

# Identificació i caracterització de proteïnes i estructures de superfície de *Bordetella pertussis* com a potencials nous candidats vacunals

**Alba Mir Cros**

Màster Universitari en Bioinformàtica i Bioestadística  
Bioinformàtica i proteòmica en virulència i malalties humanes

**Consultors: Luis Franco Serrano i Juan José González López**  
**Professor responsable de l'assignatura: Carles Ventura Royo**

24 de desembre de 2021



Aquesta obra està subjecta a una llicència de [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 3.0 Espanya de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/)

## FITXA DEL TREBALL FINAL

<b>Títol del treball:</b>	<i>Identificació i caracterització de proteïnes i estructures de superfície de Bordetella pertussis com a potencials nous candidats vacunals</i>
<b>Nom de l'autor:</b>	<i>Alba Mir Cros</i>
<b>Nom del consultor/a:</b>	<i>Luis Franco Serrano (Subàrea 8) i Juan José González López (Hospital Universitari Vall d'Hebron)</i>
<b>Nom del PRA:</b>	<i>Carles Ventura Royo (Àrea 2)</i>
<b>Data de lliurament (mm/aaaa):</b>	<i>12/2021</i>
<b>Titulació o programa:</b>	<i>Màster Universitari en Bioinformàtica i Bioestadística</i>
<b>Àrea del Treball Final:</b>	<i>Àrea 2, Subàrea 8 - Bioinformàtica i proteòmica en virulència i malalties humanes</i>
<b>Idioma del treball:</b>	<i>Català</i>
<b>Paraules clau</b>	<i>Tosferina, Bordetella pertussis, antígens vacunals</i>
<b>Resum del Treball (màxim 250 paraules):</b> <i>Amb la finalitat, context d'aplicació, metodologia, resultats i conclusions del treball</i>	
<p>Entre les possibles causes implicades en el ressorgiment de la tosferina al llarg dels darrers anys, destaca l'adaptació de <i>Bordetella pertussis</i> a la immunitat conferida per les vacunes acel·lulars (DTPa), les quals es van introduir al nostre entorn a finals dels anys noranta. És per això que en aquest treball es pretén entendre el recanvi antigènic de <i>B. pertussis</i> des del punt de vista immunològic, així com realitzar una cerca de nous candidats a ser considerats en futures composicions vacunals enfront de la tosferina.</p> <p>Per això, s'ha realitzat una exploració del genoma de <i>B. pertussis</i> a fi de fer una identificació del mecanismes patogènics del microorganisme que poguessin estar implicats en el seu procés infectiu, caracteritzant-los des del punt de vista estructural, funcional, de localització i antigèniques. Addicionalment, s'ha realitzat una caracterització immunològica de les variants al·lèliques dels factors de virulència del microorganisme inclosos en les composicions vacunals DTPa.</p> <p>Per una banda, d'entre els candidats estudiats, la HUVH-BP6, la DNT, la AC-Hly, la BapC, la BrkA i la Vag8 han sigut les proteïnes amb característiques més favorables per ser considerats bons candidats a tenir en compte en futures composicions vacunals DTPa enfront de la tosferina. Per altra banda, la variabilitat observada d'epítops de cèl·lules B i cèl·lules T entre les diferents formes al·lèliques dels antígens vacunals de <i>B. pertussis</i> inclosos en les composicions vacunals DTPa actualment utilitzades, ha pogut afavorir el recanvi antigènic del microorganisme com a mecanisme d'adaptació a la immunitat conferida per aquest tipus de</p>	

vacunes des de la seva introducció.

**Abstract (in English, 250 words or less):**

Among the possible causes involved in the resurgence of whooping cough over the last few years, stands out the adaptation of *Bordetella pertussis* to the immunity conferred by acellular vaccines (DTPa), which were introduced into our environment at the end of the 90s. That is why, the aim of the work is to understand the antigenic replacement of *B. pertussis* from an immunological point of view, as well as to carry out a search for new candidates to be considered in future vaccine compositions against pertussis.

For this purpose, an exploration of the *B. pertussis* genome has been carried out in order to identify the pathogenic mechanisms of the microorganism that could be involved in its infection process, characterising them from a structural, functional, localisation and the antigenic point of view. In addition, an immunological characterisation of the allelic variants of the virulence factors of the microorganism included in the DTPa vaccine compositions has been carried out.

On the one hand, among the candidates studied, HUVH-BP6, DNT, AC-Hly, BapC, BrkA and Vag8 were the proteins with the most favourable characteristics to be considered as good candidates to be taken into account in future pertussis DTPa vaccine compositions. On the other hand, the observed variability of B-cell and T-cell epitopes between the different allelic forms of the *B. pertussis* vaccine antigens included in the currently used DTPa vaccine compositions may have favoured the antigenic replacement of the microorganism as a mechanism of adaptation to the immunity conferred by this type of vaccine since its introduction.

# Índex

<b>1. Introducció .....</b>	<b>1</b>
1.1. Context i justificació del Treball .....	1
1.2. Objectius del Treball .....	3
1.3. Enfocament i mètode seguit.....	3
1.4. Planificació del Treball.....	4
1.5. Breu sumari de productes obtinguts .....	8
1.6. Breu descripció dels altres capítols de la memòria .....	9
<b>2. Tosferina: breu introducció .....</b>	<b>10</b>
2.1. Patogènesi de <i>Bordetella pertussis</i> .....	10
2.2. Epidemiologia de la tosferina .....	16
2.3. Vacunes i immunització .....	17
<b>3. Mètodes .....</b>	<b>19</b>
3.1. Anàlisi bioinformàtic preliminar .....	19
3.2. Estudi de proteïnes i estructures de superfície de <i>Bordetella pertussis</i> com a potencials nous candidats vacunals.....	21
3.3. Estudi dels epítops dels diferents antígens vacunals de <i>Bordetella pertussis</i> inclosos en les composicions vacunals DTPa.....	22
<b>4. Resultats i discussió .....</b>	<b>23</b>
4.1. Estudi de proteïnes i estructures de superfície de <i>Bordetella pertussis</i> com a potencials nous candidats vacunals.....	23
4.2. Estudi dels epítops dels diferents antígens vacunals de <i>Bordetella pertussis</i> inclosos en les composicions vacunals DTPa.....	55
<b>5. Conclusions .....</b>	<b>66</b>
5.1. Conclusions del treball.....	66
5.2. Assoliment dels objectius .....	66
5.3. Seguiment de la planificació i la metodologia .....	67
5.4. Perspectives futures .....	67
<b>6. Glossari .....</b>	<b>69</b>
<b>7. Bibliografia .....</b>	<b>70</b>

<b>8. Annexos .....</b>	<b>72</b>
8.1. Annex 1. Conjunt de formes al·lèliques de les molècules d'HLA de classe I i classe II més freqüents i utilitzades per dur a terme les prediccions d'epítops de cèl·lules T en les seqüències aminoacídiques de les proteïnes .....	72
8.2. Annex 2. Llistat de pèptids d'unió al MHC de classe I en les seqüències aminoacídiques de les proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics descrits de <i>Bordetella pertussis</i> i no inclosos en les composicions vacunals DTPa .....	73
8.3. Annex 3. Llistat de pèptids d'unió al MHC de classe II en les seqüències aminoacídiques de les proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics descrits de <i>Bordetella pertussis</i> i no inclosos en les composicions vacunals DTPa .....	74
8.4. Annex 4. Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops lineals de cèl·lules B en la seqüència aminoacídica de les variants al·lèliques de la FHA. ....	74
8.5. Annex 5. Llistat de pèptids d'unió al MHC de classe II en les seqüències aminoacídiques de les variants al·lèliques dels antígens vacunals de <i>Bordetella pertussis</i> inclosos en les composicions vacunals DTPa .....	76
8.6. Annex 6. Llistat de pèptids d'unió al MHC de classe II en les seqüències aminoacídiques de les variants al·lèliques dels antígens vacunals de <i>Bordetella pertussis</i> inclosos en les composicions vacunals DTPa .....	76

# Índex d'Il·lustracions

<b>Il·lustració 1.</b> Diagrama de Gantt de la planificació del treball.....	7
<b>Il·lustració 2.</b> Interacció de <i>B. pertussis</i> amb les superfícies mucoses .....	11
<b>Il·lustració 3.</b> Incidència de la tosferina a Espanya i cobertura vacunal en primovacunació ....	17
<b>Il·lustració 4.</b> Resultat gràfic obtingut de l'anotació genòmica de la soca de <i>B. pertussis</i> Tohama I mitjançant l'ús del pipeline del <i>Rapid Annotations using Subsystems Technology</i> (RAST) .....	26
<b>Il·lustració 5.</b> Representació gràfica de la presència d'epítops lineals de cèl·lules B en les principals variants al·lèliques del antígens vacunals de <i>B. pertussis</i> inclosos en les composicions vacunals DTPa .....	65
<b>Il·lustració 6.</b> Representació gràfica dels resultats obtinguts de la predicció de les regions alfa hèlix transmembrana en la seqüència aminoacídica de las proteïnes precandidates .....	465
<b>Il·lustració 7.</b> Representació gràfica dels resultats obtinguts de la predicció de les regions alfa hèlix transmembrana en la seqüència aminoacídica dels mecanismes patogènics de <i>B. pertussis</i> no inclosos en les composicions vacunals DTPa .....	44
<b>Il·lustració 8.</b> Prevalença de les variants al·lèliques dels antígens vacunals de <i>B. pertussis</i> entre els anys 1986 i 2020 i segons els períodes vacunals definits .....	56
<b>Il·lustració 9.</b> Representació gràfica de la presència d'epítops lineals de cèl·lules B en les principals variants al·lèliques del antígens vacunals de <i>B. pertussis</i> inclosos en les composicions vacunals DTPa .....	65

# Índex de Taules

<b>Taula 1.</b> Recull dels resultats obtinguts de la predicció de ORFs en el genoma de la soca de <i>B. pertussis</i> Tohama I mitjançant l'ús de diferents programes de predicció .....	11
<b>Taula 2.</b> Característiques de les proteïnes precandidates obtingudes de l'anotació genòmica de la soca de <i>B. pertussis</i> Tohama I mitjançant l'ús del Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) .....	17
<b>Taula 3.</b> Característiques de les proteïnes precandidates obtingudes de l'anotació genòmica de la soca de <i>B. pertussis</i> Tohama I mitjançant l'ús del pipeline del Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST).....	26
<b>Taula 4.</b> Estudi de la presència de la seqüència nucleotídica codificadora de les proteïnes precandidates en el genoma dels aïllats clínics BP7 i BP557 i grau d'identitat amb la seqüència gènica present en el genoma de la soca de <i>B. pertussis</i> Tohama I .....	65
<b>Taula 5.</b> Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la localització cel·lular de les proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics de <i>B. pertussis</i> no inclosos en les vacunes DTPa .....	31
<b>Taula 6.</b> Recull dels resultats obtinguts de la predicció i caracterització de la presència pèptidica de senyal en la seqüència aminoacídica de les proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics de <i>B. pertussis</i> no inclosos en les vacunes DTPa .....	33
<b>Taula 7.</b> Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència de regions barril beta transmembrana en la seqüència aminoacídica de les proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics de <i>B. pertussis</i> no inclosos en les composicions vacunals DTPa .....	46
<b>Taula 8.</b> Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops lineals de cèl·lules B en la seqüència aminoacídica de les proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics de <i>B. pertussis</i> no inclosos en les composicions vacunals DTPa .....	48
<b>Taula 9.</b> Resum dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops T en la seqüència aminoacídica de les proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics de <i>B. pertussis</i> inclosos en les composicions vacunals DTPa .....	52
<b>Taula 10.</b> Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops lineals de cèl·lules B en la seqüència aminoacídica de les variants al·lèliques de la PT .....	58
<b>Taula 11.</b> Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops de cèl·lules T en la seqüència aminoacídica de les variants al·lèliques de la PT .....	58
<b>Taula 12.</b> Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops de cèl·lules T en la seqüència aminoacídica de les variants al·lèliques de la FHA .....	59



<b>Taula 13.</b> Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops lineals de cèl·lules B en la seqüència aminoacídica de les variants al·lèliques de la PRN .....	60
<b>Taula 14.</b> Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops de cèl·lules T en la seqüència aminoacídica de les variants al·lèliques de la PRN .....	61
<b>Taula 15.</b> Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops lineals de cèl·lules B en la seqüència aminoacídica de les variants al·lèliques de la FIM2 i FIM3 .....	62
<b>Taula 16.</b> Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops de cèl·lules T en la seqüència aminoacídica de les variants al·lèliques de la FIM2 i FIM3 .....	62

# 1. Introducció

## 1.1. Context i justificació del Treball

Entre les causes que es postulen que poden haver contribuït a la reemergència de la tosferina al llarg de les dues últimes dècades com una important amenaça per a la salut global s'inclouen l'ús de vacunes menys immunògenes, les quals generen respostes immunes menys perllongades en el temps i l'adaptació de *Bordetella pertussis* a la immunitat induïda per les vacunes de cel·lulars (DTPa) actualment utilitzades, mitjançant estratègies com el recanvi antigènic o la pèrdua d'expressió d'antígens inclosos en les composicions vacunals utilitzades<sup>1-3</sup>. L'ús actual de vacunes menys immunògenes enfront de la tosferina ve condicionat pel recanvi vacunal que va tenir lloc al llarg dels anys 90 a la majoria de països desenvolupats. Fins llavors, les vacunes de cèl·lules completes (DTPw) eren les que s'utilitzaven per immunitzar la població enfront de la tosferina, unes vacunes compostes per la totalitat del microorganisme inactivat. No obstant això, degut a la gran reactogenicitat d'aquestes i als efectes adversos observats després de la seva administració, tant a nivell local com a nivell sistèmic, es va esdevenir el seu reemplaçament a favor de les actualment utilitzades vacunes DTPa, unes vacunes compostes per fins a cinc antígens purificats i inactivats del microorganisme, entre els quals es troben la toxina pertussis (PT), la hemaglutinina filamentosa (FHA), la pertactina (PRN), la fímbria de tipus 2 (FIM2) i la fímbria de tipus 3 (FIM3). És per això que, la reemergència de la tosferina coincidint amb la introducció de les vacunes DTPa compostes per menys immunògens podria haver estat, en gran part, propiciada pel recanvi vacunal que va tenir lloc entre finals del segle XX i principis del segle XXI<sup>4</sup>.

Els estudis de la dinàmica poblacional i la deriva antigènica de *B. pertussis* productora de tosferina han permès evidenciar com, coincidint amb la introducció de les vacunes DTPa, han aparegut nous llinatges de *B. pertussis* que han anat reemplaçant gradualment les variants vacunals. En aquestes poblacions, s'han observat polimorfismes en l'operó que codifica la TP (*ptx*), especialment en la subunitat A (*ptxA*), la qual alberga l'activitat tòxica i és considerada la subunitat immunodominant), en el seu promotor (*ptxP*) i en el gens que codifiquen la PRN (*prn*) i la FIM3 (*fim3*). Així, els resultats de diversos estudis de tipificació han demostrat una gran expansió de les noves formes al·lèliques *prn2* i *fim3-2* coincidint amb la introducció de les vacunes DTPa, les quals no codifiquen les formes antigèniques incloses en aquestes composicions vacunals. Aquestes, juntament amb la variant al·lèlica *ptxA1*, la qual codifica una forma antigènica tampoc inclosa en les vacunes DTPa i observada com a variant majoritària

des dels anys 80, formen el perfil al·lèlic majoritàriament present en els aïllats de *B. pertussis* productors de tosferina que circulen en l'actualitat<sup>5-7</sup>. Addicionalment i coincidint amb la introducció de les vacunes DTPa s'ha detectat una expansió del promotor *ptxP3*, el qual s'ha relacionat amb l'increment de l'expressió de la PT, 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*)<sup>8</sup>.

De la mateixa manera, s'han posat de manifest aïllats de *B. pertussis* que deixen d'expressar els antigens inclosos en les vacunes DTPa, principalment la pertactina, però també la toxina pertussis, l'hemaglutinina filamentosa o les fímbries, mantenint la virulència i la capacitat per produir malaltia<sup>9-13</sup>. D'aquesta forma, l'emergència i disseminació de soques que expressen antigens vacunals que posseeixen epítops no reconeixibles pel anticòs generats mitjançant l'administració de les vacunes DTPa, així com la pèrdua de la pròpia expressió d'aquests antigens, comprometria seriosament l'eficàcia de les vacunes actualment utilitzades en la immunització enfront de la tosferina. Aquest fet apuntaria a que *B. pertussis* s'hauria adaptat a la immunitat induïda per les vacunes DTPa, podent ser aquest un dels factors més rellevants que hagi contribuït al ressorgiment de la malaltia en el nostre entorn des de principis del segle XXI<sup>14</sup>.

Així, la realització d'aquest estudi permetrà ampliar el coneixement dels factors implicats en el procés infectiu de *B. pertussis* productora de tosferina, caracteritzant el repertori antigènic complet del microorganisme, així com identificant la variabilitat entre els epítops dels diferents al·lèls dels antigens vacunals. Aquestes troballes podran ser traslladades a la pràctica clínica assistencial, podent ser de gran utilitat alhora d'avaluar les recomanacions en quant a la idoneïtat de les vacunes que actualment s'estan utilitzant enfront de la malaltia i les que es poden utilitzar en un futur, així com la necessitat de modificar la pauta vigent de vacunació contemplada al calendari sistemàtic de vacunacions. Addicionalment, el treball realitzat en aquest estudi podrà ser de gran utilitat per identificar possibles antigens candidats a ser considerats en l'elaboració de futures composicions vacunals enfront de *B. pertussis* que poguessin generar una resposta immune òptima en l'hoste que evités la colonització i la infecció per part d'aquest microorganisme. El disseny i l'enfoc de l'estudi està dirigit a aconseguir la integració de les dades microbiològiques, genòmiques i proteòmiques amb les dades clíniques i epidemiològiques, el que permetrà donar resposta als problemes existents en relació a la prevenció de la tosferina causada per *B. pertussis*.

## 1.2. Objectius del Treball

L'**objectiu general** del present treball és:

- I. Estudiar el repertori complet de factors de virulència de *B. pertussis* productora de tosferina involucrats en el procés infectiu, posant el focus en aquells factors de virulència implicats en la interacció amb el sistema immune de l'hoste.

Amb això, els diversos **objectius específics** que es plantegen són:

- i. Identificar i caracteritzar proteïnes i estructures de superfície de *B. pertussis* com a potencials nous candidats a ser considerats en el desenvolupament o millora de futures vacunes enfront de la tosferina.
- ii. Identificar i caracteritzar els epítops de les diverses variants al·lèliques d'un mateix factor de virulència de *B. pertussis* inclòs en les composicions vacunals utilitzades que poguessin condicionar un menor reconeixement per part de la immunitat induïda per les vacunes antipertússiques utilitzades.

## 1.3. Enfocament i mètode seguit

L'estratègia a seguir per tal d'assolir els objectius plantejats consisteix, a grans trets, en realitzar l'estudi del repertori antigènic complet de *B. pertussis* productor de tosferina mitjançant un enfocament a nivell proteòmic. Per això, el disseny del present estudi inclou els següents aspectes:

### I. MOSTRA

Per la realització de l'estudi es disposa d'una àmplia col·lecció que alberga 384 aïllats clínics de *B. pertussis* productors de tosferina recollits a l'Hospital Universitari Vall d'Hebron al llarg del període 1986-2020. Així, entre aquests s'inclouen aïllats obtinguts del període d'ús exclusiu de les vacunes DTPw (1986-1997), aïllats recollits durant el període de transició entre les vacunes DTPw i les vacunes DTPa (1998-2005) i aïllats obtinguts del període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa (2006-actualitat). Per a tots ells s'ha realitzat la seqüenciació de genomes complets a través de la plataforma *MiSeq* (Illumina) i mitjançant el protocol *2x300 paired-end*. Prèviament i per l'elaboració de les llibreries genòmiques s'ha utilitzat el protocol *Nextera DNA Flex Library Prep Kit* (Illumina), segons indicacions del fabricant. D'aquesta manera, es disposa del conjunt de *reads* obtinguts de la seqüenciació de genomes complets d'aquesta col·lecció d'aïllats.

Adicionalment, es compta amb els *reads* resultants de la seqüenciació de la soca de *B. pertussis* de referència i dipositats en bases de dades públiques (Tohama I, *GenBank accession no.* NZ\_CP031787).

## II. PROCEDIMENTS

Els procediments duts a terme per a la realització del treball inclouen una exploració del genoma de *B. pertussis* a fi de fer una identificació dels mecanismes patogènics coneguts i no coneguts del microorganisme que pugin estar implicats en el seu procés infectiu mitjançant una estratègia similar a la vacunologia inversa. Així, realitzar una descripció de les característiques estructurals, funcionals, antigèniques i de localització de tots ells mitjançant eines de predicció per tal de poder proposar possibles nous candidats robusts a ser inclosos en futures composicions vacunals DTPa enfront de la tosferina. D'altra banda, s'han estudiat, des del punt de vista antigènic, les diverses formes al·lèliques dels antigens de *B. pertussis* inclosos en les actuals composicions vacunals DTPa per tal d'esbrinar si el recanvi antigènic dut a terme pel microorganisme al llarg dels últims anys des de la introducció d'aquest tipus de vacunes ha pogut estar propiciat per l'ús de les vacunes DTPa per immunitzar la població enfront de la tosferina.

### 1.4. Planificació del Treball

El present treball s'ha realitzat durant el transcurs del primer semestre del curs 2021/22, amb inici al dia 15 de setembre de 2021 i finalització prevista pel dia 21 de gener de 2022. La planificació del treball realitzat amb el conjunt de les tasques i les fites plantejades, així com el calendari definit es mostra a continuació:

#### A. PAC0-Definició dels continguts del treball, 15.09.2021 – 22.09.2021

- a. Plantejament de la temàtica escollida per la realització de l'estudi i valoració de la problemàtica a resoldre.
- b. Definició dels objectius de l'estudi.
- c. Redacció del document per a la realització de l'entrega avaluable.

FITA A. Obtenció d'un document on quedin plasmats els primers continguts del treball com són el tema escollit, la problemàtica a resoldre i els objectius de l'estudi.

**B. PAC1-Pla de treball, 23.09.2021 – 04.10.2021**

- a. Construcció del context teòric i la justificació de l'estudi.
- b. Definició dels objectius de l'estudi.
- c. Estructuració de l'enfoc i la metodologia a seguir per a la realització de l'estudi.
- d. Planificació de les tasques a realitzar i definició de les fites a aconseguir durant la realització de l'estudi.
- e. Redacció del document per a la realització de l'entrega avaluable.

FITA B. Obtenció d'un document on quedi recollit el pla de treball a seguir, incloent la metodologia que s'utilitzarà, el conjunt de tasques a realitzar i les fites a obtenir, així com la temporalització dels tots procediments de l'estudi.

**C. PAC2-Desenvolupament del treball-Fase 1, 05.10.2021 – 08.11.2021**

- a. Anàlisi bioinformàtic preliminar, 05.10.2021 – 12.10.2021.
  - i. Avaluació de la qualitat i processament dels *reads*
  - ii. Assemblatge *de novo*
  - iii. Anotació genòmica
- b. Estudi de proteïnes i estructures de superfície de *B. pertussis* com a potencials nous candidats vacunals, 13.10.2021 – 01.11.2021.
  - i. Predicció de ORFs i búsqueda d'homologia entre ORFs
  - ii. Predicció de característiques estructurals, funcionals i de localització
- c. Redacció del document per a la realització de l'entrega avaluable, 25.10.2021 – 08.11.2021.

FITA Ca. Identificació de ORFs implicats en el procés infectiu de *B. pertussis* i determinació de les seves característiques estructurals, funcionals i de localització.

FITA Cb. Obtenció d'un document on quedi plasmat un seguiment del treball realitzat i els resultats preliminars obtinguts durant la primera fase de l'estudi.

**D. PAC3-Desenvolupament del treball-Fase 2, 09.11.2021 – 09.12.2021**

- a. Estudi de proteïnes i estructures de superfície de *B. pertussis* com a potencials nous candidats vacunals, 09.11.2021 – 16.11.2021.
  - i. Predicció de característiques estructurals, funcionals i de localització
- b. Estudi dels epítops dels diferents antígens vacunals de *B. pertussis* inclosos en les composicions vacunals DTPa, 17.11.2021 – 02.12.2021.
  - i. Predicció dels epítops dels antígens PT, FHA, PRN, FIM2 i FIM3

- ii. Comparació dels epítops entre variants al·lèliques d'un mateix determinant de virulència
- c. Redacció del document per a la realització de l'entrega avaluable, 25.11.2021 – 09.12.2021.

FITA Da. Aproximació de candidats vacunals per ser considerats en futures composicions vacunals i identificació de diferències entre epítops de diferents variants al·lèliques d'un mateix determinant de virulència.

FITA Db. Obtenció d'un document on quedi plasmat un seguiment del treball realitzat i els resultats preliminars obtinguts durant la segona fase de l'estudi.

**E. PAC4-Tancament de la memòria, 10.12.2021 – 24.12.2021**

- a. Acabament i redacció dels continguts finals de la memòria.

FITA E. Obtenció de la memòria on quedi recollit el desenvolupament complet de l'estudi dut a terme.

**F. PAC5a-Elaboració de la presentació, 27.12.2021 – 03.01.2022**

- a. Elaboració de les transparències per a la presentació del treball realitzat.

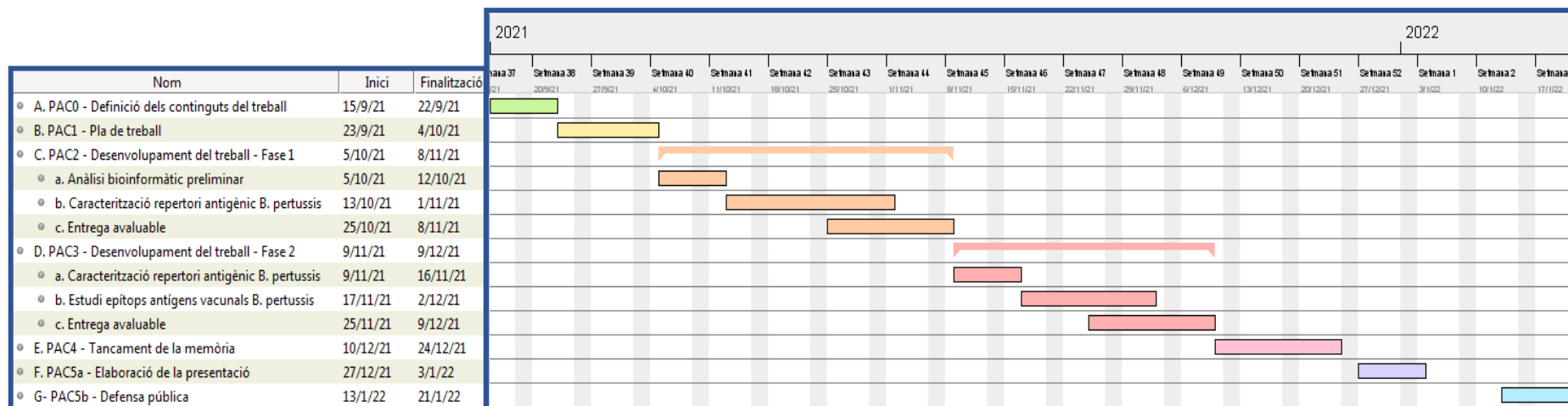
FITA F. Obtenció de la presentació on quedi recollida de forma resumida el desenvolupament de l'estudi dut a terme.

**G. PAC5b-Defensa pública, 13.01.2022 – 21.01.2022**

- a. Preparació i realització de la defensa pública del treball realitzat.

FITA G. Exposició i discussió del treball realitzat i dels resultats obtinguts amb els membres del tribunal.

El diagrama de Gantt que es mostra a continuació recull la temporalització de les tasques i fites definides per al desenvolupament del treball.



Il·lustració 1. Diagrama de Gantt de la planificació del treball [Il·lustració original].



## 1.5. Breu sumari de productes obtinguts

Els conjunt de productes obtinguts del present treball es divideixen en dues categories:

### A. Documents presentats a la Universitat Oberta de Catalunya (UOC) en forma de proves d'avaluació continuada (PACs) per el seguiment i avaluació del treball:

- a. Continguts del treball (PAC0): document que recull el tema escollit, la problemàtica a resoldre i els objectius de l'estudi.
- b. Pla de treball (PAC1): document que recull la organització inicial de les tasques a realitzar durant el desenvolupament del treball, així com la metodologia emprada i la temporalització de tots els procediments de l'estudi.
- c. Informes de seguiment del desenvolupament del treball (PAC2 i PAC3): documents que recullen les tasques realitzades en cada bloc de treball, així com els resultats preliminars obtinguts, les desviacions temporals que s'hagin pogut donar i les accions de mitigació aplicades en cas que sigui necessari.
- d. Memòria del treball: document amb la descripció del context, el desenvolupament del treball i les anàlisis del conjunt de resultats obtinguts.
- e. Presentació virtual: document multimèdia (presentació en format PowerPoint) que reculli un breu resum dels continguts del treball.

### B. Productes obtinguts amb el desenvolupament del treball:

- a. Base de dades amb els resultats de l'anotació genòmica de *B. pertussis* obtinguda amb dos pipelines d'anotació diferents, el PGAP (*Prokaryotic Genome Annotation Pipeline*), disponible en el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) i el *Rapid Annotations using Subsystems Technology* (RAST).
- b. Llista de proteïnes de *B. pertussis* precandidates a ser considerades per a futures composicions vacunals enfront de la tosferina.
- c. Descripció de les característiques estructurals, funcionals, antigèniques i de localització de les proteïnes de *B. pertussis* precandidates, així com dels mecanismes patogènics de *B. pertussis* descrits i no inclosos en les composicions vacunals DTPa.
- d. Llistat d'epítops lineals de cèl·lules B i epítops de cèl·lules T de les diferents variants al·lèliques dels mecanismes patogènics de *B. pertussis* incloses en les actuals composicions vacunals DTPa.

