

Charakterystyka genotypowa i fenotypowa szczepów *Bordetella pertussis* niewytwarzających antygenów szczepionkowych, wyizolowanych w Polsce w latach 1959-2016

Streszczenie

Wzrost zachorowań na krztusiec, obserwowany w Polsce od połowy lat 90. XX. wieku, został powiązany z wygasaniem w czasie poszczepiennej odpowiedzi immunologicznej oraz z rozprzestrzenianiem się szczepów *Bordetella pertussis* odmiennych genetycznie i antygenowo od szczepów stosowanych do produkcji polskiej szczepionki całokomórkowej przeciw krztuścowi. Wykazano także, że struktura genetyczna polskiej populacji *B. pertussis* w latach 90. XX. wieku oraz w pierwszej dekadzie XXI. wieku różniła się od obserwowanej w innych krajach o wysokim poziomie zaszczepienia przeciw krztuścowi. W 1998 roku w Polsce pojawił się dodatkowy element presji selekcyjnej w postaci immunizacji szczepionkami bezkomórkowymi przeciw krztuścowi. Częstość stosowania komercyjnych szczepionek bezkomórkowych do szczepień podstawowych dzieci rosła w czasie aż w końcu szczepienia te stały się najpopularniejszą formą immunoprofilaktyki krztuśca, stosowaną zarówno w ramach szczepień podstawowych jak i przypominających. Ponieważ różne rodzaje szczepionek przeciw krztuścowi, całokomórkowe lub bezkomórkowe, mogą w odmienny sposób oddziaływać na strukturę genetyczną populacji *B. pertussis*, to w niniejszej pracy założono, że obecny kształt presji selekcyjnej szczepień w Polsce, naznaczony w ostatniej dekadzie powszechnym stosowaniem szczepionek bezkomórkowych, w istotny sposób wpłynął na kierunek ewolucji, w tym zmian adaptacyjnych polskiej populacji pałeczek krztuśca.

Celem niniejszej pracy była analiza zmian fenotypowych oraz genotypowych u izolatów klinicznych *B. pertussis* wyosobnionych w Polsce w ostatnim dziesięcioleciu, tj. w okresie powszechnego stosowania szczepionek bezkomórkowych przeciw krztuścowi, względem izolatów pochodzących z poprzednich dekad, kiedy w immunoprofilaktyce krztuśca dominowały szczepionki całokomórkowe. Szczególny nacisk w pracy położono na ocenę zdolności bakterii do wytwarzania antygenów występujących w szczepionkach bezkomórkowych (toksyny krztuścowej, pertaktyny, hemaglutyniny włókienkowej, fimbrii typu 2 oraz typu 3), ponieważ ich utrata była opisywana u izolatów krążących w krajach stosujących od wielu lat szczepionki bezkomórkowe przeciw krztuścowi. Ponadto przeprowadzone w pracy badania obejmowały: ocenę zdolności bakterii do wytwarzania

antygeny toksyny cyklazy adenyłowej oraz potencjalnie immunogenne białka - czynniki kolonizacji tchawicy, których obecność może stanowić potencjalny mechanizm adaptacyjny bakterii do krążenia w populacjach stosujących szczepionki całokomórkowe przeciw krztuścowi (wP); analizę zmian struktury serotypowej izolatów klinicznych *B. pertussis* w czasie; ocenę stabilności serotypów szczepów stosowanych do produkcji polskiej szczepionki całokomórkowej przeciw krztuścowi; uzupełnienie uprzednio przeprowadzonej charakterystyki genetycznej izolatów o nowo wyosobnione izolaty oraz ocenę oporności na antybiotyki makrolidowe oraz trimetoprim-sulfametoksazol izolatów klinicznych *B. pertussis* wyosobnionych w Polsce w ostatniej dekadzie.

Materiał do badań stanowiły 193 izolaty *B. pertussis* wyosobnione od osób chorych na krztusiec w Polsce w okresie 1959-2016 oraz 10 szczepów szczepionkowych stosowanych obecnie lub w przeszłości do produkcji polskiej szczepionki całokomórkowej przeciw krztuścowi (DTP).

Najważniejsze wyniki przeprowadzonych badań oraz wnioski wyciągnięte na ich podstawie:

1. Zidentyfikowano 4 izolaty kliniczne *B. pertussis*, które utraciły zdolność do wytwarzania pertaktyny (Prn^-). Mutanty te stanowiły 15,4% wszystkich izolatów wyosobnionych w latach 2010-2016. Genotypowanie izolatów Prn^- oraz analiza mechanizmów warunkujących brak wytwarzania pertaktyny wykazały, że reprezentowały one różne linie genetyczne *B. pertussis*. Wykrycie wśród izolatów klinicznych *B. pertussis* szczepów niewytwarzających pertaktyny, tj. antygeny występującego w składzie większości stosowanych w Polsce szczepionek bezkomórkowych (aP), wskazuje na pojawienie się w polskiej populacji pałeczek krztuśca nowego mechanizmu adaptacyjnego, który może obniżać skuteczność powszechnie stosowanych w kraju bezkomórkowych szczepionek przeciw krztuścowi. Pojawienie się tego typu mechanizmu adaptacyjnego w Polsce jest alarmujące i wskazuje na potrzebę monitorowania częstości występowania izolatów niewytwarzających antygenów występujących w stosowanych w kraju szczepionkach bezkomórkowych.
2. Wszystkie badane izolaty kliniczne *B. pertussis* pochodzące z lat 1959-2016 posiadały zdolność do wytwarzania antygenów toksyny krztuścowej, hemaglutyniny włókienkowej, fimbrii oraz toksyny cyklazy adenyłowej. Ponadto wszystkie badane izolaty kliniczne,

poza jednym, wytwarzały również potencjalnie immunogeny - czynniki kolonizacji tchawicy. Wyniki te mogą świadczyć o istotnym znaczeniu tych białek w utrzymaniu krążenia patogenu w polskiej populacji, w której stosowane są powszechnie zarówno szczepionki całokomórkowe (wP), jak i bezkomórkowe (aP). Brak wytwarzania czynnika kolonizacji tchawicy tylko u pojedynczego szczepu może być mutacją przypadkową niezwiązaną z presją selekcyjną szczepień.

3. Serotypowanie *B. pertussis* wykazało, że w kolekcji izolatów klinicznych w ostatniej dekadzie doszło do zastąpienia dominującego wcześniej serotypu Fim2 przez Fim3. Zmiana ta mogła wynikać z presji selekcyjnej wywieranej na bakterie przez krajową szczepionkę całokomórkową przeciw krztuścowi (DTP), zawierającą, jak wykazano w niniejszej pracy, w większości szczepy o serotypie Fim2. Zmiana ta może stanowić mechanizm adaptacyjny patogenu zwiększający jego przeżywalność w polskiej populacji stosującej szczepionki całokomórkowe przeciw krztuścowi, zawierające w większości szczepy o serotypie Fim2.
4. Serotypowanie szczepów wchodzących w skład polskiej szczepionki całokomórkowej przeciw krztuścowi, aktualnie stosowanej w ramach szczepień podstawowych dzieci, wykazało, że serotyp szczepów szczepionkowych zmieniał się w zależności od badanej serii siewnej. Wyniki te sugerują, że różne serie szczepionki DTP mogły różnić się pod względem składu ilościowego antygenów fimbrialnych Fim2 oraz Fim3.
5. Wyniki genotypowania *B. pertussis* metodami: PFGE, MLST oraz MLVA pokazują, że w ostatnim dziesięcioleciu struktura genetyczna kolekcji izolatów klinicznych pałeczek krztuśca uległa zmianie. Dominujące w poprzedniej dekadzie profile PFGE-*Xba*I z grupy III, genotypy *ptxA1-ptxC1-ptxP1-prn1-tcfA2-fim2-2-fim3-1* i *ptxA1-ptxC1-ptxP1-prn2-tcfA2-fim2-1-fim3-1* oraz profile MT-70 i MT-29 zostały zastąpione przez profile PFGE-*Xba*I z grupy IV, genotypy *ptxA1-ptxC2-ptxP3-prn2-tcfA2-fim2-1-fim3-1* i *ptxA1-ptxC2-ptxP3-prn2-tcfA2-fim2-1-fim3-2* oraz profil MT-27. Zmiany te są najprawdopodobniej wynikiem powszechnego w ostatnich latach stosowania szczepionek bezkomórkowych w immunoprofilaktyce krztuśca w Polsce (szczepienia podstawowe oraz przypominające) i tym samym wskazują, na istotną rolę tych szczepień w kształtowaniu nowego kierunku ewolucji polskiej populacji *B. pertussis*.

6. Wyniki typowania izolatów klinicznych *B. pertussis* metodami MLST i MLVA wskazują, że polska populacja pałeczek krztuśca ewoluuje w kierunku jednorodności genetycznej, analogicznie jak w wielu innych krajach, w stronę profilu *ptxA1-ptxP3-prn2-MT-27*, który prawdopodobnie może zwiększać przeżywalność bakterii w populacjach o wysokim poziomie zaszczepienia przeciw krztuścowi szczepionkami bezkomórkowymi.

7. Wszystkie izolaty *B. pertussis* wyosobnione w ostatniej dekadzie od osób chorych w Polsce były wrażliwe na stosowane w leczeniu krztuśca antybiotyki makrolidowe (erytromycynę, azytromycynę i klarytromycynę) oraz trimetoprim-sulfametoksazol. Wyniki te pokazują, że w Polsce leki te mogą nadal być z powodzeniem stosowane w leczeniu krztuśca oraz eradykacji *B. pertussis* z dróg oddechowych.