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP452	12.07.2011	F	1Y	3	22.09.2010	VH26		1	3	2	1	FIM3
BP455	21.07.2011	M	4M	2	27.06.2011	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP456	21.07.2011	M	1M	0	NA	VH2		1	3	2	1	FIM3
BP457	18.07.2011	F	66Y	UNK	NA	VH2		1	3	2	1	FIM3
BP458	22.07.2011	M	3Y	4	04.03.2009	VH26		1	3	2	1	FIM2

BP461	22.07.2011	F	4Y	4	18.06.2008	VH19		1	3	9	2	FIM3
BP462	25.07.2011	F	56Y	UNK	NA	VH2		1	3	2	1	FIM3
BP463	24.07.2011	M	9Y	5	01.02.2006	VH33		1	3	2	1	FIM3
BP464	29.07.2011	M	1Y	3	15.09.2010	VH22		1	3	2	2	FIM3
BP465	27.07.2011	M	37Y	UNK	NA	VH2		1	3	2	1	FIM3
BP466	27.07.2011	F	20Y	UNK	NA	VH19	27	1	3	2	2	FIM3
BP467	27.07.2011	M	6Y	5	03.12.2008	VH26	28	1	3	2	1	FIM2
BP469	01.08.2011	F	8Y	5	13.11.2007	VH31		1	3	2	1	FIM3
BP471	01.08.2011	M	2M	1	12.07.2011	VH22		1	3	2	2	FIM3
BP472	02.08.2011	M	1M	0	NA	VH2		1	3	2	1	FIM3
BP474	03.08.2011	F	11M	3	16.02.2011	VH22	27	1	3	2	2	FIM3
BP476	19.08.2011	F	5M	2	22.07.2011	VH26		1	3	2	1	FIM3
BP477	25.08.2011	F	5M	2	22.08.2011	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP478	30.08.2011	F	2M	1	12.08.2011	VH2		1	3	2	1	FIM3
BP482	14.09.2011	M	1Y	3	29.10.2010	VH22		1	3	2	2	FIM3
BP483	13.09.2011	F	8M	3	17.06.2011	VH22		1	3	2	2	FIM3
BP484	25.09.2011	M	1M	0	NA	VH2		1	3	2	1	FIM3
BP491	16.12.2011	M	37Y	UNK	NA	VH26		1	3	2	2	FIM3
BP492	16.01.2012	F	2M	0	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP494	27.02.2012	F	12Y	5	26.04.2005	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP495	01.03.2012	F	23Y	UNK	NA	VH26		1	3	2	1	FIM3
BP496	25.04.2012	M	43Y	UNK	NA	VH26		1	3	2	1	FIM3
BP498	30.04.2012	M	1M	0	NA	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP502	24.05.2012	M	7Y	4	13.02.2008	VH2		1	3	2	1	FIM3
BP503	01.07.2012	M	11Y	5	23.05.2008	VH2		1	3	2	1	FIM3

BP505	03.07.2012	M	1Y	3	04.05.2011	VH31		1	3	2	1	FIM3
BP507	13.07.2012	F	33Y	UNK	NA	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP508	18.07.2012	F	12Y	5	20.10.2005	VH2		1	3	2	1	FIM3
BP509	27.07.2012	F	58Y	UNK	NA	VH2		1	3	2	1	FIM2
BP510	28.07.2012	M	1Y	3	09.01.2012	VH22		1	3	2	2	FIM3
BP511	06.08.2012	F	2Y	4	01.03.2011	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP512	14.08.2012	F	1Y	3	13.12.2011	VH33	27	1	3	2	1	FIM3
BP513	16.08.2012	F	11Y	5	15.01.2008	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP514	30.08.2012	M	46Y	UNK	NA	VH2		1	3	2	1	FIM3
BP515	03.09.2012	M	70Y	UNK	NA	VH26		1	3	2	1	FIM3
BP517	27.09.2012	M	2M	0	NA	VH20	27	1	3	2	2	FIM3
BP519	24.10.2012	F	1M	0	NA	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP520	26.10.2012	F	2M	0	NA	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP521	25.10.2012	M	2M	1	17.10.2012	VH31		1	3	2	2	FIM3
BP522	15.11.2012	M	2M	0	NA	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP524	06.12.2012	F	7M	3	30.10.2012	VH37	28	1	3	2	2	FIM3
BP525	24.01.2013	M	1M	0	NA	VH36	27	1	3	2	1	FIM2
BP526	12.04.2013	M	2M	0	NA	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP528	15.05.2013	M	8M	0	NA	VH33		1	3	2	1	FIM3
BP530	29.05.2013	M	2Y	2	15.05.2013	VH22		1	3	2	2	FIM3
BP531	24.07.2013	F	4Y	0	NA	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP532	30.08.2013	M	1Y	3	04.02.2013	VH34	27	1	3	2	1	FIM2
BP533	26.08.2013	M	3Y	4	03.02.2012	VH2		1	3	2	1	FIM2
BP534	05.09.2013	M	1M	0	NA	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP535	05.09.2013	M	1Y	3	16.11.2012	VH2		1	3	2	1	FIM2

