

1992–2014 年間臺灣流行之百日咳菌的抗原基因型變化

姚淑滿*、陳英彥、高培修、溫宜霖、陳睿翔、江春雪

摘要

面對百日咳對國人健康的威脅，政府以提供公費疫苗來預防疾病發生，許多國家疫苗政策皆以非細胞性百日咳疫苗(ACVs)取代全細胞性百日咳疫苗(WCVs)，臺灣也自 2010 年起全面提供 ACVs。病原體面對疫苗篩選的壓力，疫苗成份的抗原基因型隨著疫苗的使用驅使轉變，由疫苗株的基因型(*ptxA2/prn1* 或 *ptxA4/prn1*) 轉變成非疫苗株的基因型(*ptxA1/prn2* 或 *ptxA1/prn3*)，而 *ptxP* 也由 *ptxP1* 轉變成 *ptxP3*，使病原體可以產生更多的毒力因子，以對抗宿主因疫苗施打而產生的免疫作用。近年來，pertactin 不表現的菌株(pertactin-deficient, PRN-)在許多國家出現，導致疾病的流行，臺灣目前大部份的菌株仍然表現 pertactin，PRN-菌株只零星出現。抗原的表現直接影響 ACVs 的保護效果，PRN-菌株的發生率，可以做為疾病流行警訊的參考指標與疫苗選用條件的參考。在疾病罹病率方面，小於 1 歲的嬰幼兒的罹病率一直居高不下，從國際研究結果得知，目前的 ACVs 對於疾病的預防有效，但是對於感染傳播的預防無效，因此，完成免疫的學齡前兒童及學童可能受感染但症狀輕微不明顯而成為潛在的病原傳播者，所以，亟需加強民眾對疾病與疫苗的認知，讓年紀太小尚無法得到疫苗免疫保護的嬰幼兒能獲得良好的照護。

關鍵字：百日咳、百日咳菌、表面抗原、疫苗、病原適應

前言

百日咳菌在面對疫苗篩選壓力下產生的適應，除抗原基因型(*ptxA*、*prn*、*fim3*)及調控基因型(*ptxP*)改變外，最近在日本、法國、芬蘭和美國皆發現 pertactin 不表現的菌株(pertactin-deficient, PRN-)，日本於 1997 年首度發現 PRN-菌株，自 1990–2009 年收集的 121 個菌株，有 27% 菌株不表現 pertactin，日本自 1981 年開始使用非細胞性百日咳疫苗(ACVs)預防百日咳，PRN-菌株自 2000 年代初期開始增加 [1]；法國於 1998 年開始使用 ACVs，到 2002 年 ACVs 已全部取代全細胞性疫苗，在 ACVs 使用 7 年後，PRN-菌株開始出現，2007 年 PRN-菌株佔 7.8%，到了 2011 年 PRN-菌株佔 13.3% [2]；芬蘭於 2005 年全面以 ACVs 取代全細胞性百日咳疫苗，於 2011 年發現了 2 株不表現 pertactin [3]；美國在 2011–2012 年間也發現了 11 株不表現 pertactin [4]。全細胞性百日咳疫苗(WCVs)是以熱殺死細菌製成的疫苗，

衛生福利部疾病管制署研檢中心

通訊作者：姚淑滿*

E-mail：shumaan@cdc.gov.tw

投稿日期：2015 年 04 月 10 日

接受日期：2015 年 08 月 19 日

DOI：10.6524/EB.20160119.32(2).002

對廣泛的細菌蛋白引發免疫反應，可以對相似於疫苗株的流行菌株產生免疫保護作用，而 ACVs 由 1–5 種純化去毒性的毒素和細菌黏附蛋白所組成，只對疫苗成分中的幾種細菌蛋白引發免疫反應，可以對細菌的幾種特定毒力因子產生免疫保護作用，ACVs 引發的免疫作用改變，讓它也能適用於青少年和成年人的免疫接種。Pertactin 是某些 ACVs 的成分，扮演引發免疫保護的角色，一般認為 PRN-菌株出現，是百日咳菌面對 ACVs 篩選壓力，而引發病原體適應的結果[1–4]。ACVs 於 1996 年在臺灣取得上市許可，民眾可以自費選擇接種，到 2010 年由公費提供 ACVs，百日咳菌的 pertussis toxoid (PT)、filamentous hemagglutinin (FHA)、pertactin (PRN) 和 fimbriae (agglutinogens 2+3) 這 4 種抗原為 ACVs 的成份，依不同廠牌含有 1–5 種成份不等，臺灣核可上市的 ACVs 有 3 種，為 Sanofi Pasteur 製造的 Pediacel (含 4 種抗原成份) 和 Pentaxim (含 PT 和 FHA) 及 GSK 製造的 Infanrix-IPV+Hib (含 PT、FHA 和 PRN)。臺灣百日咳菌株在面對疫苗篩選的壓力下，基因型與抗原表現是否出現變化，其變化是否會影響疫苗保護效果，值得持續關切。