## 1.6. Breu descripció dels altres capítols de la memòria

Els continguts que inclouen la resta de capítols de la present memòria són:

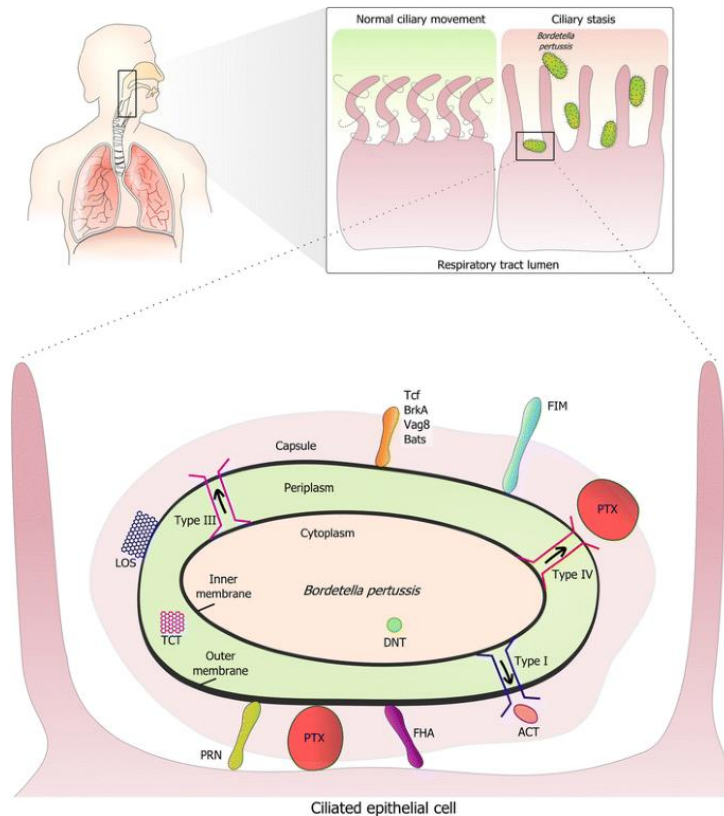
- En el capítol 2 es presenta una breu introducció sobre la tosferina, incloent aspectes com la patogènesi i els mecanismes patogènics de *Bordetella pertussis*, la composició i característiques de les vacunes disponibles a Espanya enfront d'aquesta malaltia i les pautes d'immunització vigents, així com l'evolució de l'epidemiologia de la tosferina al llarg de la història de la malaltia.
- En el capítol 3 es recull i detalla la metodologia emprada per al desenvolupament del treball.
- En el capítol 4 s'exposen el conjunt de resultats obtinguts, estructurats segons els objectius del treball definits i juntament amb la reflexió i discussió dels mateixos.
- En el capítol 5 es presenten les conclusions del treball, així com una breu reflexió sobre els objectius assolits i una anàlisi del seguiment de la planificació fixada i la metodologia emprada al llarg de la realització del treball.
- Els capítols 6 i 7 inclouen el glossari i la bibliografia, respectivament.
- En el capítol 8 o Annex s'hi recull la informació i la llista d'arxius rellevants per al desenvolupament del treball.

## 2. Tosferina: breu introducció

La tosferina és una malaltia infecciosa aguda causada generalment per *Bordetella pertussis*, un coccobacil gramnegatiu, de reservori exclusivament humà i amb una elevada transmissibilitat 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, observant-se majoritàriament en edat preescolar y escolar. Encara que els adolescents y els adults són el principal reservori del microorganisme, jugant un paper crucial en la seva transmissió, són els infants menors de 3 mesos els que presenten la major incidència de la malaltia i també les formes més greus, requerint sovint, de suport vital avançat<sup>15</sup>.

### 2.1. Patogènesi de *Bordetella pertussis*

*B. pertussis* és un bacteri patogen que estableix infecció per via respiratòria i roman localitzat 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 al sèrum i sistemes de regulació (Il·lustració 2). La producció de tots aquests determinants de virulència permet l'adherència 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 immunomodulador de *B. pertussis* i per la resposta al dany tissular causat durant la pròpia infecció<sup>15</sup>.



**Il·lustració 2.** Interacció de *B. pertussis* amb les superfícies mucoses. **Figura de Ilse Jongerius et al. 2015<sup>16</sup>.**

L'hemaglutinina filamentosa (FHA), les fimbries (FIM) i la pertactina (PRN) són tres determinants de virulència de *B. pertussis* que juguen un paper fonamental durant el procés d'unió a l'epiteli respiratori. La toxina pertussis (PT), 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 ciclasa-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 cel·lular amb un paper important en la resistència al sèrum. Per a la regulació de tots ells, *B. pertussis* presenta l'operó *bvg*, compost per *bvgA* i *bvgS*, els quals formen el sistema de transducció de senyals de dos components que controla els estats o fases virulents i avirulents de *B. pertussis*, l'expressió dels quals està regulada per factors ambientals. La major part del dany tissular local a les cèl·lules epitelials ciliades està produït per l'acció de la citotoxina traqueal (TCT) i la toxina dermonecròtica (DNT). A diferència d'altres malalties bacterianes, hi ha poques manifestacions sistèmiques associades a la infecció per *B. pertussis* ja que aquesta no sol penetrar al torrent sanguini ni es dissemina. Tot i això, la PT 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<sup>15,17</sup>.

Els principals mecanismes patogènics coneguts de *B. pertussis* s'exposen i descriuen a continuació<sup>15</sup>:

### **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 de forma activa en el seu alliberament.

- **Toxina pertussis (*pertussis toxin*, PT)**

La PT és una proteïna periplasmàtica de 94 kDa formada per cinc subunitats produïda per *B. pertussis*, sent la seva principal i característica toxina. Es tracta d'una exotoxina de tipus AB<sub>5</sub> 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 de la secreció d'insulina. Tot això, en conjunt, 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, la PT modifica la capacitat de resposta de les cèl·lules T i indueix la producció d'immunoglobulina (Ig) E, responsable de la immunitat perllongada generada per l'organisme enfront de la malaltia. És considerat un important immunogen, per la qual cosa és un dels principals components de les vacunes DTPa.

- **Citotoxina traqueal (*tracheal cytotoxin*, TCT)**

La TCT és una exotoxina de 9,2 kDa en forma de 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 proinflamatòries, 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 paroxismes.

- 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 25kDa i 18kDa, respectivament. 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'adenilat ciclasa com d'hemolisina, 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.

- 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). Es tracta d'una toxina termolàbil, de la qual es desconeix amb exactitud el seu paper en la patogènesi de la malaltia. En ratolins i primats s'ha observat que, a diferents dosis, produeix vasoconstricció i necrosis isquèmica local. Així Tot i que falten evidències, és probable que en humans produeixi la destrucció localitzada del teixit del tracte respiratori.

- Lipopolisacàrid (*lipopolysaccharide*, LPS)

El LPS és una endotoxina que confereix protecció al bacteri enfront de la lisi cel·lular vehiculada pel complement. El LPS de *B. pertussis* està compost pel nucli oligosacàrid i el lípid A, és el principal responsable de la presència de febre després de la immunització amb les vacunes DTPw i, encara que presenta propietats antigèniques i adjuvants, no té capacitat protectora, no sent un dels components de les vacunes DTPa.

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

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

## **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, així com dels 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 autotransportadora 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). 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 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. Es tracta d'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·lèls 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 principals de la majoria de composicions vacunals DTPa.

- **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. Es tracta d'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 (*two partner secretion*, 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 vacunals DTPa.

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

Les FIM són projeccions filamentoses de naturalesa proteica de la superfície bacteriana. 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 dels gens *fim2* i *fim3*. Ambdós tipus 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 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, estant incloses en algunes de les composicions vacunals DTPa.

- 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. El primer, a banda de ser una proteïna de superfície és també una proteïna secretada de 60 kDa, 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 altres.

### **Factors de resistència al sèrum**

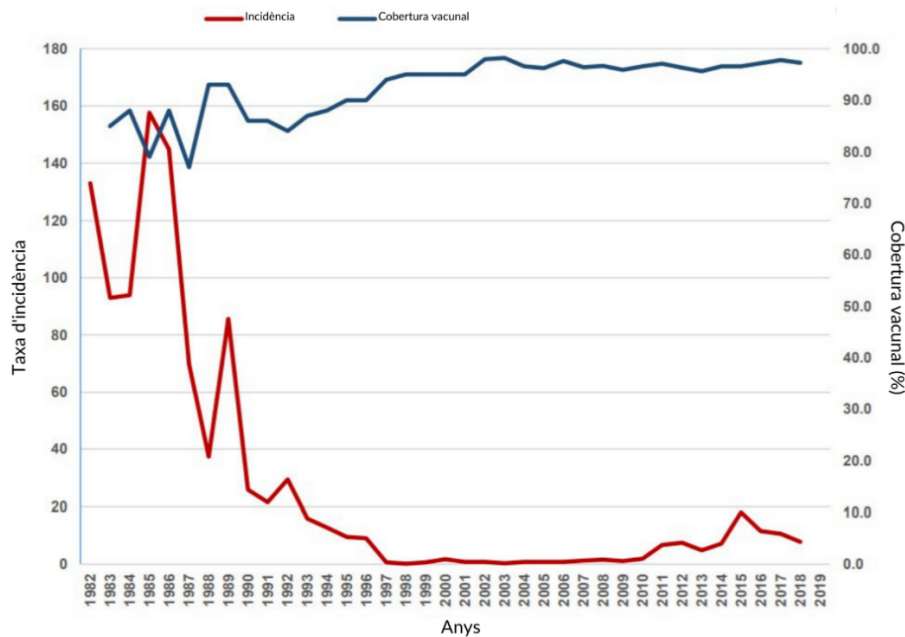
*B. pertussis* utilitza nombroses estratègies per evadir el sistema immunològic, inclosa la capacitat per resistir a la mort a través del complement. En aquest sentit, les proteïnes autotransportadores de superfície Vag8 i BrkA, d'aproximadament 100 kDa i 73 kDa, respectivament, són els principals factors de resistència al sèrum del microorganisme. Concretament, Vag8 actua unint-se a l'inhibidor d'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 membrana.

## 2.2. Epidemiologia de la tosferina

Des de que les vacunes enfront de la tosferina es troben incloses al calendari sistemàtic de vacunació infantil espanyol, la incidència de la malaltia ha anat disminuint (Il·lustració 3). Així, des de finals dels anys vuitanta y fins a principis dels anys 2000, la taxa d'incidència a Espanya es va mantenir al voltant d'1 cas per cada 100.000 habitants. No obstant això, a partir de l'any 2010 s'ha observat un fort augment en el nombre de casos, registrant-se uns valors d'incidència per als dos últims anys epidèmics de la malaltia de 7,98 casos per cada 100.000 habitants l'any 2011 i incrementant-se fins als 18,92 casos per cada 100.000 habitants l'any 2015. Així, 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 principis del segle XXI, observada tant en els anys epidèmics com en els períodes interepidèmics i malgrat la implementació d'extenses campanyes de vacunació i les elevades taxes d'immunització. 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 2005. Així, 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 el 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<sup>18</sup>.



**Il·lustració 3.** Incidència de la tosferina a Espanya i cobertura vacunal en primovacunació. **Figura modificada del Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III. Tasas de incidencia de tosferina y cobertura con la serie primaria de vacunación con DTPw/DTPa, España 1982-2018<sup>19</sup>.**

Disponible a l'enllaç:

[https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20A-Z/TOSFERINA/Gr%C3%A1fico\\_%20tosferina\\_2019.pdf](https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20A-Z/TOSFERINA/Gr%C3%A1fico_%20tosferina_2019.pdf).

### 2.3. Vacunes i immunització

A Espanya, la vacunació enfront de la tosferina es va iniciar l'any 1965, utilitzant-se dos tipus de vacuna antipertússica des de llavors i fins a dia d'avui. La primera, una vacuna inactivada de cèl·lules completes o cel·lular (DTPw), la qual es va començar a administrar a Espanya des de l'any 1965, es tracta d'una vacuna composta per una gran quantitat d'antígens que, degut als seus efectes adversos sistèmics i locals i a una gran variabilitat entre lots, va deixar d'utilitzar-se a finals de la dècada dels noranta. El segon tipus de vacunes, denominades acel·lulars (DTPa), van reemplaçar progressivament a les primeres al llarg del període 1998-2005 a Espanya. Les DTPa estan compostes per combinacions de fins a cinc antígens de *B. pertussis*, entre els que s'inclouen la toxina pertussis (PT), l'hemaglutinina filamentosa (FHA), la pertactina (PRN) i les fímbries de tipus 2 i 3 (FIM2 i FIM3), i concretament les formes al·lèliques *ptxA2/4*, *fhaB1*, *prn1/7*, *fim2-1* i *fim3-1*. 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<sup>15</sup>.

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<sup>20</sup>:

- 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 *Comité Asesor de Vacunas (CAV)* de l'*Asociación Española de Pediatría (AEP)* de considerar 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 la dona embarassada amb una dosi de dTpa en cada embaràs a partir de la setmana 27 de gestació, preferentment en la setmana 27 o 28.

## 3. Mètodes

### 3.1. Anàlisi bioinformàtic preliminar

#### 3.1.1. Avaluació de la qualitat i processament dels *reads*

Primerament, per tal d'avaluar la qualitat dels *reads* obtinguts s'ha utilitzat els recurs FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Posteriorment i per tal de filtrar i eliminar els *reads* erronis generats durant la seqüenciació s'ha aplicat l'eina Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>), utilitzant els següents criteris pel filtratge dels *paired end reads*:

- Eliminar les bases amb una qualitat inferior a 3 o N.
- Escanejar els *reads* amb una finestra corredissa de 4 bases d'ample, tallant quan la qualitat mitjana per base caigui per sota de 15.
- Eliminar els *reads* de menys de 36 bases de llarg.

#### 3.1.2. Assemblatge *de novo*

S'ha realitzat l'assemblatge *de novo* dels genomes dels aïllats mitjançant eines útils per a l'obtenció de *contigs* com SPAdes o Velvet, disponibles en entorns com Unicycler o Ridom SeqSphere+.

Paral·lelament, per alguns dels aïllats s'ha realitzat la seqüenciació de genomes complets utilitzant dues tecnologies de seqüenciació diferents, mitjançant les plataformes MiSeq (Illumina) i MinION (Oxford Nanopore Technologies). L'ús combinat d'ambdues tecnologies, amb les quals s'obtenen *short-reads* i *long-reads*, respectivament, permet obtenir la seqüència completa dels cromosomes bacterians, podent-se recuperar la totalitat de gens que un microorganisme pot posseir, així com conèixer la contribució de certs esdeveniments genètics com són els reordenaments genòmics. L'anàlisi que s'ha dut a terme de forma posterior a la seqüenciació de genomes complets per tal d'obtenir els assemblatges dels aïllats inclou els següents passos:

- Processament *post-run* MiSeq: en aquesta primera fase de processament de les lectures obtingudes després del procés de seqüenciació amb la plataforma MiSeq (Illumina), s'ha avaluat la qualitat dels *short-reads* obtinguts mitjançant el recurs FastQC, així com s'ha realitzat un filtratge de qualitat dels mateixos mitjançant l'eina Trimmomatic.

- Processament *post-run* MinION: en aquesta primera fase de processament de les lectures obtingudes després del procés de seqüenciació amb la plataforma MinION (Oxford Nanopore Technologies), s'ha realitzat la búsqueda i la demultiplexació dels *long-reads*, així com l'eliminació dels adaptadors mitjançant el programa Porechop. Posteriorment, s'ha utilitzat l'eina Filtrlong per realitzar un filtratge de qualitat dels *long-reads* resultants.
- Assemblatge híbrid: s'ha obtingut un assemblatge híbrid de *short-reads* i *long-reads* com a producte de la integració dels *reads* filtrats d'Illumina i dels *reads* d'Oxford Nanopore a través de Unicycler.

### 3.1.3. Anotació genòmica

Entre les eines que es poden utilitzar per l'anotació genòmica es troben el PGAP (*Prokaryotic Genome Annotation Pipeline*), disponible en el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) o el programa d'anotació genòmica *Rapid Annotations using Subsystems Technology* RAST, els quals utilitzen dues aproximacions diferents per tal d'obtenir una anotació. Per una banda, el *pipeline* del NCBI combina la predicció de gens *de novo* amb la detecció basada en similitud. Per la seva banda, el *pipeline* del RAST utilitza un enfoc bastant allunyat del que utilitzen altres *pipelines*. Així, RAST fa ús d'una llibreria de subsistemes (conjunt de rols funcionals), curada manualment, i de famílies de proteïnes derivades d'ells. Es tracta de *pipelines* versàtils i personalitzables, amb els quals es pot combinar l'ús de diferents estratègies i bases de dades com UniProt/SwissProt, RefSeq, TIGRFAMs, FIGfams, COG o Pfam. Altres eines que es podien haver utilitzat per la realització de l'anotació genòmica són el Prokka o el bakta.

Així, mitjançant l'anotació genòmica s'han pogut identificar les posicions, les funcions i la informació associada a tots els gens, regions codificants i característiques rellevants del genoma de la soca de *B. pertussis* Tohama I. En primer lloc, l'anotació estructural ha permès identificar gens i altres llocs amb rellevància biològica, amb les seves posicions en el genoma i estructura, mentre que, posteriorment, l'anotació funcional ha ajudat a determinar les funcions i tota la informació biològica rellevant de cada un dels llocs anotats.

## 3.2. Estudi de proteïnes i estructures de superfície de *Bordetella pertussis* com a potencials nous candidats vacunals

### 3.2.1. Predicció de ORFs i cerca d'homologia entre ORFs

S'ha realitzat la cerca de ORFs (*open reading frames*) mitjançant programes especialitzats en la predicció de ORFs a partir de seqüències de DNA, com per exemple, ORFfinder (NCBI), StartORF, Microscope, GeneMark i EasyGene. Per tal d'estudiar la homologia entre els ORFs seleccionats i les seqüències de DNA caracteritzades i amb funcionalitat coneguda disponibles en bases de dades públiques s'han utilitzat programes com FASTA (sequence comparison/homology search), Standard Protein BLAST (blastp) o Translated BLAST (blastx).

En aquest apartat s'han considerat aquells ORFs conservats en l'espècie presents en el conjunt de genomes estudiats i que, a més a més, no presentin variabilitat entre aïllats en quant a la identitat de la seva seqüència nucleotídica.

### 3.2.1. Predicció de característiques estructurals, funcionals i de localització

En aquest apartat s'han utilitzat una sèrie d'eines informàtiques per tal de predir les característiques proteiques, tant a nivell estructural i funcional com a nivell de localització d'aquells ORF sense homologia coneguda (*putative proteins*). Alguns dels programes basats en algorismes que s'han utilitzat són:

- PSORTb 3.0: predicció de la ubicació de proteïnes en bacteris Gramnegatius (<https://www.psort.org/psortb/>)<sup>21</sup>.
- SignalP 5.0: predicció de la presència i ubicació de llocs d'escissió de la peptidasa senyal I (SPaseI) (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>)<sup>22</sup>.
- TMHMM 2.0 i TBBpred: identificació de motius estructurals de tipus hèlix transmembrana o barrils beta en la conformació de proteïnes (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0> i <http://crdd.osdd.net/raghava/tbbpred/>)<sup>23,24</sup>.
- BepiPred 2.0: identificació d'epítops de cèl·lules B (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?BepiPred-2.0>)<sup>25</sup>.
- IEDB: identificació d'epítops de cèl·lules T mitjançant la predicció de pèptids d'unió a molècules MHC (*major histocompatibility complex*) de classe I i classe II (<http://tools.iedb.org/main/tcell/>)<sup>26</sup>.

### 3.3. Estudi dels epítops dels diferents antígens vacunals de *Bordetella pertussis* inclosos en les composicions vacunals DTPa

#### 3.3.1. Predicció dels epítops dels antígens PT, FHA, PRN, FIM2 i FIM3

En aquest apartat s'han cercat mitjançant eines de predicció els epítops dels antígens de *B. pertussis* inclosos en les actuals composicions vacunals DTPa, els quals són la subunitat A de la PT (*ptxA*), la FHA (*fhaB*), la PRN (*prn*), la FIM2 (*fim2*) i la FIM3 (*fim3*). Per una banda, s'han identificat els pèptids lineals d'unió a cèl·lules B mitjançant el programa de predicció BepiPred 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?BepiPred-2.0>) i per altra banda, s'han identificat els pèptids d'unió a molècules MHC de classe I i molècules MHC de classe II a través dels programes de predicció que inclou la base de dades d'epítops de cèl·lules T IEDB (<http://tools.iedb.org/main/tcell/>)<sup>25,26</sup>.

#### 3.3.2. Comparació dels epítops entre variants al·lèliques d'un mateix determinant de virulència

S'ha realitzat una comparativa entre els epítops trobats per les diferents variants al·lèliques majoritàriament observades entre els aïllats de *B. pertussis* productors de tosferina per tal d'estudiar la seva implicació en una disminució de la immunitat induïda per part de les vacunes DTPa, així com la capacitat adaptativa del microorganisme a la immunitat poblacional.

## 4. Resultats i discussió

### 4.1. Estudi de proteïnes i estructures de superfície de *Bordetella pertussis* com a potencials nous candidats vacunals

#### 4.1.1. Predicció de ORFs i búsqueda d'homologia entre ORFs

Per a la realització d'una primera aproximació en la descripció i caracterització del conjunt de ORFs presents en el genoma de *B. pertussis*, s'ha realitzat una predicció inicial de ORFs utilitzant el genoma de la soca de *B. pertussis* més comunament utilitzada com a soca de referència, la soca Tohama I. El genoma complet assemblet d'aquesta soca s'ha obtingut de la base de dades pública *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), on es troba disponible amb la referència NZ\_CP031787.1.

La Taula 1 recull els resultats obtinguts de la predicció de ORFs mitjançant diversos programes de predicció:

**Taula 1.** Recull del resultats obtinguts de la predicció de ORFs en el genoma de la soca de *B. pertussis* Tohama I mitjançant l'ús de diferents programes de predicció.

ORF Finder			GeneMarkS		
Característiques de la cerca	Descripció dels resultats	Nombre de ORFs	Característiques de la cerca	Descripció dels resultats	Nombre de ORFs
1. ORFs amb inici atg, gtg, ctg o ttg	Cadena directa	2038		Cadena directa	2037
2. ORFs en els marcs de lectura 1, 2 i 3					
3. ORFs amb almenys 125 codons de llarg	Cadena reversa	2063	1. Codi genètic bacterià (11)	Cadena reversa	1944
4. Codi genètic bacterià (11)					
	<b>Total</b>	<b>4101</b>		<b>Total</b>	<b>3981</b>

ORFs, open reading frames.

D'aquesta manera, el programa ORF Finder ha predit la presència d'un total de 4101 ORFs al llarg dels 4.102.412 nucleòtids que conformen el genoma de la soca de *B. pertussis* Tohama I mentre que el programa GeneMarkS ha predit la presència d'un total de 3981 ORFs al genoma



de la mateixa, tenint en compte els mateixos paràmetres alhora de realitzar ambdues prediccions.

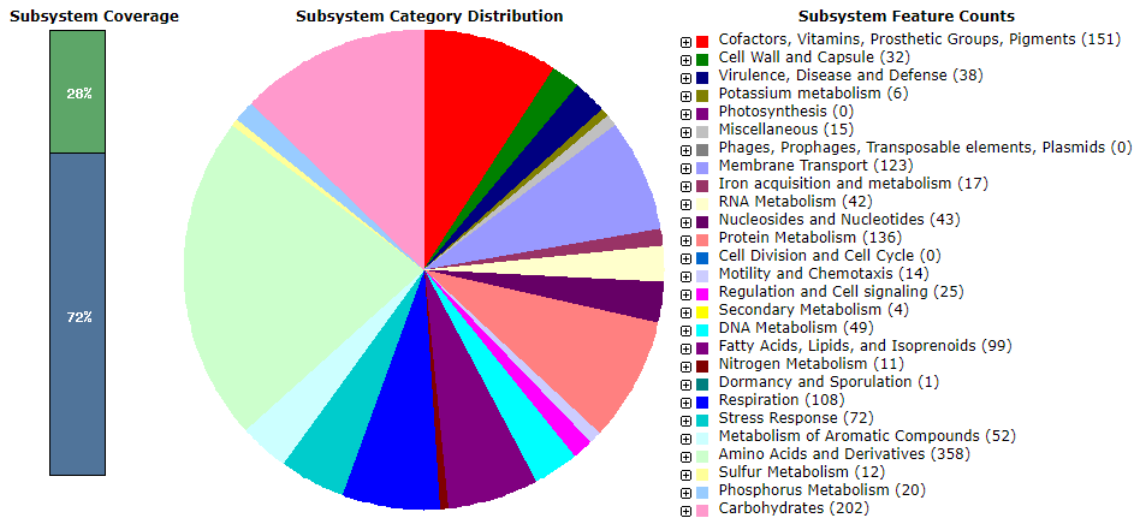
Per tal de verificar la predicció d'ORFs obtinguda, s'ha considerat realitzar l'anotació genòmica de la soca de *B. pertussis* Tohama I mitjançant el *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAP) del NCBI i el programa d'anotació genòmica *Rapid Annotations using Subsystems Technology* (RAST). D'aquesta manera, els resultats de l'anotació realitzada mitjançant el PGAP del NCBI han permès identificar un total de 3548 seqüències codificants al llarg del genoma complet de la soca de *B. pertussis* Tohama I. D'aquestes, un total de 1812 se situen a la cadena directa mentre que els altres 1736 es troben a la cadena reversa, observant-se proteïnes des de 29 aminoàcids i fins a 4217 aminoàcids de llargada. Entre elles, destaquen un grup de proteïnes de membrana, les quals no s'associen a cap gen conegut o prèviament descrit (Taula 2). Degut a la seva localització a la membrana de *B. pertussis* i a la seva funció desconeguda s'ha optat per considerar-les proteïnes precandidates a ser estudiades i caracteritzades al llarg de les següents etapes de desenvolupament de l'estudi, amb l'objectiu de conèixer les seves característiques i la seva implicació en el procés infectiu de *B. pertussis*.

**Taula 2.** Característiques de les proteïnes precandidates obtingudes de l'anotació genòmica de la soca de *B. pertussis* Tohama I mitjançant l'ús del *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAP) del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Posició inici	Posició final	Cadena	Etiqueta	Producte proteic	Llargada (aa)	Nom	Referència pròpia
29925	31421	-	D0Z01_RS00165	WP_010931229.1	498	<i>membrane protein</i>	HUVH-BP1
170997	171476	-	D0Z01_RS00845	WP_010931296.1	159	<i>membrane protein</i>	HUVH-BP2
493918	494370	-	D0Z01_RS02450	WP_010931463.1	150	<i>membrane protein</i>	HUVH-BP3
599319	599918	+	D0Z01_RS02980	WP_010931516.1	199	<i>membrane protein</i>	HUVH-BP4
807228	808196	+	D0Z01_RS04070	WP_010931618.1	322	<i>membrane protein</i>	HUVH-BP5
820225	820845	-	D0Z01_RS04135	WP_010931624.1	206	<i>membrane protein</i>	HUVH-BP6
832334	832972	-	D0Z01_RS04195	WP_010931630.1	212	<i>membrane protein</i>	HUVH-BP7
981072	982247	+	D0Z01_RS04905	WP_010929575.1	391	<i>membrane protein</i>	HUVH-BP8
1527319	1527795	+	D0Z01_RS07635	WP_010929875.1	158	<i>membrane protein</i>	HUVH-BP9
2116485	2116787	-	D0Z01_RS10370	WP_010930189.1	100	<i>membrane protein</i>	HUVH-BP10
2251401	2252093	-	D0Z01_RS10990	WP_010930257.1	230	<i>membrane protein</i>	HUVH-BP11
2259663	2261399	-	D0Z01_RS11030	WP_010930261.1	578	<i>membrane protein</i>	HUVH-BP12
3018585	3018821	+	D0Z01_RS14675	WP_010930652.1	78	<i>membrane protein</i>	HUVH-BP13
3179043	3179678	+	D0Z01_RS15400	WP_010930729.1	211	<i>membrane protein</i>	HUVH-BP14
3260431	3261405	+	D0Z01_RS15835	WP_010930774.1	324	<i>membrane protein</i>	HUVH-BP15
3266777	3267016	+	D0Z01_RS15875	WP_010930778.1	79	<i>membrane protein</i>	HUVH-BP16
3552078	3552578	-	D0Z01_RS17225	WP_010930933.1	166	<i>membrane protein</i>	HUVH-BP17
3855716	3856591	-	D0Z01_RS18720	WP_010931095.1	291	<i>membrane protein</i>	HUVH-BP18

aa, aminoàcids.

Paral·lelament, els resultats de l'anotació realitzada mitjançant el *pipeline* de RAST han permès identificar un total de 4024 seqüències codificants i 58 ARNs al llarg del genoma complet de la soca de *B. pertussis* Tohama I. D'aquestes, el 28% de les seqüències codificants identificades es troben associades a algun dels 303 subsistemes descrits (Il·lustració 4).



**Il·lustració 4.** Resultat gràfic obtingut de l'anotació genòmica de la soca de *B. pertussis* Tohama I mitjançant l'ús del pipeline del *Rapid Annotations using Subsystems Technology* (RAST).

A fi de comparar ambdues anotacions genòmiques realitzades segons les dues aproximacions prèviament descrites, s'ha realitzat la identificació de les divuit proteïnes precandidates seleccionades de l'anotació del genoma de la soca de *B. pertussis* Tohama I realitzada amb el PGAP del NCBI entre les seqüències codificats obtingudes de l'anotació genòmica realitzada mitjançant el programa RAST, característiques de les quals es mostren a la Taula 3.

**Taula 3.** Característiques de les proteïnes precandidates obtingudes de l'anotació genòmica de la soca de *B. pertussis* Tohama I mitjançant l'ús del pipeline del *Rapid Annotations using Subsystems Technology* (RAST).

