

# Badania genetycznej zmienności szczepów *Bordetella pertussis* w aspekcie wzrostu zachorowań na krztusiec

## The study of genetic variation of *Bordetella pertussis* strains in the aspect of whooping cough increase rate

ANNA LUTYŃSKA, EWA MOSIEJ, MONIKA ZAWADKA, MACIEJ POLAK, EWA AUGUSTYNOWICZ

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

Pomimo wysokiego poziomu zaszczepienia populacji przeciw krztuścowi w Polsce od połowy lat 90. XX wieku odnotowane jest pogorszenie wskaźników zapadalności na krztusiec. Ze względu na skalę zachorowań krztusiec klasyfikuje się jako nowo powracające zagrożenie zdrowia publicznego. Wzrastająca liczba zachorowań na krztusiec u starszych dzieci, młodzieży oraz osób dorosłych w krajach o wysokim poziomie zaszczepienia populacji stanowi ważny czynnik transmisji zakażeń do nieuodpornionych lub nie w pełni uodpornionych noworodków i niemowląt, które są najbardziej podatne na ostrą formę choroby, w tym zgon oraz powikłania. Jedną z możliwych przyczyn wzrostu zachorowań na krztusiec są zmiany genetyczne obserwowane wśród obecnie izolowanych szczepów *Bordetella pertussis*. Badania wykonane w Polsce wyraźnie wskazują, że po wprowadzeniu powszechnych szczepień przeciw krztuścowi genetyczna struktura populacji izolowanych szczepów zmieniła się, doszło do zróżnicowania między izolatami szczepionkowymi i dzikimi, a także pojawiły się szczepy posiadające wcześniej nie występujące allele genów kodujących istotne czynniki warunkujące immunogenność oraz zjadliwość. Badania efektywności eliminacji szczepów o nie występujących wcześniej wariantach genów na modelu zwierzęcym wskazują na ich potencjalnie epidemiczny charakter w przypadku spadku odporności poszczepiennej. Obecnie trwają badania nad oceną efektywności szczepionek przygotowanych eksperymentalnie w porównaniu do stosowanej w Polsce do powszechnych szczepień szczepionki pełnokomórkowej w eliminacji szczepów wykazujących zróżnicowane allele promotora toksyny krztuścowej. Przypuszcza się, że nowe warianty szczepów *B. pertussis* mogą posiadać zwiększony potencjał zjadliwości ze względu na wydzielanie zwiększonych ilości toksyny krztuścowej. Monitorowanie genetycznej zmienności *B. pertussis* może w przyszłości stanowić nowy sposób zapobiegania zachorowaniom na krztusiec w postaci odpowiedniego ukierunkowywania odpowiedzi immunologicznej przez dobór szczepów szczepionkowych lub szczepionek przeciwkrztuścowych.

**Słowa kluczowe:** *Bordetella pertussis*, krztusiec, genotypowanie, szczepienia

In Poland, despite the high immunization level, whooping cough incidence rate has been increasing since 1990-ies. As the increase is significant, pertussis is regarded as the re-emerging disease. The increase of pertussis cases among older children, adolescents and adults seen in highly immunized countries has been recognized as an important factor in the *Bordetella pertussis* transmission to not immunized or not completely immunized neonates and newborns, who are the most susceptible to the severe form of the disease, including complications and death. The genetic changes seen among the currently circulating *B. pertussis* strains are regarded as one of the possible reasons responsible for the pertussis frequency increase in highly immunized countries. The studies performed in Poland clearly showed that after the introduction of the routine vaccination against pertussis, the genetic structure of *B. pertussis* isolated strains changed and the differences among vaccine and circulating isolates were recognized together with the appearance of strains harboring previously unobserved alleles of genes encoding crucial antigens responsible for immunogenic and virulence properties. The studies on the effectiveness of *B. pertussis* strains elimination from mice lungs showed that some of their specific variants might become epidemic in the situation of immunity decrease. Currently, studies on the effectiveness of experimental and commercial vaccines in elimination of strains differing by pertussis toxin promoter alleles are taking place. It is suspected that the newly emerged *B. pertussis* strain variants might be more virulent, as they excrete a higher level of pertussis toxin. The monitoring of genetic variability of *B. pertussis* might be regarded as the new pertussis prevention strategy by redirecting immunity induced with vaccination by proper selection of vaccine strains or pertussis vaccines.