材料與方法

一、實驗室診斷方法與菌株收集

實驗室確定診斷方法在 2009 年 6 月 15 日以前只採用病原體分離鑑定，之後新增 PCR 檢測方法，除可以提高靈敏度外亦能縮短檢驗時效，增進防疫功效。收集 1992–2014 年經由傳染病通報管理系統送到實驗室的臨床檢體，進行病原體分離與鑑定，收集菌株共 376 株持續進行基因型變化監測。世界各國 ACVs 使用後，菌株抗原表現變化的資料陸續被發表，顯現抗原表現監測的重要性，臺灣雖是自 2010 年開始公費提供 ACVs，但在 1996 年已有 ACVs 在臺灣取得上市許可，民眾可以自費接種，且依文獻資料提到 ACVs 使用 7 年後，監測資料顯示疫苗抗原成分表現缺乏的百日咳菌株出現增加 [2]，因而回溯收集 2003–2014 年的菌株共 241 株，進行抗原表現分析。

二、發生率分析

利用傳染病通報系統中資料，以 1992–2014 年之百日咳通報個案資料進行分析，為了解百日咳在各年齡層罹病情形，將發病年齡區分為小於 1 歲、1–4 歲、5–9 歲、10–14 歲、15–40 歲、40 歲以上等年齡組別觀察，以上資料利用 EXCEL 2010 分析。

三、百日咳菌具多形性的重要抗原的基因型(*ptxA*、*prn*、*fim3*、*ptxP*)分析

依基因具多形性的特定片段，選取適當引子進行 PCR 放大特定片段，產物經定序取得核酸序列資料，再進行序列比對分型 [5–7]。

四、百日咳菌 pertactin 的表現分析

運用西方墨點轉漬法分析抗原表現，將分離之百日咳菌株接種於 Bordet-Gengou(BG)培養基 35°C–37°C 培養 3 至 5 天，參考 Otsuka 等人發表之方法 [1]，利用界面活性劑打破細胞，萃取蛋白質及進行定量，蛋白質經

SDS-PAGE 電泳分離後，轉置到硝化纖維膜上，再利用冷光免疫偵測系統，檢測百日咳菌有無 pertactin 的表現，陽性對照為經 IMAC(immobilized metal affinity column)純化的 pertactin，濃度 0.03 ug/lane。