Posició inici	Posició final	Marc de lectura	Cadena	Llargada (pb)	Funció	Subsistema	Referència pròpia
31421	29925	-2	-	1497	<i>Integral membrane protein</i>	<i>none</i>	<b>HUVH-BP1</b>
171476	170997	-2	-	480	<i>putative membrane protein</i>	<i>none</i>	<b>HUVH-BP2</b>
494370	493918	-3	-	453	<i>Putative inner membrane protein</i>	<i>none</i>	<b>HUVH-BP3</b>
599319	599918	3	+	600	<i>putative membrane protein</i>	<i>none</i>	<b>HUVH-BP4</b>
807228	808196	3	+	969	<i>Predicted NAD regulator in Alphaproteobacteria</i>	<i>none</i>	<b>HUVH-BP5</b>
820845	820225	-3	-	621	<i>Hypothetical protein in cytochrome oxidase iogènesis cluster</i>	<i>none</i>	<b>HUVH-BP6</b>
832972	832334	-1	-	639	<i>putative membrane protein</i>	<i>none</i>	<b>HUVH-BP7</b>
981177	982247	3	+	1071	<i>putative membrane protein</i>	<i>none</i>	<b>HUVH-BP8</b>
1527319	1527795	1	+	477	<i>putative membrane protein</i>	<i>none</i>	<b>HUVH-BP9</b>
2116787	2116485	-2	-	303	<i>putative membrane protein</i>	<i>none</i>	<b>HUVH-BP10</b>
2252093	2251401	-2	-	693	<i>putative membrane protein</i>	<i>none</i>	<b>HUVH-BP11</b>
2261399	2259663	-2	-	1737	<i>putative membrane protein</i>	<i>none</i>	<b>HUVH-BP12</b>
3018585	3018821	3	+	237	<i>putative membrane protein</i>	<i>none</i>	<b>HUVH-BP13</b>
3179055	3179678	3	+	624	<i>putative membrane protein</i>	<i>none</i>	<b>HUVH-BP14</b>
3260455	3261405	1	+	951	<i>Type cbb3 cytochrome oxidase iogènesis protein Ccol; Copper-translocating P-type ATPase (EC 3.6.3.4)</i>	<i>Biogenesis of cbb3-type cytochrome c oxidases; Copper Transport System; Copper homeostasis</i>	<b>HUVH-BP15</b>
3266777	3267016	2	+	240	<i>Putative inner membrane protein</i>	<i>none</i>	<b>HUVH-BP16</b>
3552578	3552078	-2	-	501	<i>Integral membrane protein</i>	<i>none</i>	<b>HUVH-BP17</b>
3856591	3855716	-1	-	876	<i>hypothetical protein</i>	<i>none</i>	<b>HUVH-BP18</b>

pb, parells de bases.

Amb la comparativa realitzada s'ha observat com, ambdues aproximacions utilitzades per dur a terme l'anotació del genoma de la soca de *B. pertussis* Tohama I mostren petites variacions puntuals en les anotacions obtingudes de les divuit proteïnes identificades prèviament com a precandidates en aquesta fase del projecte. Així, s'observa una lleugera diferència en les posicions d'inici o final per a tres de les divuit proteïnes descrites, concretament per a les proteïnes HUVH-BP8, HUVH-BP14 i HUVH-BP15. D'entre aquestes, és especialment rellevant les característiques associades a la proteïna HUVH-BP15 obtingudes de l'anotació genòmica realitzada amb el programa RAST, i per la qual, el *pipeline* del NCBI no identifica. Per la seva banda, per a les proteïnes HUVH-BP8 i HUVH-BP14, les diferències en l'anotació no van més enllà de les posicions d'inici o final, essent considerades també com a possibles proteïnes de membrana pel *pipeline* del RAST i no incloses en cap dels subsistemes contemplats (Taula 3).

Addicionalment i amb l'objectiu d'identificar la presència o absència de les divuit proteïnes prèviament definides com a precandidates en el genoma d'altres soques de *B. pertussis*, així com el seu grau d'identitat a nivell de seqüència nucleotídica, s'ha realitzat l'assemblatge del genoma de dues soques de *B. pertussis* aïllades de pacients amb diagnòstic de tosferina a l'Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona als anys 1989 i 2015, respectivament (BP7 i BP557). Per aquests dos aïllats, tal i com s'ha descrit anteriorment (*veure apartat 3. Mètodes, pàg. 19*) s'ha realitzat la seqüenciació de genomes complets utilitzant dues tecnologies de seqüenciació diferents, mitjançant les plataformes MiSeq (Illumina) i MinION (Oxford Nanopore Technologies).

Per tal de fer la búsqueda i determinar la presència o absència de la seqüència nucleotídica codificadora de les proteïnes precandidates en els assemblatges genòmics obtinguts de la seqüenciació dels genomes complets dels aïllats BP7 i BP557, així com el grau d'identitat amb la seqüència gènica present en el genoma de la soca de *B. pertussis* de referència Tohama I, s'ha utilitzat el programa Geneious. Geneious és una plataforma d'alineació, assemblatge i anàlisi de seqüències de ADN, ARN i proteïnes que integra eines bioinformàtiques i de biologia molecular. Els resultats obtinguts d'aquest anàlisi es recullen a la Taula 4.

**Taula 4.** Estudi de la presència de la seqüència nucleotídica codificadora de les proteïnes precandidates en el genoma dels aïllats clínics BP7 i BP557 i grau d'identitat amb la seqüència gènica present en el genoma de la soca de *B. pertussis* Tohama I.

Referència pròpia	Identitat nucleotídica amb soca BP7 (Llargada, pb)	Identitat nucleotídica amb soca BP557 (Llargada, pb)
HUVH-BP1	100% (1497)	100% (1497)
HUVH-BP2	100% (480)	100% (480)
HUVH-BP3	100% (453)	100% (453)
HUVH-BP4	100% (600)	100% (600)
HUVH-BP5	100% (969)	100% (969)
HUVH-BP6	100% (621)	100% (621)
HUVH-BP7	100% (639)	100% (639)
HUVH-BP8	100% (1176)	100% (1176)
HUVH-BP9	100% (477)	100% (477)
HUVH-BP10	100% (303)	100% (303)
HUVH-BP11	100% (693)	100% (693)
HUVH-BP12	100% (1737)	100% (1737)
HUVH-BP13	100% (237)	100% (237)
HUVH-BP14	100% (636)	100% (636)
HUVH-BP15	no trobada	100% (975)
HUVH-BP16	no trobada	100% (240)
HUVH-BP17	100% (501)	100% (501)
HUVH-BP18	100% (876)	100% (876)

pb, parells de bases.

Així, s'observa com totes les seqüències gèniques codificadores de les proteïnes definides com a precandidates es troben presents en el genoma de la soca de *B. pertussis* BP557 i amb un grau d'identitat per totes elles del 100%. No obstant això, dues de les seqüències gèniques, les quals codifiquen per les proteïnes HUVH-BP15 i HUVH-BP16 es troben absents en el genoma de la soca de *B. pertussis* BP7 (Taula 4). És per això que, les proteïnes HUVH-BP15 i HUVH-BP16 no es considerarien bones candidates a ser considerades en futures composicions vacunals per no observar-se com a seqüències conservades entre els aïllats analitzats.

#### 4.1.2. Predicció de característiques estructurals, funcionals i de localització

Al llarg d'aquest apartat, s'han utilitzat diferents eines de predicció de les característiques de les proteïnes definides prèviament com a precandidates per tal de conèixer aspectes com la

seva ubicació cel·lular, així com les seves característiques estructural i antigèniques. Addicionalment, s'han incorporat en aquest apartat les seqüències aminoacídiques d'aquells mecanismes patogènics coneguts de *B. pertussis* i no inclosos en les formulacions DTPa actualment utilitzades per immunitzar a la població enfront de la tosferina per tal d'avaluar la seva possible incorporació en futures composicions vacunals. Aquests són les toxines dermonecròtica (DNT) i adenilat ciclasa-hemolisina (AC-Hly), els autotransportadors factor de colonització traqueal A (TCF-A) i BapC, els factors de resistència al sèrum BrkA i Vag8 i les proteïnes efectores secretades pel sistema de secreció de tipus III (T3SS), BopB, BopC/BteA, BopD, BopN i Bsp22.

Primerament, per tal de realitzar una aproximació de la ubicació cel·lular de cadascuna de les proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics descrits de *B. pertussis* i no inclosos en les composicions vacunals DTPa, s'ha realitzat una predicció de la seva localització per tal de que dita informació aportí pistes sobre les funcions que duen a terme en el microorganisme. Aquesta predicció s'ha dut a terme amb el programa PSORTb (<https://www.psort.org/psortb/>)<sup>21</sup>, el qual es basa en la cerca de diverses característiques presents en l'estructura primària de la proteïna, com poden ser la presència d'un pèptid senyal o de motius de tipus hèlix transmembrana. Els resultats obtinguts de la predicció de la localització cel·lular es recullen a la Taula 5.

**Taula 5.** Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la localització cel·lular de les proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics de *B. pertussis* no inclosos en les vacunes DTPa.

Referència	Ubicació predita	Motius de localització trobats
HUVH-BP1	membrana citoplasmàtica	14 hèlixs internes
HUVH-BP2	membrana citoplasmàtica	5 hèlixs internes
HUVH-BP3	membrana citoplasmàtica	4 hèlixs internes
HUVH-BP4	desconeguda	2 hèlixs internes
HUVH-BP5	proteïna citoplasmàtica	-
HUVH-BP6	desconeguda	1 hèlix interna, pèptid senyal
HUVH-BP7	membrana citoplasmàtica	1 hèlix interna, pèptid senyal
HUVH-BP8	desconeguda	1 hèlix interna
HUVH-BP9	membrana citoplasmàtica	2 hèlixs internes
HUVH-BP10	membrana citoplasmàtica	2 hèlixs internes, pèptid senyal
HUVH-BP11	proteïna periplasmàtica	1 hèlix interna
HUVH-BP12	membrana citoplasmàtica	14 hèlixs internes
HUVH-BP13	membrana citoplasmàtica	2 hèlixs internes
HUVH-BP14	membrana citoplasmàtica	5 hèlixs internes, pèptid senyal
HUVH-BP15	membrana citoplasmàtica	4 hèlixs internes, motius de membrana citoplasmàtica
HUVH-BP16	membrana citoplasmàtica	2 hèlixs internes
HUVH-BP17	membrana citoplasmàtica	2 hèlixs internes, pèptid senyal
HUVH-BP18	membrana citoplasmàtica	10 hèlixs internes
DNT	desconeguda (aquesta proteïna pot tenir múltiples llocs de localització)	-
AC-Hly	extracel·lular	6 hèlixs internes, motius de secreció extracel·lular
TCF-A	membrana externa	1 hèlix interna, pèptid senyal, motius de membrana externa
BapC	membrana externa (aquesta proteïna pot tenir múltiples llocs de localització)	motius de membrana externa i extracel·lulars
BrkA	membrana externa (aquesta proteïna pot tenir múltiples llocs de localització)	pèptid senyal, motius de membrana externa i extracel·lulars
Vag8	membrana externa (aquesta proteïna pot tenir múltiples llocs de localització)	1 hèlix interna, pèptid senyal, motius de membrana externa i extracel·lulars
BopB	membrana citoplasmàtica	4 hèlixs internes
BopC/BteA	membrana externa	-
BopD	desconeguda	1 hèlix interna
BopN	desconeguda (aquesta proteïna pot tenir múltiples llocs de localització)	motius de membrana externa
Bsp22	desconeguda	-

DNT, toxina dermonecròtica; AC-Hly, toxina adenilat ciclasa-hemolisina; TCF-A, factor de colonització traqueal A.



Els resultats obtinguts mostren com, per a tretze (72,2%) de les divuit proteïnes precandidates es prediu que es troben ubicades a la membrana cel·lular citoplasmàtica, per a dues de les proteïnes precandidates es prediu que són proteïnes citoplasmàtica (HUVH-BP5) i periplasmàtica (HUVH-BP11), respectivament i, finalment, per a tres de les proteïnes precandidates no es prediu la seva ubicació cel·lular (HUVH-BP4, HUVH-BP6 i HUVH-BP8). Entre aquestes i malgrat que l'eina de predicció utilitzada no hagi proporcionat una ubicació concreta, destaca la identificació d'un pèptid senyal en la seqüència aminoacídica de la proteïna precandidata HUVH-BP6, la qual podria ubicar-se a la membrana externa o ser una proteïna de secreció extracel·lular de *B. pertussis*, podent estar implicada en el seu procés infectiu. Pel que fa als mecanismes patogènics de *B. pertussis* no inclosos en les composicions vacunals DTPa, els resultats de la predicció mostren com la majoria de proteïnes presenten motius de membrana cel·lular externa i extracel·lulars (a excepció de la proteïna BopB, per la qual es prediu que es troba ubicada a la membrana cel·lular citoplasmàtica), els quals apunten a la seva exposició exterior i corroborarien la implicació de tots ells en el procés infectiu de *B. pertussis*. Tot i això, per a les proteïnes DNT, BopD, BopN i Bsp22 no es prediu la seva localització exacta encara que es coneix i s'ha descrit que són toxines (DNT) i proteïnes secretades pel microorganisme a través del sistema de secreció de tipus III (BopD, BopN i Bsp22) i que participen del seu procés infectiu (Taula 5)<sup>27-33</sup>.

A continuació, per tal d'identificar la presència de llocs d'escissió de la peptidasa senyal I (SpaseI) en la seqüència aminoacídica de les proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics de *B. pertussis* no inclosos en les composicions DTPa i fer-ne una caracterització, s'ha realitzat una predicció de la presència de pèptids senyal, així com de la ubicació dels seus llocs d'escissió mitjançant el programa SignalP (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>)<sup>22</sup>. Els resultats obtinguts de la predicció de la presència de pèptids senyal es recullen a la Taula 6.

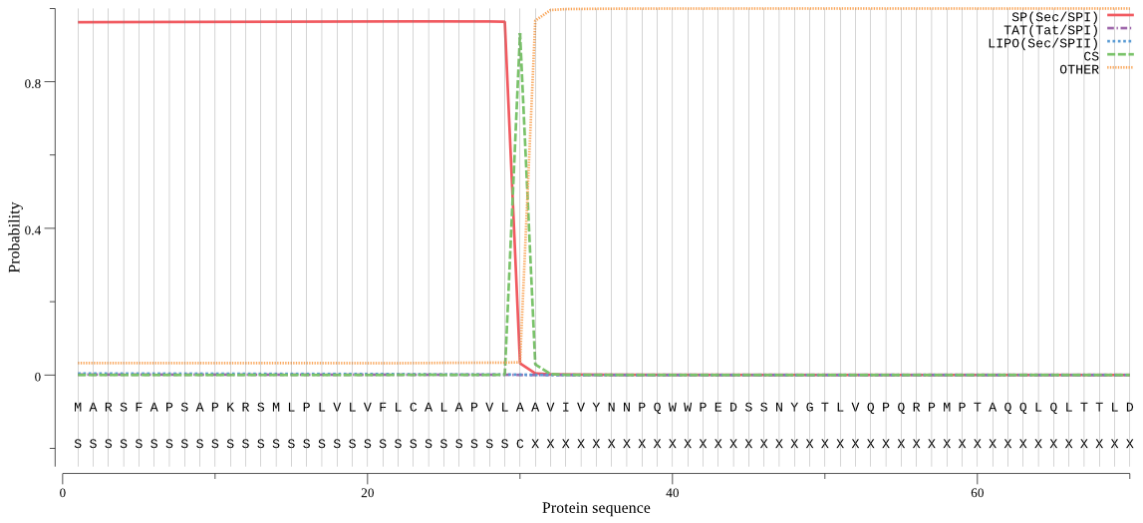
**Taula 6.** Recull dels resultats obtinguts de la predicció i caracterització de la presència pèptids senyal en la seqüència aminoacídica de les proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics de *B. pertussis* no inclosos en les vacunes DTPa.

Referència	Identificació de pèptid senyal
HUVH-BP1	no
HUVH-BP2	no
HUVH-BP3	no
HUVH-BP4	no
HUVH-BP5	no
HUVH-BP6	sí, pèptid senyal de tipus Sec/SPI, lloc d'escissió entre les posicions 30 i 31
HUVH-BP7	no
HUVH-BP8	no
HUVH-BP9	no
HUVH-BP10	no
HUVH-BP11	no
HUVH-BP12	no
HUVH-BP13	no
HUVH-BP14	no
HUVH-BP15	no
HUVH-BP16	no
HUVH-BP17	no
HUVH-BP18	no
DNT	no
AC-Hly	no
TCF-A	sí, pèptid senyal de tipus Sec/SPI, lloc d'escissió entre les posicions 39 i 40
BapC	sí, pèptid senyal de tipus Sec/SPI, lloc d'escissió entre les posicions 30 i 31
BrkA	sí, pèptid senyal de tipus Sec/SPI, lloc d'escissió entre les posicions 42 i 43
Vag8	sí, pèptid senyal de tipus Sec/SPI, lloc d'escissió entre les posicions 37 i 38
BopB	no
BopC/BteA	no
BopD	no
BopN	no
Bsp22	no

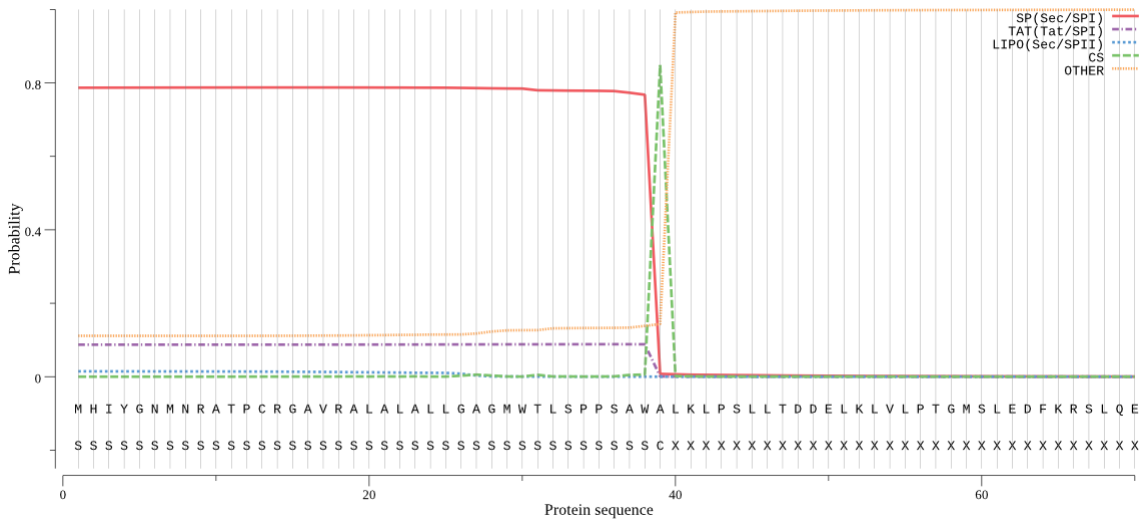
DNT, toxina dermonecròtica; AC-Hly, toxina adenilat ciclasa-hemolisina; TCF-A, factor de colonització traqueal A.

Així, s'observa com la predicció realitzada amb el programa SignalP identifica la presència d'un pèptid senyal de tipus Sec/SPI amb lloc d'escissió entre les posicions 30 i 31 de la seqüència aminoacídica de la proteïna precandidata HUVH-BP6, el qual podria apuntar a que es tracta d'una proteïna ubicada a la membrana cel·lular externa o de secreció extracel·lular (Taula 6). Els pèptids senyal de tipus Sec/SPI són els pèptids senyal secretors estàndard, transportats pel sistema de translocació Sec i escindits per la peptidasa senyal I (Lep). De la mateixa manera, es prediu la presència de pèptids senyals de tipus Sec/SPI per a les proteïnes autotransportadores TCF-A i BapC i pels factors de resistència al sèrum BrkA i Vag8, tots ells localitzats a la membrana cel·lular externa de *B. pertussis* (Taula 6). La representació gràfica dels pèptids senyal identificats en la seqüència aminoacídica de la proteïna precandidata HUVH-BP6 i en les seqüències aminoacídiques dels diversos mecanismes patogènics de *B. pertussis* descrits i no inclosos en les composicions vacunals DTPa es mostra a la Il·lustració 5.

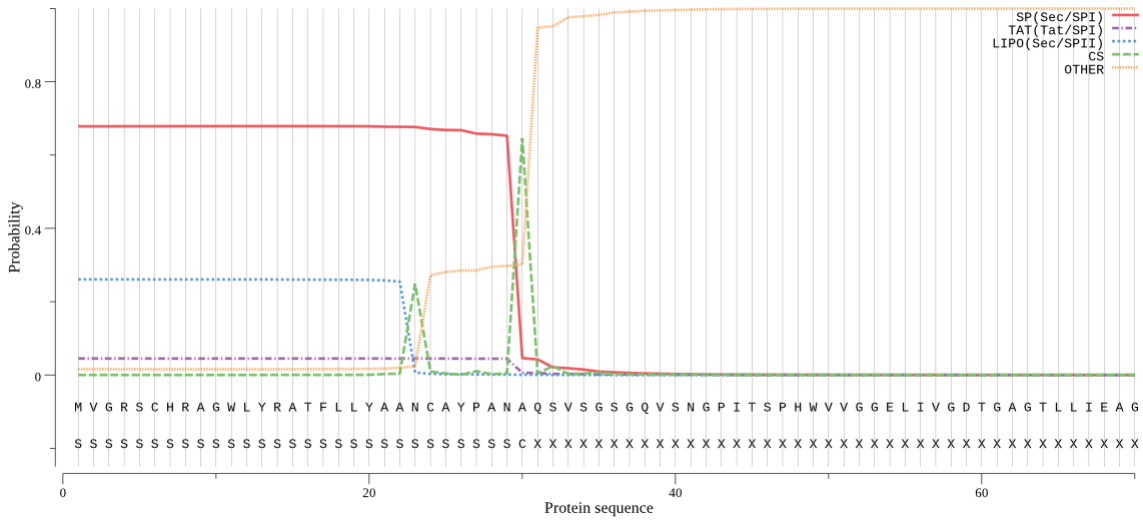
A)



B)

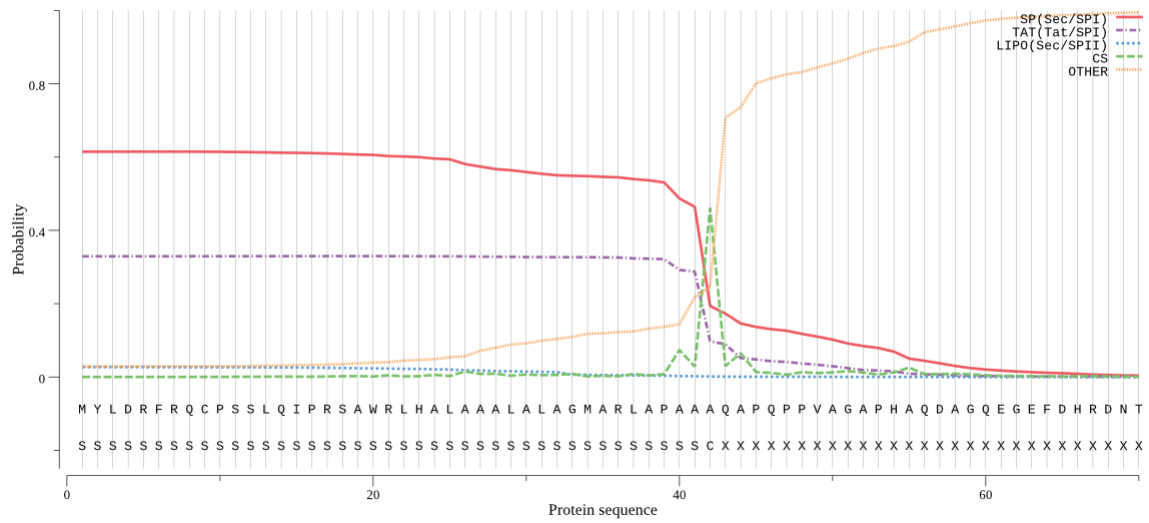


C)



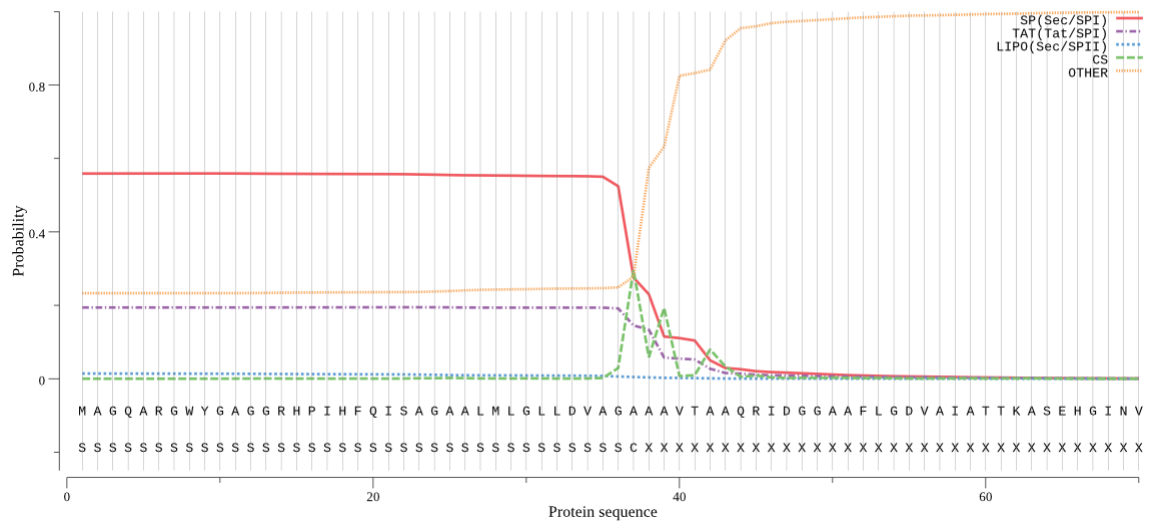
D)

SignalP-5.0 prediction (Gram-negative): WP\_010931506.1



E)

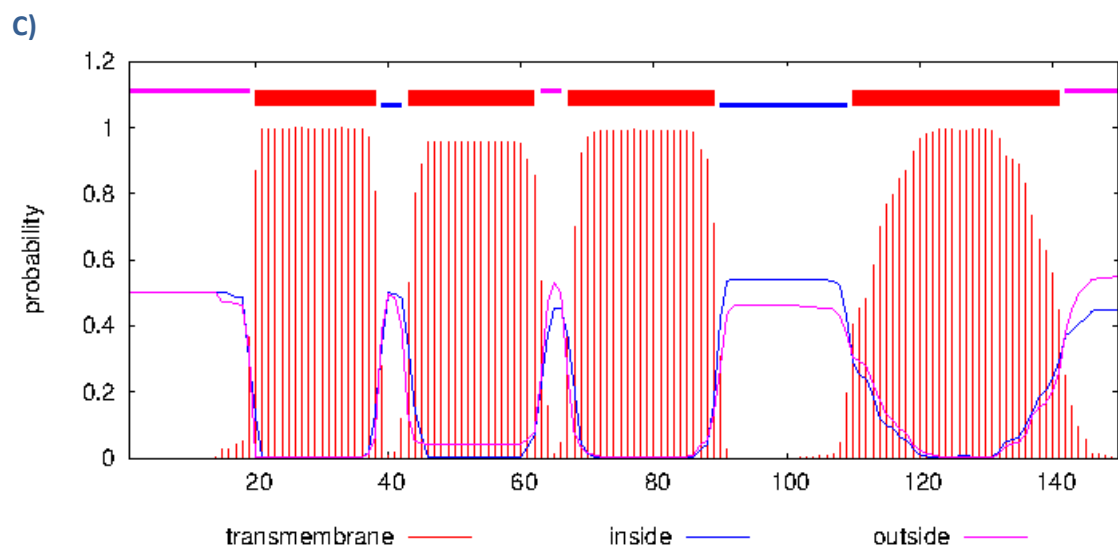
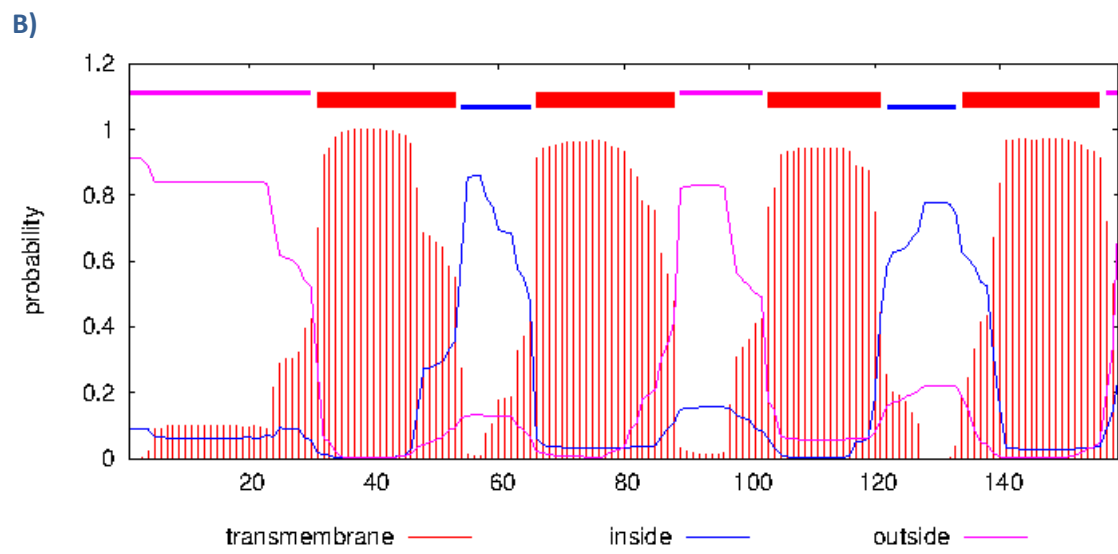
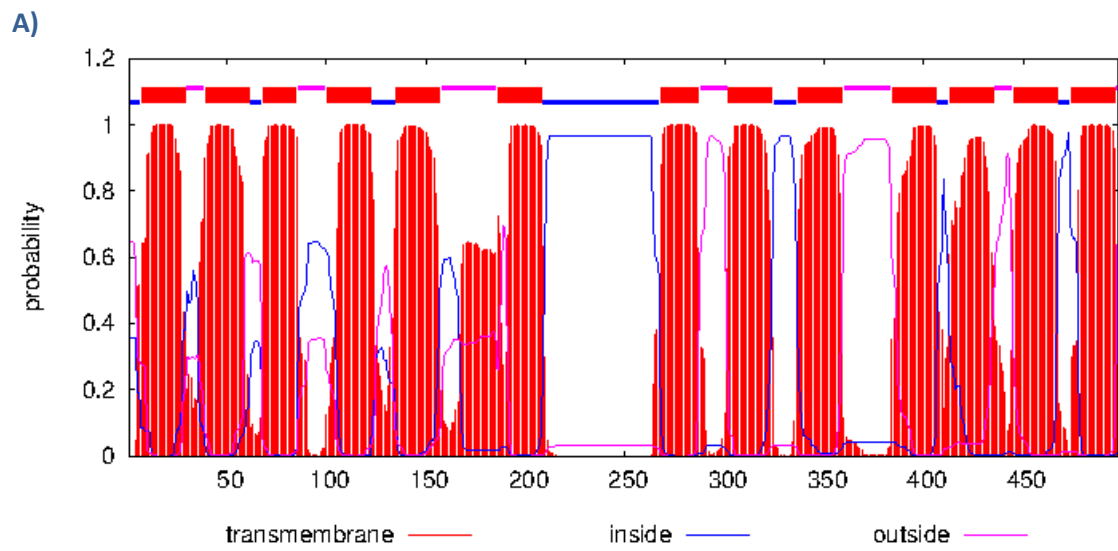
SignalP-5.0 prediction (Gram-negative): WP\_010930866.1



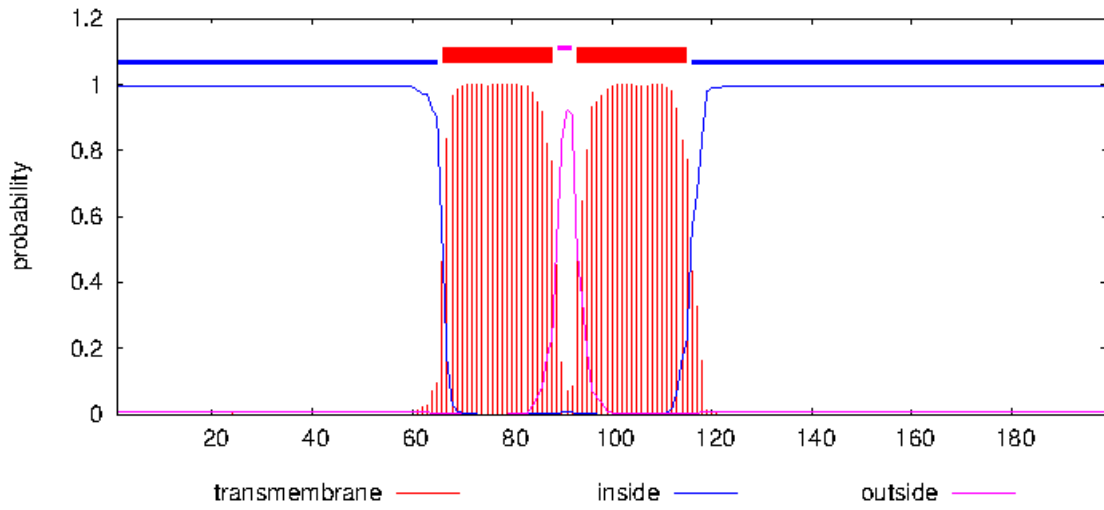
**II·lustració 5.** Representació gràfica de la predicció de la presència de pèptids senyal en la seqüència aminoacídica de las proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics de *B. pertussis* no inclosos en les composicions vacinals DTPa. A) Proteïna precandidata HUVH-BP6, B) Factor de colonització traqueal A, C) Proteïna autotransportadora BapC, D) Proteïna de resistència al sèrum BrkA, E) Proteïna de resistència al sèrum Vag8.