**Key words:** *Bordetella pertussis*, whooping cough, genotyping, vaccination

© Probl Hig Epidemiol 2012, 93(3): 599-604

www.phie.pl

Nadesłano: 25.06.2012

Zakwalifikowano do druku: 08.08.2012

**Adres do korespondencji / Address for correspondence**

dr hab. Anna Lutyńska

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny,  
00-791 Warszawa ul. Chocimska 24

tel. 22 542 12 14, fax.22 542 13 11, e-mail: alutyńska@pzh.gov.pl

## Sytuacja epidemiologiczna zachorowań na krztusiec w Polsce i Europie

Krztusiec jest chorobą zakaźną, przeciw której zapobiega się drogą powszechnych szczepień ochron-

nych. W różnych krajach, odpowiednio od lat 50. i 80. XX wieku, dostępne są dwa rodzaje szczepionek przeciw krztuścowi: pełnokomórkowa (wP-*whole pertussis vaccine*) oraz bezkomórkowa (aP-*acellular pertussis*

vaccine). Obecnie w krajach Unii Europejskiej, poza Polską, do szczepień dzieci w schematach podstawowych stosowane są szczepionki skojarzone zawierające bezkomórkowy komponent krztuscowy. Szerokie zastosowanie szczepionek bezkomórkowych znajduje uzasadnienie w lepszym profilu bezpieczeństwa przejawiającym się mniejszą częstością niepożądanych odczynów poszczepiennych. Skuteczność szczepionek bezkomórkowych, oznaczana w badaniach klinicznych, jest jednak niższa w stosunku do szczepionek pełnokomórkowych [1, 2].

Na świecie występuje nadal średnio 40-50 mln przypadków zachorowań na krztusiec rocznie, stanowiących przyczynę ponad 350 000 zgonów, głównie niemowląt, oraz powikłań tj. zapalenia płuc (5 000 000) oraz powikłań neurologicznych (50 000), co wynika z braku masowej immunoprofilaktyki przeciw krztuscowi głównie w krajach rozwijających się.

W krajach, które powszechnie wprowadziły szczepienia przeciw krztuscowi i utrzymały wysoki poziom zaszczepienia populacji, liczba rejestrowanych zachorowań zmniejszyła się, jak również w dużym stopniu wyeliminowano zgony z powodu zachorowań na krztusiec [3, 4]. Tym bardziej zaskakujący okazał się fakt stabilnego, odnotowanego od połowy lat 90. pogorszenia się wskaźników zapadalności na krztusiec. Obecnie ze względu na skalę zachorowań, krztusiec klasyfikuje się jako nowo powracające zagrożenie zdrowia publicznego. W wielu krajach europejskich o wysokim poziomie zaszczepienia, krztusiec występuje endemicznie i co gorsze często wiąże się ze wzrostem częstości hospitalizacji oraz umieralności nie uodpornionych lub nie w pełni uodpornionych noworodków i niemowląt. Dane EUVAC-NET wskazują, że w Europie w latach 1998-2002 umieralność dzieci z powodu krztusca poniżej 1 r.ż. wynosiła 6,3/1000 urodzeń, stanowiąc 94% wszystkich zgonów dzieci poniżej 1 r.ż. [5,6].

Z punktu widzenia zdrowia publicznego, zachorowania na krztusiec u starszych dzieci, młodzieży oraz osób dorosłych, które zazwyczaj przebiegają łagodnie lub bezobjawowo, stanowią ważny czynnik transmisji zakażeń do nie uodpornionych lub nie w pełni uodpornionych niemowląt, które są najbardziej podatne na ostrą formę choroby/powikłania/zgon. Badania przeprowadzone w Niemczech wskazują, że źródłem zakażenia chorych niemowląt w wieku poniżej 6 miesięcy życia byli dorośli/młodzież oraz dzieci w wieku 1,5-13 lat. We Francji wykazano, że w 88% rejestrowanych przypadków zachorowań na krztusiec niemowląt, źródłem zakażenia byli dorośli. Szacuje się, że w krajach o niskim poziomie zaszczepienia (poniżej 70%) odsetek wrażliwych dzieci do ukończenia 1 r.ż., które ulegają zakażeniu szczepami *B. pertussis* wynosi ok. 30%, do ukończenia 5 lat – 80% i do ukończenia 15 lat – 100%. W krajach o wysokim poziomie zaszczepienia

(powyżej 70%) odsetek ten ocenia się na 10% u dzieci do ukończenia 1 roku życia., 60% do ukończenia 5 r.ż. i 100% do ukończenia 15 r.ż. [6, 7].