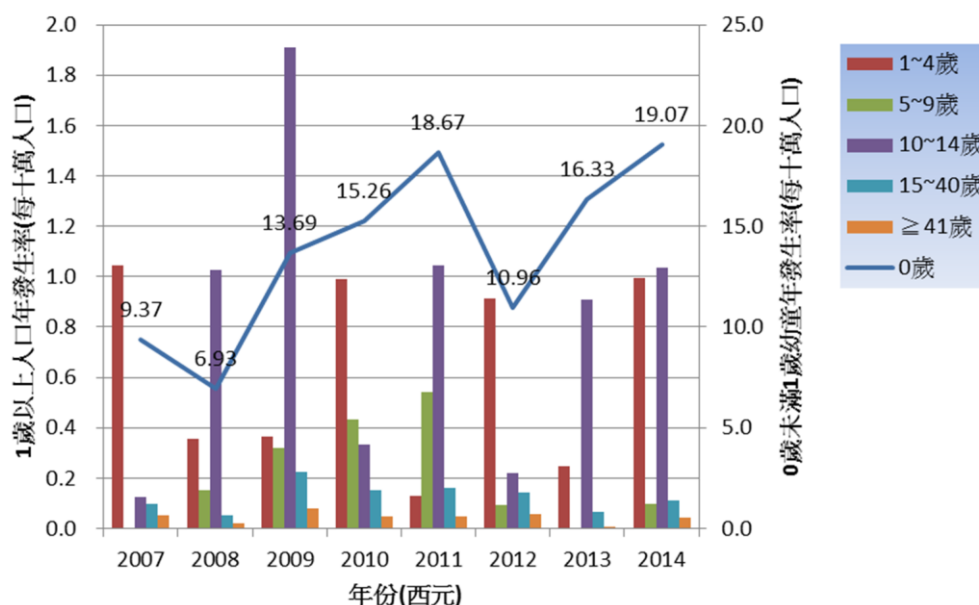
五、百日咳菌 fimbriae 血清型分析

使用 WHO 國際標準單株抗體 anti-FIM2 (NIBSC 06/124)和 anti-FIM3 (NIBSC 06/128)，採用玻片凝集方法，將培養 72 小時之新鮮菌落的生理食鹽水懸浮液與稀釋 1/10 的單株抗體混合均勻，1 分鐘後觀察凝集反應 [5]，陽性對照菌株為 Tohama (FIM2+)、ATCC18323 (FIM3+)和 CCUG48428 (FIM2+/FIM3+)。

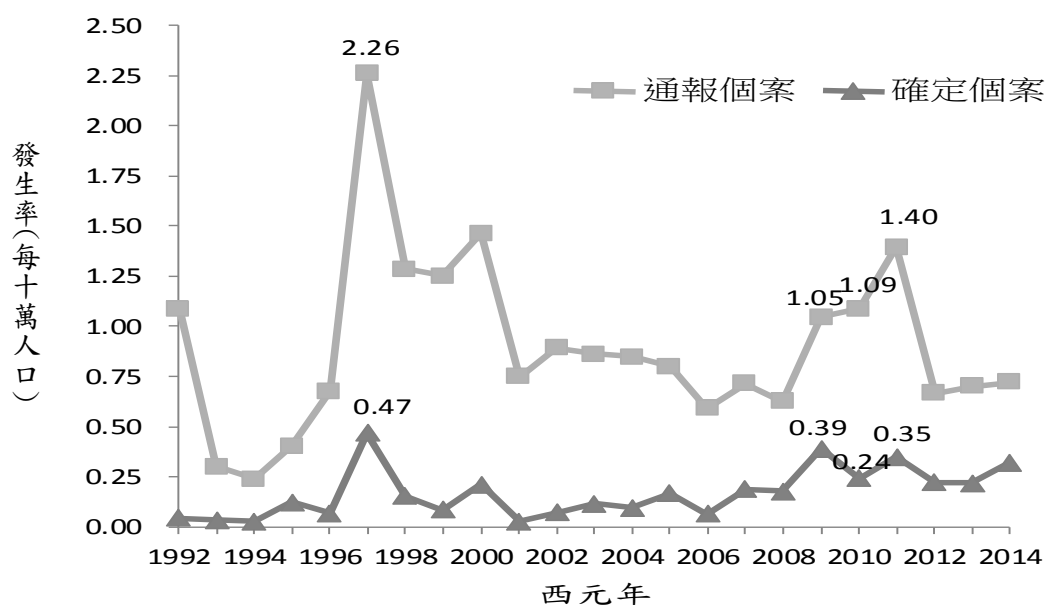
結果

一、2007–2014 年臺灣百日咳確定病例之不同年齡層年發生率

2007–2014 年臺灣百日咳確定病例的年齡別年發生率分布（每十萬人）如圖一，小於 1 歲的嬰兒最高，其次是 10–14 歲青少年和 1–4 歲幼童。觀察各年齡群在 2010 年公費提供 ACVs 使用後的變化，小於 1 歲的嬰兒發生率在 2012 年下降到每十萬人口 10.96 人後，開始持續增加到 2014 年每十萬人口 19.07 人；在 5–9 歲年齡群發生率自 2008 到 2011 年持續上升，但在 2012 年下降後無上升趨勢，唯個案數太少無法判定該年齡群發生率有下降趨勢；10–14 歲青少年發生率自 2012 年降到每十萬人口 0.22 人後，也開始持續上升。1992–2014 年百日咳通報與確定個案年發生率分布（每十萬人）如圖二，1997 年出現一個大波峰，百日咳通報個案發生率 2.26，其後於 2009–2011 年出現一個小波峰，百日咳通報個案發生率 2009–2011 年分別為 1.05、1.09 和 1.40。