La seqüència aminoacídica de la proteïna es representa a l'eix X del gràfic mentre que a l'eix Y s'hi representa la probabilitat. Tal i com es mostra en la llegenda, en vermell es representen els pèptids senyal de tipus SP(Sec/SPI), en lila els pèptids senyals de tipus TAT(Tat/SPI), en blau els pèptids senyal de tipus LIPO (Sec/SPII), en verd els llocs d'escissió (*cleavage site*, CS) i en groc altres tipus de pèptids senyal.

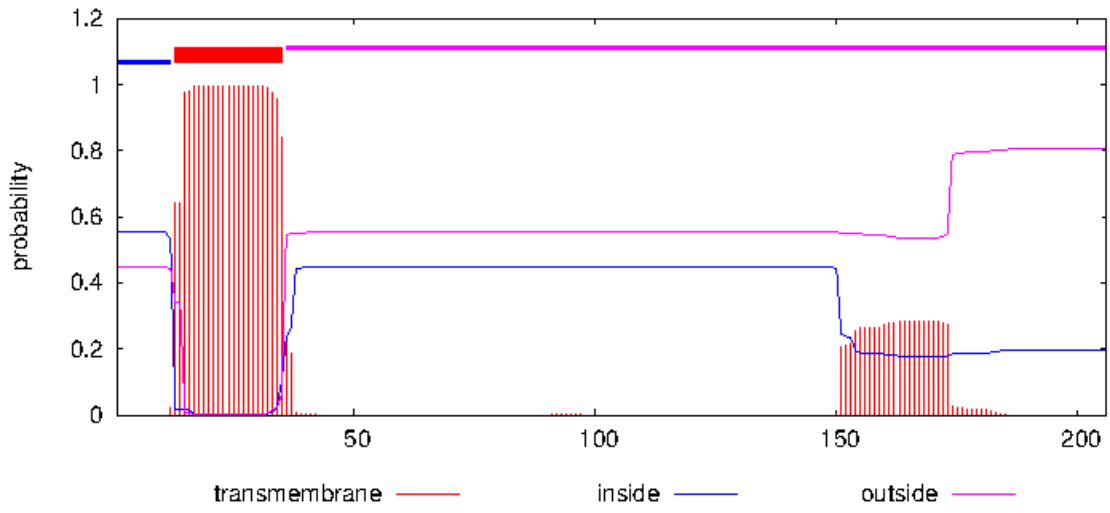
Seguidament, per tal de realitzar una primera aproximació en la caracterització estructural de cadascuna de les proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics de *B. pertussis* no inclosos en les composicions vacunals DTPa s'ha realitzat, per una banda, una predicció dels motius estructurals de tipus hèlix transmembrana en les diverses seqüències aminoacídiques esmentades mitjançant el programa TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)<sup>23</sup>, el qual permet fer una predicció de les regions que travessen la membrana i la seva orientació per tal de poder caracteritzar la topologia de les proteïnes. La representació gràfica dels resultats de predicció de regions transmembrana obtinguts es mostren a les Il·lustracions 6 i 7.



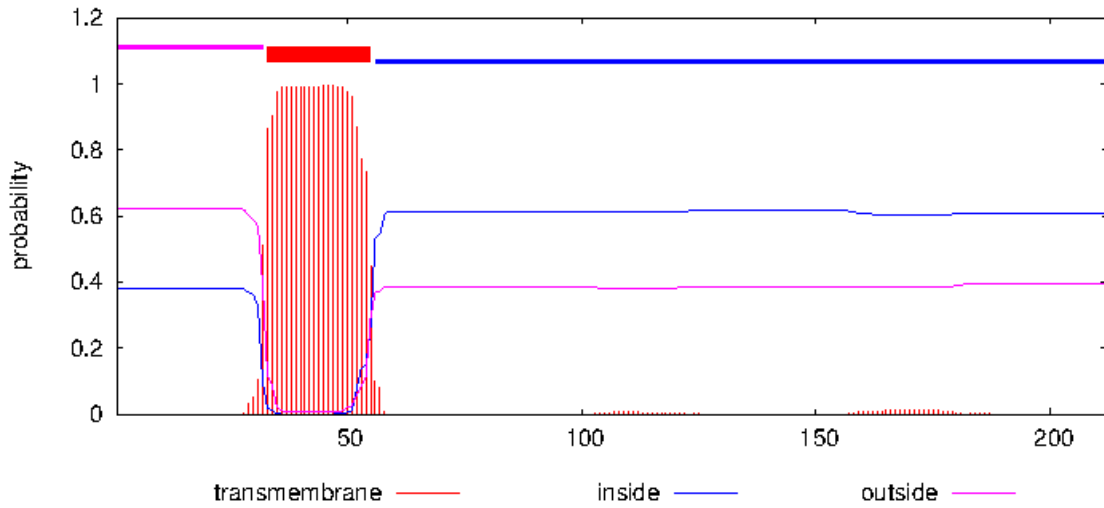
D)



E)

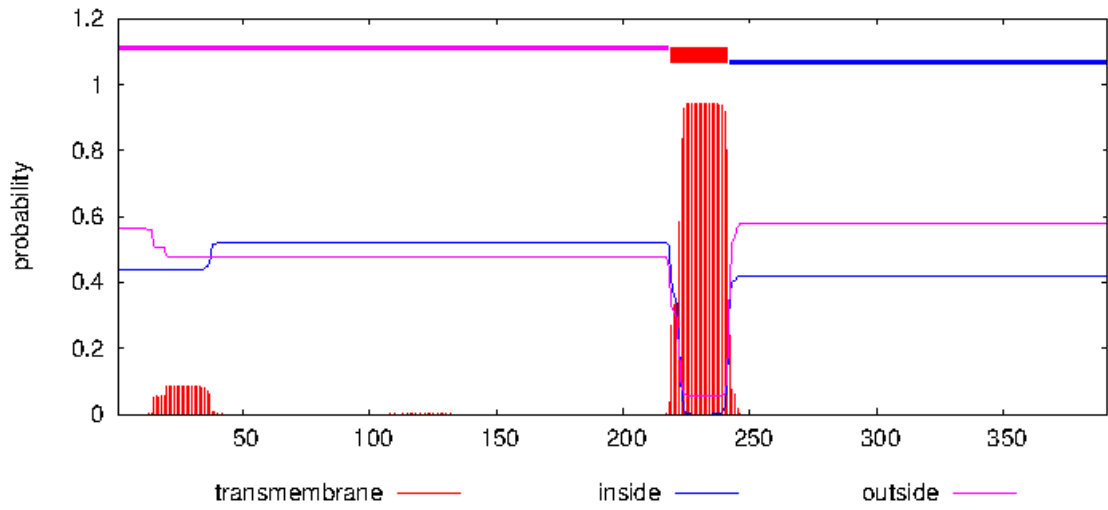


F)

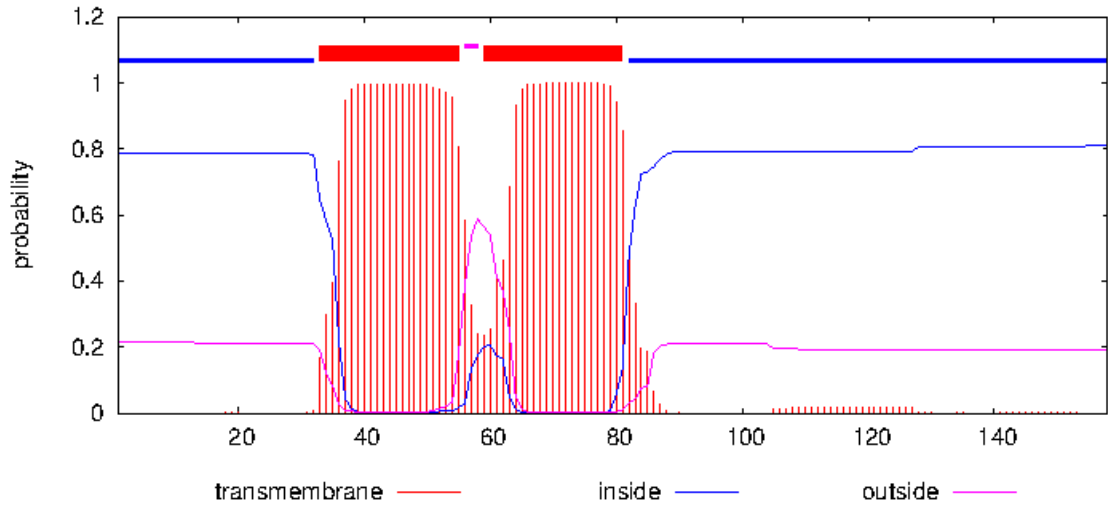




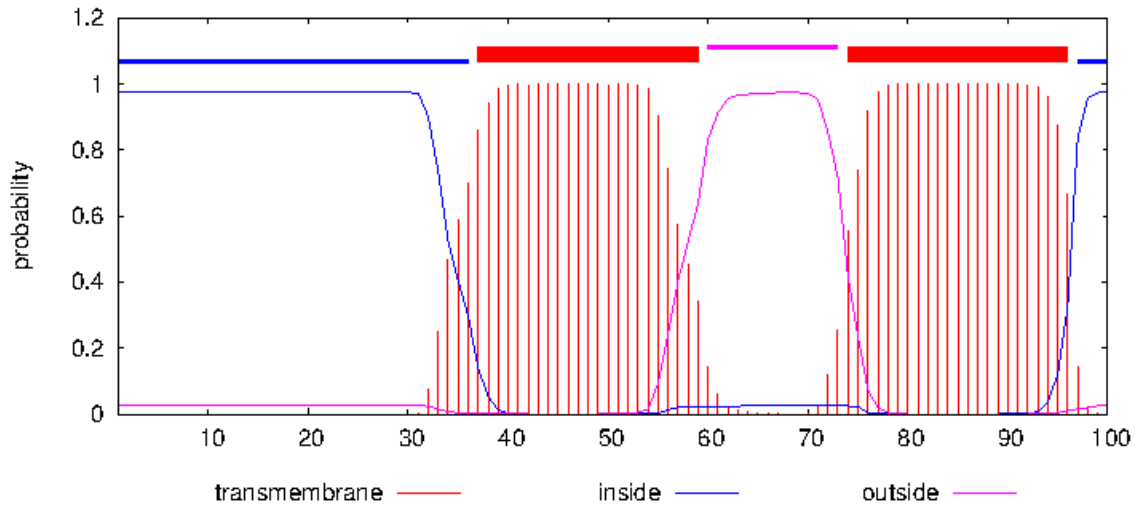
G)



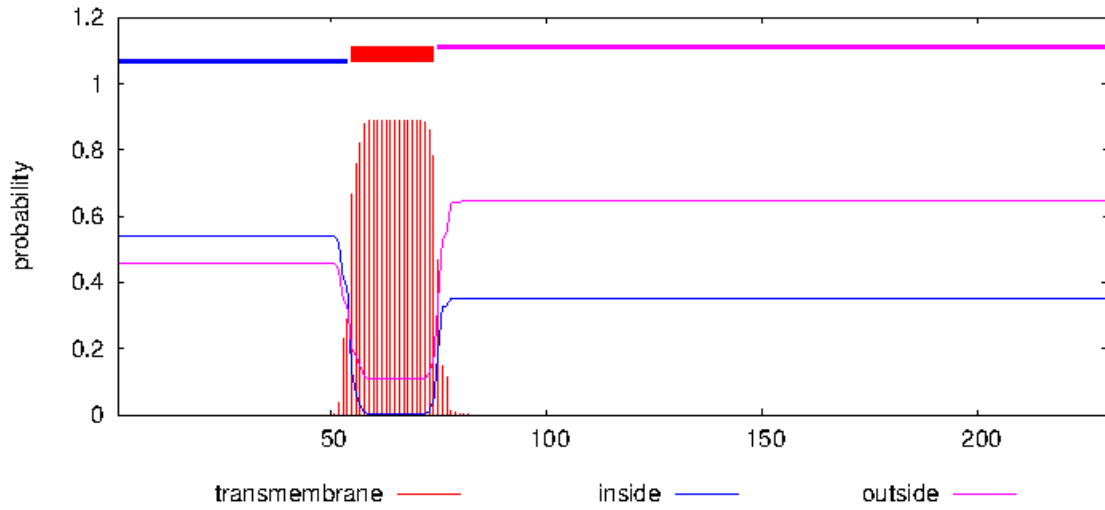
H)



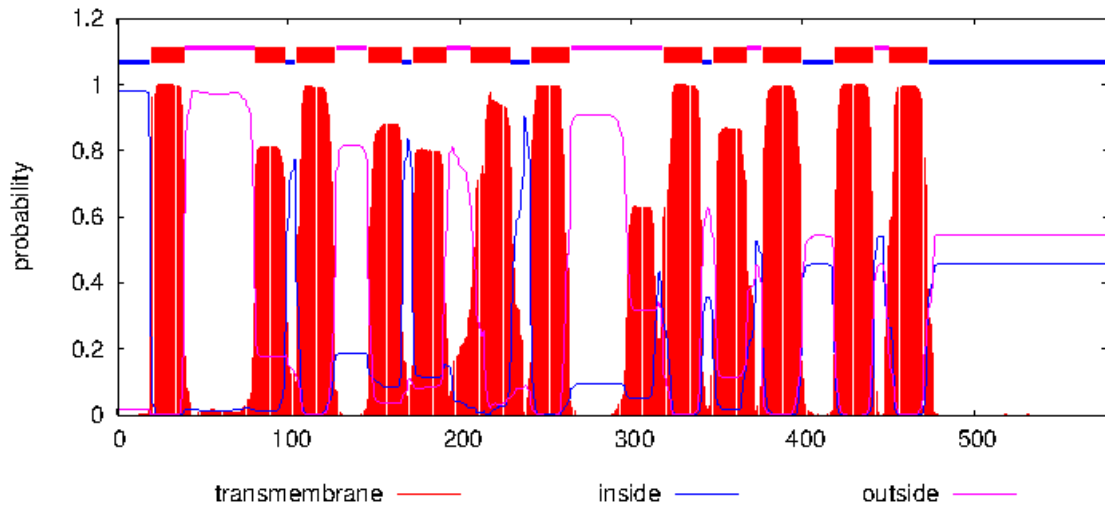
I)



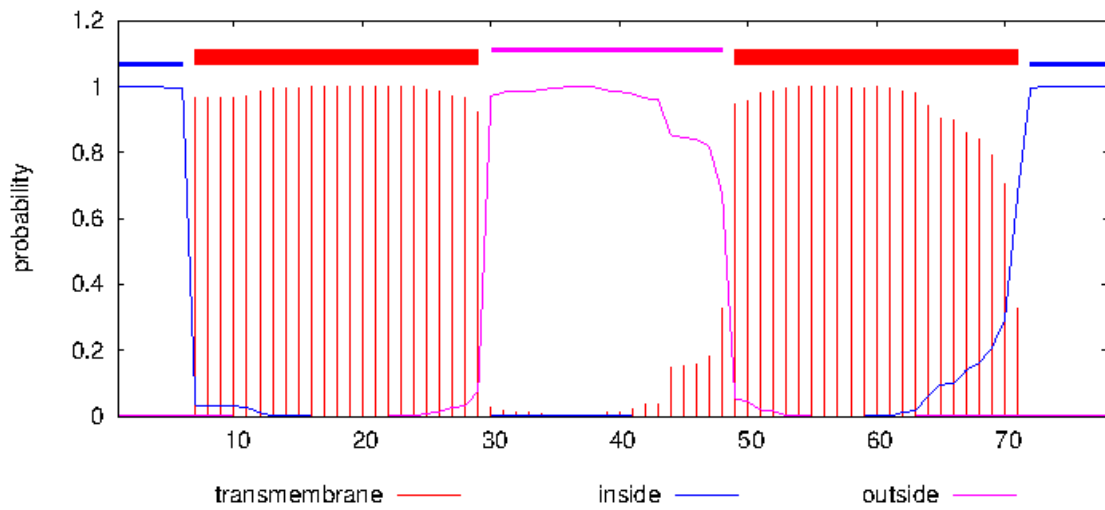
J)



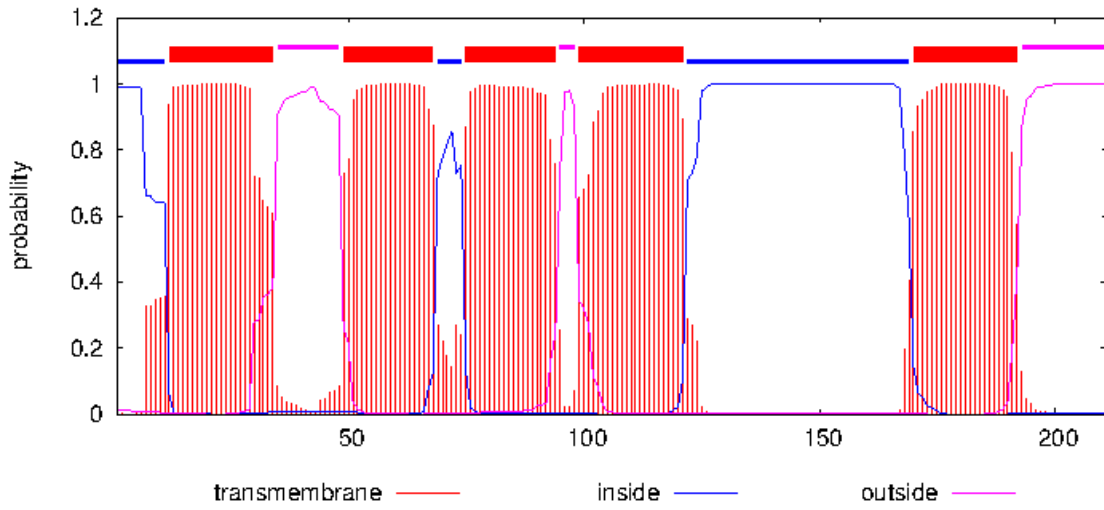
K)



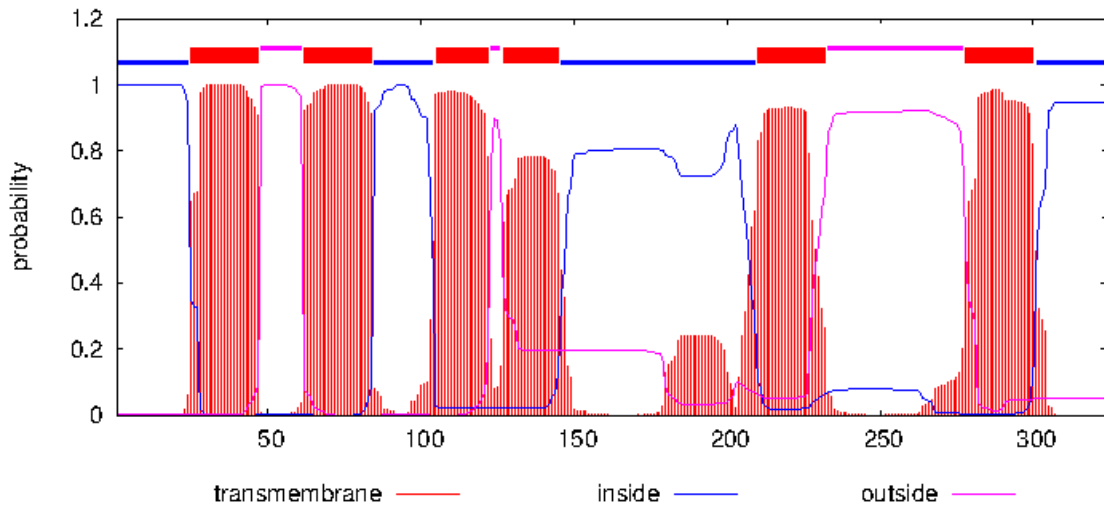
L)



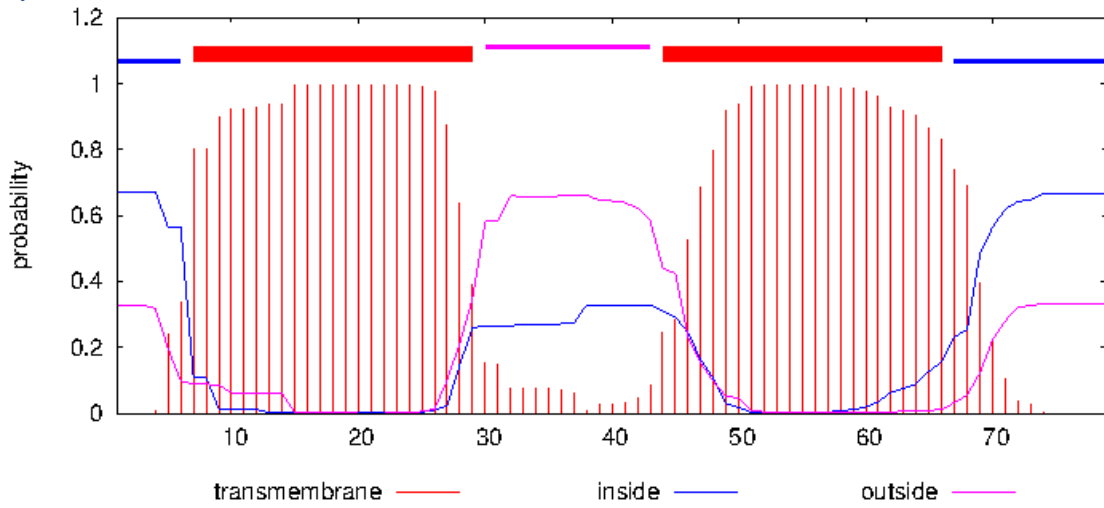
M)

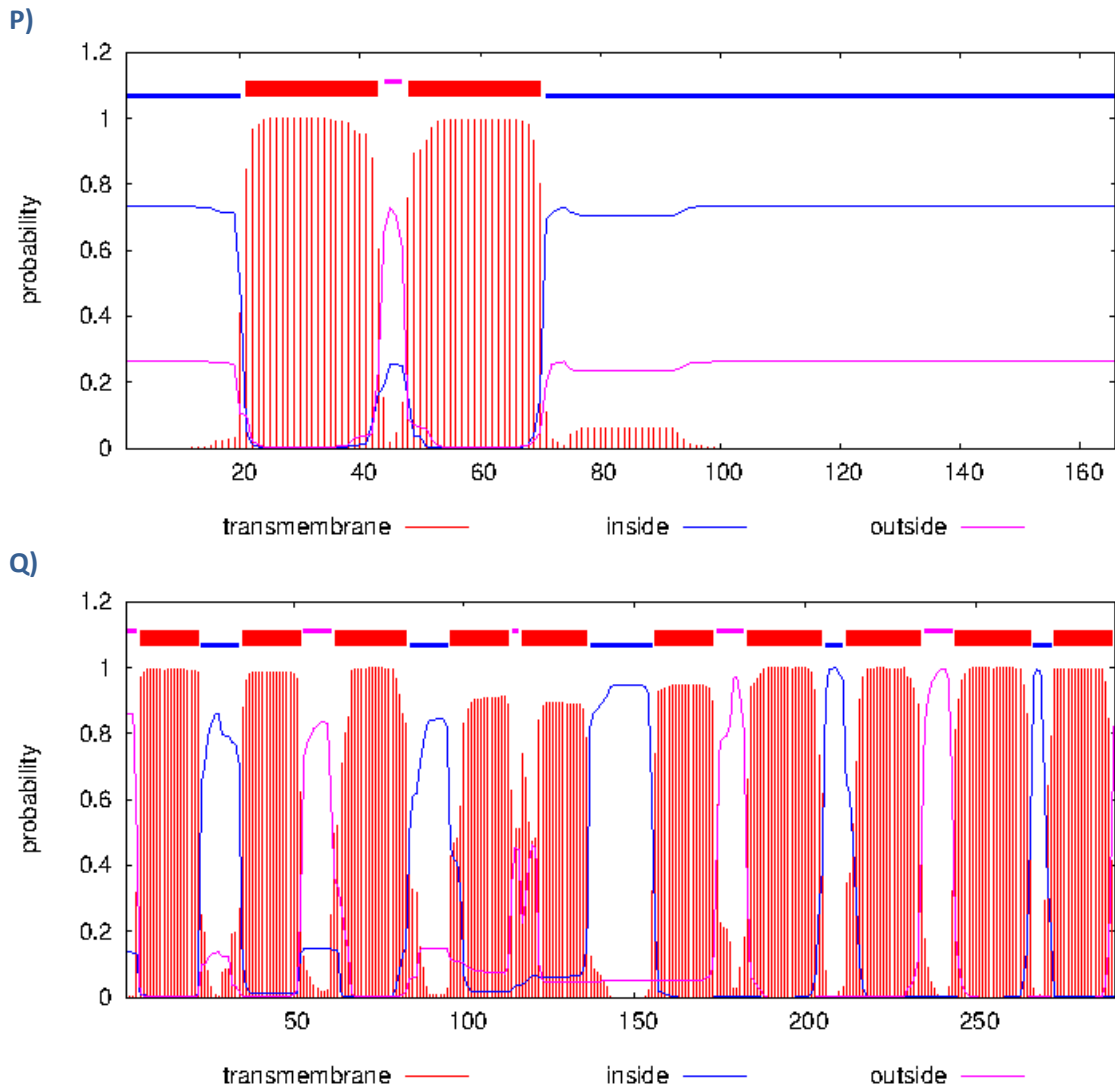


N)



O)



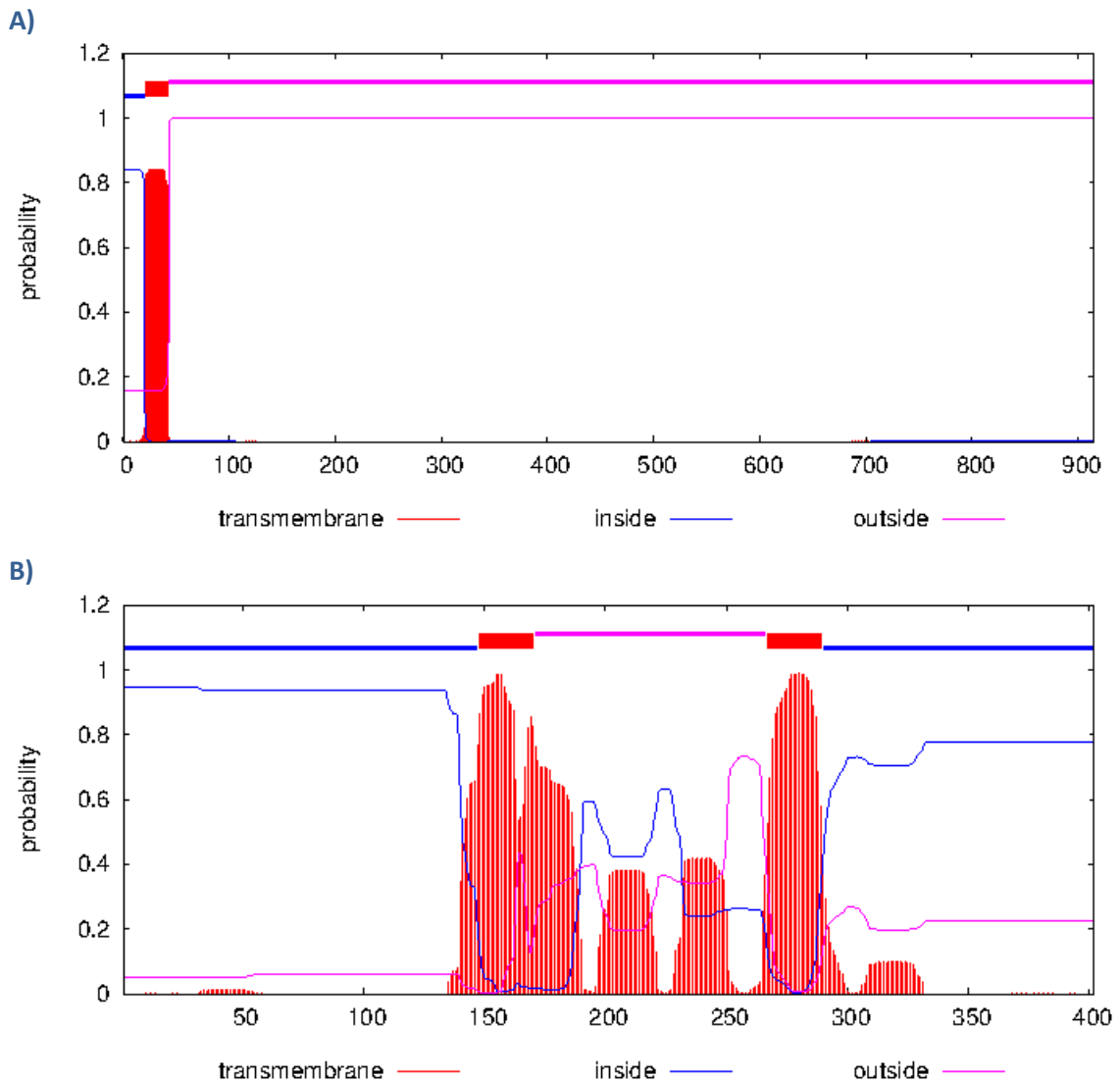


**Il·lustració 6.** Representació gràfica dels resultats obtinguts de la predicció de les regions alfa hèlix transmembrana en la seqüència aminoacídica de las proteïnes precandidates; A) Proteïna precandidata HUVH-BP1, B) Proteïna precandidata HUVH-BP2, C) Proteïna precandidata HUVH-BP3, D) Proteïna precandidata HUVH-BP4, E) Proteïna precandidata HUVH-BP6, F) Proteïna precandidata HUVH-BP7, G) Proteïna precandidata HUVH-BP8, H) Proteïna precandidata HUVH-BP9, I) Proteïna precandidata HUVH-BP10, J) Proteïna precandidata HUVH-BP11, K) Proteïna precandidata HUVH-BP12, L) Proteïna precandidata HUVH-BP13, M) Proteïna precandidata HUVH-BP14, N) Proteïna precandidata HUVH-BP15, O) Proteïna precandidata HUVH-BP16, P) Proteïna precandidata HUVH-BP17, Q) Proteïna precandidata HUVH-BP18.