Należy jednak podkreślić, że realna ocena skali zachorowań na krztusiec nie jest znana. Uważa się, że rejestrowane przypadki krztusca stanowią jedynie 1-36% przypadków rzeczywiście występujących, obejmując zachorowania o najbardziej typowych objawach klinicznych. Szacuje się, że liczba przypadków nierejestrowanych może być 40-160 razy większa niż rejestrowanych, a liczba przypadków nie rejestrowanych, bezobjawowych, może być 4-22 razy większa od liczby przypadków objawowych nie rejestrowanych [4].

W celu ograniczenia zachorowań na krztusiec możliwe są do przyjęcia następujące strategie: wprowadzenie powszechnych szczepień osób dorosłych, wybiórczych szczepień przyszłych matek, członków rodzin i innych osób z bliskiego kontaktu z noworodkiem, wybiórczych szczepień pracowników ochrony zdrowia, wybiórczych szczepień osób mających zawodowy kontakt z dziećmi, powszechnego szczepienia młodzieży, szczepienia przypominającego w okresie przedszkolnym w wieku 4-6 lat oraz poprawę realizacji lub udoskonalanie obecnych programów szczepień niemowląt i małych dzieci. W Europie dodatkowe szczepienia u młodzieży wprowadziły Niemcy i Francja. Francja po oszacowaniu zapadalności na poziomie 507/100 000 osób, dodatkowo wprowadziła szczepienia pracowników opieki medycznej, pozostających w bezpośrednim kontakcie z niemowlętami oraz młodych osób dorosłych. Szczepienia przeciw krztuscowi u młodych osób dorosłych wprowadziły także Austria, Francja oraz Niemcy, a rutynowe szczepienie dorosłych zalecają, co 10 lat Szwajcaria i Luksemburg. Po odnotowanym wzroście zapadalności na krztusiec u niemowląt w latach 1999-2003, w Niemczech zalecane są szczepienia pracowników opieki zdrowotnej i osób opiekujących się zawodowo dziećmi, co 10 lat oraz od 2004 r. wybiórcze szczepienia młodych matek, członków rodzin i innych osób z bliskiego kontaktu z noworodkiem [8, 9].

Niewątpliwie uzyskanie maksymalnego efektu odporności zbiorowiskowej, pozwalającego na eliminację choroby z użyciem dostępnych obecnie szczepionek przeciw krztuscowi, stosowanych jedynie u dzieci nie jest możliwe, gdyż przebycie choroby nie jest wystarczająco czułym i swoistym wskaźnikiem uniknięcia ponownego zakażenia. Szczepienia przeciw krztuscowi zapobiegają chorobie, a nie zakażeniu. Wraz z upływem czasu od podania ostatniej dawki, u osób zaszczepionych następuje spadek odporności i osoby te stanowią istotny czynnik transmisji zakażeń [10].

Na ile proponowane strategie sprawdzą się i przyniosą spodziewane efekty trudno jest dzisiaj ocenić. Wprowadzenie szczepień młodzieży w Niemczech

wpłynęło na spadek liczby hospitalizacji niemowląt z powodu krztusca, lecz we Francji zastosowana strategia nie przyniosła oczekiwanych rezultatów [8]. We wszystkich dotychczasowych zaleceniach dotyczących strategii poprawy sytuacji epidemiologicznej zachorowań na krztusiec zawsze wymieniana jest konieczność monitorowania genetycznej zmienności izolowanych szczepów w celu obserwacji zmian struktury populacji [9].

### Badania przyczyn wzrostu zachorowań na krztusiec w Polsce

Prace prowadzone w Zakładzie Badania Surowic i Szczepionek Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny (NIZP-PZH) w zakresie wyjaśnienia przyczyn wzrostu zachorowań na krztusiec w Polsce potwierdziły, że wzrost ten nie wiąże się z obniżeniem poziomu zaszczepienia, zmianami w systemie nadzoru szczepiennego, diagnostyce, obniżeniem się skuteczności szczepionki przeciw krztuścowi, a jedynie ze spadkiem wzbudzonej odpowiedzi poszczepiennej oraz z pojawieniem się nowych szczepów, opornych na działanie szczepienia [11, 12, 13]. W Polsce do masowych szczepień populacji przeciw krztuścowi od 1960 r. stosowana jest krajowa szczepionka DTP z pełnokomórkowym składnikiem krztuścowym.