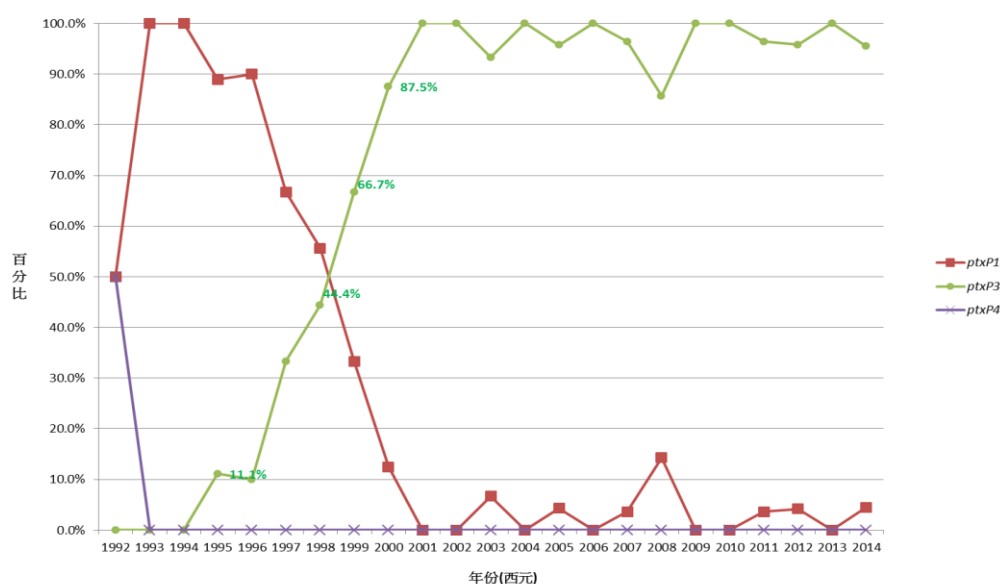
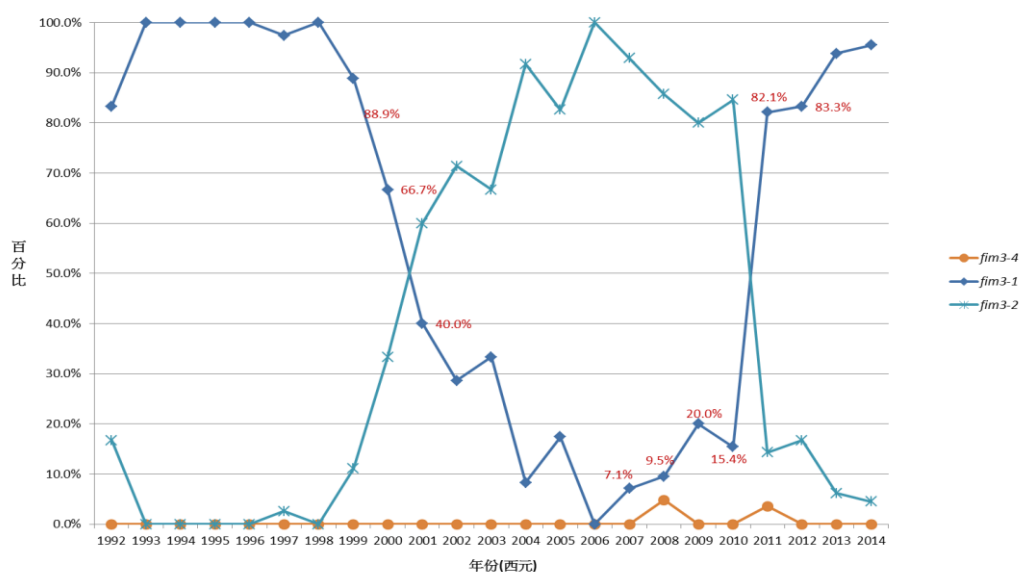
圖一、2007–2014 年臺灣百日咳確定病例，依據感染個案不同年齡層分布圖



