

Anna Gzyl, Ewa Augustynowicz, Grzegorz Gniadek, Janusz Ślusarczyk

ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA SZCZEPÓW *BORDETELLA PERTUSSIS*. CZĘŚĆ I. AKTUALNY STAN WIEDZY

Zakład Badania Surowic i Szczepionek Państwowego Zakładu Higieny
Kierownik: J. Ślusarczyk

*W ostatnich latach pojawiły się doniesienia na temat zmienności genetycznej populacji szczepów *Bordetella pertussis*. Badania te wskazują na różnorodność profili DNA i alleli genów kodujących podjednostkę S1 toksyny krztuścowej (ptx S1) i pertaktynę (prn) wśród szczepów *B. pertussis* stosowanych do produkcji komponenty krztuścowej szczepionki DTP w porównaniu do szczepów aktualnie izolowanych z materiału klinicznego.*

*Słowa kluczowe: podjednostka S1 toksyny krztuścowej, pertaktyna, DTP, *Bordetella pertussis**

*Key words: S1 subunit pertussis toxin, pertactin, DTP, *Bordetella pertussis**

WSTĘP

Poniższy przegląd problemów związanych ze szczepieniami i szczepionkami przeciw krztuścowi ma na celu przedstawienie wyników ostatnich badań zmienności genetycznej populacji szczepów *B. pertussis* w kontekście ostatnio odnotowywanego nasilenia zachorowań na krztusiec w wielu krajach. Wystąpienie zmian w populacjach drobnoustrojów w postaci pojawienia się mutantów mniej wrażliwych lub niewrażliwych na działanie szczepień jest wymieniane jako jedna z możliwych przyczyn nawrotu zachorowań obok przyczyn alternatywnych, np.: spadku jakości szczepionki, obniżenia się wykonawstwa szczepień, zanikania odporności poszczepiennej w miarę upływu czasu po szczepieniu oraz zmiany transmisji zakażenia w różnych grupach wiekowych. Praca ma na celu przedstawienie aktualnej sytuacji rozkładu zmienności na poziomie genomu i genów kodujących podjednostkę S1 toksyny krztuścowej i pertaktynę dzikich i szczepionkowych szczepów *B. pertussis* izolowanych na przełomie dekad, jako jednej z możliwych przyczyn obniżenia się skuteczności szczepień przeciw krztuścowi.

BADANIA ZMIENNOŚCI GENETYCZNEJ POPULACJI SZCZEPÓW *B. PERTUSSIS* NA POZIOMIE GENOMU

Zespół van der Zee z ośrodka w Bilthoven w Holandii pierwszy opisał odmienność genetyczną szczepów *Bordetella pertussis* szczepionkowych oraz izolowanych w latach

90-tych (1). Analiza typowania genetycznego przeprowadzona metodą elektroforezy pulsacyjnej PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) oraz hybrydyzacji wykazała odmienność szczepów *B. pertussis* izolowanych od chorych w Holandii w latach 1950-54 w stosunku do szczepów izolowanych w następnych przedziałach czasowych (1, 2). Szczepy prezentujące profile DNA podobne do typów szczepów stosowanych do produkcji holenderskiej szczepionki pełnokomórkowej izolowano wyłącznie w okresie 1950-54. Dodatkowo analiza profili DNA szczepów izolowanych w okresie 1949-1954 i 1965-1972 wykazała obniżenie się zmienności genetycznej szczepów, co może wynikać ze zmniejszenia się rozmiaru populacji bakterii lub ekspansji klonalnej. Dwie trzecie badanych szczepów *B. pertussis* izolowanych w latach 1965-1972 wykazywało pojedynczy profil DNA, który nie występował wcześniej i który stał się dominujący w następnych dekadach. Przypuszczano, że po wprowadzeniu w Holandii w 1954 roku obowiązkowych szczepień przeciw krztuścowi powstały szczepy, na które wpływ odpowiedzi immunologicznej indukowanej za pomocą szczepień mógł być mniejszy niż wpływ przesunięć genetycznych (*random genetic drift*) oraz zmian w populacji osób szczepionych (zanikająca odporność) lub też spadek jakości szczepionki.