Analizy epidemiologiczne zachorowań na krztusiec oraz efektywności szczepień przeciw krztuścowi w Polsce wskazują na: realny wzrost zachorowań przy wysokim poziomie zaszczepienia populacji, brak niekorzystnych zmian w zapadalności w grupie wieku 0-4 lata, spadek skuteczności szczepień u dzieci w wieku powyżej 5 lat oraz na niskie wykonawstwo miarodajnych potwierdzeń diagnostycznych zachorowań na krztusiec [14]. W celu przeciwdziałania utrzymującemu się wzrostowi zachorowań na krztusiec, w 2003 r. do Programu Szczepień Ochronnych (PSO) wprowadzono dodatkową dawkę szczepienia szczepionką DTaP z bezkomórkowym komponentem krztuścowym (aP) u dzieci w wieku 6 lat. PSO obecnie zaleca stosowanie szczepionki o obniżonej zawartości antygenów krztuścowych (ap) do szczepień osób dorosłych w miejsce szczepionki Td, zalecanej do podawania, co 10 lat.

### Zmiany genetyczne izolowanych szczepów *B. pertussis*

Jedną z możliwych przyczyn obserwowanego wzrostu zachorowań na krztusiec są zmiany genetyczne wśród obecnie izolowanych szczepów *B. pertussis*. Badania wykonane w Polsce potwierdziły, że genetyczna struktura populacji izolowanych szczepów zmieniła się [11, 13].

Zmiany genetyczne obserwowane w genomach obecnie izolowanych szczepów *B. pertussis* wydają się być jedną z podstawowych przyczyn skrócenia trwania odpowiedzi poszczepiennej oraz wzrostu zapadalności na krztusiec.

W celu oszacowania stopnia zmian zachodzących w genetycznej strukturze populacji izolowanych szczepów i wyróżnienia szczepów epidemicznych, a także porównania genetycznych markerów szczepów izolowanych obecnie w Polsce ze szczepami izolowanymi w innych krajach europejskich wykonano typowanie metodą PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Badaniom poddano 300 szczepów *B. pertussis*, w tym 155 szczepów wyizolowanych od osób chorych na krztusiec w Polsce w latach 1960-2005, szczepy szczepionkowe dotychczas stosowane do produkcji pełnokomórkowego komponentu przeciw krztuścowi oraz 141 zagranicznych szczepów *B. pertussis* pochodzących z Danii, Wielkiej Brytanii, Finlandii, Francji, Holandii, Szwecji oraz Niemiec wyizolowanych od osób chorych na krztusiec w latach 1999-2004. Uzyskane profile PFGE zaklasyfikowano do 5 wcześniej opisanych (III, IV $\alpha$ , IV $\beta$ , IV $\gamma$ , V) oraz nieopisanych (A, B, C) przez inne ośrodki europejskie klasterów. Łącznie do 3 nowych klasterów (A-C) zostało zaklasyfikowanych 48% polskich szczepów *B. pertussis*. Do 3 nowych klasterów (A, B, C) zostały zaliczone wyłącznie polskie szczepy *B. pertussis*, przy czym do klasterów B i C zostały zaklasyfikowane wyłącznie polskie izolaty pochodzące z okresów, odpowiednio 1964-1974 oraz 1995-2004. Szczepionkowe szczepy *B. pertussis* stosowane do produkcji krztuścowego komponentu szczepionki DTP zaliczono do klasteru III. Do 3 wcześniej opisanych w Europie klasterów – IV $\alpha$ , IV $\beta$ , IV $\gamma$  zaklasyfikowano 97% zagranicznych szczepów *B. pertussis*. Przeprowadzone badania wykazały, że większość izolowanych szczepów *B. pertussis* w Polsce charakteryzuje się profilami PFGE niespotykanymi wśród pozostałych krajów europejskich [13]. Odmienność genetycznej struktury populacji szczepów *B. pertussis* w Polsce może wynikać z licznych zmian szczepów szczepionkowych przeprowadzanych do 1977 r., czego nie obserwowano w innych krajach europejskich, co mogło powodować w populacji szerszy zakres indukowanej odpowiedzi immunologicznej. Na zmiany w genetycznej strukturze populacji izolowanych szczepów mogą nakładać się zmiany wykryte w sekwencjach wielu genów kodujących antygeny istotne dla wytworzenia skutecznej odpowiedzi odpornościowej przeciw krztuścowi. Zmienność częstości alleli genu kodującego podjednostkę S1 toksyny krztuścowej (*ptxA*) i genu kodującego pertaktynę (*prn*) wśród szczepów *B. pertussis* izolowanych w Polsce wyraźnie wskazuje, że nastąpiło zróżnicowanie między izolatami szczepionkowymi i dzikimi. Szczepy obecnie izolowane