La seqüència aminoacídica de la proteïna es representa a l'eix X del gràfic mentre que a l'eix Y s'hi representa la probabilitat. Tal i com es mostra en la llegenda, en vermell es representen les regions transmembrana, en blau les regions interiors i en rosa les regions exteriors.

Els resultats de la predicció de la presència d'hèlix transmembrana en les seqüències aminoacídiques confirma la predicció de la ubicació cel·lular de les proteïnes precandidates, sent només la proteïna precandidata HUVH-BP5 la única que no presenta hèlix transmembrana en la seva estructura i per la qual la predicció de la seva localització l'ha situat com una proteïna citoplasmàtica. Per la seva banda, pel que fa a la proteïnes precandidates HUVH-BP4,

HUVH-BP6 i HUVH-BP8 i per les quals no s'ha predit cap localització cel·lular anteriorment, s'observa com les tres presenten regions alfa hèlix transmembrana, amb les que es podrien trobar ubicades a la membrana cel·lular citoplasmàtica de *B. pertussis*, en el cas de les proteïnes precandidates HUVH-BP4 i HUVH-BP8 o a la membrana cel·lular externa del microorganisme en el cas de la proteïna precandidata HUVH-BP6, tenint en compte la presència del pèptid senyal en la seva seqüència (Il·lustració 6 i Taula 5).



**Il·lustració 7.** Representació gràfica dels resultats obtinguts de la predicció de les regions alfa hèlix transmembrana en la seqüència aminoacídica dels mecanismes patogènics de *B. pertussis* no inclosos en les composicions vacunals DTPa; A) Proteïna de resistència al sèrum Vag8, B) Proteïna secretada pel T3SS BopB.

La seqüència aminoacídica de la proteïna es representa a l'eix X del gràfic mentre que a l'eix Y s'hi representa la probabilitat. Tal i com es mostra en la llegenda, en vermell es representen les regions transmembrana, en blau les regions interiors i en rosa les regions exteriors.

Els resultats de la predicció de la presència d'hèlix transmembrana en les seqüències aminoacídiques dels mecanismes patogènics de *B. pertussis* no inclosos en les composicions vacunals DTPa mostren com, tan sols la proteïna de resistència al sèrum Vag8 i la proteïna efectora secretada pel sistema de secreció de tipus III BopB presenten aquestes regions, confirmant la ubicació prèviament predita per elles, les quals es situen a la membrana cel·lular externa i a la membrana cel·lular citoplasmàtica, respectivament (Il·lustració 7 i Taula 5).

D'altra banda i per tal de seguir amb la caracterització estructural de cadascuna de les proteïnes precandidates, s'ha realitzat una predicció de la presència de regions barril beta transmembrana en les seqüències aminoacídiques esmentades mitjançant el programa TBBpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/tbbpred/>)<sup>24</sup>. Els resultats obtinguts de la predicció de regions barril beta transmembrana obtinguts es recullen a la Taula 7.

**Taula 7.** Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència de regions barril beta transmembrana en la seqüència aminoacídica de les proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics de *B. pertussis* no inclosos en les composicions vacunals DTPa.

Referència	Seqüència aminoacídica predita
HUVH-BP1	M G Q Q V V I T A A H W M Y L L G V V V I V I T M I F R A N
HUVH-BP2	M D P P A W A A L L E A C A L G A W M R G S S W A Y P A A N
HUVH-BP3	M T Q A H L S V P G A A R R P R S K I A L G L L A C A L G W
HUVH-BP4	M S S I V V A R F D S V P S A R S A A H A L V G D G F R E E
HUVH-BP5	M A A P R L P Y P I P I A L T D A L D R S V S A E L V A V L
HUVH-BP6	M A R S F A P S A P K R S M L P L V L V F L C A L A P V L A
HUVH-BP7	M L L P G L A M L F G R G G P R D E A G R R V F R L R P V R
HUVH-BP8	M P L F A A S Q H P R S P F A G A A P L A H R P L S A I A A
HUVH-BP9	M N N L F A A P T P E E H A A L L Q E I G P L P L S G Q A W
HUVH-BP10	M A A L A Y L L L S R R A R P A A A P R P L R A L P A G R R
HUVH-BP11	M N P H L P P D D D D R D L R A L Y R E L P R H E P D I M L
HUVH-BP12	M S P I S R S T P A R L T V Q A T A K L P R L V L L G L S L
HUVH-BP13	M R R A A K W W G P A A T W T L A A L L V L L V G H G V V P
HUVH-BP14	M A C F M A L V L A R F G F G F C M L L A A L M L L V A A T
HUVH-BP15	M R P T S I L A V P A D L P G A D R Q A R R H A L V R L G V
HUVH-BP16	M R W R S L M W I L W P S F L A A G V G S A L I F A L I D P
HUVH-BP17	M N P D G G I F D N R W H L R L P V R V P A L A V A L G L L
HUVH-BP18	M N Q G L L Y L A A S V A C S V T V A V L L K L A R R H A I
DNT	M D K D E S A L R Q L V D M A L V G Y D G V V E E L L A L P
AC-Hly	M Q Q S H Q A G Y A N A A D R E S G I P A A V L D G I K A V
TCF-A	M H I Y G N M N R A T P C R G A V R A L A L A L L G A G M W
BapC	M V G R S C H R A G W L Y R A T F L L Y A A N C A Y P A N A
BrkA	M Y L D R F R Q C P S S L Q I P R S A W R L H A L A A A L A
Vag8	M A G Q A R G W Y G A G G R H P I H F Q I S A G A A L M L G
BopB	M R M T V M S T T I S T A P S G A A L A P S R I D M R A P E
BopC/BteA	M L S N N V N P V V G L S Y R P L P E T P P S G Q A A A H P
BopD	M S V S P T S P G S F G A G P V F D S E L Q A P A P S A Q R
BopN	M T R I D A A P N P F H A A M Q G R H D A S A N T S S G W L
Bsp22	M S I D L G V S L T S Q A G G L Q G I D L K S M D I Q T L M

DNT, toxina dermonecròtica; AC-Hly, toxina adenilat ciclasa-hemolisina; TCF-A, factor de colonització traqueal A.

Els resultats mostren com cap de les seqüències aminoacídiques estudiades, tant de les proteïnes precandidates com dels mecanismes patogènics de *B. pertussis* no inclosos en les composicions vacunals DTPa, presenta una estructura de barril beta, podent ser totes elles proteïnes globulars (Taula 7).

Seguidament i després d'haver realitzat una primera aproximació de les característiques estructurals i de localització de les proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics de *B.*

*pertussis* no inclosos en les composicions vacunals DTPa, s'ha continuat amb la seva caracterització mitjançant la cerca d'epítops de cèl·lules B i d'epítops de cèl·lules T en les seves seqüències aminoacídiques. Primerament, per a la identificació d'epítops de cèl·lules B s'ha utilitzat el programa BepiPred, el qual realitza una predicció de potencials epítops de cèl·lules B lineals (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?BepiPred-2.0>)<sup>25</sup>. Els resultats obtinguts de dita predicció es mostren a la Taula 8.



**Taula 8.** Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops lineals de cèl·lules B en la seqüència aminoacídica de les proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics de *B. pertussis* no inclosos en les composicions vacunals DTPa.

Referència	Nombre d'epítops lineals de cèl·lules B identificats	Pèptids
HUVH-BP1	8	GSDVR, TNG, GISAKAAGV, QIQAPSEALLDAWQRRRAVVVPESVEESGTMDKGELAAAVDYDSGSVPLGKQGW, LFPSPALRGG, RD, PDQAAGILGVEPG, WIPN
HUVH-BP2	2	LGRRFALA, ALWGARLAGWDSRPPPW
HUVH-BP3	5	HLSVPGAARRPR, GRR, FVWYDNP, EKFDRLYNPLGLQVSR TG, LD
HUVH-BP4	6	DSVPS, GDGFRE, RTGRRMSRPWRFPGDLRTRARW, VLTGYGR, ASGLRRARAEAYAGQLARD, D, EE, AGGLQVEKARSRWPGARGQSTPTGWRTRAPRPPAQR TQ
HUVH-BP5	7	RLPYPIPIALTDALDR, ELAHR, VETQTHHPLG, DSDRSNEAG, EAGATGVAQVGWQHWRYPWEDWRAGRLAIIAIDEIAPRLLAWAGAGADAAAARQRQRVALTFGLDGAGWN, AGLVPESRHPDASGLPVAGQSMRHD, GLHKQNFRLIEQQLVEETGGMASGAAGRPAKLFRRFRDVLLEAIAIGSKLPLA
HUVH-BP6	7	FAPSAPKRS, NNPQWWPEDSSNYGTLVQPQRPMPTAQQQLTLDGKPFDPAGL, ACPE, SQGKNVD, GEVPQKVLDAYRGTMLRARPEQLGRYLLGQDAASAAL, DGV
HUVH-BP7	8	GPRDEAGR RVF, RLTD, DQRM RDY, VPPLYRLERLSGRYQDTARERSAPRS, DWPAP, RLVPN, RPADAVTAE
HUVH-BP8	6	I, AQGEAALP, YVEDPAWPRG, PPAAPERSVNDGYQPLAQRDLPKYDN, LAVRPHTF, KFPEPEPPAEAMAPLSEPPPRDEVDHEEPVQRQPAVRSILFAILLALATLGVAVYWWQRLTGTSGVITSSERVTPGATA TSPDSREAEPPAAGAASPOGGDAGSADTSGAAPPAAQAQAGPDAAPADVPEDAATDAQAESEAAATPAPAAARVTV RINVPQWGEIWIWVRRGVSPPMKELRLVPG, DLPPY
HUVH-BP9	4	AAPTPEEHAALLQEIGPLPLSGQAWPD, GLPPGQVNP, VTRIDESGLRQTWITRREVAWQDIQFAKFVPLLF, GRPIVFQGGTRD
HUVH-BP10	2	LSRRARPAAPRPLRALPAGRRRMP, GSGGGYRGQADF
HUVH-BP11	4	LPPDDDRDLRALYRELPRHEPDIMLDASIREQAQRAAEADRRARRPRA, LEQYALQPAAEVELQAEQEAQAQTRDAVPEPPAPDPAALAPPPLGALAPEAARGAAESSAQDAAPARRGYMPQRAAP AVRAEKQQENLAASARQRDDPAYAQRVE, REGKPEAAA, LAWRRAPGLALPPDLEQLAPADGGT
HUVH-BP12	21	SRSTPARLTVQATAKL, FMRDPWK, AHA, FGPWLG, RRAEAQPL, GEPAARDYG, RL, DRPFLG, PRSLLWQVRWLPW, AEGSDYWRNWKWTWLASYDWPDLRITGRTRLDLPWYLW, RWRRAWLYAPH, DGPND, RRGVVNTLDWF, HFGWPAQISRNIAARQTGTGEASISW, LRSRPLAW, YARSYRT, LQANLQ, SGQR, DNMSFTYD, TTSSLRDGTAAYS DGATE, RGGRRADRH
HUVH-BP13	3	AKWWGP, PEARVSDAP, YRRTRR
HUVH-BP14	4	ALERSQ, LVGGAPHWLAGNS, A, WLRARRAAAAEQPAPRKAAPPKGAAPARAAKAAAKTQIAPRGQRIPW
HUVH-BP15	10	ILAVPADLPGADRQARRHAL, VRNDGIPADALATLDWAIVLM, RGRAG, RGE, PLVRRHLQAGGELGAAA, Q, VMSCPCA, AQGD, YGSLAW, NAWRLRRHR
HUVH-BP16	2	IFGQVPTS, PGGQDE
HUVH-BP17	7	GIFDN, P, GSRGGAPA, WRVLGGRGWM, DAEAGSRVTN, PALPPGHWR, VQAATSW
HUVH-BP18	9	I, PDAQALRQAMQGV, YAGIVKSDA, GESLTAR, RRRAPAGAADDAPDRRAAW, GTA, IRRTRWQAR, SLPD, RLSA
DNT	47	LALPSEESGLAGGRAKREKAFAFSEAPNGDEPIGQDAR, FPKYRPVAVSNLK, RARLEPE, RVPHPL, LKRRRQRPVDRSGRLG, GTVDLDAD, RRM DGEPD DGS LD TAEHD, FQASGPYGVVADAG, IRAQGSVDSPGDMPRLDA, LRDVRYGDY, GARRGNASTMPAVAAGEYDEIVASGA, S, RPL, RLEQETAGMLLDGQEP, DFRSDAFASYAEYAAQFNIDYDQY, TVDQWCLPLQVRHYKVLTSQPGLIARGIENHNRIEYCLGRPLTDL, ELWSDVLANAEVMQNPT, EPQGRFRTGRRTGGWFLGGPATEGPSLRDNYLLKLRQSNPGLDVKK, YRQEYRLPAGAL, SALYKPEW, QDRSYR, GKLSFTRTQYGNLRFVVRQRIAGLSGQ, FEPVP, VGGRNQA, GQLASEWRMAGV DATGLVESTSGGR, YTRGLGPLSEC, LPPRL, LDVPGRGAPEIFGRIRTRNLVALAAE, AAP, QARRVALRHIDTCRSLRALPRAESD, DAGLRQR, GDLSPVNDVLYRAGYDLD, DRNTSLGRQAR, GYENA, HAATASEVVEAVSPRLGNVFDISNVAQLERGIGNP, WRQASGG, AISPTRLDYANTDIGLNLHGDISPLRARPLGGRRDIDLPP, RYDRPVRMSAPRALDASVFRPVDG,

		EIEYAYGAPAAAAREVMLT, GDEG, V, STELGDWATARE, GYAPISIPAPMRNDD, GKDVPPGGSTRITRHHDEGAGS, YNAAVQASAV, LAWAGSGSALDVLNER, VTLF
<b>AC-Hly</b>	37	SHQAGYANAADRESGI, PHSTSLIAEGVATKGLGVHAKSSDWGL, LSKLFGRAPEVIARADNDVNSSLAHGHT, ERLDYLRLQAGLVTGMAD, VVASNHAGYEQ, FRVKETSD, RKGDDDFE, KVIGNAAGIP, SNFRDSARSSVTSVTDYLARTRAASEATGGDLRERIDL, K, RAGARSVGTARRQFRYDGMNIGVITD, HAV, HGTEQNNPFPEA, YGVAGKSLFDDGLGAAPGVPSGRKSPDVLETVPASPGLRRPSLGAVERQDSGYDSLGVGSRFSLSLGEVSDMAA, GARQDDAEPGVSGASAHWGQR, RAGSTNTPQEA, GEASSA, FFRGSSRWAGGFGV, DAPAGQK, YADQ, K, SAYGYE, KTAATEGAVA, RGVQQPIIEKLANDYARKIDELGGPQAYFEKLNQARHEQLANSQDGLR, LQAGWN, TEISKAL, DNLSKV, QGERVAGQPVVLDVAAGGDIASRKGERPALFITPLAAPGEEQRRRTKTGKSEFT, VGKQDRWRIRDGAADTTIDLAKVVSQVLDANGVLKHSIKLDVIGGGDDVVLANASRIHYDGGAGTNTVSYAALGRQDS ITVSADGERFNVKQLNANNVYREGVATQTTAYGKRTENVQYRHVELARVGLVEVDTLHVQHI, GGAGNDSITGNAHNDNFLAGGSGDDRLDGGAGNDTLVGGEGQNTVIGGAGDDVFLQDLGVWNSQLDGGAGVDTVKY NVHQPSSEERLERMGDTGIHADLQKGTVEKWPALNLSVDHVKNENLHGSRLNDRAGDDQDNELWGHGNDTIRGR GGDDILRGGGLDLYGEDGNDIFLQDDETVSDDIDGGAGLDTVYSAMIHPGRIVAPHEYGFGIEADLSREWVRKASAL GVDYYDNVRNVENVIGTSMKDVLIQDAQANTLMGQGGDDTVRGGDDLLFGGGDNDMLYGDAGNDTLYGLGDD TLEGGAGNDWFGQTQAREHDVLRGGDGDVTVDYSGTAHAGIAAGRIGLILADLAGRVDKLEAGSSAYDVTSGIE NVVGTTELADRITGDAQANVLRGAGGADVLGAGGDDVLLGGDGDQLSGDAGRDRLYGEAGDDWFFQDAANAGNLL DGGDGRDVTDFSGPGRDLGAKGVFLSLGKGFASLMDEPETSNNLRNIENAVGSDARD, VLI, DA, ANV, L, EGSDDLSDAGNDDLFGGQGGDDT, LFGVGYGHDTIYESGGGHDTI, AGADQLWFARQGNLEIRILGTDDALTVHDWYRDADHRVEIHAANQAVDQAGIEKLVEMAQYPPDGGAAAAAPPAA RV
<b>TCF-A</b>	8	GNMNRATPCRGAV, TLPSPSAWALKPLSLTDELKLVLP TGMSLEDFKRSLQESAPSALATPPSSSPPVAKPGPGSVAEAPSGSGHKDNPSPVV GVGPGMAESSGGHNPVGGGTHENGLPGIGKVGGSAPGPDSTGSGPDAGMASGAGSTSPGASGGAGKDAMPPESEG ERPDSGMSDSGRGGESSAGLNDPDGAGKPPREEGEPGSKSPADGGQDGPVPRDGGDADPQPPRDGNGEQPPKG GGDEGQRPPPAAGNGGNGGNAQLPERGDDAGPKPEGEGGDEGPQPQGGGEQDAPVPPVAPAPPAGNGVYD PGTHLTTPASAAVSLASSHGWWQAEMNALS KRMGELRLTPVAGGVWGRAFGRRQVDVNRVSRFRQ, RIKFDRGGTGGDD, DAKGRRVRGQYRG, ADYTASNGLRIKDD, RQFDLGDG, IRHKVRLDG, EYAKGSRQTMPW SCHRAGWLYRATFLLYAANCAYPANAQSVSGSQVSNGPITSPHVVVGGELIVGDTGAGTLLIEAGGTVLNDWAYIGSD NGAVGTLTVSGRDGAGAASTWTTVDVSVIGVAAGSRGTLEVLGGARAQSGWGTIGVAAGSVGVTVSGPGSVWNIAT VNSFQIGSGSGTLWIDQGGAVYSGQVIGWNPGS DGHVTVLGPATVWNP LNNIYVGLGGT GELDIRDGAAVATAGSS PPGAAASIYIGTSAGSAGTVTVSSATAVSTLTSTDRIEIGSAGAGLTVAKGGMVGVASDAWIAITGSSGTLNLTGDASG RGVLETGSVIKGAGNATFNLDGGVLRANRDEANFLNGFSTQAVSGGAWFDNAHDVGVVTAFTSGTSSFNKLAGATLTL SGNSAAFTGNTDIQAGTLQVDGVLGGPVDVLAGARLTGTGRVATANKGTIAPGRSFGFTLIAGDYAAQGGNLEIRT QLGADDSPTDRLVITGASAGVTPVTVENIGGTGASTQRGIQVQVNGASAGRFLNLANGDYVIEGRPALVAGAYVYVLLQ DAADGDWYLSLPPDPGAPQGGGGLPGAGEPVLYQPGVPVYE, LSRLSLRQRVGNRLYDPADVGRNG, GSASQLDPSASTTGERQDVS, DRILAGGQEQSRL, YKADTRVSSYINGT, WYGRDGAYV, IWFDSLSSRLAGLKDGRKAHGY, KAFGLREG, TRFDSFDRFGRVEDDKGDSL, LDYKSSWQAGGANRE, KHEFLDG, PVSSRMARTW, DYGWGERYAIYQ, DADADFAGS
<b>BapC</b>	14	RFRQCPSLQIPRS, RLAPAAAQAPQPPVAGAPHAQDAGQEGEFDRDNT, AVFDDGVGINLDDDPDELGETAPTLKDIHISVEHKNPMSKPAIGVRVSGAGRALTLAGSTIDATEGGIPAVVRRGGTLELD GVTVAGGEGMEPMTVSDAGSRLSVRGGVGLGGEAPGVGLVRAAQGGQASIIDATLQSLGALIDAGGSSISVAGGSIDMD MGPFGPPPPPLPGAPLAAHPPDRVAHVHAGQDGKVTREVALRAHGPQATGVYAYMPGSEITLQGGTVSVQGGDDG AGVVAGAGLLDALPPGGTVRLDGTTVSTDGANTDAVLVRGDAARAENVNTVLRATAKSLAAGVSAHQHGRVTLRQTRIEI AGAGAEGISVLGFEPQSGSPASVDMQGGSIITGNRAAGIALTHGSARLEGVAVRAEGSGSSAAQLANGTLVVSAGSLA SAQSGAISVTDTPKLMPGALASSTVSVRLTDGATAQGGNGVFLQQHSTIPVAVALES GALARGDIVADGNKPLDAGISLS VASGAAWHGATQVLQSATLKGKGTWVYNADSRVQDMSMRGGRVEFQAPAPEASYKTLTLQTLGNGVFLVNTNVAA GQNDQLRVTGRADGQHRVLRNAGGEADSRGARLGLVHTQGGGNATFRLANVKGAVDLGTWRYSLAEDPKTHVWVSL QRAGQALS GAANAANAADLSSIALAESNALDKR LGELRLRADAGGPWARTFSEERQISNRHARAYDQT, GLDRGWSASGGRW, TYADRTYPGDDGGKVK, DGGYY, RLGR, AGTDGGRVTAD, LEGGRRFELPND, RTSGKRYRASNGLRVKVDANTATLG, RFRRIALAGG, TQEFKSTGDVRTNGIGHAGAGRHRV, AALGKGHNLY, EYAAGDRINIP
<b>BrkA</b>	14	QARGWYGAGGRHIHFQISAGAALMLGLLDVAGAAAVTAAQRIDGGAFLGD, AIATTKASEHGINVTGRTAEVVRTGGTIRTSGNQAQGLRVGTENAPDNTALGASVFLQNLIIETSGTGALGVSVHEPQGGG GTRLSMSGTTVRTRGDDSFALQLSGPASATLNDVALETAGQQAPAVVWQGAQLNAQGLVVQVNGAGVSAIHAQDAG SFTLSGSDITARGLEVAGIYVQEGMQGTLTG,
<b>Vag8</b>	14	RVTTQGDTPALQVEDAGTHVSMNGGALSTSGANSAPAAWLLAGGSAQFRDVLRTVGEASHGVDAVAHSEVELAHAQ VRADGQGAHGLVTRSSAMVRAGSLVESTGDGAAALLESGLHTVDGVSVHGHGAAGLEVGDGSENVSLNGLARLSSDQP TAIRLIDPRVNLNDIKDRAQLLDIAPEAQPDGSPQARVVRVALADGGTWAGRTDGAHVTVRLLDRGVWTVTGDSRV AEVKLEGGTLAFAPPAQPKGAFKTLVATQGISGTIVMNAHLPSGTADVLVAPQGGFRQVLLVNNNTDDGTESGATKV PLIEDEQGHATAFTLGNMGGRV DAGARQYELTASEAQADKARTWQLTPTNELSTATAAVNAMAIAASQRIWQAEMDV

		LLRHMSGLHSIGSPGGFWARGLSQRQLDGTGYGPWQKQT, GLDRRVAGGATTA, SETRRDGGAYRAGH, LNDSGSYV, VKYNRFRHGFDIRTTDLKRVDKHRSH, GRRIDIDGG, GSRYEASNGLRVRADGAHS, GRQMRLANG, AQELGADNA, TNGIRHVTRSRRGGFA, GKRHALYADYEYAKGARFEAPWTLO, GY
<b>BopB</b>	13	STTISTAPSGAALAPSRIDMRAPEPGSAGEGAG, RPALPASPSLRTAPVLDPVPPVRLSPADL, VDGQLATARENLDQAQVKAKQNTQAQLDKLDAWFRKAEDAESKGWL, DQISREAGGPPI, GVDQSQADQ, IRGAWDRA, QVLQGGTAVAQG, VG, DRKQADLLVADKADLAA, E, ADDIKK, LA, NLGR GLSYRPLPETPPSGQAAAHPMSRLLEPNDEFVRSVASPRLHHSSEALRE, RQFQASGDRSLQQLRDLEVALNHWEASQPREFAKRG, QQLHEQAPSHANLDVKWLDGLRAGSMALQGDVVKV, MQNLEDLHTRRPDEFAAR, AKQHGTPPTASDVAGMPQWQEYTA MLRERFAGLDIRPNLTAEENGVA, EA, A, ADGVSHQGDVG, QADDD SALWSRPSAADSGGRLSVEAGAKASTDFEAPASKGELLRGKGISGEAVL, MSVSGSRAGAAGEAEGSLRLY, FEPFALSGSIGREEADGTAASANPVLSLNVSAELSSKLGLEA, LDAEGR, IDKRS DGLSVRLEAQAEAF, LHSKYADAHGL, A, VTGSAANVG, LVAS, NIGW, LRASQLDHDAKTSGNESQLN, IDATSQKLDALNSASRIRKVDGFAAGDGA, ADLSHD
<b>BopC/BteA</b>	21	
<b>BopD</b>	10	PTSPGSFGAGPVFDELQAPAPSAQRGGAAAPVPPVDRRGVEPGDPTLGMPLPAPDLLAGGAVSRTRAALDDDLDAARL, RDAARIARDAEATRQTALGD, Q, QAAS, FVQLGA, AMGGAAAQAKGAAFSEQASTSRKVAAGLHDAP, TQLEAQAAASFGADAARSSAKSQRVSS, SAAQERRAAEHARRAELDVEAKVHETASRRADE, Q, AGMEQSRSETARSV DAAPNPFHAAMQGRHDASANTSSGWLQGRQRIAPAPTGISLADAAE,
<b>BopN</b>	15	AAEEKHHSERKVTARPMWLDAQAELFSTHDPDAQA, RGAPMQL, AQAFPGVTQ, GEHEDAAPHALEA, A, G, RSADELAF, YGNDD, AAATPSTDGV, Q, GNAGSQECADAQG, EDKWIAPA, AERHGANALSE, TQIYADMD
<b>Bsp22</b>	9	SLTSQAGGLQGLDKLSMD, E, K, E, AQ, RAKAEFPPNPKPGDITIPGWDSQKISRIEVP, AGLTGMFEARDGRVTGPDGRGTQVVNGTGVMAGSTTYKELE, LDTASNTQQMD, NKRNEAFEVMTNTEKRRSDLNSSIT

DNT, toxina dermonecròtica; AC-Hly, toxina adenilat ciclasa-hemolisina; TCF-A, factor de colonització traqueal A.

Així, s'observa com, en diferent mesura, totes les proteïnes precandidates presenten algun epítot lineal de cèl·lula B, d'entre 2 pèptids com és el cas de les proteïnes HUVH-BP2 (159 aa), HUVH-BP10 (100 aa) i HUVH-BP16 (79 aa) i fins a 21 pèptids en el cas de la proteïna HUVH-BP12 (578 aa), coincidint amb la proteïna precandidata de major tamany (Taula 2 i Taula 8). Pel que fa als mecanismes patogènics prèviament descrits de *B. pertussis* i no inclosos en les composicions vacinals DTPa, aquests presenten d'entre 8 i 47 pèptids, sent destacable la identificació de 47 i 37 pèptids en les toxines DNT i AC-Hly, respectivament.