圖二、1992–2014 年百日咳通報及確定個案發生率

二、百日咳菌具多形性之重要抗原的基因型(*ptxP*、*prn*、*ptxA1*、*fim3*)變化

收集 1992–2014 年 376 株百日咳菌，進行疫苗重要抗原基因(*ptxP*、*prn*、*ptxA1*、*fim3*)的分型。本土菌株 *ptxA* 基因型有 3 型(*ptxA1*、*ptxA2* 和 *ptxA5*)，自 1993 年起主要流行型別是 *ptxA1* 占 100%，*ptxA5* 只在 1992 年出現過，而 *ptxA2* 也只在 1999 年出現過。本土菌株 pertactin 基因型有 6 型(*prn1*、*prn2*、*prn3*、*prn4*、*prn6* 和 *prn7*)，在 1997 年以前主要流行基因型是 *prn1*，1998 年起 *prn2* 開始成為優勢型別，自 2000 年之後 90% 以上的菌株皆為 *prn2*。本土菌株 *ptxP* 基因型有 3 型 (*ptxP1*、*ptxP3* 和 *ptxP4*) (圖三)，*ptxP3* 在 1995 年出現，快速成為流行的基因型，到 1998 年 *ptxP3* 已占 44.4%，1999 年占有比例為 66.7%，成為優勢的流行基因型，2000 年之後占有比例皆達 85% 以上。本土菌株 *fim3* 基因型有 3 型(*fim3-1*、*fim3-2* 和 *fim3-4*) (圖四)，*fim3-1* 是 1998 年以前主要的流行基因型，1999 年開始逐年減少，1999–2005 年的占比依序為 88.9%、66.7%、40%、28.6%、33.3%、8.3% 和 17.4%，到 2006 年降至為 0%，接著 *fim3-1* 開始反轉增加，2007–2010 年的占比依序為 7.1%、9.5%、20% 和 15.4%，2011 年占有比例更高達 82.1%，之後便都維持在 80% 以上的盛行率。

圖三、1992–2014 年臺灣百日咳菌基因型 *ptxP* 變化趨勢圖圖四、1992–2014 年臺灣百日咳菌基因型 *fim3* 變化趨勢圖

三、百日咳菌抗原表現

收集 2003–2014 年的 241 株百日咳菌，分析其抗原表現，結果如表一。發現 2 株 PRN-菌株，分別於 2011 年和 2014 年分離出，PRN+菌株占 99.2%，PRN-菌株只占 0.8%；Fimbriae 血清型分析，臺灣百日咳菌株大部分表現 Serotype 3 fimbriae (Fim3)，占了 97.3%，Serotype 2 fimbriae (Fim2)只占 3.7%，其中在 2004 年發現一株 Fim2 和 Fim3 皆表現的百日咳菌，也在 2011 年發現一株 Fim2 和 Fim3 皆不表現的百日咳菌。

表一、2003–2014 年 241 株百日咳菌其 *pertactin* 和 *fimbriae* 的抗原表現

| | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| No. | 15 | 11 | 23 | 15 | 28 | 21 | 30 | 13 | 28 | 24 | 16 | 17 |
| PRN+ | 15 | 11 | 23 | 15 | 28 | 21 | 30 | 13 | 27 | 24 | 16 | 16 |
| PRN- | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Fim2+ | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Fim3+ | 14 | 10 | 22 | 15 | 27 | 19 | 30 | 13 | 26 | 24 | 16 | 16 |
| Fim2+Fim3+ | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fim2- Fim3- | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