BADANIA ZMIENNOŚCI GENETYCZNEJ POPULACJI SZCZEPÓW *B. PERTUSSIS* NA POZIOMIE GENOMU

Wyniki genotypowania DNA wykonane metodą elektroforezy pulsacyjnej oraz hybrydyzacji potwierdzone zostały za pomocą badań sekwencjonowania genów kodujących podjednostkę S1 toksyny krztuścowej (*ptxS1*) oraz pertaktynę (*prn*). Dotychczasowe badania sekwencjonowania produktów PCR genu kodującego podjednostkę S1 toksyny krztuścowej *ptxS1* pozwoliły zidentyfikować 5 wariantów genu: *ptxS1A*, *ptxS1B*, *ptxS1C*, *ptxS1D*, *ptxS1E* na podstawie różnic nukleotydowych w jednym z czterech zdefiniowanych zmiennych *loci* (3 - 9) (tab. I). Wykryte mutacje skorelowano z możliwością pojawiania się dwóch epitopów dla komórek T (10). Nie wiadomo, czy wykryte mutacje wpływają na zdefiniowany wcześniej epitop dla limfocytów B (dwie nieciągłe sekwencje aminokwasów w pozycjach 64-75 i 151-161).

W przypadku sekwencji genu kodującego pertaktynę podstawienia nukleotydowe wykryto na całej długości cząsteczki, przy czym ich największą częstość odnotowano w dwóch obszarach genu, oznaczonych jako 1 i 2. Region 1 genu *prn* wykazywał polimorficzność ze względu na rodzaj i liczbę sekwencji powtarzających się (GGxxP) (tab. II). Wykryta zmienność może wpływać na strukturę lub konformację motywu RGD, odpowiadającego za adhezję lub na zdefiniowany we wcześniejszych badaniach epitop dla limfocytów B. W regionie 2 genu kodującego pertaktynę odnotowano różnice dotyczące liczby jednostki powtarzającej się PQP i jak dotychczas zostały one wykryte jedynie dla referencyjnego szczepu *B. pertussis* (Kendrick) oraz pojedynczego szczepu izolowanego od chorego we Francji (11). W sumie zidentyfikowano 8 wariantów sekwencji *prn1-pm8* (3 - 9).

Wyniki sekwencjonowania genu *ptxS1* przeprowadzone w Zakładzie Badania Surowic i Szczepionek PZH wykazały, że w polskiej populacji szczepów *B. pertussis* izolowanych w latach 1960-2000 wystąpiły do tej pory trzy warianty genu: *ptxS1B*, *ptxS1D*, *ptxS1A* (6). Analiza częstości ich występowania wskazuje, że szczepy posiadające szczepionkowy wariant podjednostki toksyny krztuścowej *ptxS1B* zostały wyparte przez

Table 1a I. Allele genu kodującego podjednostkę S1 toksyny krztuścowej

Table 1e I. Alleles of gene encoding S1 subunit of pertussis toxin

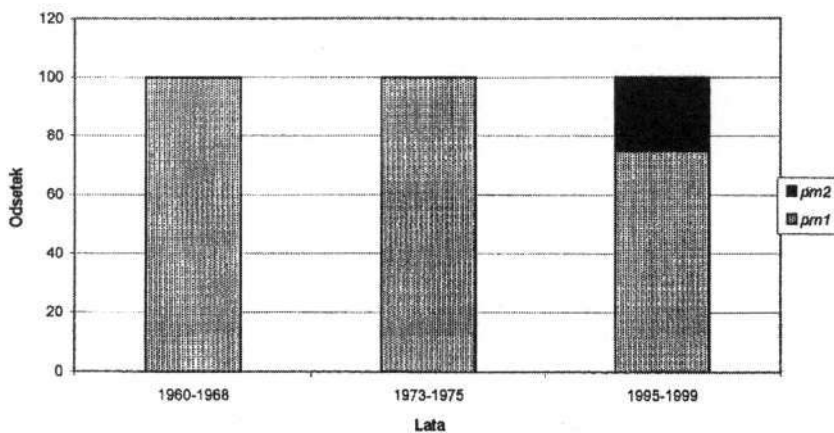
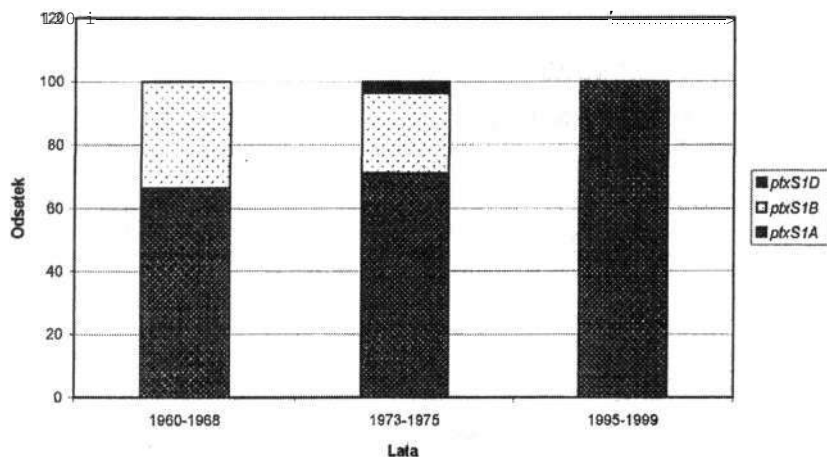
Allel	Pozycja nukleotydu w stosunku do kodonu start genu <i>ptxS1</i>				Polska	Holandia	Finlandia	Włochy	Francja	Wielka Brytania	USA
	202-203-204	586-587-588	682-683-684	694-695-696							
<i>ptxS1A</i>	(GAC)-D	(TTC)-S	(ATA)-I	(ATA)-I	+	+	+	+	+	+	+
<i>ptxS1B</i>	(GAC)-D	(TTC)-S	(ATG)-M	(ATA)-I	+	+	+	+	+	-	+
<i>ptxS1C</i>	(GAC)-D	(TTC)-S	(ATG)-M	(GTG)-V	-	-	-	-	-	-	-
<i>ptxS1D</i>	(GAA)-E	(TTC)-S	(ATG)-M	(GTG)-V	+	+	+	+	+	-	+
<i>ptxS1E</i>	(GAA)-e	(TTC)-P	(ATG)-M	(ATG)-M	-	-	-	-	-	-	-