reprezentują profile alleli genów kodujących toksynę krztuścową i pertaktynę, odmienne w stosunku do profilu szczepów szczepionkowych oraz szczepów izolowanych po wprowadzaniu do masowych szczepień szczepionki przeciw krztuścowi. Przeprowadzona analiza sekwencji fragmentów genów *ptxA* oraz *prn* wykazała, że wśród szczepów izolowanych w Polsce w latach 1960-1977, występowały szczepy o 5 różnych kombinacjach alleli genów *ptxA* i *prn*: *ptxA1-prn1* (67%), *ptxA2-prn1* (25%), *ptxA1-prn2* (2,8%), *ptxA1-prn3* (2,8%) oraz *ptxA3-prn1* (2,8%). Z kolei wśród szczepów pochodzących od chorych na krztusiec wyizolowanych w latach 1995-2005 zidentyfikowano 3 kombinacje alleli genów *ptxA* oraz *prn*: *ptxA1-prn1* (71%), *ptxA1-prn2* (25%) oraz *ptxA1-prn3* (4%) [13]. W aktualnym składzie szczepów *B. pertussis* stosowanych do produkcji krajowej szczepionki DTP znajdują się szczepy o allelach *ptxA2/prn1*, charakterystycznych dla izolatów pochodzących z lat 60. i 70. Opublikowane dane wskazują, że szczepy o profilu *ptxA2/prn1*, tzw. „starego typu” (Holandia, Finlandia, USA, Japonia, Argentyna), *ptxA2/A3/prn1* (Francja) i *ptxA1/A2/prn1* (Wielka Brytania) były i są nadal stosowane do produkcji szczepionek DTwP/aP w postaci niezmienionej [15, 16, 17, 18, 19, 20, 21]. Tego rodzaju skład szczepionki bezkomórkowej, podobnie jak w przypadku szczepionki pełnokomórkowej, może w przyszłości doprowadzić do ekspansji szczepów przejawiających warianty białek nie włączonych do składu szczepionki. Przypuszcza się, że w przypadku stosowania szczepionek bezkomórkowych takie zjawisko może wystąpić szybciej niż w przypadku szczepionek pełnokomórkowych, ze względu na węższy zakres wzbudzonej odpowiedzi odpornościowej. We wszystkich krajach wśród obecnie izolowanych szczepów, występują szczepy o odmiennych profilach alleli genu kodujących podjednostkę S1 toksyny krztuścowej oraz pertaktynę. Nadal w fazie hipotezy jest założenie, że nowopowstałe warianty *B. pertussis* mogą być mniej wrażliwe na odpowiedź immunologiczną wzbudzaną drogą szczepień przeciw krztuścowi. Jeżeli postawiona hipoteza jest prawdziwa, opisany polimorfizm obu genów i rozkład ich wariantów powinien w bezpośredni sposób rzutować na skład pełnokomórkowych oraz bezkomórkowych szczepionek przeciw krztuścowi.

Analizę częstości wariantów genów *ptxA/prn* uzupełniły wyniki typowania metodą MLST (*Multilocus Sequence Typing*) szczepów *B. pertussis* wykonanego na poziomie sekwencji genów: *ptxA*, *ptxC* oraz *tcfA*. Szczepy o szczepionkowym typie MLST-2 izolowano wyłącznie w latach 1960-1977. W okresie 1995-2010, szczepy o szczepionkowym profilu MLST-2 nie były izolowane, a częstość izolacji szczepów o profilu MLST-3 wzrosła do 93%. Od 1997 r. wyizolowano 6 szczepów o profilu MLST-5 oraz pojedynczy szczep

o profilu MLST-4. Większość szczepów pochodzących z Danii, Szwecji, Holandii, Francji, Wielkiej Brytanii, Niemiec oraz Finlandii posiadało profil MLST-5. W Finlandii szczepy o profilu MLST-3 izolowano z częstością 37%. W Wielkiej Brytanii oraz Niemczech profil MLST-3 występował u 10% szczepów a we Francji u 6% szczepów. Wzrost zachorowań na krztusiec w Polsce, pomimo wysokiego poziomu zaszczepienia populacji, może być skorelowany z pojawieniem się szczepów o profilu MLST-5, charakteryzującym się także nieszczepionkowymi allelami pertaktyny (*prn2*) oraz promotora toksyny krztuścowej (*ptxP3*).