討論

全球百日咳菌的演化調查中 [8]，依疫苗使用種類將時間分為 4 期：WCVs 早期（1960 年以前）、WCV（1960–1995 年）、WCV/ACV（1996–2000 年）和 ACV（2000 年以後），以觀察基因型變化。*ptxA* 最常見的三型基因型為 *ptxA1*、*ptxA2* 和 *ptxA4*，*ptxA2* 和 *ptxA4* 為 WCVs 早期（1960 年以前）主要的流行型別，*ptxA1* 大約在 1921–1932 年間出現，早在使用 WCVs 之前，在 WCVs 早期（1960 年以前）約占 5%，接著三期占有率分別為 WCV（1960–1995 年）68%、WCV/ACV（1996–2000 年）92% 和 ACV（2000 年以後）90%；在臺灣，1992–1996 年 *ptxA1* 占有率即達 91.66%，接著上升到 99.6%（1997–2010 年）和 100%（2011–2013 年），顯示 *ptxA* 在 WCV（1960–1995 年）期間已受到疫苗篩選壓力的作用。*prn* 全球最常見的三型為 *prn1*、*prn2* 和 *prn3*，*prn1* 為 WCVs 早期（1960 年以前）主要的流行型別，在 WCV（1960–1995 年）期間 *prn2* 和 *prn3* 新興崛起，*prn3* 出現的頻率保持穩定占 10%–17%，*prn2* 則持續增加，由 WCV（1960–1995 年）的 18% 上升到 ACV（2000 年以後）的 65%；在臺灣，1992–1996 年 *prn2* 占 33%，接著持續上升到 1997–2010 年占 85%，至 2011–2013 年占有率更提高到 96%，*prn2* 出現在 WCV（1960–1995 年）期間，而 ACV（2000 年以後）期間疫苗更發揮篩選壓力，使 *prn2* 成為最主要的流行型別。*fim3* 有 5 個基因型，*fim3-1*（疫苗型）和 *fim3-2* 為全球主要的基因型，*fim3-1* 一直為主要的流行型別，直到 *fim3-2* 在 WCV（1960–1995 年）期間被偵測到，當時占有率 1%，接著持續上升到 ACV（2000 年以後）占有率為 37%；在臺灣，1992–1996 年 *fim3-1* 占有率為 97%，1997–2010 年 *fim3-1* 減少到 39% 而 *fim3-2* 增加到 61%，2011–2013 年 *fim3-1* 和 *fim3-2* 占有率出現反轉，*fim3-1* 轉為增加到 85% 而 *fim3-2* 轉為減少到 13%，這結果顯示 *fim3* 基因一樣受到宿主免疫壓力篩選而產生流行變化，但與 *ptxA* 和 *prn* 有差異，*fim3* 受到疫苗的影響可能比較不大，因此流行的基因型沒有一直固定在非疫苗型，而是隨著宿主的因素而產生變化，菌株適應環境產生流行菌株的改變，這項改變也可能是造成臺灣在 2009–2011 年百日咳的罹病率增加的因素之一。

百日咳菌的 *ptx* 啟動子(*ptxP*)有十幾種基因型，最主要的流行型別是 *ptxP1* 和 *ptxP3*，在 WCVs 早期（1960 年以前）和 WCV（1960–1995 年）期間，*ptxP1* 為主要流行型別，分別占 68% 和 83%，但後來 *ptxP3* 開始取代 *ptxP1*，在 WCV/ACV（1996–2000 年）和 ACV（2000 年以後）期間，*ptxP3* 成為主要流行型別，分別占 48% 和 57%，*ptxP3* 基因突變出現的時間約在 1974–1977 年間。菌株帶 *ptxP3* 基因比較帶 *ptxP1* 基因可以產生更多的百日咳毒素(PT) [9]，使菌株更容易逃避宿主的免疫反應，在 1996 年之後在全球引起百日咳流行，如加拿大、瑞典、荷蘭、法國、澳洲、日本和韓國 [7, 9–14]；在臺灣，*ptxP3* 在 1995 年首度被偵測到，在 1999 年占有比率已超過 *ptxP1* 達 66.7%，到了 2000 年以後 *ptxP3* 占有比率皆達 85% 以上，臺灣在 1997 年百日咳罹病率增加，可能與 *ptxP3* 菌株全球擴散流行有關係。

Fim2 和 Fim3 皆是 WCVs 和 ACVs 疫苗內，重要的免疫保護的抗原因子。Fim2 和 Fim3 的血清型別也受疫苗使用的影響而轉變，英國的資料顯示 WCVs 使用後讓 Fim2/Fim3 或 Fim2 的菌株減少 [15]，在疫苗使用前期（1920–1956 年），分離菌株血清型的分佈為 Fim2 占 58% 和 Fim2/Fim3 占 13%，在疫苗使用後初期（1963–1967 年），Fim2 減少到 16% 和 Fim2/Fim3 上升到 38%，在 1970 年代中期因為疫苗安全性問題導致疫苗接種率下降後，血清型又從 Fim3 轉回 Fim2，接著使用含有 5 種百日咳菌抗原成份的 ACVs 後，Fim3 血清型菌株繼續維持著優勢，但是，有些國家使用的 ACVs 不含 Fim2/Fim3，仍然可以觀察到由 Fim3 血清型菌株取得優勢，顯然可能與 ACVs 的使用沒有直接相關；在 Poolman 等人所發表 ACVs 的 fimbriae 抗原角色研究中指出，疫苗引發的免疫對於 Fim2 比 Fim3 有更強的保護作用 [16]，推測因為抗原性的不同，在宿主因素影響下，讓抗原性弱的 Fim3 菌株仍可以取得某些適應優勢。臺灣臨床分離菌株以 Fim3 菌株為優勢，菌群占 97.3%。