Table II. Allele genu kodującego pertaktynę

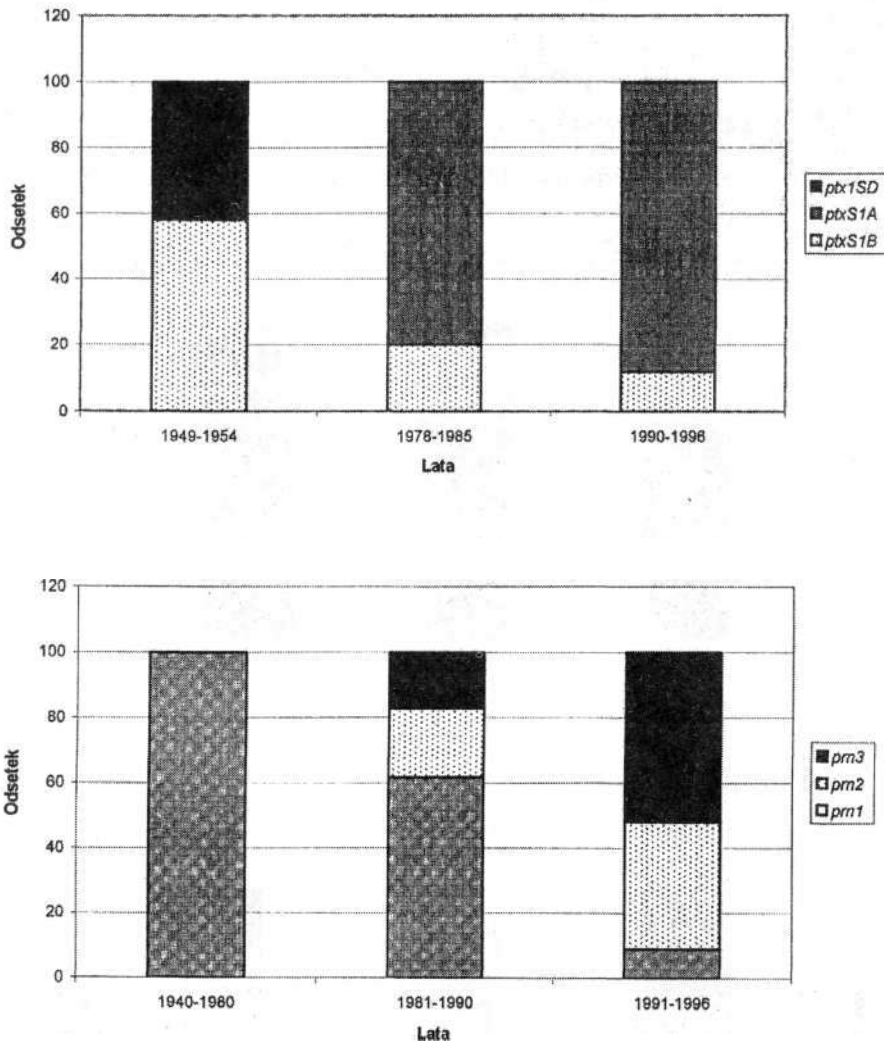
Table II. Alleles of gene encoding pertactin