Typ MLST-5 obecnie dominuje w krajach, w których odnotowywany jest wyższy poziom zachorowań na krztusiec niż występujący w Polsce. Wyniki typowania z użyciem metod PFGE oraz MLST wskazują, że niektóre klony *B. pertussis* mogą rozprzestrzeniać się skuteczniej, przez co mogą być powiązane ze wzrostem zachorowań na krztusiec. Obecnie przeprowadzane są badania polimorfizmu tandemowych sekwencji powtórzonych (MLVA – *Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis*) w celu wyróżnienia dominujących typów VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*) w Polsce w odniesieniu do typów dominujących w innych państwach europejskich w celu oceny czy różne strategie szczepień (dotyczące np. stosowanych szczepów szczepionkowych) mogły korelować z wyższą lub niższą genetyczną różnorodnością szczepów.

### Badania potencjału zjadliwości szczepów *B. pertussis in vitro*

Wykonane badania na modelu mysim, potwierdziły efektywność obecnie stosowanej w Polsce szczepionki pełnokomórkowej przeciw krztuścowi oraz szczepionek przygotowanych eksperymentalnie w eliminacji szczepów *B. pertussis* o wcześniej nie występujących w Polsce profilach: *ptxA1/prn2*, *ptxA1/prn3* oraz *ptxA1/prn1*. Jednak wykazano wyższy potencjał namnażania się w tkance płuc myszy szczepów o profilu *ptxA1/prn2* w porównaniu do szczepów zawierających inne profile alleli, co wskazuje na ich potencjalną rolę w przypadku niestosowania szczepień lub spadku odporności poszczepiennej.

Dla wyróżnionych, w uprzednio wykonanych badaniach genotypowania, potencjalnie epidemicznych szczepów *B. pertussis* obecnie wykonywane są badania poziomu wytwarzanej toksyny krztuścowej *in vitro*. W celu wyróżnienia szczepów zdolnych do wytwarzania zwiększonej ilości toksyny krztuścowej, badany jest efekt zlepiania się hodowli komórek jajnika chomika chińskiego CHO.

Toksyna krztuścowa (*PT – Pertussis Toxin*) wywołuje/nasila szereg efektów biologicznych *in vivo* i uważana jest za główny czynnik zjadliwości

*B. pertussis*, odpowiedzialny za powstawanie objawów klinicznych krztuśca przez udział w adhezji do komórek nabłonka, jego destrukcji oraz przez obniżanie mechanizmów odporności komórkowej. Toksyna krztuścowa odgrywa istotną rolę w indukowaniu odpowiedzi odpornościowej gospodarza, a przeciwciała przeciw-toksynie krztuścowej chronią myszy przed zakażeniem żywymi komórkami *B. pertussis* drogą domózgową i oddechową. Inaktywowana toksyna krztuścowa wchodzi w skład szczepionek bezkomórkowych przeciw krztuścowi, a jej adiuwantowe właściwości wpływają na nasilenie immunogenności innych antygenów szczepionkowych [22]. Zidentyfikowane różnice sekwencji nukleotydów w promotorze genu kodującego podjednostkę toksyny krztuścowej w korelacji do badań poziomu wytwarzanej toksyny krztuścowej *in vitro* wśród obecnie izolowanych szczepów *B. pertussis* mogą ostatecznie potwierdzić zasadność wyróżnienia szczepów potencjalnie epidemicznych o zwiększonym potencjale zjadliwości. Wstępne badania wskazują na statystycznie niższą efektywność szczepionki w eliminacji szczepów *B. pertussis* o kombinacji alleli *ptxP3-ptxA1/prn2* w porównaniu do szczepów z *ptxP1* niezależnie od wariantu alleli *ptxA1/prn* ( $p < 0,01$ ).

### Rola zakażeń *Bordetella parapertussis*

*B. parapertussis* jest obok *B. pertussis* czynnikiem etiologicznym krztuśca. Objawy krztuśca wywołanego przez *B. parapertussis* są bardzo podobne do objawów choroby wywołanej przez *B. pertussis*, ale przebieg choroby jest w większości przypadków łagodniejszy. Przeprowadzone badania efektywności szczepionki DTP w stosunku do *B. parapertussis*, potwierdziły jej znamienne wyższą skuteczność w indukowaniu ochronnej odpowiedzi w porównaniu do szczepionki DTap, wskazując jednocześnie, że wielkość tego efektu jest uzależniona od badanego szczepu. Monitorowanie tych zakażeń i dalsze badania nad zmiennością krążących szczepów *B. parapertussis* mogą pozwolić na lepszą ocenę perspektyw kontroli zachorowań na krztusiec [23].