BP536	09.09.2013	F	2M	0	NA	VH2		1	3	2	1	FIM2
BP537	07.09.2013	M	1Y	3	17.06.2013	VH34		1	3	2	1	FIM2
BP538	07.09.2013	M	10Y	5	17.06.2008	VH2	27	1	3	2	1	FIM2
BP539	06.10.2013	M	2M	0	NA	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP540	16.12.2013	M	54Y	UNK	NA	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP541	10.02.2014	F	2M	1	13.01.2014	VH31		1	3	2	2	FIM3
BP542	26.05.2014	M	10Y	5	20.07.2009	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP543	19.06.2014	M	2M	1	27.05.2014	VH35	30	1	3	1	1	FIM2
BP545	12.08.2014	M	1M	0	NA	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP546	15.08.2014	F	5M	2	02.07.2014	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP547	18.08.2014	F	42Y	UNK	NA	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP551	23.09.2014	M	3Y	4	11.10.2012	VH2		1	3	2	1	FIM2
BP552	03.10.2014	F	78Y	UNK	NA	VH38	27	1	3	9	2	FIM3
BP553	31.03.2015	F	1M	0	NA	VH26	27	1	3	2	1	FIM2
BP554	09.04.2015	F	1M	0	NA	VH2	27	1	3	2	1	FIM2
BP555	18.04.2015	M	5M	2	03.03.2015	VH20	27	1	3	2	2	FIM3
BP556	24.04.2015	M	7M	3	26.03.2015	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP557	26.04.2015	M	1Y	3	21.01.2015	VH19		1	3	2	2	FIM3
BP558	13.05.2015	F	12Y	5	08.02.2008	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP559	21.05.2015	F	1M	0	NA	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP560	29.05.2015	M	1Y	3	08.10.2014	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP561	03.06.2015	F	1M	0	NA	VH2		1	3	2	1	FIM2
BP562	17.06.2015	M	3Y	4	03.04.2013	VH26		1	3	2	1	FIM2
BP563	16.06.2015	F	36Y	UNK	NA	VH19	27	1	3	2	2	FIM3
BP564	25.06.2015	F	40Y	UNK	NA	VH26		1	3	2	1	FIM3

BP565	20.07.2015	M	4Y	4	26.09.2012	VH19	1	3	2	2	FIM3
BP567	28.07.2015	M	12Y	5	09.12.2008	VH36	1	3	2	1	FIM2
BP568	26.08.2015	M	42Y	UNK	NA	VH2	1	3	2	1	FIM2
BP569	21.09.2015	M	1M	0	NA	VH2	1	3	2	1	FIM2

NA: not applicable

UNK: unknown

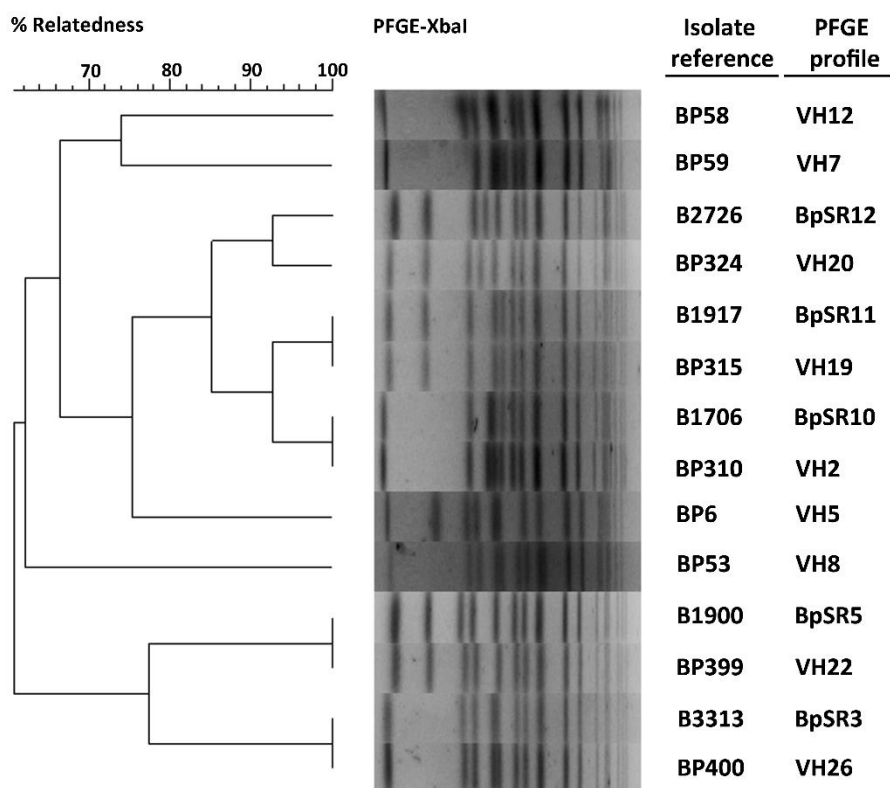


Figure S2, Supplementary Information: PFGE profiles of selected *B. pertussis* isolates included in the study and reference *B. pertussis* strains. The dendrogram was generated using the UPGMA algorithm based on the Dice similarity coefficient with 1.0% band position tolerance.