Allel	Region 1	Region 2	PL	NL	FIN	IT	F	GB	USA
<i>pm1</i>	RGDAPA GGAVP GGAVP GGAVP -----GGFGPGGFGP VLD	5 PQP	+	+	+	+	+	+	+
<i>prn2</i>	RGDAPA GGAVP GGAVP ——— GGFGP GGFGP GGFGP GGFGP VLD	5 PQP	+	+	+	+	+	+	+
<i>prn3</i>	RGDAPA GGAVP GGAVP ——— -----GGFGP GGFGP GGFGP VLD	5 PQP		+	+	+	+		
<i>prn4</i>	RGDAPA GGAVP GGAVP ——— -----GGFGPGGFGP VLD	5 PQP			+				
<i>prn5</i>	RGDAPA GGAVP-----GGFGP GGFGP GGFGP VLD	5 PQP				+			
<i>prn6</i> <i>prn1A</i>	RGDAPA GGAVP GGAVP GGAVP -----GGFGPGGFGP VLD	4 PQP					+		
<i>prn7</i>	RGDAPA GGAVP GGAVP GGAVP -----GGEGPGGEGP— VLD	5 PQP							
<i>prn8</i>	RGDAPA GGAVP-----GGFGPGGFGP VLD	5 PQP							

szczerpy o wariancie *ptxS1A* (ryc. 1). Podobną sytuację odnotowano w Holandii (ryc. 2) oraz Finlandii. Szczerpy o wariantach genu *ptxS1B* i *ptxS1D*, typowych dla szczepów szczepionkowych, dominowały w Holandii w latach 1953-1964, a w Finlandii w latach 1949-1954. W następných przedziałach czasowych nie wyizolowano żadnego szczepu o profilu toksyny krztuścowej *ptxS1D*. Z kolei w Finlandii przestały występować szczepu dzikie o profilu *ptxS1B*, a w Holandii ich częstość obniżyła się do 12%. Obecnie izolowane są wyłącznie szczepu o profilu toksyny krztuścowej *ptxS1A* (8, 12).



Ryc. 1. Częstość alleli *ptxS1* i *prn* wśród szczepów *B. pertussis* izolowanych w Polsce
 Fig. 1. Frequency of *ptxS1* and *prn* alleles among *B. pertussis* strains isolated in Poland

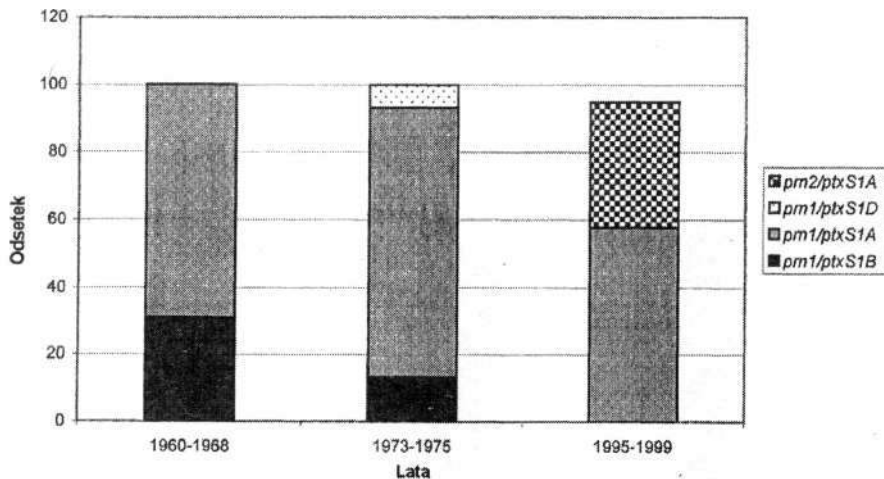


Ryc. 2. Częstość alleli *ptxS1* i *prn* wśród szczepów *B. pertussis* izolowanych w Holandii
 Fig. 2. Frequency of *ptxS1* and *prn* alleles among *B. pertussis* strains isolated in the Netherlands