PRN-菌株的出現，在許多國家引起百日咳爆發流行[1–3, 17, 18]，PRN-菌株的機制調查發現，大部分是因為 IS481(insertion sequences 481)插入影響基因表現，少部分約 17% 在基因上沒有發現突變，不表現 pertactin 是發生在轉錄或轉譯的調控。目前在各國發現 PRN-菌株其基因特性有差異，推想不是由同一個 clone 在全球擴散的結果[18]。PRN-菌株可以逃避宿主因 ACVs 引發的免疫對抗，但缺乏 pertactin 的菌株會影響致病性嗎？在體外的研究試驗發現，PRN-菌株其生長速度比 PRN+ 菌株快[1]，PRN-菌株因為具有生長優勢，缺乏 pertactin 不會影響其在宿主間的傳播，另外在引發宿主的疾病嚴重程度及住院天數的比較，發現 PRN-菌株和 PRN+ 菌株也沒有差異[19]，另已有研究證實 PRN-菌株與疫苗的相關性[20]，研究發現在經疫苗免疫後的百日咳病患中，分離到 PRN-菌株比 PRN+ 菌株多，意味著目前的疫苗對 PRN+ 菌株有比較好的保護效果。臺灣流行菌株以 PRN+ 的菌株為優勢占 99.2%，PRN- 的菌株只占 0.8%，PRN- 的菌株目前只零星出現，未來是否會有 PRN- 的菌株持續增加需密切關注，pertactin 是 ACVs 的抗原成分之一，當 PRN- 的菌株出現增加時，需考量不同疫苗的不同成份組合，其選用可能與疫苗保護效果有關。

百日咳菌株為適應生存，在疫苗壓力篩選下，流行菌株所帶的疫苗抗原基因型多轉為非疫苗型(*ptxA1/prn2* 或 *ptxA1/prn3*)，但由疾病罹病率的觀察（圖一），大於 1 歲、小於 10 歲的幼兒小孩其罹病率低於嬰幼兒，顯示 ACVs 對疾病有一定的保護程度，可是對於疾病的預防仍面臨的嚴峻的挑戰，小於 1 歲的嬰幼兒其罹病率一直很高，由一些研究報告指出目前的 ACVs 對於疾病預防有效，但對於感染傳播預防無效 [21]，在狒狒的研究實驗中發現，疫苗施打後的狒狒再經百日咳菌感染，實驗狒狒在疾病症狀的表現為，施打 ACVs 與 WCVs 表現相同；而在病原菌的清除實驗中發現，施打 ACVs 的狒狒其百日咳菌的清除速率比施打 WCVs 的狒狒慢，與未經免疫的狒狒一樣，且可以將百日咳傳染給沒有免疫的狒狒，實驗推論 ACVs 對於疾病預防有效但對於感染傳播預防無效。因而推論完成 ACVs 免疫的幼兒和學齡前兒童可能受感染但症狀輕微不明顯而成為潛在的病原傳播者，ACVs 的預防接種能讓完成免疫的孩童獲得保護免於疾病威脅，但年幼無法完成免疫的嬰幼兒依然是疾病高危險群，除期待有更好的疫苗上市外，對於症狀輕微的潛在感染者需加強監測，國際間面對百日咳的預防 [22–23]，皆將重點放於年紀太小無法接受疫苗保護的嬰幼兒，孕婦接種疫苗藉由胎盤將免疫抗體傳給新生兒，是目前有效保護新生兒面對百日咳威脅的方法 [24]，此外還需考慮幼兒照護機構內的人員，接著再列入學童、青少年與成年人，在一篇個案報告研究中指出，一個 5 歲的小孩經完整疫苗免疫後，發生咳嗽症狀經實驗室診斷證實為罹患百日咳 [25]。顯示完整疫苗免疫後的 5 歲兒童依然可能得到百日咳，建立醫護與民眾對疾病與疫苗的正確知識，一旦發現有咳嗽症狀無其他感染之可疑的人，提早通報百日咳採取檢體確認，讓年紀太小無法得到疫苗免疫保護的嬰幼兒能獲得良好的照護，免於疾病威脅。

誌謝

感謝疾病管制署急性傳染病組及百日咳防治工作有關之衛生醫療單位人員，協助百日咳感染防疫資料的收集，一併獻上感激之意。

參考文獻

1. Otsuka N, Han HJ, Toyozumi-Ajisaka H, et al. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. *PLoS One*. 2012; 7(2): e31985.
2. Hegerle N, Paris AS, Brun D, et al. Evolution of French *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* isolates: Increase of *Bordetellae* not expressing pertactin. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(9): E340–6.
3. Barkoff AM, Mertsola J, Guillot S, et al. Appearance of *Bordetella pertussis* strains not expressing the vaccine antigen pertactin in Finland. *Clin Vaccine Immunol*.