ANNEX 2. Material suplementari **Estudi 3: Estudi de l'expressió de l'antigen de la pertactina entre els aïllats clínics de *B. pertussis* productors de tosferina.**

Supplementary information. Materials and methods.

1. Bacterial isolates and study period

Among 342 *B. pertussis* clinical isolates obtained between 1986 and 2018, 260 isolates were collected at Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Catalunya), 26 isolates were collected at Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, Comunidad de Madrid), 25 isolates were collected al Hospital Universitario La Paz (Madrid, Comunidad de Madrid), 16 isolates were collected at Hospital Universitario de Salamanca (Salamanca, Castilla y León) and 15 isolates were collected at Hospital Universitario de Guadalajara (Guadalajara, Castilla la Mancha).

2. Pertactin expression

For indirect whole-cell enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), 100µl of inactivated bacterial suspension (0.1 at 620nm) was coated overnight at room temperature in polystyrene microtiter plates. Next day, Rabbit Serum (R9133, Sigma-Aldrich) with PBS at 1:100 was used to block the plate. For detection of *B. pertussis* Prn-production, a monoclonal antibody specific to PRN (97/558, NIBSC) produced in sheep was used (diluted in Rabbit Serum-PBS, 1:10.000). Alkaline-phosphatase-conjugated (Anti-sheepIgG-AP, Sigma-Aldrich) diluted 1:10.000 with Rabbit Serum-PBS was used as secondary antibody. Finally, alkaline-phosphatase substrate (S0942, Sigma-Aldrich) was added to the plate. The absorbance was measured at 405nm after 1 hour of incubation at 37°C and the addition of stop buffer (NaOH 3M). As negative control, one Prn-negative isolate collected in France was used (FR3640).

3. Whole genome sequencing and data analysis

For whole genome sequencing, DNA libraries were constructed by using Nextera DNA Flex Library Prep Kit (Illumina, San Diego) prior to sequencing with MiSeq System (Illumina, San Diego), through a 2x300 paired-end protocol. Paired-end reads were trimmed and assembled using Trimmomatic (version 0.39) and Velvet (version 2.0), respectively. The identification of mutations in the *prn* gene were performed through the CLC Genomics Workbench program and the tool BLAST (version 2.10.1). Trimmed reads were used for detecting SNP variants with Snippy (version 4.3.6), using *Bordetella pertussis* Tohama I as a reference strain (GenBank accession no. NZ_CP031787). A maximum likelihood analysis was performed with IQTree (version 1.6.10) using 1,000 bootstrap replicates. The temporal signal was analysed by plotting root-to-tip divergence versus sampling time of the maximum likelihood tree with TempEst (version 1.5.3).

Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees (BEAST version 1.10.4) was used to infer the phylogenetic dynamics. Generalised time-reversible model (GTR) of nucleotide substitution was used, which was selected as best fitting in bModelTest (version 1.2.1). Different clock models and coalescent priors were compared with path sampling with 100M chain, strict clock and uncorrelated log normal clock were tested and coalescent constant population, coalescent exponential population, and Bayesian Skyline. As result, strict clock and constant population was used to infer temporal scale of the evolutionary process.

The genome sequence reads of all 184 *B. pertussis* strains were deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> under project number PRJNA667582.

4. Statistical analysis

To assess differences between frequencies of Prn-deficient isolates between different periods of time, fisher's exact test was calculated. Two-tailed p values <0.05 were considered significant.

5. Ethical issues

The study of the *B. pertussis* isolates was approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitari Vall d'Hebron (reference number: PR(AG)694/2020).

ANNEX 3. Document d'aprovació per a la presentació de la **Tesi Doctoral com a compendi de publicacions.**



Jordi Mas Gordi, coordinador del Programa de Doctorat en MICROBIOLOGIA de la Universitat Autònoma de Barcelona

FAIG CONSTAR

Que la Comissió del Programa de Doctorat en MICROBIOLOGIA accepta la proposta de presentació de la tesi per compendi de publicacions de l'alumna **Alba Mir Cros** titulada "**Dinàmica poblacional i deriva antigènica de *B. pertussis* i el paper d'altres espècies del gènere *Bordetella* en l'emergència de la tosferina al segle XXI**", dirigida pel Dr. Juan José González López i la Dra. M^a Nieves Larrosa Escartín.

I per a que consti, signo aquest document



A Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 17 de març de 2021