Z kolei wariant *prn1* charakterystyczny dla polskich szczepów szczepionkowych dominował w izolatach *B. pertussis* do 1999 roku, kiedy pojawiły się szczepy posiadające nowe warianty genu pertaktyny, *prn1* i *pm4* (pojedynczy szczep) (ryc. 1) (6). Można przypuszczać, że szczepy o nowych allelach genu pertaktyny mogą w przyszłości zacząć stopniowo wypierać szczepy dominujące obecnie, czyli posiadające wariant *prn1*. W Holandii, szczepy o szczepionkowym allelu pertaktyny *prn1* dominowały - jeśli uwzględnić

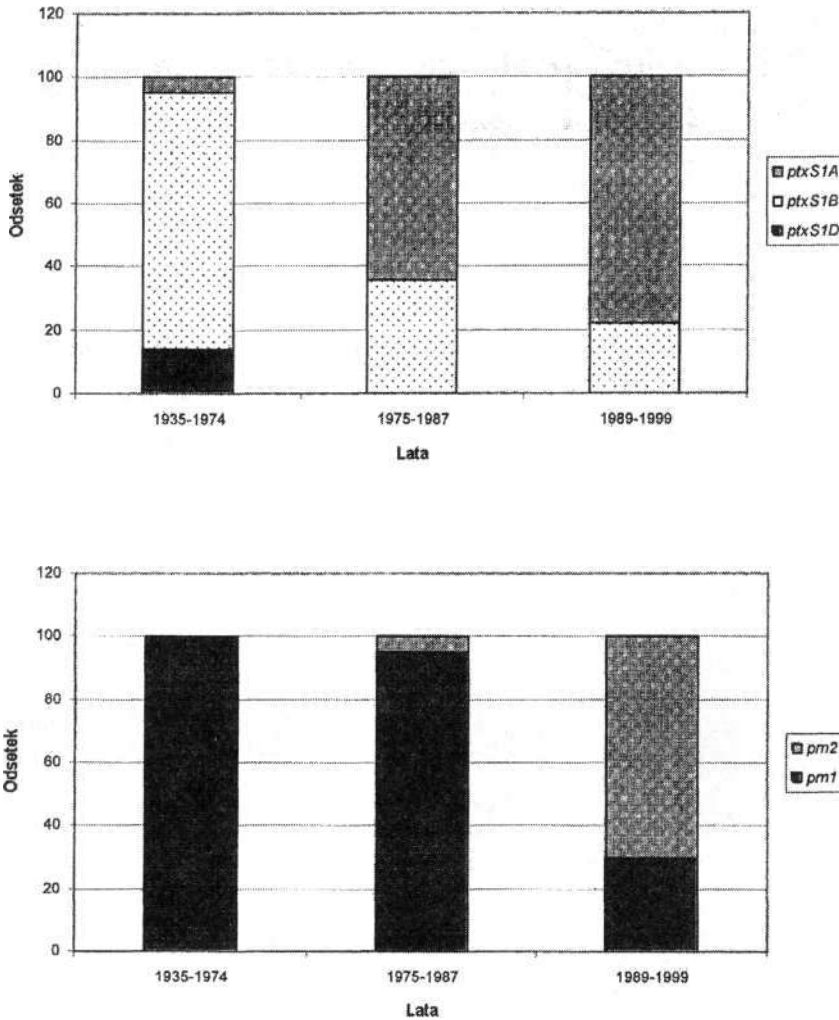
częstość izolacji - do 1980 roku, po czym zostały prawie całkowicie wyparte przez szczepcy o typach *prn2* i *prn3* (ryc. 2) (8). Natomiast w Finlandii szczepcy o szczepionkowym allelu *pml* po 1982 roku został wyparte przez szczepcy o wariancie pertaktyny *pm2*, przy czym dodatkowo pojawiły się szczepcy o profilu *prn3* i *prn4* (12).

Analiza częstości występowania pięciu z sześciu możliwych kombinacji wariantów *ptxS1* i *prn* szczepców *B. pertussis* izolowanych w Polsce wskazuje, że dominującą kombinacją w przeszłości i obecnie pozostaje układ alleli *ptxS1A/prn1*. Ten fakt może sugerować, że stosowana w Polsce szczepionka pełnokomórkowa przeciw krztuścowi (*WCV-Whole Cell Vaccine*) nadal może być skuteczna we wzbudzaniu odporności w stosunku do 60-70% szczepców krążących obecnie, że względu na obecność szczepionkowego wariantu pertaktyny (ryc. 3). W latach 90-tych u 30% szczepców pojawiła się nieznana wcześniej, całkowicie „nieszczepionkowa” kombinacja wariantów *ptxS1A/prn2*, która przypuszczalnie może być bardziej odporna na działanie szczepień.