Seguidament, s'ha dut a terme una identificació d'epítots de cèl·lules T mitjançant la cerca de pèptids d'unió a molècules MHC de classe I i de pèptids d'unió a molècules MHC de classe II en les seqüències aminoacídiques de les proteïnes precandidates. Dita identificació s'ha realitzat a través de l'eina i el programa de predicció NetMHCpan i IEDB, per a la predicció de pèptids d'unió a molècules MHC de classe I i II, respectivament (<http://tools.iedb.org/main/tcell/>)<sup>26</sup>. En una població determinada, certs al·lels d'HLA (*human leukocyte antigen*) s'observen amb major freqüència que d'altres. Així, per la identificació de pèptids d'unió a molècules MHC de classe I i classe II en les seqüències aminoacídiques de les proteïnes precandidates s'ha considerat un petit conjunt d'al·lels per tal de cobrir la major part de la població, el qual és d'ús freqüent en el desenvolupament de vacunes. Amb aquest fi, les formes al·lèliques de les molècules d'HLA de classe I i classe II utilitzades es troben recollides a l'Annex 1 (*veure Annex 1, pàg. 72*), havent-se considerat un total de 27 variants per a les molècules MHC de classe I

(tenint en compte pèptids de 9 i 10 aminoàcids de longitud per a cada variant al·lèlica) i un total de 27 variants per a les molècules de MHC de classe II (tenint en compte pèptids de 15 aminoàcids de longitud per a cada variant al·lèlica). Aquests conjunts de referència han estat dissenyats pels experts seguint els següents criteris; I) les especificitats més comunes en la població general, segons les dades publicades a les bases de dades DbMHC i allelfrequencies.net, i II) especificitats d'unió representatives comunament compartides, és a dir, supertipus. Així, en termes de cobertura de població, els conjunts d'al·lels de referència per a les classes I i II proporcionarien una cobertura superior al 97% i al 99%, respectivament<sup>26</sup>. Pel que fa als llindars utilitzats per a dur a terme les prediccions de pèptids d'unió a molècules MHC de classe I i classe II, es van considerar aquells pèptids d'unió a molècules MHC de classe I resultants amb un *percentile rank* igual o inferior al 1% i els pèptids d'unió a molècules MHC de classe II resultants amb un *adjusted rank* igual o inferior al 10%. Els resultats obtinguts de la predicció de la identificació d'epítops de cèl·lules T es recullen a la Taula 9 i als Annexos 2 i 3.

**Taula 9.** Resum dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops T en la seqüència aminoacídica de les proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics de *B. pertussis* inclosos en les composicions vacunals DTPa.

Referència	Nombre d'epítops d'unió al MHC de classe I (percentil rank≤1%)	Cobertura al·lèlica (%)*	Nombre d'epítops d'unió al MHC de classe II (adjusted rank≤10%)	Cobertura al·lèlica (%)*
HUVH-BP1	711	100%	2265	100%
HUVH-BP2	210	96,3%	779	100%
HUVH-BP3	290	96,3%	469	96,3%
HUVH-BP4	190	100%	385	81,5%
HUVH-BP5	438	100%	741	96,3%
HUVH-BP6	258	100%	394	100%
HUVH-BP7	318	100%	497	92,6%
HUVH-BP8	427	100%	735	100%
HUVH-BP9	239	100%	514	100%
HUVH-BP10	125	88,9%	377	88,9%
HUVH-BP11	211	100%	416	85,2%
HUVH-BP12	915	100%	2058	100%
HUVH-BP13	104	100%	236	85,2%
HUVH-BP14	254	100%	915	100%
HUVH-BP15	462	100%	1216	100%
HUVH-BP16	107	85,2%	348	88,9%
HUVH-BP17	194	96,3%	481	88,9%
HUVH-BP18	427	100%	1416	100%
DNT	1970	100%	4438	100%
AC-Hly	1461	100%	2243	100%
TCF-A	578	100%	577	96,3%
BapC	755	100%	1229	100%
BrkA	918	100%	1571	100%
Vag8	839	100%	1462	100%
BopB	434	100%	1041	96,3%
BopC/BteA	668	100%	994	100%
BopD	222	96,3%	378	70,4%
BopN	401	100%	706	92,3%
Bsp22	226	100%	236	70,4%

\*Percentatge de cobertura d'al·lèls d'HLA respecte del conjunt d'al·lèls utilitzat per a dur a terme la predicció.

MHC, complex major d'histocompatibilitat; DNT, toxina dermonecròtica; AC-Hly, toxina adenilat ciclasa-hemolisina; TCF-A, factor de colonització traqueal A.

Els resultats de la predicció d'epítops de cèl·lules T mostren com, per una banda, tretze de les divuit proteïnes precandidates (72,2%) presenten epítops d'unió al MHC de classe I que cobririen el 100% de les variants al·lèliques d'HLA de classe I més freqüents entre la població i com, en nou de les divuit proteïnes precandidates (50%) s'hi identifiquen epítops d'unió al MHC de classe II que cobririen el 100% de les variants al·lèliques d'HLA de classe II més freqüents entre la població, observant-se un total de vuit proteïnes precandidates (44,4%) que presenten pèptids d'unió a ambdós classes de MHC, les quals cobririen la totalitat de les formes al·lèliques d'HLA de classe I i classe II que es consideren pel desenvolupament de vacunes. Aquestes proteïnes precandidates són: HUVH-BP1, HUVH-BP6, HUVH-BP8, HUVH-BP9, HUVH-BP12, HUVH-BP14, HUVH-BP15 i HUVH-BP18 (Taula 9).

D'altra banda, pel que fa als mecanismes patogènics prèviament descrits de *B. pertussis* i no inclosos en les composicions vacunals DTPa s'observa com tan deu de les onze proteïnes estudiades (90,9%) presenten epítops d'unió al MHC de classe I que cobririen el 100% de les variants al·lèliques d'HLA de classe I més freqüents entre la població i com, tan sols la proteïna secretada pel sistema de secreció de tipus III BopD posseeix epítops d'unió al MHC de classe I que cobririen el 96,3% de les variants al·lèliques que es consideren pel desenvolupament de noves formulacions vacunals. De la mateixa manera, sis de les onze proteïnes estudiades (54,5%) presenten epítops d'unió al MHC de classe II que cobririen el 100% de les variants al·lèliques d'HLA de classe II considerades, mentre que les cinc proteïnes restants (45,5%) posseeixen epítops d'unió al MHC de classe II que no cobririen la totalitat de variants al·lèliques utilitzades per a realitzar la predicció, entre les quals es troben la proteïna TCF-A i les proteïnes secretades pel sistema de secreció de tipus III BopB, BopD, BopN i Bsp22. Així, de la totalitat de mecanismes patogènics prèviament identificats de *B. pertussis* i no inclosos en les composicions vacunals DTPa actualment utilitzades, els sis mecanismes patogènics (54,5%) que presenten pèptids d'unió a ambdós classes de MHC que cobririen totes les formes al·lèliques d'HLA de classe I i classe II considerades per a la realització de la predicció són les toxines DNT i AC-Hly, l'autotransportador BapC, els factors de residència al sèrum BrkA i Vag8 i la proteïna secretada pel sistema de secreció de tipus III BopC/BteA (Taula 9).

Així, tenint en compte els resultats de predicció de les característiques estructurals, de localització, funcionals i antigèniques de les proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics coneguts de *B. pertussis* i no inclosos en les composicions vacunals DTPa actuals, s'opta per considerar la proteïna HUVH-BP6 com a candidata a tenir en compte per a l'elaboració de futures formulacions vacunals DTPa enfront de la tosferina. Aquesta presenta,

d'una banda, un pèptid senyal mitjançant el qual podria estar situada a la membrana cel·lular externa de *B. pertussis* o ser una proteïna secretada per part del microorganisme i, per tant, estar implicada en el seu procés infectiu i, de l'altra banda, presenta epítops lineals de cèl·lules B, així com epítops de cèl·lules T, a través de la possessió de pèptids d'unió a ambdós classes de MHC que cobririen la totalitat de les formes al·lèliques d'HLA de classe I i classe II més freqüents entre la població i que es consideren pel desenvolupament de vacunes.

Finalment, per les seves característiques estructurals, funcionals, de localització i antigèniques, els mecanismes patogènics prèviament descrits de *B. pertussis* que podrien ser considerats per ser inclosos en futures formulacions vacunals són les toxines DNT i AC-Hly, l'autotransportador BapC, els factors de resistència al sèrum BrkA i Vag8 i la proteïna secretada pel sistema de secreció de tipus III BopC/BteA. En aquest sentit, de forma recent, s'han realitzat múltiples intents per tal de millorar les vacunes disponibles 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 cutània. Així, des del punt de vista de revisar la composició de les actualment utilitzades vacunes DTPa, per tal de millorar la immunogenicitat i la seguretat de les vacunes antipertússiques, els experts ja han considerat el desenvolupament de noves vacunes DTPa amb múltiples components, inclosos nous components antigènics, entre els que destaca la toxina AC-Hly i els factors de resistència al sèrum BrkA i Vag8<sup>34-40</sup>.

## 4.2. Estudi dels epítops dels diferents antígens vacunals de *Bordetella pertussis* inclosos en les composicions vacunals DTPa

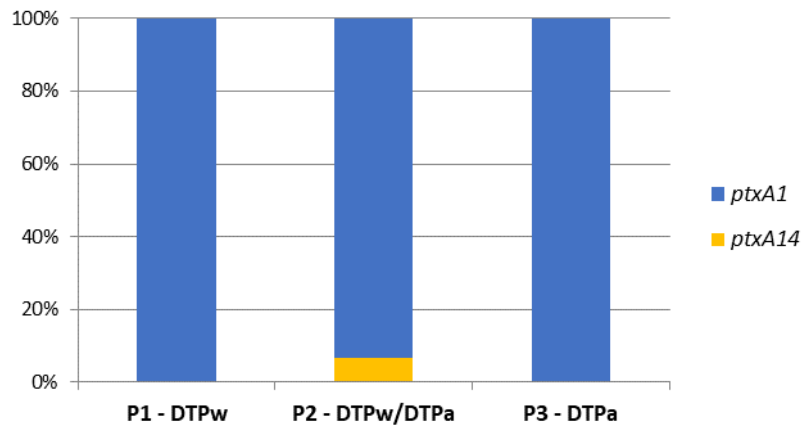
### 4.2.1. Predicció dels epítops dels antígens PT, FHA, PRN, FIM2 i FIM3

Prèviament a l'estudi d'epítops de les antígens inclosos en les composicions vacunals DTPa (PT, FHA, PRN, FIM2 i FIM3), actualment utilitzades per a la immunització enfront de la tosferina, s'ha realitzat l'estudi epidemiològic de les variants antigèniques d'aquests factors de virulència que han circulat en el nostre entorn des de l'any 1986 i fins l'any 2020. Així, s'ha dut a terme una caracterització al·lèlica dels antígens vacunals mitjançant l'anàlisi de la seqüència nucleotídica dels gens que codifiquen per a la PT (*ptxA*), la FHA (*fhaB*), la PRN (*prn*), la FIM2 (*fim2*) i la FIM3 (*fim3*) en una col·lecció de 384 aïllats clínics de *B. pertussis* productors de tosferina.

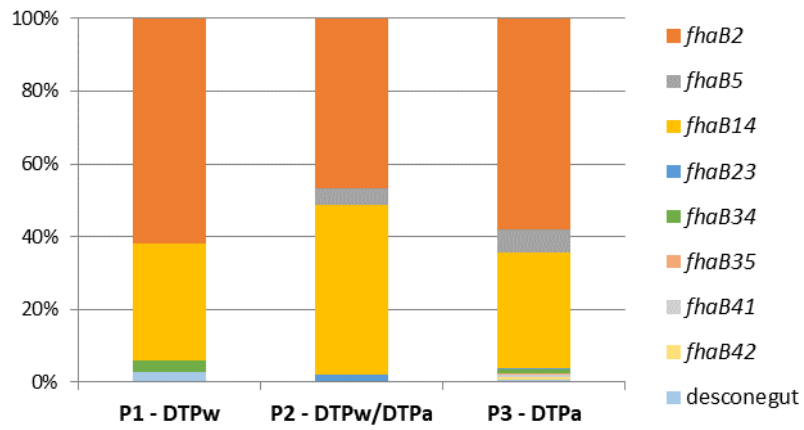
D'aquesta manera i tenint en compte que els al·lèls inclosos en les composicions vacunals DTPa són les variants *ptxA2* i *ptxA4* per a la PT, *fhaB1* per a la FHA, *prn1* i *prn7* per a la PRN, *fim2-1* per a la FIM2 i *fim3-1* per a la FIM3, s'observa com, durant el període d'ús exclusiu de les vacunes DTPa (2006-2020), les formes antigèniques circulants són diferents de les que estan incloses a les composicions vacunals utilitzades, amb la única excepció de la FIM2 i la FIM3, les quals es troben incloses tant sols en algunes de les composicions utilitzades (Il·lustració 8). Així, el 100% dels aïllats del període 2006-2020 presenten l'al·lel *ptxA1* per a la PT, el 46,1% i 25,3% dels aïllats presenten els al·lèls *fhaB2* i *fhaB14*, respectivament, per la FHA i el 98,7% dels aïllats presenten l'al·lel *prn2* per la PRN. Pel que fa a les fimbries, el 99,3% dels aïllats d'aquest mateix període presenten l'al·lel *fim2.1* per la FIM2 mentre que el 59,3% i el 40% dels aïllats presenten els al·lèls *fim3.1* i *fim3.2*, respectivament, per la FIM3.



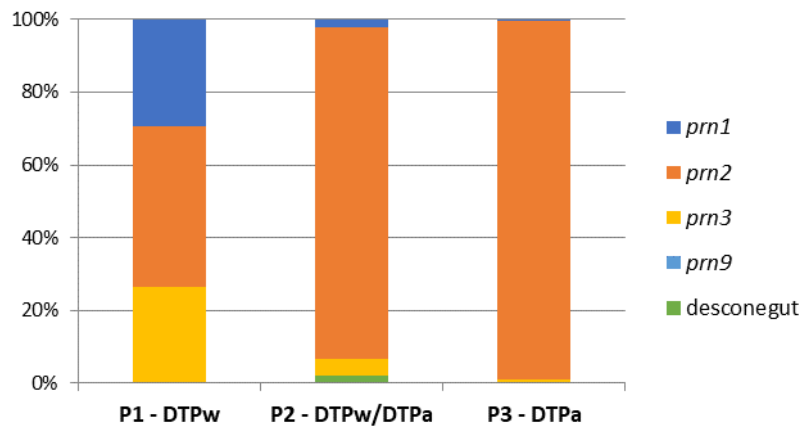
A)



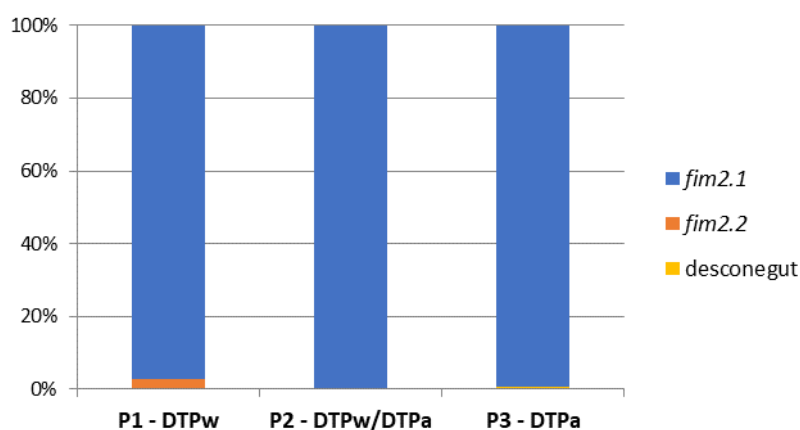
B)



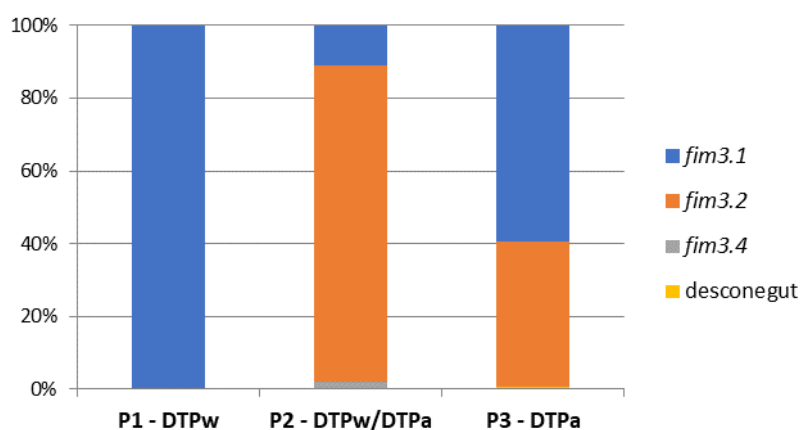
C)



D)



E)



**Il·lustració 8.** Prevalença de les variants al·lèliques dels antígens vacunals de *B. pertussis* entre els anys 1986 i 2020 i segons els períodes vacunals definits; A) Toxina pertussis (PT), B) Hemaglutinina filamentosa (FHA), c) Pertactina (PRN), D) Fímbria de tipus 2 (FIM2), E) Fímbria de tipus 3 (FIM3).

P1, període 1; P2, període 2; P3, període 3; DTPw, vacuna antipertússica de cèl·lules completes; DTPa, vacuna antipertússica acel·lular.

Un vegada identificades totes aquelles variants al·lèliques d'un mateix antigen vacunal de *B. pertussis* que han circulat en el nostre entorn al llarg del període 1986-2020, s'ha realitzat una identificació de la presència d'epítops lineals de cèl·lules B i la presència d'epítops de cèl·lules T de les diverses formes al·lèliques dels antígens vacunal PT, FHA, PRN, FIM2 i FIM3 mitjançant el programa BepiPred i la base de dades EIDB, respectivament, per tal de dur a terme una comparativa posterior entre aquelles formes incloses en les composicions vacunals DTPa i les formes que han circulat al nostre entorn durant l'ús d'aquestes. Els resultats obtinguts d'aquestes prediccions es recullen a les Taules 10-16 i als Annexos 4, 5 i 6.

**Taula 10.** Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops lineals de cèl·lules B en la seqüència aminoacídica de les variants al·lèliques de la PT.

Al·lel	Nombre d'epítops	
	lineals de cèl·lules B identificats	Pèptids
<i>ptxA1</i>	9	RQT, VTSPAWADD, YDSRPPEDVFQNGFTAWGNNDN, DHLTGRSCQVGSSN, AVEAERAGRGTGH, NFYGAASSYFEYVDYGDNAGR, NFYGAASSYFEYVDYGDNAGR, NGITGETTTTEYSNARYVSQQTRANPNPYTSRR, QAESSEAMAASERAG
<i>ptxA2</i>	12	QT, VTSPAWADD, YDSRPPEDV, QNGFTAWGNNDN, H, TGRSCQVGSSN, AVEAERAGRGTGH, NFYGAASS, FEYVDYGDNAGR, QSEYLAHRRIPPE, NGITGETTTTEYSNARYVSQQTRANPNPYTSRRS, QAESSEAMAASERAG
<i>ptxA4</i>	12	RQT, VTSPAWAD, YDSRPPEDV, QNGFTAWGNNDN, H, TGRSCQVGSSN, AVEAERAGRGTGH, NFYGAASS, FEYVDYGDNAGR, QSEYLAHRRIPPE, NGITGETTTTEYSNARYVSQQTRANPNPYTSRRS, QAESSEAMAASERAG
<i>ptxA14</i>	12	RQT, VTSPAWAD, DSRPPGDV, QNGFTAWGNNDN, DH, TGRSCQVGSSN, AVEAERAGRGTGH, NFYGAASS, FEYVDYGDNAGR, QSEYLAHRRIPPE, NGITGETTTTEYSNARYVSQQTRANPNPYTSRR, QAESSEAMAASERAG

**Taula 11.** Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops de cèl·lules T en la seqüència aminoacídica de les variants al·lèliques de la PT.

Referència pròpia	Nombre d'epítops		Nombre d'epítops d'unió al MHC de classe II ( <i>adjusted rank</i> ≤ 10%)	Cobertura al·lèlica (%) <sup>*</sup>
	d'unió al MHC de classe I ( <i>percentil rank</i> ≤ 1%)	Cobertura al·lèlica (%) <sup>*</sup>		
<i>ptxA1</i>	401	100%	544	96,3%
<i>ptxA2</i>	403	100%	552	96,3%
<i>ptxA4</i>	403	100%	547	96,3%
<i>ptxA14</i>	399	100%	538	96,3%

\*Percentatge de cobertura d'al·lèls d'HLA respecte del conjunt d'al·lèls utilitzat per a dur a terme la predicció.  
MHC, complex major d'histocompatibilitat.

Els resultats de la predicció realitzada per a la identificació d'epítops lineals de cèl·lules B mostren la presència d'un menor nombre de pèptids d'unió a cèl·lules B en la forma al·lèlica 1 de la PT, la qual és actualment majoritària, en comparació amb els observats en les formes al·lèliques 2 i 4, incloses en les composicions vacunals DTPa (Taula 10). De la mateixa manera, pels epítops de cèl·lules T, també s'observa un menor nombre de pèptids d'unió a cèl·lules T en la variant *ptxA1* respecte de les variants vacunals *ptxA2* i *ptxA4*. D'altra banda, és curiós com els resultats de la predicció de pèptids d'unió al MHC de classe II no mostren una cobertura per a la totalitat de variants al·lèliques d'HLA de classe II contemplades per a cap de les formes al·lèliques de la PT estudiades, entre les quals s'hi inclouen les variants vacunals *ptxA2* i *ptxA4* (Taula 11).

*Hemaglutinina filamentosa, FHA*

**Taula 12.** Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops de cèl·lules T en la seqüència aminoacídica de les variants al·lèliques de la FHA.

Referència pròpia	Nombre d'epítops		Nombre d'epítops d'unió	
	d'unió al MHC de classe I (percentil rank≤1%)	Cobertura al·lèlica (%)*	al MHC de classe II (adjusted rank≤10%)	Cobertura al·lèlica (%)*
<i>fhaB1</i>	3128	100%	4865	100%
<i>fhaB2</i>	3133	100%	4823	100%
<i>fhaB5</i>	3135	100%	4823	100%
<i>fhaB14</i>	3135	100%	4823	100%
<i>fhaB23</i>	3132	100%	4823	100%
<i>fhaB34</i>	3129	100%	4813	100%
<i>fhaB35</i>	3132	100%	4804	100%
<i>fhaB41</i>	3133	100%	4823	100%
<i>fhaB42</i>	3133	100%	4823	100%

\*Percentatge de cobertura d'al·lels d'HLA respecte del conjunt d'al·lels utilitzat per a dur a terme la predicció.  
MHC, complex major d'histocompatibilitat.

Els resultats de la predicció realitzada per a la identificació d'epítops de cèl·lules B i cèl·lules T per a les diferents variants de la FHA mostren certa variabilitat entre els pèptids identificats en la forma al·lèlica *fhaB1*, inclosa en les composicions vacunals, i les formes al·lèliques *fhaB2*, *fhaB5* i *fhaB14*, actualment predominants entre els aïllats de *B. pertussis* circulants, especialment en el cas dels epítops lineals de cèl·lules B. Pel que fa als epítops de cèl·lules T cal esmentar que totes les variants de la FHA estudiades posseeixen epítops de cèl·lules T d'unió al MHC de classe I i classe II que cobreixen la totalitat de les variants d'HLA de classe I i classe II més freqüents entre la població i utilitzades pel desenvolupament de vacunes (Taula 12 i Annex 4, veure pàg. 74)

*Pertactina, PRN*

**Taula 13.** Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops lineals de cèl·lules B en la seqüència aminoacídica de les variants al·lèliques de la PRN.

Al·lel	Nombre d'epítops lineals de cèl·lules B identificats	Pèptids
<i>prn1</i>	18	LSRIVKAAPLRRRTLAMALGALGAAPAAHADWNNQSIKVTGERQHGIHIQGSDDPGGVRTASGTTIKVSGRQAQGILLENPAAE ELQFRNGSVTSSGQLSDDGIRRFGLTGTVKAGKLVADHATLANVGDWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQAGAGVQIER GANVTVQRSAIVDGLHIGALQSLQPEDLPPSRVLRDNTAVPASGAPAAVSV, ELTLDGGHITGGRAAGVAAMQGAHVHLQRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPVLGDWYGVVDSGSS VELAQSIWEAPELGAAIRVGRGARVTVSGGSLAPHGNIETGGARRFAPQAAPLSITLQAGAHAQKALLYRVLPEPVKLT GGADAQGDIVATELPSIPGTSIGPLDVALASQARWTGATRAVDSLSIDNATWVMTDNSNVGALRLASDGSVDFQQPAEAG RF, TLAGSGL, VFADLGLSDKLVVMQDASGQHRLWVRNSGSEPASANTLLLVTPLGSAATFTLANKDGKVDIGTYRYRLAANGNGQWSLV GAKAPPAPKPAQPGPQPQPQPEAPAPQPPAGRELSAAANAANTGGVGLASTLWYAESNLSKRLGELRLNPDAG G, AQRQLDNRAGRFRDQ, VAVAGG, RGDRGFTGDGGGHT, DSGFY, S, DFKVAGSDGYAVKGYRTHG, RRFTHA, GGAYRAANGLRVRDEGSS, EVGKRIELAGGR, EFDGAGTVHTNGIAHRTELGRTRA, LGRGHSLY, SYEYKGPKLAMPW, F, Y
<i>prn2</i>	18	RIVKAAPLRRRTLAMALGALGAAPAAHADWNNQSIKVTGERQHGIHIQGSDDPGGVRTASG, TIKVSQRQAQGILLENPAEELQFRNGSVTSSGQLSDDGIRRFGLTGTVKAGKLVADHATLANVGDWDDDGIALYVAGEQAQ ASIADSTLQAGAGVQIERGANVTVQRSAIVDGLHIGALQSLQPEDLPPSRVLRDNTAVPASGAPAAVSVLGASELTDG GHITGGRAAGVAAMQGAHVHLQRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPVLGDWYGVVDSGSS VELAQSIWEAPELGAAIRVGRGARVTVSGGSLAPHGNIETGGARRFAPQAAPLSITLQAGAHAQKALLYRVLPEPVKLT GGADAQGDIVATELPSIPGTSIGPLDVALASQARWTGATRAVDSLSIDNATWVMTDNSNVGALRLASDGSVDFQQPAEAG RFKVLTVNTLAGSGL, VFADLGLSDKLVVMQDASGQHRLWVRNSGSEPASANTLLLVTPLGSAATFTLANKDGKVDIGTYRYRLAANGNGQWSLV GAKAPPAPKPAQPGPQPQPQPEAPAPQPPAGRELSAAANA, SNLSKRLGELRLNPDAGG, AQRQLDNRAGRFRDQ, AVAVAGG, YTRGDRGFTGDGGGHT, DSGFY, SR, KVAGSDGYAVKGYRTHG, RRFTHA, GGAYRAANGLRVRDEGSSV, EVGKRIELAGGRQ, EFDGAGT, IHRTELGRTRA, ALGRGHSLY, SYEYKGPKLAMPW, Y
<i>prn3</i>	19	SRIVKAAPLRRRTLAMALGALGAAPAAHADWNNQSIKVTGERQHGIHIQGSDDPGGVRTASGTTIKVSGRQAQGILLENPAAE LQFRNGSVTSSGQLSDDGIRRFGLTGTVKAGKLVADHATLANVGDWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQAGAGVQIERG ANVTVQRSAIVDGLHIGALQSLQPEDLPPSRVLRDNTAVPASGAPAAVSVLGA, ITGGRAAGVAAMQGAHVHL, RATIRRGDAPAGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPVLGDWYGVVDSGSSVELAQSIWEAPELGAAIRVGRGARVTVSGG SLSAPHGNIETGGARRFAPQAAPLSITLQAGAHAQKALLYRVLPEPVKLTGGADAQGDIVATELPSIPGTSIGPLDVALAS QARWTGATRAVDSLSIDNATWVMTDNSNVGALRLASDGSVDFQQPAEAGRFKVL, NLAGSGL, VFADLGLSD, VMQDASGQHRLWVRNSGSEPASANTLLLVTPLGSAATFTLANKDGKVDIGTYRYRLAANGNGQWSLVGAKAPPAPKPA QPGPQPQPQPEAPAPQPPAGRELSA, AESNLSKRLGELRLNPDAG, QRQLDNRAGRFRDQ, VAVAGG, TRGDRGFTGDGGGHT, VAGSDGYAVKGYRTHG, RRFTHA, GGAYRAANGLRVRDEGSSV, VGKRIELAGGRQ, EFDGAGT, IHRTELGRTRA, LGRGHSLY, SYEYKGPKLAMPWT, Y
<i>prn7</i>	18	LSRIVKAAPLRRRTLAM, LGALGAAPAAHADWNNQSIKVTGERQHGIHIQGSDDPGGVRTASGTTIKVSGRQAQGILLENPAEELQFRNGSVTSSGQLSD DGIRRFGLTGTVKAGKLVADHATLANVGDWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQAGAGVQIERGANVTVQRSAIVDGLH IGALQSLQPEDLPPSRVLRDNTAVPASGAPAAVSVLGASELTDGGHITGGRAAGVAAM, ATIRRGDAPAGGAVPGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPVLGDWYGVVDSGSSVELAQSIWEAPELGAAIRVGRGARVTVSGG LSAPHGNIETGGARRFAPQAAPLSITLQAGAHAQKALLYRVLPEPVKLTGGADAQGDIVATELPSIPGTSIGPLDVALAS QARWTGATRAVDSLSIDNATWVMTDNSNVGALRLASDGSVDFQQPAEAGRFKVL, TLAGSGL, VFADLGLSDKLVVMQDASGQHRLWVRNSGSEPASANTLLLVTPLGSAATFTLANKDGKVDIGTYRYRLAANGNGQWSLV GAKAPPAPKPAQPGPQPQPQPEAPAPQPPAGRELSAAAN, AESNLSKRLGELRLNPDAG, QRQLDNRAGRFRDQ, AVAVAGG, TRGDRGFTGDGGGHT, DSGFY, S, KVAGSDGYAVKGYRTHG, RRFTHA, GGAYRAANGLRVRDEGSSV, VGKRIELAGGRQ, EFDGAGTVHTNGIAHRTELGRTRA, ALGRGHSLY, YEYKGPKLAMPW
<i>prn9</i>	24	SRIVKAAPLRRRTL, APAAHADWNNQSIKVTGERQHGIHIQGSDDPGGVRTASGTTIKVSGRQAQGILLENPAEELQFRNGSVTSSGQLSDDGIRRF LGTGTVKAGKLVADHATLANVGDWDDDGIALYVAGEQAQASIADSTLQAGAGVQIERGANVTVQRSAIVDGLHIGALQSL

QPEDLPPSRVLRDNTAVPASGAPAAVSV, ASELTDGGHITGGRAAGVAAMQGAVV,  
 TIRRGDAPAGGAVPGGAVPGGFGPGGFGPGGFGPGGFGPVLGDWYGVVDVSGSSVELAQSSIVEAPELGAIRVGRG  
 ARV, V,  
 GGSLSAPHGNVIETGGARRFAPQAAPLSITLQAGAHAQGKALLYRVLPEPVKLTLTGGADAQGGDIVATELPSIPGTSIGPLDVA  
 LASQARWTGATRAVDLSIDNATWVMTDNSNVGALRLASDGSVDFQQPAEAGRFKVL, VNTLAGSGLF,  
 MNVFADLGLSD, VVMQDASGQHRLWVRNSGSEPASANTL,  
 VQTPLGSAATFTLANKDGKVDIGTYRRLAANGNGQWSLVGAKAPPAPKAPQPGPQPQPQPQPEAPAPQPAGRELS  
 AAANAA, NALSKRLGELRLNPDAGG, FAQRQLDNRAGRFRDQK, AVAVAGGR, TRGDRGFTGDGGGHT, DSGFY, S,  
 VAGSDGYAVKGYRT, RRFTHA, GGAYRAANGLRVRDEGGSSV, EVGKRIELAGGRQ,  
 EFDGAGTVHTNGIAHRTELRGTRA, LGRGHSLY, SYEYSGPKLAMPWTF, Y

**Taula 14.** Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops de cèl·lules T en la seqüència aminoacídica de les variants al·lèliques de la PRN.