### Perspektywy zastosowania monitorowania genetycznej zmienności *B. pertussis*

Prezentowane wyniki badań stanowią istotny element wiedzy na temat zmienności czynników zjadliwości *B. pertussis* w aspekcie prowadzonych szczepień oraz nadzoru epidemiologicznego, a także opracowania strategii przeciwdziałających dalszemu wzrostowi zachorowań na krztusiec. Prowadzone badania są istotne w celu wyjaśnienia kierunków ewolucji izolowanych szczepów *B. pertussis* w Polsce, w porównaniu do szczepów izolowanych w innych krajach europejskich. W aktualnej sytuacji epidemio-

logicznej istotna wydaje się ocena korelacji markerów genetycznej zmienności z poziomem wytwarzanej toksyny krztuścowej, jako najważniejszego czynnika zjadliwości *B. pertussis*, w aspekcie wyróżniania szczepów o potencjale szczepów szczepionkowych. Wyniki zaproponowanych badań mogą pozwolić na ocenę zasadności zmiany składu szczepów produkcyjnych w szczepionce DTP oraz prezentowania wskazań odnośnie ich optymalnego doboru. Aspekt ten dotyczy również szczepionek z bezkomórkowym składnikiem krztuścowym.

W wielu krajach szczepionki bezkomórkowe stosowane w miejsce szczepionek pełnokomórkowych lub jako dodatkowa dawka przypominająca produkowane są w oparciu o szczepy o allelach badanych genów, które faktycznie występowały w latach 60. i 70. XX wieku i obecnie nie występują wśród szczepów krążących w populacji. Wprowadzenie dodatkowej dawki przypominającej w postaci szczepionki DTap, jako działania mające zahamować dalszy wzrost zachorowań na krztusiec w Polsce może być skuteczne, jeśli stosowane szczepionki bezkomórkowe będą w stanie opierać się zmienności antygenowej występującej wśród aktualnie izolowanych szczepów *B. pertussis*. Należy jednak zauważyć, że profil szczepów używanych do produkcji szczepionek aP/ap jest identyczny z profilem szczepów stosowanych do produkcji pełnokomórkowego komponentu krztuścowego. Ich efektywność w zapobieganiu zachorowaniom na krztusiec w populacji jest zatem w istotnej części uzależniona od utrzymywania wysokiego poziomu zaszczepienia u starszych dzieci, młodzieży oraz osób dorosłych.

Badania mające na celu potwierdzenie skuteczności eliminacji szczepów *B. pertussis* o nowych genotypach za pomocą przygotowanych eksperymentalnych szczepionek przeciw krztuścowi, mogą bezpośrednio potwierdzić zasadność zmiany składu szczepów szczepionkowych, a tym samym pozwolą określić perspektywy utrzymywania się trendu wzrostu zachorowań na krztusiec w Polsce, czy też jego powstrzymania poprzez wydłużenie ochronnej odpowiedzi immunologicznej.

Ranga zagadnienia i problemu zachorowań na krztusiec wydaje się poważna, gdyż pojawienie się szczepów niewrażliwych lub mniej wrażliwych na działanie odpowiedzi immunologicznej indukowanej drogą szczepień tzw. „*escape mutants*” oprócz kosztów społeczno-ekonomicznych może wymusić w przyszłości zmianę polityki konstrukcji szczepionek przeciw krztuścowi, ich doboru do krajowych programów szczepień, a już dzisiaj narzuca konieczność monitorowania pojawiających się wariantów szczepów *B. pertussis*.

Monitorowanie genetycznej zmienności szczepów *B. pertussis* w korelacji z określaniem skuteczności ich

eliminacji *in vivo*, może w przyszłości stanowić nowy sposób zapobiegania zachorowaniom na krztusiec w postaci odpowiedniego ukierunkowywania odpowiedzi immunologicznej, poprzez dobór szczepów produkcyjnych oraz dobór szczepionek przeciw krztuścowi.

Prowadzone badania mogą w przyszłości umożliwić prognozowanie kierunków ewolucji populacji drobnoustrojów w aspekcie immunoprofilaktyki, ocenę i aktualizację zaleceń dotyczących szczepień ochronnych oraz mogą mieć wpływ na opracowywanie optymalnych strategii szczepień o zakresie

międzynarodowym np. w ramach europejskiej grupy EUperstrain, zrzeszającej 12 państw UE, (w tym również Polskę) w zakresie wypracowania skutecznej strategii szczepień przeciw krztuścowi w Europie. Wyniki prowadzonych badań oprócz aspektów poznawczych mogą w przyszłości odgrywać znaczenie dla podejmowania optymalnych decyzji przeciwepidemicznych w zakresie stosowanych szczepień.