Ryc. 3. Częstość kombinacji alleli *ptxS1/prn* wśród szczepców *B. pertussis* izolowanych w Polsce
Fig. 3. Frequency of *ptxS1* and *prn* allele combinations among *B. pertussis* strains isolated in Poland

Badania prowadzone przez zespół Cassidy i wsp. (4) wskazują, że większość szczepionek pełnokomórkowych stosowanych w USA od połowy lat 40-tych była produkowana w oparciu o szczepcy o wariantach *prn1/ptxS1B*. Z kolei, większość szczepców obecnie izolowanych nie zawiera wariantów genów *ptxS1* i *prn*, jakie są obecne w szczepkach szczepionkowych (ryc. 4). Częstość allelu *pml* występującego u większości izolatów (95%) w latach 1975-1987 spadła do 30% w latach 1989-1999. Nieszczepionkowy allel *pm2*, który występował zaledwie u 5% szczepców w latach 1975-1987, stał się dominujący (70%) w szczepkach izolowanych w latach 1989-1999. W przypadku podjednostki S1 toksyny krztuścowej częstość izolowanych szczepców o nieszczepionkowym allelu *ptxS1A* wzrosła do 78% w latach 1989-1999 (4).



Ryc. 4. Częstość alleli *ptxS1* i *prn* wśród szczepów *B. pertussis* izolowanych w USA
 Fig. 4. Frequency of *ptxS1* and *prn* alleles among *B. pertussis* strains isolated in USA

Zmienność częstości wariantów genu kodującego podjednostkę SI toksyny krztuścowej i pertaktyny szczepów *B. pertussis* w czasie wyraźnie wskazuje, że nastąpiło zróżnicowanie pomiędzy izolatami szczepionkowymi i dzikimi. Szczepy obecnie izolowane posiadają profil genetyczny toksyny krztuścowej i pertaktyny odmienny w stosunku do profilu szczepów szczepionkowych oraz szczepów izolowanych w tych dekadach, kiedy wprowadzono szczepionkę przeciwkrztuścową do masowych szczepień. Dane te ze względu na wzrost zachorowań na krztusiec mogą wskazywać w przypadku Polski,

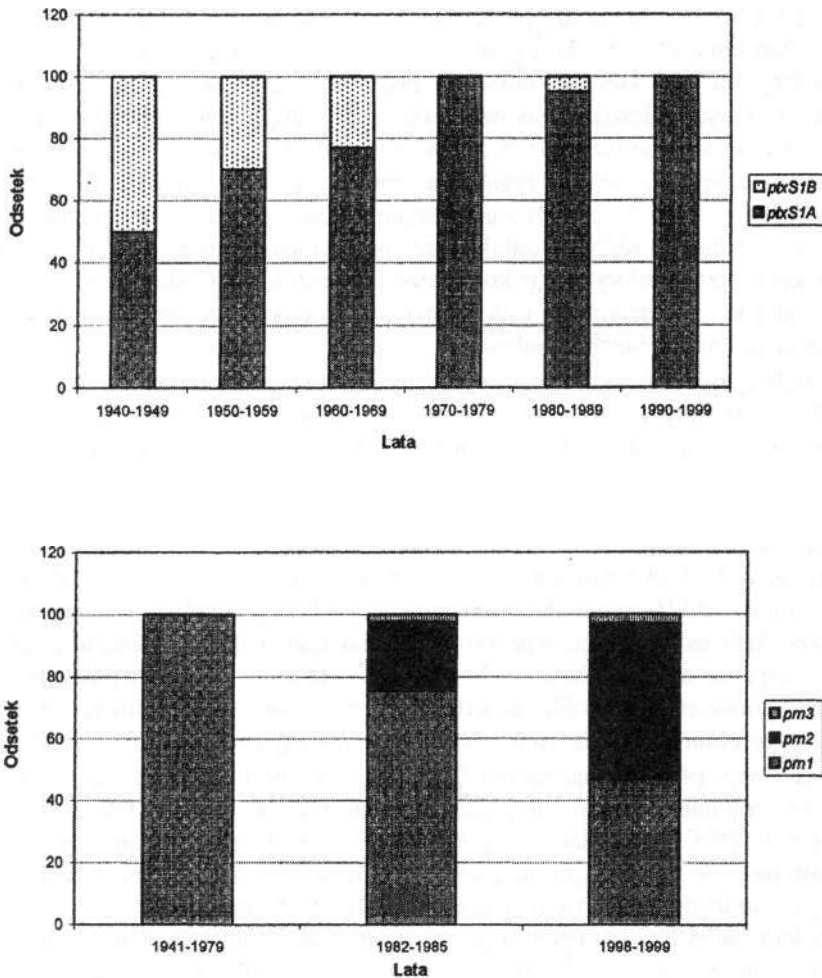
Holandii i USA, że indukowana obecnie odpowiedź poszczepienna w populacji powstaje w stosunku do szczepów, które krążyły w tych populacjach około 50 lat temu. Z tego względu odpowiedź ta może nie być dostatecznie skuteczna w stosunku do szczepów o nowych, nieszczepionkowych wariantach antygenów, wyróżnionych na podstawie wariantów genetycznych. Nie wiadomo jednak, w jakim stopniu zmienność antygenowa mapująca się w regionach powiązanych z epitopami dla komórek B i T wpływa na interakcje krążącego antygeny z odpowiedzią immunologiczną indukowaną szczepieniem, zdolność indukowania proliferacji komórek T oraz rozpoznawania antygeny przez limfocyty T w kontekście cząsteczek MHC klasy II (10, 13).