- 2012; 19(10): 1703–4.
4. Quinlan T, Musser KA, Currenti SA, et al. Pertactin-negative variants of *Bordetella pertussis* in New York State: A retrospective analysis, 2004-2013. *Mol Cell Probes* 2014; 28: 138–40.
 5. Mooi FR, Hallander H, Wirsing von Konig CH, et al. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000; 19(3): 174–81.
 6. Tsang RS, Lau AK, Sill ML, et al. Polymorphisms of the fimbria *fim3* gene of *Bordetella pertussis* strains isolated in Canada. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(11): 5364–7.
 7. Lam C, Octavia S, Bahrame Z, et al. Selection and emergence of pertussis toxin promoter *ptxP3* allele in the evolution of *Bordetella pertussis*. *Infect Genet Evol*. 2012; 12(2): 492–5.
 8. Bart MJ, Harris SR, Advani A, et al. Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *mBio*. 2014; 5(2): e01074–14.
 9. Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, et al. *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15(8): 1206–13.
 10. Advani A, Gustafsson L, Ahren C, et al. Appearance of *Fim3* and *ptxP3*-*Bordetella pertussis* strains, in two regions of Sweden with different vaccination programs. *Vaccine*. 2011; 29(18): 3438–42.
 11. Shuel M, Jamieson FB, Tang P, et al. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* in Ontario, Canada reveals one predominant clone. *Int J Infect Dis*. 2013; 17(6): e413–7.
 12. Octavia S, Sintchenko V, Gilbert GL, et al. Newly emerging clones of *Bordetella pertussis* carrying *prn2* and *ptxP3* alleles implicated in Australian pertussis epidemic in 2008-2010. *J Infect Dis*. 2012; 205(8): 1220–4.
 13. Kim SH, Lee J, Sung HY, et al. Recent trends of antigenic variation in *Bordetella pertussis* isolates in Korea. *J Korean Med Sci*. 2014; 29(3): 328–33.
 14. Miyaji Y, Otsuka N, Toyozumi-Ajisaka H, et al. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. *PLoS One*. 2013; 8(10): e77165.
 15. Gorringe AR, and Vaughan TE. *Bordetella pertussis* fimbriae (*Fim*): relevance for vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2014; 13(10): 1205–14.
 16. Poolman JT, and Hallander HO. Acellular pertussis vaccines and the role of

- pertactin and fimbriae. *Expert Rev Vaccines*. 2007; 6(1): 47–56.
17. Queenan AM, Cassiday PK, and Evangelista A. Pertactin-negative variants of *Bordetella pertussis* in the United States. *N Engl J Med*. 2013; 368(6): 583–4.
 18. Lam C, Octavia S, Ricafort L, et al. Rapid Increase in Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* Isolates, Australia. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20(4): 626–33.
 19. Bodilis H, and Guiso N. Virulence of pertactin-negative *Bordetella pertussis* isolates from infants, France. *Emerg Infect Dis*. 2013; 19(3): 471–4.
 20. Martin SW, Pawloski L, Williams M, et al. Pertactin-negative *Bordetella pertussis* strains: evidence for a possible selective advantage. *Clin Infect Dis*. 2015; 60(2): 223–7.
 21. Warfel JM, Zimmerman LI, and Merkel TJ. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(2): 787–92.
 22. Mooi FR, Zeddeman A, and van Gent M. The pertussis problem: classical epidemiology and strain characterization should go hand in hand. *J. Pediatr*. 2015.
 23. Ridda I, Gao Z, and Macintyre CR. Attitudes, knowledge and perceptions towards whooping cough and pertussis vaccine in hospitalized adults. *Vaccine*. 2014; 32(9): 1107–12.
 24. Swamy GK, and Wheeler SM. Neonatal pertussis, cocooning and maternal immunization. *Expert Rev Vaccines*. 2014; 13(9): 1107–14.
 25. Kmietowicz Z. One in five children with persistent cough found to have whooping cough. *BMJ*. 2014; 348: g4211.