*Obecnie trwające badania wykonywane są w ramach projektów badawczych: MNiSzW nr NN404206539, MNiSzW nr. NN404206839, NCN nr 2011/01/N/*

## Piśmiennictwo / References

- Edwards K, Meade B, Decker M, et al. Comparison of 13 acellular pertussis vaccines, overview and serologic response. *Pediatrics* 1995, 96:548-57.
- Decker M, Edwards K, Steinhoff M, et al. Comparison of 13 acellular pertussis vaccines, adverse reactions. *Pediatrics* 1995, 96: 557-66.
- Celentano LP, Massari M, Paramatti D, et al. EUVAC-NET Group. Resurgence of pertussis in Europe. *Pediatr Infect Dis J* 2005, 9: 761-5.
- Cherry JD. Epidemiology of pertussis. *Pediatr Infect Dis J* 2006, 4: 361-2.
- Bonmarin I, Levy-Bruhl D, Baron S, et al. Pertussis surveillance in French hospitals, results from a 10 year period. *Euro Surveill* 2007, 20: 12.
- Wendelboe AM, Njamkepo E, Bourillon A, et al. Infant Pertussis Study Group. Transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *Pediatr Infect Dis J* 2007, 4: 293-9.
- Grimprel E, Baron S, Lévy-Bruhl D, et al. Influence of vaccination coverage on pertussis transmission in France. *Lancet* 1999, 354: 1699-700.
- Bonmarin I, Poujol I, Lévy-Bruhl D. Nosocomial infections and community clusters of pertussis in France, 2000-2005. *Euro Surveill* 2007, 1211: E11-2.
- Forsyth KD, Wirsing von Konig CH, Tan T, et al. Prevention of pertussis, recommendations derived from the second Global Pertussis Initiative roundtable meeting. *Vaccine* 2007, 25: 2634-42.
- Jenkinson D. Duration of effectiveness of pertussis vaccine, evidence from a 10 year community study. *Br Med J* 1988, 296: 612-4.
- Gzyl A, Augustynowicz E, van Loo I, et al. Temporal nucleotide changes in pertactin and pertussis toxin genes in *Bordetella pertussis* strains isolated from clinical cases in Poland. *Vaccine* 2002, 20: 299-303.
- Gzyl A, Augustynowicz E, Gniadek G, et al. Pertussis in Poland. *Int J Epidemiol* 2003, 33: 1-8.
- Mosiej E, Augustynowicz E, Zawadka M, et al. Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates circulating in Poland, after 50 years of whole-cell pertussis vaccine use. *J Clin Microbiol* 2011, 4: 1452-7.
- Lutyńska A, Wiatrzyk A, Mosiej E i wsp. Szczepienia młodzieży i osób dorosłych jako strategia poprawy sytuacji epidemiologicznej zachorowań na krztusiec. *Prz Epidemiol* 2011, 65: 45-50.
- Fry NK, Neal S, Harrison TG, et al. Genotypic variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertactin and pertussis toxin in historical and recent clinical isolates in the United Kingdom. *Infect Immun* 2001, 69: 5520-8.
- Cassiday P, Sanden G, Heuvelman K, et al. Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935-1999. *J Infect Dis* 2000, 182: 1402-8.
- Guiso N, Boursaux-Eude C, Weber C, et al. Analysis of *Bordetella pertussis* isolates collected in Japan before and after introduction of acellular pertussis vaccines. *Vaccine* 2001, 19: 3248-52.
- Hardwick TH, Cassiday P, Weyant RS, et al. Changes in predominance and diversity of genomic subtypes of *Bordetella pertussis* isolated in the United States, 1935 to 1999. *Emerg Infect Dis* 2002, 8: 44-9.
- Mooi FR, He Q, van Oirschot H, et al. Variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertussis toxin and pertactin in vaccine strains and clinical isolates in Finland. *Infect Immun* 1999, 67: 3133-4.
- Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, et al. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands, temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect Immun* 1998, 66: 670-5.
- Weber C, Boursaux-Eude C, Coralie G, et al. Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years. *J Clin Microbiol* 2001, 39: 4396-403.
- Frits R Mooi, Inge HM, et al. *Bordetella pertussis* Strains with Increased Toxin Production Associated with Pertussis Resurgence. *Emerg Infect Dis* 2009, 15: 1206-13.
- Zawadka M, Polak M, Rabczenko D, et al. Effectiveness of the whole-cell pertussis vaccine produced in Poland against different *Bordetella parapertussis* isolates in the mouse intranasal challenge model. *Vaccine* 2011, 29: 5488-94.