Z drugiej strony zmienności genetycznej nie powiązano ze wzrostem zachorowań w Wielkiej Brytanii, Francji i Finlandii.

W Wielkiej Brytanii wszystkie trzy szczepy produkcyjne oraz szczepy izolowane do roku 1980 zawierały wariant *prn1*. Po roku 1980 sukcesywnie zaczęły się pojawiać szczepy o nie-szczepionkowych wariantach pertaktyny, *prn2* i *prn3*, stanowiące w latach 80-tych i 90-tych odpowiednio 24% i 53% wszystkich badanych izolatów (ryc. 5). Pod względem *ptxSl* obecnie izolowane w Wielkiej Brytanii szczepy *B. pertussis* zawierają warianty charakterystyczne dla szczepów znajdujących się w składzie szczepionki angielskiej, tj. u 87% obserwowany jest wariant *ptxSlA*, a u 13% wariant *ptxSlB* (5). Częstość allelu *ptxSlD* w populacji szczepów brytyjskich przed 1954 rokiem sięgała aż 43% wszystkich izolacji, natomiast po 1954 roku spadła do zera. Badacze angielscy przypuszczają, że brak nasilenia zachorowań na krztusiec w Wielkiej Brytanii może wynikać z podobieństwa profilu genetycznego szczepów szczepionkowych do profilu genetycznego naturalnie krążących obecnie szczepów, tj. *prn1*, *ptxSlB*, *ptxSlA* (5).

Weber i wsp. (9) wskazują na możliwość okresowego pojawiania się zmian genetycznych w populacji szczepów *B. pertussis* izolowanych we Francji. Okresowa zmienność profili DNA w przedziałach 3-letnich nie została skorelowana ze zmianami zdefiniowanymi w obrębie genów *ptxSl* i *prn*, pomimo, że szczepy szczepionkowe posiadają odmienny profil tych markerów niż szczepy obecnie izolowane. Badania zmienności genetycznej szczepów *B. pertussis* we Francji objęły jedynie ostatnie dziesięciolecie i nie można ich odnieść do profili szczepów izolowanych wcześniej.

Zróznicowana częstość pojawiających się obecnie wariantów antygenów może być związana z różnicami w sytuacji epidemiologicznej krztuśca. Na przykład w Finlandii - pomimo wykrytej odmienności wariantów genetycznych podjednostki SI toksyny krztuścowej i pertaktyny w szczepach dzikich i szczepionkowych - nie odnotowano tak wysokiego nasilenia zachorowań na krztusiec, w odróżnieniu od sytuacji obserwowanej w Polsce czy Holandii (12, 14). Można przypuszczać, że wynika to z wysokiej mocy fińskiej szczepionki pełnokomórkowej, związanej, np. z silniejszą zdolnością indukcji odpowiedzi ochronnej przed zakażeniem szczepami *B. pertussis* o wariantach *pm2* i *prn4*, a słabszej przed zakażeniem szczepami zawierającymi allel *prn3*, który dominuje w Holandii, a w Finlandii jest izolowany z niższą częstością. Wariant *prn3* występuje obecnie u 63%, 12%, i 3% populacji szczepów *B. pertussis* izolowanych odpowiednio w Holandii, Finlandii i Anglii. Ponadto na sytuację epidemiologiczną krztuśca w Finlandii może wywierać wpływ mała gęstość zaludnienia i w związku z tym gorsze warunki dla przenoszenia zakażeń. Można również przypuszczać, że populacje szczepów