Referència pròpia	Nombre d'epítops		Nombre d'epítops d'unió	
	d'unió al MHC de classe I (percentil rank≤1%)	Cobertura al·lèlica (%)*	al MHC de classe II (adjusted rank≤10%)	Cobertura al·lèlica (%)*
<i>prn1</i>	867	100%	1659	100%
<i>prn2</i>	867	100%	1654	100%
<i>prn3</i>	867	100%	1654	100%
<i>prn7</i>	873	100%	1654	100%
<i>prn9</i>	867	100%	1654	100%

\*Percentatge de cobertura d'al·lels d'HLA respecte del conjunt d'al·lels utilitzat per a dur a terme la predicció.  
 MHC, complex major d'histocompatibilitat.

Tal i com s'ha observat prèviament amb la PT i la FHA, els resultats de la predicció realitzada per a la identificació d'epítops de cèl·lules B i cèl·lules T per a les diferents variants de la PRN mostren certa variabilitat entre els epítops presents en les variants al·lèliques vacunals *prn1* i *prn7* de la variant *prn2*, present a la majoria d'aïllats de *B. pertussis* productors de toserina que circulen actualment al nostre entorn. Pel que fa als epítops de cèl·lules T cal esmentar que totes les variants de la PRN estudiades posseeixen epítops de cèl·lules T d'unió al MHC de classe I i classe II que cobreixen la totalitat de les variants d'HLA de classe I i classe II estudiades.

*Fímbrics de tipus 2 i 3, FIM2 i FIM3*

**Taula 15.** Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops lineals de cèl·lules B en la seqüència aminoacídica de les variants al·lèliques de la FIM2 i FIM3.

Al·lel	Nombre d'epítops	
	lineals de cèl·lules B identificats	Pèptids
<i>fim2.1</i>	8	FQRA, IEDPSGNHTK, V, PKISKNALKANGDQAGRTP, DCPSSLGNGV, EPGPTTDYSTGDLRAYKMVYATNPQTQLSNITAATEA, SKITMGANEATQQAAGFDPEVQTGGTSRT, KNGDVE
<i>fim2.1</i>	8	FQR, IEDPSGNHTK, V, PKISKNALKANGDQAGRTP, DCPSSLGNGV, EPGPTTDYSTGDLRAYKMVYATNPQTQLSNITAATEA, KITMGANEATQQAAGFDPEVQTGGTSKT, KNGDVE
<i>fim3.1</i>	4	IEEPSTLNHIKVVQLPKISKNALRNDGDTAGATP, CPQALGALKLYFEPGITTNYDTGDLIAYKQTYNASGNGNLSTVSSATKA, GQHIRMGTDKTTQAAQFTGKVTNGSKS, KPKEDVD
<i>fim3.2</i>	4	IEEPSTLNHIKVVQLPKISKNALRNDGDTAGATP, ECPQELGALKLYFEPGITTNYDTGDLIAYKQTYNASGNGNLSTVSSATKA, GQHIRMGTDKTTQAAQFTGKVTNGSKS, KPKEDVD
<i>fim3.4</i>	4	IEEPSTLNHIKVVQLPKISKNALRNDGDTAGATP, CPQALGALKLYFEPGITTNYDTGDLIAYKQTYNASGNGNLSTVSSATKA, GQHIRMGTDKTTQAAQFTGKVTNGSKS, KPKEDVD

**Taula 16.** Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops de cèl·lules T en la seqüència aminoacídica de les variants al·lèliques de la FIM2 i FIM3.

Referència pròpia	Nombre d'epítops		Nombre d'epítops d'unió	
	d'unió al MHC de classe I (percentil rank≤1%)	Cobertura al·lèlica (%)*	al MHC de classe II (adjusted rank≤10%)	Cobertura al·lèlica (%)*
<i>fim2.1</i>	252	100%	334	85,2%
<i>fim2.2</i>	256	100%	325	85,2%
<i>fim3.1</i>	284	100%	392	96,3%
<i>fim3.2</i>	281	100%	392	96,3%
<i>fim3.4</i>	284	100%	392	96,3%

\*Percentatge de cobertura d'al·lèls d'HLA respecte del conjunt d'al·lèls utilitzat per a dur a terme la predicció.  
MHC, complex major d'histocompatibilitat.

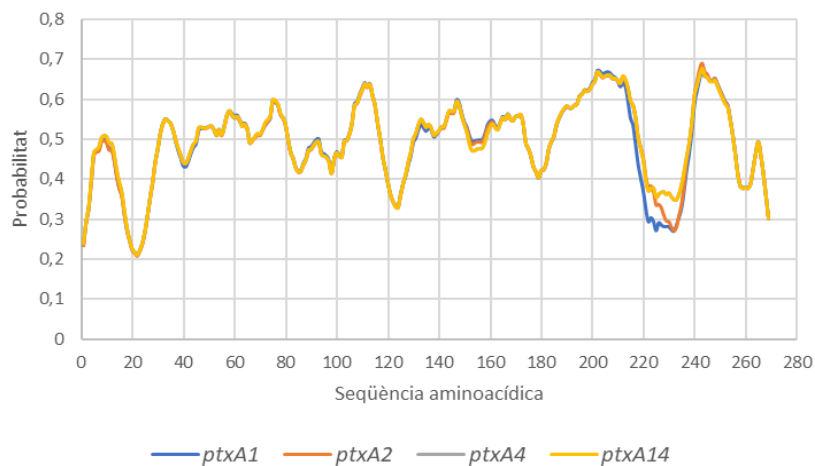
Els resultats de la predicció realitzada per a la identificació d'epítops de cèl·lules B i cèl·lules T per a les diferents variants de la FIM2 i FIM3 mostren poca variabilitat entre els pèptids identificats en les formes al·lèliques *fim2.1* i *fim3.1*, incloses en algunes de les composicions vacunals DTPa, i les formes al·lèliques no incloses (Taula 15). D'altra banda, i de forma similar que amb la PT, els resultats de la predicció de pèptids d'unió al MHC de classe II no mostren una cobertura per a la totalitat de variants al·lèliques d'HLA de classe II contemplades per a

cap de les formes al·lèliques de la FIM2 i FIM3 estudiades, entre les quals s'hi inclouen les variants vacunals *fim2.1* i *fim3.1* (Taula 16).

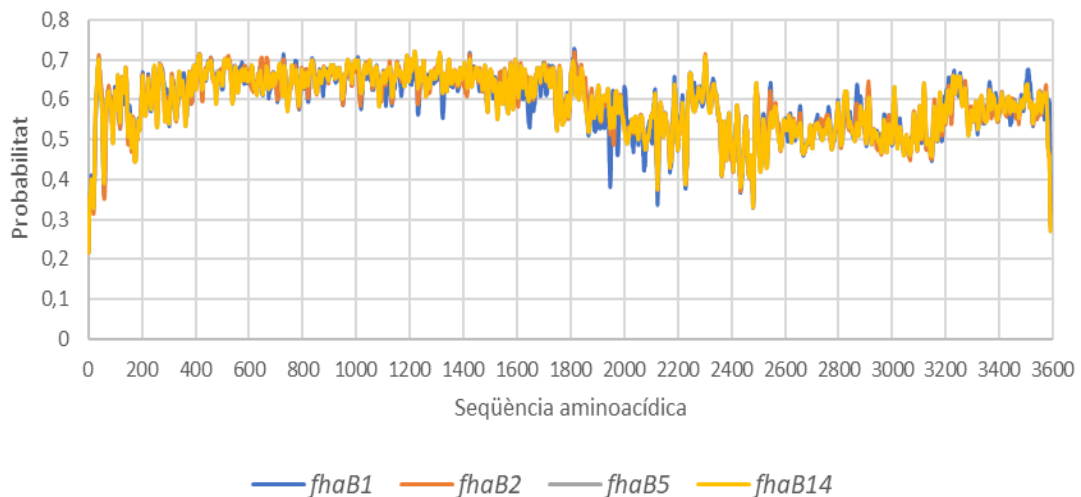
#### 4.2.2. Comparació dels epítops entre variants al·lèliques d'un mateix determinant de virulència

Per tal de realitzar una comparativa entre els epítops lineals de cèl·lules B prèviament identificats per a les diferents variants al·lèliques dels antígens vacunals de *B. pertussis* inclosos en les composicions vacunals DTPa actualment utilitzades s'ha realitzat una representació gràfica de la predicció de la seva presència per a cada una de les formes al·lèliques descrites que circulen en el nostre entorn de cada un dels cinc components antigènics inclosos en les formulacions DTPa, la qual es pot observar a la Il·lustració 9.

A)

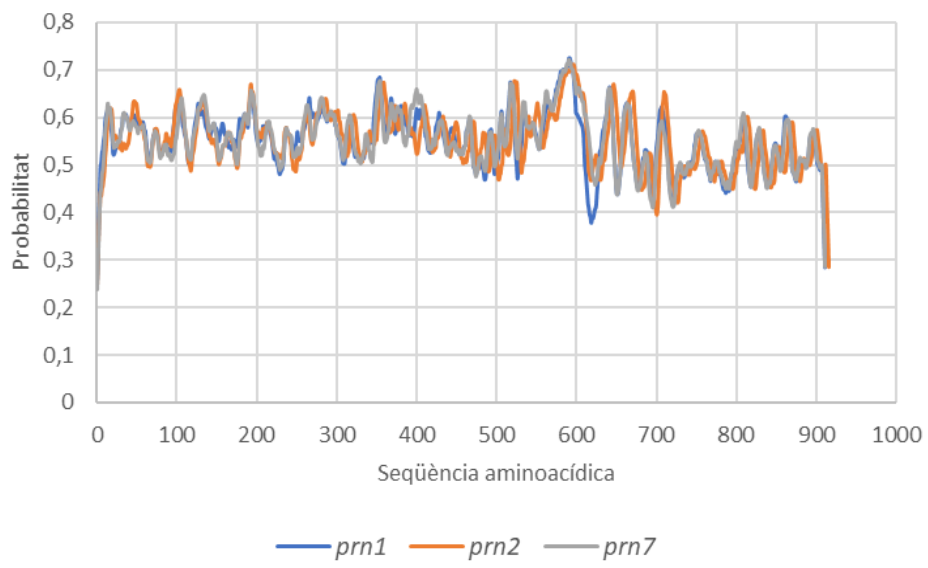


B)

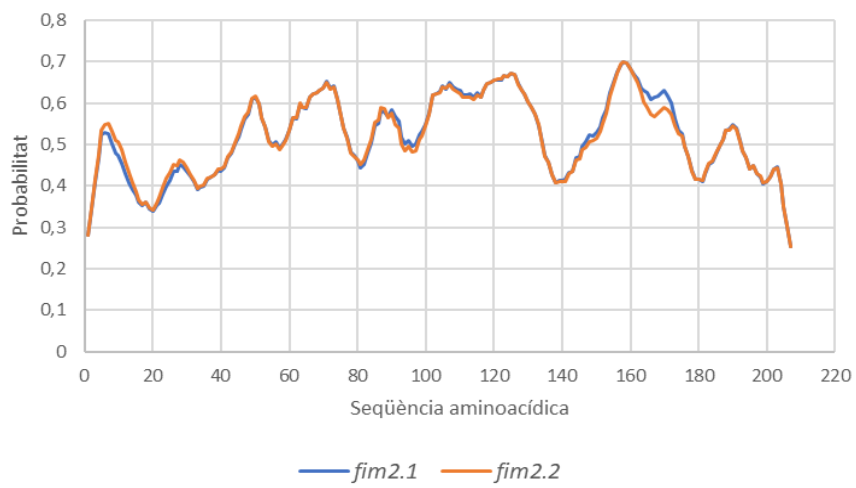




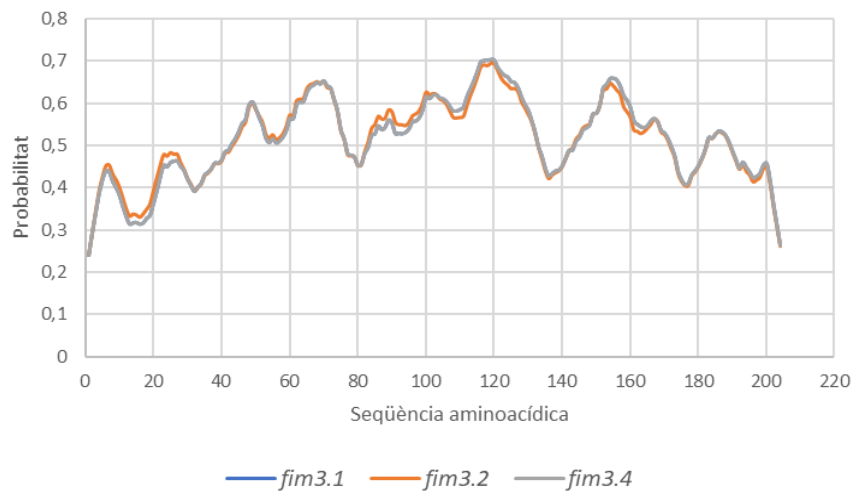
C)



D)



E)



**Il·lustració 9.** Representació gràfica de la presència d'epítops lineals de cèl·lules B en les principals variants al·lèliques del antigens vacunals de *B. pertussis* inclosos en les composicions vacunals DTPa; A) Toxina pertussis (PT), B) Hemaglutinina filamentosa (FHA), c) Pertactina (PRN), D) Fímbrria de tipus 2 (FIM2), E) Fímbrria de tipus 3 (FIM3).

Així, la representació gràfica dels resultats de predicció d'epítops lineals de cèl·lules B permeten observar diferències entre les variants al·lèliques dels factors de virulència de *B. pertussis* inclosos en les composicions vacunals DTPa actuals i les formes antigèniques descrites com a predominants entre els aïllats clínics de *B. pertussis* que circulen en el nostre entorn des de la introducció d'aquestes vacunes, els quals són els causants dels casos de tosferina observats actualment (Il·lustració 9). Així, pels factors de virulència inclosos en la majoria de les composicions vacunals DTPa utilitzades a Espanya (PT, FHA i PRN), les formes al·lèliques *ptxA1*, *fhaB2/fhaB14* i *prn2*, s'haurien pogut veure afavorides per la pressió selectiva exercida per les variants *ptxA2/ptxA4*, *fhaB1* i *prn1/prn7*, incloses en aquestes vacunes i per les quals la població ha estat immunitzada. D'aquesta manera, la pressió selectiva exercida per l'ús de les vacunes DTPa ha pogut condicionar el recanvi antigènic de *B. pertussis*, amb el qual el microorganisme presenta en l'actualitat unes variants antigèniques que podrien presentar un menor reconeixement per part del sistema immunològic de l'hoste, provocant un augment en el nombre de casos de tosferina en el que es considera la reemergència de la malaltia. Per la seva banda, en el cas de les fímbrries, les quals no es troben incloses en totes les composicions vacunals DTPa utilitzades, les variants vacunals *fim2.1* i *fim3.1* se segueixen observant actualment entre els aïllats de *B. pertussis* productors de tosferina (Il·lustració 8D i 8E). És per això que, la seva absència en moltes de les formulacions vacunals DTPa utilitzades ha pogut generar una menor pressió selectiva enfront de les FIM, no observant-se un reemplaçament complet de les variants al·lèliques vacunals.

## 5. Conclusions

### 5.1. Conclusions del treball

Després d'haver realitzat les diferents tasques d'aquest treball i analitzat els blocs de resultats obtinguts, a continuació, es resumeixen les conclusions a les que s'ha arribat:

- La proteïna de *B. pertussis* identificada com a HUVH-BP6 podria ser una bona candidata a ser considerada per a les futures composicions vacunals DTPa utilitzades enfront de la tosferina per les característiques estructurals, de localització i antigèniques que presenta.
- Les toxines de *B. pertussis* DNT i AC-Hly, així com l'autotransportador BapC, els factors de resistència al sèrum BrkA i Vag8 i la proteïna secretada per part del sistema de secreció de tipus III BopC/BteA, implicats en el procés infectiu del microorganisme, podrien ser bons candidats a ser considerats per la millora de les actuals composicions vacunals DTPa utilitzades enfront de la tosferina per les característiques funcionals, antigèniques i de localització que presenten.
- Del conjunt de proteïnes precandidats i mecanismes patogènics estudiats en el present estudi, les proteïnes HUVH-BP6, DNT, AC-Hly, BapC, BrkA, Vag8 i BopC/BteA han sigut els precandidats més favorables per continuar un possible estudi de desenvolupament de noves formulacions de vacunes DTPa per immunitzar la població enfront de la tosferina.
- Les diferències en la presència d'epítops de cèl·lules B i cèl·lules T per a les diferents formes al·lèliques del antígen vacunal de *B. pertussis* inclosos en les composicions vacunals DTPa actualment utilitzades, ha pogut condicionar el recanvi antigènic observat en les poblacions circulants del microorganisme des de la introducció d'aquestes vacunes al nostre entorn.
- Les característiques immunogèniques dels antígens inclosos en les composicions vacunals DTPa ha pogut generar una pressió selectiva que ha condicionat l'adaptació de *B. pertussis* a la immunitat conferida per aquest tipus de vacunes.

### 5.2. Assoliment dels objectius

A l'inici d'aquest treball es van marcar dos objectius específics: identificar i caracteritzar proteïnes i estructures de superfície de *B. pertussis* com a nous candidats a ser considerats en el desenvolupament o millora de futures vacunes enfront de la tosferina i identificar i caracteritzar els epítops de les diverses variants al·lèliques d'un mateix factor de virulència de

*B. pertussis* inclòs en les composicions vacunals utilitzades que poguessin condicionar un menor reconeixement per part de la immunitat induïda per les vacunes antipertússiques utilitzades. Després del desenvolupament del treball, a grans trets, ambdós objectius s'han complert.

Per una banda, s'han obtingut candidats favorables a ser considerats en la millora de les composicions vacunals DTPa actualment utilitzades enfront de la tosferina i, de l'altra banda, s'han descrit diferències en la presència d'epítops de cèl·lules B i cèl·lules T entre les formes al·lèliques incloses en les composicions vacunals DTPa i les formes antigènics predominants entre els aïllats de *B. pertussis* circulants en el nostre entorn des de la introducció del seu ús, denotant una possible pressió selectiva per part de la immunitat conferida per aquest tipus de vacuna que ha pogut propiciar el característic recanvi antigènic del microorganisme.

### 5.3. Seguiment de la planificació i la metodologia

En línies generals, el treball s'ha dut a terme conforme la planificació proposada inicialment i no s'han donat desviacions importants en la temporalització, no havent-se de realitzar grans accions de mitigació ni modificacions del cronograma fixat.

### 5.4. Perspectives futures

Els resultats obtinguts en el present treball obren la porta, d'una banda, a continuar amb l'estudi de les proteïnes amb característiques més favorables per ser considerades bones candidates a tenir en compte en futures composicions vacunals, estudiant aspectes com la seva implicació en el procés infectiu de *B. pertussis* i la resposta del sistema immunològic enfront d'elles. D'altra banda, els resultats obtinguts permetran seguir amb l'estudi dels aspectes immunològics de les diverses variants al·lèliques dels factors de virulència inclosos en les composicions vacunals DTPa, des del punt de vista, per exemple, de la identificació dels seus epítops des d'un punt de vista estructural i conformacional, així com el reconeixement per part dels anticossos i cèl·lules del sistema immunològic.



## 6. Glossari

**aa:** aminoàcids

**AC-Hly:** (de l'anglès *toxin adenylate cyclase-haemolysin*), toxina adenilat ciclasa-hemolisina

**DNT:** (de l'anglès *dermonecrotic toxin*), toxina dermonecròtica

**DTPa:** (de l'anglès *acellular vaccine*), vacuna acel·lular enfront de la diftèria, el tètanus i la tosferina

**dTpa:** (de l'anglès *acellular vaccine*), vacuna acel·lular de baixa càrrega antigènica enfront de la diftèria, el tètanus i la tosferina

**DTPw:** (de l'anglès *whole-cell vaccine*), vacuna de cèl·lules completes enfront de la diftèria, el tètanus i la tosferina

**FHA:** (de l'anglès *filamentous haemagglutinin*), hemaglutinina filamentosa

**FIM:** (de l'anglès *fimbriae*), fimbria

**HLA:** (de l'anglès *human leukocyte antigen*), antígens leucocitaris humans

**kDa:** kilodalton

**LPS:** (de l'anglès *lipopolysaccharide*), lipopolisacàrid

**MHC:** (de l'anglès *major histocompatibility complex*), complex major d'histocompatibilitat

**PRN:** (de l'anglès *pertactin*), pertactina

**PT:** (de l'anglès *pertussis toxin*), toxina pertussis

**TCF-A:** (de l'anglès *tracheal colonization factor A*), factor de colonització traqueal A

**TCT:** (de l'anglès *tracheal cytotoxin*), citotoxina traqueal

**T3SS:** (de l'anglès *type III secretion system*), sistema de secreció de tipus III

## 7. Bibliografia

1. Esposito, S. *et al.* Pertussis Prevention: Reasons for Resurgence, and Differences in the Current Acellular Pertussis Vaccines. *Front Immunol* **10**, 1344 (2019).
2. Ausiello, C. M. & Cassone, A. Acellular pertussis vaccines and pertussis resurgence: revise or replace? *MBio* **5**, e01339-01314 (2014).
3. Lapidot, R. & Gill, C. J. The Pertussis resurgence: putting together the pieces of the puzzle. *Trop Dis Travel Med Vaccines* **2**, 26 (2016).
4. Hallander, H. O. & Gustafsson, L. Efficacy and effectiveness of acellular pertussis vaccines: a 20-year Swedish experience. *Expert Rev Vaccines* **8**, 1303–1307 (2009).
5. 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).
6. 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).
7. Barkoff, A.-M. *et al.* Surveillance of Circulating Bordetella pertussis Strains in Europe during 1998 to 2015. *J Clin Microbiol* **56**, (2018).
8. Mooi, F. R. *et al.* Bordetella pertussis Strains with Increased Toxin Production Associated with Pertussis Resurgence. *Emerg Infect Dis* **15**, 1206–1213 (2009).
9. Bouchez, V. *et al.* First report and detailed characterization of B. pertussis isolates not expressing Pertussis Toxin or Pertactin. *Vaccine* **27**, 6034–6041 (2009).
10. Williams, M. M. *et al.* Bordetella pertussis Strain Lacking Pertactin and Pertussis Toxin. *Emerging Infect. Dis.* **22**, 319–322 (2016).
11. Lam, C. *et al.* Rapid Increase in Pertactin-deficient Bordetella pertussis Isolates, Australia. *Emerg Infect Dis* **20**, 626–633 (2014).
12. Barkoff, A.-M. *et al.* Pertactin-deficient Bordetella pertussis isolates: evidence of increased circulation in Europe, 1998 to 2015. *Euro Surveill.* **24**, (2019).
13. Martin, S. W. *et al.* Pertactin-Negative Bordetella pertussis Strains: Evidence for a Possible Selective Advantage. *Clin Infect Dis* **60**, 223–227 (2015).
14. Mir-Cros, A. *et al.* Population dynamics and antigenic drift of Bordetella pertussis following whole cell vaccine replacement, Barcelona, Spain, 1986-2015. *Emerg Microbes Infect* **8**, 1711–1720 (2019).
15. 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).
16. 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).
17. 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).
18. Situación de la Tosferina en España, 1998-2016 [Internet]. Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III [citad a 2 de desembre de 2021]. Disponible a l'enllaç: <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20A-Z/TOSFERINA/Situaci%C3%B3n%20de%20la%20Tosferina%20en%20Espana%C3%B1a,%201998-2016.pdf>
19. Tasas de incidencia de tosferina y cobertura con la serie primaria de vacunación con DTP/DTPa, España 1982-2018 [Internet]. Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III [citad a 3 de desembre de 2021]. Disponible a l'enllaç: [https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20A-Z/TOSFERINA/Gr%C3%A1fico\\_%20tosferina\\_2019.pdf](https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20A-Z/TOSFERINA/Gr%C3%A1fico_%20tosferina_2019.pdf)

20. 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).
21. Yu, N. Y. et al. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* **26**, 1608–1615 (2010).
22. Almagro Armenteros, J. J. et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol* **37**, 420–423 (2019).
23. Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**, 567–580 (2001).
24. Natt, N. K., Kaur, H. & Raghava, G. P. S. Prediction of transmembrane regions of beta-barrel proteins using ANN- and SVM-based methods. *Proteins* **56**, 11–18 (2004).
25. Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M. & Marcatili, P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res* **45**, W24–W29 (2017).
26. Vita, R. et al. The immune epitope database (IEDB) 3.0. *Nucleic Acids Res* **43**, D405–412 (2015).
27. 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).
28. Cowell, J. L., Hewlett, E. L. & Manclark, C. R. Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **25**, 896–901 (1979).
29. 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).
30. 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).
31. 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).
32. 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).
33. Kamanova, J. *Bordetella* Type III Secretion Injectosome and Effector Proteins. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, 466 (2020).
34. Dewan, K. K., Linz, B., DeRocco, S. E. & Harvill, E. T. Acellular Pertussis Vaccine Components: Today and Tomorrow. *Vaccines (Basel)* **8**, (2020).
35. Hozbor, D. New Pertussis Vaccines: A Need and a Challenge. *Adv Exp Med Biol* **1183**, 115–126 (2019).
36. Loch, C. The Path to New Pediatric Vaccines against Pertussis. *Vaccines (Basel)* **9**, (2021).
37. 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).
38. Edwards, K. M. & Berbers, G. A. M. Immune responses to pertussis vaccines and disease. *J Infect Dis* **209 Suppl 1**, S10-15 (2014).
39. Cherry, J. D. Why do pertussis vaccines fail? *Pediatrics* **129**, 968–970 (2012).
40. 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).



## 8. Annexos

### 8.1. Annex 1. Conjunt de formes al·lèliques de les molècules d'HLA de classe I i classe II més freqüents i utilitzades per dur a terme les prediccions d'epítops de cèl·lules T en les seqüències aminoacídiques de les proteïnes

#### Variants al·lèliques de les molècules d'HLA de classe I

HLA-A\*01:01 - 9, 10 aa

HLA-A\*02:01 - 9, 10 aa

HLA-A\*02:03 - 9, 10 aa

HLA-A\*02:06 - 9, 10 aa

HLA-A\*03:01 - 9, 10 aa

HLA-A\*11:01 - 9, 10 aa

HLA-A\*23:01 - 9, 10 aa

HLA-A\*24:02 - 9, 10 aa

HLA-A\*26:01 - 9, 10 aa

HLA-A\*30:01 - 9, 10 aa

HLA-A\*30:02 - 9, 10 aa

HLA-A\*31:01 - 9, 10 aa

HLA-A\*32:01 - 9, 10 aa

HLA-A\*33:01 - 9, 10 aa

HLA-A\*68:01 - 9, 10 aa

HLA-A\*68:02 - 9, 10 aa

HLA-B\*07:02 - 9, 10 aa

HLA-B\*08:01 - 9, 10 aa

HLA-B\*15:01 - 9, 10 aa

HLA-B\*35:01 - 9, 10 aa

HLA-B\*40:01 - 9, 10 aa

HLA-B\*44:02 - 9, 10 aa

HLA-B\*44:03 - 9, 10 aa

HLA-B\*51:01 - 9, 10 aa

HLA-B\*53:01 - 9, 10 aa

HLA-B\*57:01 - 9, 10 aa

HLA-B\*58:01 - 9, 10 aa

## Variants al·lèliques de les molècules d'HLA de classe II

HLA-DRB1\*01:01 - 15 aa  
HLA-DRB1\*03:01 - 15 aa  
HLA-DRB1\*04:01 - 15 aa  
HLA-DRB1\*04:05 - 15 aa  
HLA-DRB1\*07:01 - 15 aa  
HLA-DRB1\*08:02 - 15 aa  
HLA-DRB1\*09:01 - 15 aa  
HLA-DRB1\*11:01 - 15 aa  
HLA-DRB1\*12:01 - 15 aa  
HLA-DRB1\*13:02 - 15 aa  
HLA-DRB1\*15:01 - 15 aa  
HLA-DRB3\*01:01 - 15 aa  
HLA-DRB3\*02:02 - 15 aa  
HLA-DRB4\*01:01 - 15 aa  
HLA-DRB5\*01:01 - 15 aa  
HLA-DQA1\*05:01/DQB1\*02:01 - 15 aa  
HLA-DQA1\*05:01/DQB1\*03:01 - 15 aa  
HLA-DQA1\*03:01/DQB1\*03:02 - 15 aa  
HLA-DQA1\*04:01/DQB1\*04:02 - 15 aa  
HLA-DQA1\*01:01/DQB1\*05:01 - 15 aa  
HLA-DQA1\*01:02/DQB1\*06:02 - 15 aa  
HLA-DPA1\*02:01/DPB1\*01:01 - 15 aa  
HLA-DPA1\*01:03/DPB1\*02:01 - 15 aa  
HLA-DPA1\*01:03/DPB1\*04:01 - 15 aa  
HLA-DPA1\*03:01/DPB1\*04:02 - 15 aa  
HLA-DPA1\*02:01/DPB1\*05:01 - 15 aa  
HLA-DPA1\*02:01/DPB1\*14:01 - 15 aa

## 8.2. Annex 2. Llistat de pèptids d'unió al MHC de classe I en les seqüències aminoàcídiques de les proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics descrits de *Bordetella pertussis* i no inclosos en les composicions vacunals DTPa

*Veure arxiu Annex 2 adjunt.*

**8.3. Annex 3. Llistat de pèptids d'unió al MHC de classe II en les seqüències aminoacídiques de les proteïnes precandidates i dels mecanismes patogènics descrits de *Bordetella pertussis* i no inclosos en les composicions vacunals DTPa**

Veure arxiu Annex 3 adjunt.