Ryc. 5. Częstość alleli *ptxS1* i *prn* wśród szczepów *B. pertussis* izolowanych w Wielkiej Brytanii
 Fig. 5. Frequency of *ptxS1* and *prn* alleles among *B. pertussis* strains isolated in Great Britain

w tych krajach znajdują się w fazie pojawiania się zmienności, która z biegiem czasu może się nasilić i indukować wzrost zachorowań.

Anna Gzyl, Ewa Augustynowicz, Grzegorz Gniadek, Janusz Ślusarczyk

GENETIC VARIABILITY OF *BORDETELLA PERTUSSIS* STRAINS.
 PART I. CURRENT KNOWLEDGE

SUMMARY

Variability of *B. pertussis* genome concerning S1 subunit of pertussis toxin (*ptxS1*) and pertactin (*prn*) genes has recently been recognised. Studies clearly showed differences in the

DNA patterns and *ptxSI* and *prn* alleles present in *B. pertussis* strains used for production of pertussis component in the DTP vaccine, in comparison to strains presently isolated from clinical materials. This trend has been observed in highly immunized populations with a long history of pertussis vaccination (The Netherlands, Finland, Poland, USA). Different *ptxSI* and *prn* allele distribution for different countries needs further careful monitoring.

PIŚMIENNICTWO

1. Van der Zee A, Vernooij S, Peeters M, i in. Dynamics of the population structure of *Bordetella pertussis* as measured by IS1002-associated RFLP: comparison of pre-and post-vaccination strains and global distribution. *Microbiol* 1996;142:3479-85.
2. Van Loo IH, van der Heide GJ, Nagelkerke NJ, i in. Temporal trends in the population structure of *Bordetella pertussis* during 1949-1996 in a highly vaccinated population. *J Infect Dis* 1999;179:915-23.
3. Boursaux-Eude C, Thiberge S, Caeletti G, i in. Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection: II. Sequence variation and protection induced by a tricomponent acellular vaccine. *Vaccine* 1999;17:2651-60.
4. Cassiday P, Sanden G, Heuvelman K, i in. Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935-1999. *J Infect Dis* 2000;182:1402-8.
5. Fry NK, Neal S, Harrison TG, i in. 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.
6. Gzyl A, Augustynowicz E, van Loo I, i in. Temporal nucleotide changes in pertactin and pertussis toxin genes in *Bordetella pertussis* strains isolated from clinical cases in Poland *Vaccine* 2000;20:299-303.
7. Mastrantonio P, Spigaglia P, van Oirschot H, i in. Antigenic Variants in *Bordetella pertussis* strains isolated from vaccinated and unvaccinated children. *Microbiology* 1999;145:2069-75.
8. Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, i in. 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;2:670-5.
9. Weber C, Boursaux-Eude C, Coralie G, i in. 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;39:4397-403.
10. De Magistris MT, Di Tomasso A, Domenighini M, i in. Interaction of the pertussis toxin peptide containing residue 30-42 with DR1 and the T-cell receptors of 12 human T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2990-4.
11. Boursaux-Eude C, Guiso N. Polymorphism of repeated regions of pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* 2000;68:4815-7.
12. Mooi FR, He Q, van Oirschot H, i in. Variation in The *Bordetella pertussis* virulence factors pertussis toxin and pertactin in vaccine strains and clinical Isolates in Finland. *Infect Immun* 1999;6:3133-4.
13. Leininger E, Ewanowitch CA, Bhargava A, i in. Comparative roles of Arg-Gly-Asp sequence present in the *Bordetella pertussis* adhesins pertactin and filamentous haemagglutinin. *Infect Immun* 1992;60:2380-5.
14. He Q, Vilijanen MK, Arvilommi H, i in. Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population. *JAMA* 1998;280:635-7.

Adres autorów:

Anna Gzyl

Zakład Badania Surowic i Szczepionek Państwowego Zakładu Higieny

ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

tel. (0-prefiks-22) 54-21-213

e-mail: agzyl@pzh.gov.pl