**8.4. Annex 4. Recull dels resultats obtinguts de la predicció de la presència d'epítops lineals de cèl·lules B en la seqüència aminoacídica de les variants al·lèliques de la FHA.**

Al·lel	Pèptids
<i>fhaB1</i>	<p>VGNTFCGRTRGQARSGARATSLSVAPNA,  LPLVTHAQLVLPQGGTQVLQGGNKVPVNIADPNSSGGVSHNKQQFNANPQVVFNNGLTDGVSRRIGGALTKNPNLTRQASAILAEVDTSPSRL, LEVYKGA,  GISVNLSTLNASNLTTGRPSVNGGRIGLDVQQGTVTIERGGVNATGLGYFDVVARLVKLGAVSSKQKPLADIADVAGANRYDHATRRATPIAAGARGAAAGAYAI  GTAAGAMYGKHITLVSSDSGLGVRQLGSLSSPSAITVSSQGEIALGDATVQRGPLSLKAGVVSAGKLAGGGAVNVAGGGAVKIASASSVGNLAVQGGGKQATLLNAG  GTLVSGRQAVQLGAASSRQALSVNAGGALKADKLSATRRVDVQKQAVALGSASSNALSVRAGGALKAGKLSATGRLDVQKQAVTLGVSASDGALSVSAGGNLRANEL  VSSAQLEVRGQREVALDDASSARGMTVVAAGALAARNLQSKGAIGVQGGAEVSVANANSDAELRVRGRGQVDLHDLASAARGADISGEGRVNIGRARSDDSVKSAHGAL  SIDSMTALGAIGVQAGGSVSAKDMRSRGAVTVSSGGAVNLGDVQSDGQVRATSAGAMTVRDVAAAADLALQAGDALQAGFLKSAGAMTVNGRDVRLDGAHAGGQ  LRVSSDQGAALGSLAAKGLTVSARAATVAELKSLDNISVTGGERVSVQSVNSASRVAISAHGALDVGKVSASKIGLEGWAVGADSLGSDGAISSVSRDAVRVDQARSL  ADISLGAEGGATLGAVEAAGSIDVRGGSTVAANSLHANRDVRSVSGKDAVRVTAATSGGGLHVSSGRQLDLGAVQARGALALDGGAGVALQSAKASGTLHVQGGHELDLG  TLAAGVAVDVTGTVRVAKLVSADAGADLQAGRSMTLGIIVDTTGDQLARAQQKLELGSVSKSDGGLQAAAGGALSAAAEEVAGALELSSGQGVTVDRASARARIDSTGSV  GIGALKAGAVEAASPRRARRALRQDFFTPGSVVVRAQGNVTVGRGDPHQGVLAQGGDIIMDAKGGTLLLRNDALTENGTVTISADSAVLEHSTIESKISQSVLAAGDKGKPA  VSVKAKKFLNGLTRAVNDNNETMSGRQIDVVDGRPQITDAVTGEARKDESVDAAALVADGGPIVVEAGELVSHAGGIGNGRNKENGASVTVRTTGNLVNKGYISAGK  QGVLEVGGALTNEFLVSDGTQRIEAQRIENRGTFSQAPAGTAGALVVKAAEIVHDGVMATKGMQIAGKGGGSPVTAGAKATTSANKLSVDVASWDNAGSLDIKK  GGAQVTVAGRYAEHGEVSIQGDYTVSADAIALAAQVTQRGGANLTSRHDTRFSNKIRLMGPLQVNAGGPPVNTGNLKVREGVTVTAASFNETGAEVMKASATLTTSG  AARNAGKMQVKEAATIVAASVSNPGTFTAGKDITVTSRGGFDNEGKMESNKDIVIKTEQFSNGRVLDLAKHDLTVTASQADNRGSLKAGHDFTVQAQRIDNSGTMAAGH  DATLKAHLRNTGQVVAGHDIHIINSKLENTGRVDARNDIALDVADFTNTGSLYAEHDTLTLAQGTQRDLVVDQDHILPVAEGLTRVKAKSLTTEIETGNPGLIAEVQENI  DNKQAIIVGKDLTSSAHGNVANEANALLWAAGELTVKAQNTNKRALIEAGGNARLTAVALNKLGRIRAGEDMHLDAPIENTAKLSGEVQRKGVQDVGGEHGR  WSGIGVNYWLRAGNGKAGTIAAPWYGGDLTAEQSLIEVGKDLYLNAGARKDEHRHLLNEGVQIAGGHGIGGDVDRNSVVRTVSAEMEYFKTLPVSLTALDNRAGLSP  ATWNFQS, DQNRYEIWIWGLYPTYTEWSV, LGYQAKPAPTAPPMPKAPDELDRGHTLESAEGRKIFGEYKLLQGEYKAKM, YGEATRVRHDLQGR,  KALGMDAETKEVDG, KQADQATIDAETDKVAQR, DAVRLQAIQPRV, DWRALGHSQMLMQRWDFKAGKRGAEIAFPYKQTV, IHNGENAAQNRGRPEGL,  ATSVSGSFDALRDVGLKRLD,  IFTRIGAAQTSADGAAGPALARQARQAPETDGMVDARGLGSADALASLASLDAQAQLEVSRRRNAQVADAGLAGPSAVAAPAVGAADVGEVPTGDQVDQPVAVGL  EQPVATVRVAPPAVAL, FIDQSKFYG, QIGYKPDRAARV, LGGYERLPRV, KVGVAPTAQQLKQ, ATRQGITDQYAGGGALIA, HDVSSVNLGIQ,  KVVVADSKGAGGGIEADDEVDSGRDIGIEGGKLRGKDVRLK, MRYDDKGRLAARGDGDALDAQ, LHIEAKRLETAGATLKGKGVKLDV,  KLGVEYAGSSYENKSSTPLGSLF, LEGKMQNLEIEGGSVDAHTDLSVARDARFKAADFAHAHEKEDVRQLSLGAKVAGGVEYAGFLSGESGLEAHAGRGMTAG, HE,  SSETEKSYRANLNFVGGGSVEA, DINRNRVGGAAKGNAGTEALRMRAKVESTKYVSEQTSQSSGWSVEVASTASARSLLTAATRLGDSVAQNVEDGREIRGELMAAQ,  ATQLVTADTAVALSA, DFDSSHSRSTSQNTQYLGGNLSIEATEGD, FGGDQVSLKAAKSVN, ESTFESYSESHNFH, NLGANAVQAVGLGL, GTSHQITNETGKYA,  DLNL, G, INAT, QDERNYNSSGGG, IQNRTLVPVGS, NFNTEHDNSRLTND, T, IADLSGKGNLKVDA, QNLKDYRDKDGGSGG,  GISSTLAPTIVGAFGRVAGEDYQAEQRATIDVGTQKDPARLQVGGVGTNLNQDAAQATVVRQNKHWAGGGSEFSVAGKSLKKNQVRVETPTPDVVDGPPSRPTTP  PASPPQIRATVEVSSPPVSVATVEVVRPKVETAQPLPPRPVAAQVVPVTPPKVEVAVKVEVVRPKVETAQPLPPRPVVAEKVTPAVQPQLAKVETVQPVKPETTKPLPKP  LPVAVKTKAPPPVETAQPLPPVQKATPGPVAEVGKATVTTVQVQSAPPKAPVAKQAPAPAPKPKPKPKAERPCKGKTPPLSGRHHVQQVQVQLQRQASDINNTKSL  PGGKLPKPVTKLTDENGKPYTINRREDLMLKNGKVLSTKTTLGLQTFRLRSISAARTTGSSMKP</p>
<i>fhaB2</i>	<p>VGNTFCGRTRGQARSGARATSLSVAPNAL,  PLVTHAQLVLPQGGTQVLQGGNKVPVNIADPNSSGGVSHNKQQFNANPQVVFNNGLTDGVSRRIGGALTKNPNLTRQASAI, VTDSPS, EVYKGA,  ISVNLSTLNASNLTTGRPSVNGGRIGLDVQQGTVTIERGGVNATGLGYFDVVARLVKLGAVSSKQKPLADIADVAGANRYDHATRRATPIAAGARGAAAGAYAI  TAAGAMYGKHITLVSSDSGLGVRQLGSLSSPSAITVSSQGEIALGDATVQRGPLSLKAGVVSAGKLAGGGAVNVAGGGAVKIASASSVGNLAVQGGGKQATLLNAGGT  LLVSGRQAVQLGAASSRQALSVNAGGALKADKLSATRRVDVQKQAVALGSASSNALSVRAGGALKAGKLSATGRLDVQKQAVTLGVSASDGALSVSAGGNLRKQLVS  SAQLEVRGQREVALDDASSARGMTVVAAGALAARNLQSKGAIGVQGGAEVSVANANSDAELRVRGRGQVDLHDLASAARGADISGEGRVNIGRARSDDSVKSAHGALS  DSMTALGAIGVQAGGSVSAKDMRSRGAVTVSSGGAVNLGDVQSDGQVRATSAGAMTVRDVAAAADLALQAGDALQAGFLKSAGAMTVNGRDVRLDGAHAGGQLR  VSSDQGAALGSLAAKGLTVSARAATVAELKSLDNISVTGGERVSVQSVNSASRVAISAHGALDVGKVSASKIGLEGWAVGADSLGSDGAISSVSRDAVRVDQARSLA  DISLGAEGGATLGAVEAAGSIDVRGGSTVAANSLHANRDVRSVSGKDAVRVTAATSGGGLHVSSGRQLDLGAVQARGALALDGGAGVALQSAKASGTLHVQGGHELDLGT  LAAVAVDVTGTVRVAKLVSADAGADLQAGRSMTLGIIVDTTGDQLARAQQKLELGSVSKSDGGLQAAAGGALSAAAEEVAGALELSSGQGVTVDRASARARIDSTGSV  GALKAGAVEAASPRRARRALRQDFFTPGSVVVRAQGNVTVGRGDPHQGVLAQGGDIIMDAKGGTLLLRNDALTENGTVTISADSAVLEHSTIESKISQSVLAAGDKGKPA  SVKAKKFLNGLTRAVNDNNETMSGRQIDVVDGRPQITDAVTGEARKDESVDAAALVADGGPIVVEAGELVSHAGGIGNGRNKENGASVTVRTTGNLVNKGYISAGK  GVLEVGGALTNEFLVSDGTQRIEAQRIENRGTFSQAPAGTAGALVVKAAEIVHDGVMATKGMQIAGKGGGSPVTAGAKATTSANKLSVDVASWDNAGSLDIKKG</p>

GAQVTVAGRYAEHGEVSIQGDYTVSADAIALAAQVTRQGGAAANLTSRHDTRFSNKIRLMGQLQVNAGGAVSNTGNLKVREGVTVTAASFDNETGAEVMAKSATLTTSGA  
ARNAGMKMQVKEAATIVAASVSNPGTFTAGKDITVTSRGGFDNEGKMESNKDVIKTEQFSNGRVLDAKHDLTVTASGQADNRGSLKAGHDFTVQAQRIDNSGTMMAAGHD  
ATLKAPHLRNTGQVVAGHDIIHINSKLENTGRVDARNDIALDVADFTNTGSLYAEHDATLTLAQGTQRDLVVDQDHILPVAEGLTRVKAASLTTEIETGNPGSLIAEVQENID  
NKQAIIVGKDLTSSAHGNVANEANALLWAAGELTVKAQNITNKRAALIEAGGNARLTAVALLNKLGRIAGEDMHLDAPRIENTAKLSGEVQRKGVQDVGGGEHGRW  
SGIGYVNYWLRAGNGKAGTIAAPWYGGDLTAEQSLIEVGKLDLYLNAGARKDEHRHLLNEGVIQAGGHGHIGGDVNRNSVVRTVSAMEYFKTLPVSLTALDNRAGLSPA  
TWNFQSTYELLDYLLDQNRYE,  
YPTYTEWSVNTLKNLDLGYQAKPAPTAPPMPKAPELDRLGHTLESAEGRKIFGEYKQLQGEYKAKMAVQAVEAYGEATRVRVDQLGQRYGKALGGMDAETKEVDGIIQE  
F, DQATIDAETDKVAQRYKSQIDAVRLQAIQPRVT, GADWRALGHSQMLQMRWKDFKAGKRGAEIAFYKPEQTV, IHNGENAAQNRGRPEGL,  
ATSVSGSFDALRDVGLKRLD,  
HIFTRIGAAQTSADGAAGPALARQARQAPETDGMVDARGLGSADALASLASLDAQAQGLEVSRRNAQVADAGLAGPSAVAAPAVGAADVGEVPTGDQVQDQPVVAV  
GLEQPVATVRVAPPAVAL, FIDQSKFY, GYKPDRAA, LGGYERLQVVRG, KVGVAQTAQQLKQ, ATRQGITDQYAGGGALIAS, HDVSSVNGLI,  
KGKVVADSKGAGGGIEADDEVDVSGRDIGIEGGKLRGKDVRLK, MRYDDKGRLAARGDGALDAQGGQLHIEAKRLETA, G,  
LKGKVKLDVDDVKLGGVYEGSSYENKSSSTPLGSL, EGKMQNLEI,  
DAAHTDLSVARDARFKAADFAHAHEKDVRLSLGAKVGGYEGFSLGSEGLEAHAGRGMTA, SHE, SSETEKSYRNANLNFGGGSV,  
DINRNRYYGGAAGNAGTTEALMRRAKVESTKYVSEQTSQSSGWSVEVASTASARSSLLTAATRLGDSVAQNVEDGREIRGELM, QVAEATQLVTADTAVALSAG,  
DFDSSHSRSTSQ, GGGDQVSLKAAS, ESTFESYSESHNF, DANLGANAVQGAVALG, AGMGTSHQITNETGKTYA, NL, ATSKQDERNYSNGGG, AIQNRTLAVPVG,  
GFNFNTEHNSRLTND, IADLSGKGNLKVDDG, N,  
QNLKDYRDKDGGSGGLNVGISSTLLAPTGVAFGRVAGEDYQAEQRATIDVGTQKDPARLQVGGGVKGTLNQDAAQATVVQRNKHVAGGGSEFSVAGKSLKKNQVR  
PVETPTPDVVDGPPSRPTTPASPQPIRATVEVSSPPVSVATVEVPRPKVETAQPLPPRPVAAQVVPVTPPKVEVAKVEVPRPKVETAQPLPPRPVAAEKVTPPAVQPQL  
AKVETVQVPKPETTKPLPKPLPAKVTAKAPPVETAQPLPPVKPQKATPGPVAEVGKATVTTVQVQSAPPKAPVAKQPAPAPKPKPKPKPAERPKPKGKTTPLSGRHHVQ  
QQVQVLRQASDINNTKSLPGGKLPKPVTKLTDENGKPYTYINRREDLMLKNGKVLSTKTTLGLQETFLRVEDIGGG

*fhaB5*

TVGNTFCGRTRGQARSARATSLSVAPNA, GLPLVTHAQQLVPPQGGTQVQVLOGGNKVP,  
NIADPNSGGVSHNKFFQQFNANPGVVFNNGLTDGVSRIIGGALTKNPNLROASAILAEVTDTSRRL, LEVYKGA,  
ISVNGSLTLNASNLTLTGRPSVNGGRIGLDVQQGTVTIERGGVNTATGLGYFDVVARLVKLGAVSSKQKPLADIADVAGANRYDHATRRATPIAAGARGAAAGAYIDG  
TAAGAMYGKHITLVSSDGLGVRQLGSLSSPSAITVSSQGEIALGDATVQRGPLSLKAGVVSAGKLASGGGAVNVAGGGAVKIASASSVGNLAVQGGGKQVATLLNAGGT  
LLVSGRQAVQLGAASSRQALSVNAGGALKADKLSATRRVDVGDGKQAVALGSASSNALSVRAGGALKAGLSATGRLDVGDQKQAVTLGVSASDGLSAGGNLRAKQLVS  
SAQLEVRGQREVALDDASSARGMTVVAAGALAAARNLQSKGAIGVQGGAEVSVANANSDAELRVRGRGQVLDLHLSAARGADISGEGRVNIARRSDSVKVAHAGLSI  
DSMTALGAIGVQAGGSVAKDMRSRGAVTVSSGGAVNLGDVQSDGQVRSAGAMTVRDVAAAADLALQAGDALQAGFLKSAGAMTVNDRDVRDLGAGHAGGQLR  
VSSDQGAALGSLAAKELTVSARAATVAELKSLDNISVTGGERVSVQSVNSASRVAISAHGALDVGKVSAGSGLGEGWAVGADSLGSDGAISSVGRDAVRVDQARSLA  
DISLGAEGGATLGAEEAGSIDVRGGSTVAANSLHANRDVRSVSGKDAVRVTAATSGGGLHVSRRQLDLGAVQARGALALDGGAGVALQSAKASGTLHVQGGHELDLGT  
LAAVAVDVTGTDVRAKLVSDAGADLQAGRSMTLGIQVDTTDLQARAQQKLELGSVSKDGGGLQAAAGGALSAAAEVAGALELGGQVTVDRASASRARIDSTGSGVI  
GALKAGAVEAASPRRARRALRQDFFTPGSVVRAQGNVTVGRGDPHQGVLAQQDIIIMDAKGGTLLLRNDALTENGTVTISADSAVLEHSTIESKISQSVLAAKGDGKPAV  
SVKVAKKLFLNGLTRAVNDDNETMSSGRQIDVVDGRPJITDAVTGEARKDESVSDAALVADGGPIVVEAGELVSHAGGIGNRNGKENGASVTVRTGNLVNKGYISAGKQ  
GVLEVGALTFNEFLVGSQDGTQRIEAQRIENRGTFSQAPAGTAGALVKAEEAIVHDGVMATKGMQIAGKGGGSPVTVAGAKATTSANKLSVDVASWDNAGSLDIKKG  
GAQVTVAGRYAEHGEVSIQGDYTVSADAIALAAQVTRQGGAAANLTSRHDTRFSNKIRLMGQLQVNAGGAVSNTGNLKVREGVTVTAASFDNETGAEVMAKSATLTTSGA  
ARNAGMKMQVKEAATIVAASVSNPGTFTAGKDITVTSRGGFDNEGKMESNKDVIKTEQFSNGRVLDAKHDLTVTASGQADNRGSLKAGHDFTVQAQRIDNSGTMMAAGHD  
ATLKAPHLRNTGQVVAGHDIIHINSKLENTGRVDARNDIALDVADFTNTGSLYAEHDATLTLAQGTQRDLVVDQDHILPVAEGLTRVKAASLTTEIETGNPGSLIAEVQENID  
NKQAIIVGKDLTSSAHGNVANEANALLWAAGELTVKAQNITNKRAALIEAGGNARLTAVALLNKLGRIAGEDMHLDAPRIENTAKLSGEVQRKGVQDVGGGEHGRW  
SGIGYVNYWLRAGNGKAGTIAAPWYGGDLTAEQSLIEVGKLDLYLNAGARKDEHRHLLNEGVIQAGGHGHIGGDVNRNSVVRTVSAMEYFKTLPVSLTALDNRAGLSPA  
TWNFQSTYELLDYLLDQNRYEIWLGYPTYTEWSVNTLKNLDLGYQAKPAPTAPPMPKAPELDRLGHTL, SAE,  
FGEYKQLQGEYKAKMAVQAVEAYGEATRVRVDQLGQRYGKALGGMDAETKEVDGIIQE, Q, TIDAETDKVAQRYKSQIDAVRLQAIQPRVT,  
GADWRALGHSQMLQMRWKDFKAGKRGAEIAFYKPEQTV, IHNGENAAQNRGRPEGL, ATSVSGSFDALRDVGLKRLD,  
HIFTRIGAAQTSADGAAGPALARQARQAPETDGMVDARGLGSADALASLASLDAQAQGLEVSRRNAQVADAGLAGPSAVAAPAVGAADVGEVPTGDQVQDQPVVAV  
GLEQPVATVRVAPPAVAL, FIDQSKFY, GYKPDRAARVA, LGGYERLQVVRG, KVGVAQTAQQLKQ, ATRQGITDQYAGGG, HDVSSVNGLI,  
KVVVADSKGAGGGIEADDEVDVSGRDIGIEGGKLRGKDV, MRYDDKGRLAARGDGALDAQGGQLHIEAKRLETA, KGGKVKLDVDDVKLGGVYEGSSYENKSSSTPLGS,  
TLEGKMQNLEI, AAHTDLSVARDARFKAADFAHAHEKDVRLS, KVGAGGYEAGFSLGSEGLEAHAGRGMTA, SHEQSSETEKSYRNANLNFGGGSVEA,  
GADINRNRYYGGAAGNAGTTEALMRRAKVESTKYVSEQTSQSSGW, EVASTASARSSLLTAATRLGDSVAQNVEDGREIRGELMAAQ, AEATQLVTADTAVALSA,  
DFDSSHSRSTSQNTQYLGN, IEA, GGGDQVSLKAAS, STFESYSESHNF, ANLGANAVQGAVALGLT, QITNETGKTYAGTS, LNLS, VR, KQDERNYSNGGG,  
AIQNRTLAVPVGSAGFNTEHNSRLTNDG, SD, IADLSGKGNLKVDDG,  
IADLSGKGNLKVDDGAVNAQNLKDYRDKDGGSGGLNVGISSTLLAPTGVAFGRVAGEDYQAEQRATIDVGTQKDPARLQVGGGVKGTLNQDAAQATVVQRNKHVAGG  
GSEFSVAGKSLKKNQVRPVETPTPDVVDGPPSRPTTPASPQPIRATVEVSSPPVSVATVEVPRPKVETAQPLPPRPVAAQVVPVTPPKVEVAKVEVPRPKVETAQPLP  
PRPVAAEKVTPPAVQPQLAKVETVQVPKPETTKPLPKPLPAKVTAKAPPVETAQPLPPVKPQKATPGPVAEVGKATVTTVQVQSAPPKAPVAKQPAPAPKPKPKPKPA  
ERPCKGKTTPLSGRHHVQVQVQLRQASDINNTKSLPGGKLPKPVTKLTDENGKPYTYINRREDLMLKNGKVLSTKTTLGLQETFLRVEDIGGG

*fhaB14*

TVGNTFCGRTRGQARSARATSLSVAPNA, GLPLVTHAQQLVPPQGGTQVQVLOGGNKVP,  
NIADPNSGGVSHNKFFQQFNANPGVVFNNGLTDGVSRIIGGALTKNPNLROASAILAEVTDTSRRL, LEVYKGA,  
ISVNGSLTLNASNLTLTGRPSVNGGRIGLDVQQGTVTIERGGVNTATGLGYFDVVARLVKLGAVSSKQKPLADIADVAGANRYDHATRRATPIAAGARGAAAGAYIDG  
TAAGAMYGKHITLVSSDGLGVRQLGSLSSPSAITVSSQGEIALGDATVQRGPLSLKAGVVSAGKLASGGGAVNVAGGGAVKIASASSVGNLAVQGGGKQVATLLNAGGT  
LLVSGRQAVQLGAASSRQALSVNAGGALKADKLSATRRVDVGDGKQAVALGSASSNALSVRAGGALKAGLSATGRLDVGDQKQAVTLGVSASDGLSAGGNLRAKQLVS  
SAQLEVRGQREVALDDASSARGMTVVAAGALAAARNLQSKGAIGVQGGAEVSVANANSDAELRVRGRGQVLDLHLSAARGADISGEGRVNIARRSDSVKVAHAGLSI  
DSMTALGAIGVQAGGSVAKDMRSRGAVTVSSGGAVNLGDVQSDGQVRSAGAMTVRDVAAAADLALQAGDALQAGFLKSAGAMTVNDRDVRDLGAGHAGGQLR  
VSSDQGAALGSLAAKELTVSARAATVAELKSLDNISVTGGERVSVQSVNSASRVAISAHGALDVGKVSAGSGLGEGWAVGADSLGSDGAISSVGRDAVRVDQARSLA  
DISLGAEGGATLGAEEAGSIDVRGGSTVAANSLHANRDVRSVSGKDAVRVTAATSGGGLHVSRRQLDLGAVQARGALALDGGAGVALQSAKASGTLHVQGGHELDLGT

---

LAAVGAVDVTGTDVVRVAKLVSDAGADLQAGRSMTLGVDTTGDQLQARAQQKLELGSVKSDGGLQAAAGGALSAAAEEVAGALELSGQGVTVDRASARARIDSTGSVGI  
GALKAGAVEAASPRRARRALRQDFFTPGSVVVRAQGNVTVGRGDPHQGVLAQGGDIIMDAKGGTLLLRNDALTENGTVTISADSAVLEHSTIESKISQSVLAAKGDGKPAV  
SVKVAKKFLNGLTRAVNDNNETMSGRQIDVVDGRPJITDAVTGEARKDESIVSDAALVADGGPIVVEAGELVSHAGGIGNGRNKENGASVTVRTTGNLVNKGYSAGKQ  
GVLEVGGALTNEFLVGSDDGTQRIEAQRIENRGTFSQAPAGTAGALVVKAAEIVHDGVMATKGMEMQIAGKGGGSPTVTAGAKATTSANKLSVDVASWDNAGSLDIKKG  
GAQVTVAGRYAEHGEVSIQGDYTVSADAIALAAQVTRQGGAAANLTSRHDTRFSNKIRLMGPLQVNAAGGAVSNTGNLKVREGVTVTAASFNETGAEVMAKSATLTTSGA  
ARNAGMKMQVKEAATIVAASVSNPGTFTAGKDITVTSRGGFDNEGKMESENKDIVIKTEQFSNGRVLDAKHDLTASGQADNRGSLKAGHDFTVQAQRIDNSGTMAAGHD  
ATLKAPHLRNTGQVVAGHDIIHINSKLENTGRVDARNDIALDVADFTNTGSLYAEHDATLTLAQGTQRDLVVDQDHILPVAEGLRVKAKSLTTEIETGNPGLIAEVQENID  
NKQAIIVGKDLTLSSAHGNVANEANALLWAAGELTVKAQNITNKRAALIEAGGNARLTAAVALLNKLGRIRAGEDMHLDPRIENTAKLSGEVQRKGVQDVGGGEHGRW  
SGIGYVNYWLRAGNGKKAGTIAAPWYGGDLTAEQSLIEVGKDLVYNAGARKDEHRHLLNEGVQAGGGHIGGDVDNRSVVRTVSAMEYFKTLPVSLTALDNRAGLSPA  
TWNFQSTYELLDYLLDQNRYEYIWGLYPTYTEWSVNTLKNLDLGYQAKPAPTAPPMPKAPELDRLGHTL, SAE,  
FGEYKLLQGEYEKAKMAVQAVEAYGEATRRVHDQLGQRYGKALGGMDAETKEVDGIIQEF, Q, TIDAETDKVAQRYKSQIDAVRLQAIQPRVTV,  
GADWRALGHSQMLQRWKDFKAGKRGAEIAFYKPEQTV, IHNGENAAQNRGRPEGL, ATSVSGSFDALRDVGLKRLD,  
HIFTRIGAAQTSADGAAGPALARQARQAPETDGMVDARGLGSADALASLASLAAQGLEVSGRRNAQVADAGLAGPSAVAAPAVGAADVGVEPVTGDQVQDQVAVVAV  
GLEQPVATVRVAPPAVAL, FIDQSKF, GYKPDRAARVA, LGGYESRPLVRG, KVGVAPTAQQLKQ, ATRQGIDQYAGGG, HDVSSVNGLI,  
KVVVADSKGAGGGIEADDEVDSGRDIGIEGGKLRGKDV, MRYDGKRLAARGDGALDAQGGQLHIEAKRLETA, KGGKVKLDVDDVKLGGVYEAGSSYENKSSTPLGS,  
TLEGKMQNLEI, AAHTDLSVARDFKAAADFHAHEKDVRLS, KVGAGGYEAGFSLGSESGLEAHAGRGMTA, SHEQSSETEKSYRANLNFGGGGVEA,  
GADINRNRYGGAAGNAGTEALRMRAKKVESTKYVSEQTSQSSGW, EVASTASARSSLLTAATRLGDSVAQNVEDGREIRGELMAAQ, AEATQLVTADTAVALSA,  
DFDSSHSRSTSQNTQYLGN, IEA, GGGDQVSLKAAS, STFESYSESHNF, ANLANAVQAVGLGLT, QJTNETGKTYAGTS, LNLS, VR, KQDERNYNSSGGG,  
AIQNRTLAVPVGSAGFNTEHNSRLTNDG, SD, IADLSGKGNLKVDDGA,  
NAQNLKDYRDKDGGSGGLNVGISSTLAPTGVAFGRVAGEDYQAEQRATIDVGGTKDQPARLQVGGGVKGTLNQDAAQATVVQRNKHVAGGGSEFSVAGKSLKKNQ  
VRPVEPTPDVVDGPPSRPTTPASPQPIRATVEVSSPPVSVATVEVVPKPVETAQPLPPRVAAQVVPVTPPKVEVAKVEVVPKPVETAQPLPPRVVAVKVTTPAVQP  
QLAKVETVQPVKPETTKPLPKLPVAVKTKAPPPVETAQPLPPVKPKQATPGPVAEVGKATVTTVQVQSAPPKPAVAKQAPAPKPKPKPKPAERPKPGKTTPLSGRHV  
VQQVQVQLRQASDINNTKSLPGGKLPKPVTKLTDENGGKQTYTINRRDLMLKLNKVLSTKTLGLEQTFRLRVEDIGGK

---

### 8.5. Annex 5. Llistat de pèptids d'unió al MHC de classe II en les seqüències aminoacídiques de les variants al·lèliques dels antígens vacunals de *Bordetella pertussis* inclosos en les composicions vacunals DTPa

*Veure arxiu Annex 5 adjunt.*

### 8.6. Annex 6. Llistat de pèptids d'unió al MHC de classe II en les seqüències aminoacídiques de les variants al·lèliques dels antígens vacunals de *Bordetella pertussis* inclosos en les composicions vacunals DTPa

*Veure arxiu Annex 6 adjunt.*