

Received: 2015.08.19  
Accepted: 2016.09.15  
Published: 2016.12.21

## Mikroewolucja podszczerpów BCG\*

### Microevolution of BCG substrains

Katarzyna Krysztopa-Grzybowska, Anna Lutyńska

Zakład Badania Surowic i Szczepionek, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego  
– Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

#### Streszczenie

Gruźlica stanowiła i nadal stanowi jedną z głównych przyczyn zachorowalności i umieralności na świecie. Jej zwalczanie pozostaje priorytetem zdrowia publicznego, trudnym do zrealizowania bez zastosowania nowo opracowanej szczepionki. Jedyną dostępną szczepionką przeciw gruźlicy (BCG) jest stosowana od prawie 100 lat. Na świecie do jej produkcji są wykorzystywane różne siostrzane podszczerpy, pochodzące od rodzicielskiego szczepu *Mycobacterium bovis*. Wyjaśnienie mechanizmów atenuacji, które doprowadziły do uzyskania wyjściowego szczepu szczepionkowego, a także zidentyfikowanie markerów mikroewolucji szczepów siostrzanych związanej z dystrybucją i odmiennymi warunkami produkcji różnych szczepionek BCG na całym świecie, może przyczynić się do zrozumienia różnic w obserwowanej skuteczności szczepionek produkowanych z wykorzystaniem poszczególnych podszczerpów. Najistotniejszym markerem związanym z atenuacją zjadliwego szczepu *M. bovis* jest utrata regionu RD1 zidentyfikowana u wszystkich podszczerpów BCG. Wśród pozostałych markerów atenuacji, dotychczas nie w pełni poznanych, istotną rolę przypisuje się swoistej kumulacji mutacji typu SNP. Odmiennie warunki pasażowania rodzicielskiego szczepu szczepionkowego, podczas wytwarzania szczepionki BCG w różnych krajach, doprowadziły do wyodrębnienia około 50 różnych siostrzanych podszczerpów BCG. Wśród nich wyróżnia się podszczerpy „wczesne”, stosowane do 1927 r. oraz podszczerpy „późne”, mające dodatkowo delecję RD2, pozyskane w latach 1927-1961. Retrospektywne badania wykazały, że podczas rozsyłania podszczerpów siostrzanych w okresie 1924-1966 doszło do utraty 22 regionów genomu, zawierających łącznie 52 geny. Zmienność genetyczna wywołana presją selekcyjną w postaci wieloletnich swoistych procesów wytwarzania szczepionki, może stanowić jedną z przyczyn obserwowanych różnic w immunogenności lub resztkowej zjadliwości podszczerpów BCG.

Słowa kluczowe:

szczepionka przeciw gruźlicy • BCG • podszczerpy BCG • atenuacja

#### Summary

Tuberculosis was, and still is, one of the main causes of morbidity and mortality in the world. Thus it still remains a public health priority. Nonetheless, without a newly developed vaccine, it is rather unlikely to be easily resolved. The only available vaccine against tuberculosis (BCG) has been used for nearly 100 years. Currently a variety of BCG substrains are used by many manufacturers in the world. All these substrains were obtained from a single parental strain of *Mycobacterium bovis*. Attempts to explain the complete mechanisms of attenuation, as well as tracing the microevolution resulting from the different distribution time and conditions of production of BCG vaccines in the different parts of the world, might explain the differences in the observed efficacy of vaccines produced with different substrains. The most important marker associated with attenuation of virulent *M. bovis* is the loss of the RD1 region observed in all BCG substrains. Among other attenuation markers, still not completely identified, accu-

\*Pracę wykonano w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki nr 2014/15/N/NZ7/03793.

mulation of SNP mutations seems to be an important one. The different number of passages and culture conditions of the parental vaccine strain have led to there being about 50 different sister vaccine BCG substrains throughout the world. Among them, there are “early strains”, distributed until 1927, and “later strains” with the RD2 deletion obtained during 1927-1961. It has also been found that 22 regions containing 52 genes were lost during the distribution of sister substrains during the period 1924-1966. Genetic differences due to selection pressure, revealing specific microevolutionary traits, may explain the variability in immunogenicity and residual virulence of each vaccine BCG substrain.

**Keywords:** TB vaccine • BCG • BCG substrains • attenuation

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1226692>

**Word count:** 3140  
**Tables:** –  
**Figures:** 1  
**References:** 47

**Adres autorki:** mgr Katarzyna Krysztopa-Grzybowska, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Zakład Badania Surowic i Szczepionek, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; e-mail: [kkrysztopa@pzh.gov.pl](mailto:kkrysztopa@pzh.gov.pl)

## GRUŻLICA

Czynnikiem etiologicznym gruźlicy jest patogen wewnątrzkomórkowy *Mycobacterium tuberculosis*, który zidentyfikował Robert Koch w 1882 r. Badania szczątków antycznych mumii wykazały obecność prątków gruźlicy, co dowodzi, że choroba pojawiła się wśród ludzi co najmniej kilka tysięcy lat temu. Od połowy XIX w. zapadalność i śmiertelność wywołana gruźlicą w Europie zaczęła spadać. Poprawiające się warunki socjoekonomiczne i leczenie sanatoryjne wpłynęły na spadek współczynnika umieralności z powodu gruźlicy do 200 w 1900 r., a następnie do 26 przypadków na 100 tys. mieszkańców w 1950 r. [39]. W ostatnich dekadach zachorowalność i umieralność obniżyła się znacznie, co może się wiązać z szybszym przyrostem populacji na świecie w porównaniu do częstości występowania gruźlicy. Z tych względów analiza wartości bezwzględnych liczby zachorowań w ciągu ostatniej dekady niekoniecznie musi wskazywać na jej spadek [19]. W Polsce od 2000 r. wskaźniki zapadalności na gruźlicę utrzymują się na stałym poziomie około 20 przypadków na 100 tys. mieszkańców [47].

Gruźlica była i nadal jest jedną z głównych przyczyn zachorowalności i umieralności na świecie, a jej zwalczanie pozostaje priorytetem dla zdrowia publicznego [37]. Z powodu gruźlicy rocznie umiera prawie 2 mln ludzi, a liczba nowo rejestrowanych przypadków, sięgająca ponad 9 mln, jest najwyższą spośród odnotowywanych w ostatnich latach [45]. Obecnie szacuje się, że 1/3 światowej populacji jest zakażona prątkami gruźlicy, co stanowi rezerwuuar *M. tuberculosis*, a także źródło nowych przypadków gruźlicy [33,44]. Ponad 80% zachorowań rejestrowanych jest w 22 krajach rozwija-

jących się, gdzie często dochodzi do współzakażenia *M. tuberculosis*/HIV [24]. Prawie 80% przypadków gruźlicy wśród osób zakażonych HIV zamieszkuje Afrykę. Skuteczność obecnie prowadzonej kontroli nad zachorowaniami na gruźlicę na świecie napotyka wiele przeszkód związanych przede wszystkim z brakiem odpowiednio szybkiej diagnostyki oraz możliwością zastosowania bardziej efektywnej szczepionki. Zdolność opanowania sytuacji epidemiologicznej dodatkowo pogarszają częste współzakażenia wirusem HIV oraz wzrost występowania szczepów wielolekoopornych (multi drug resistant – MDR), ekstensywnie opornych (extensively drug resistant – XDR), a od niedawna także całkowicie lekoopornych (totally drug resistant – TDR). Z tych powodów światowy cel wyeliminowania gruźlicy jako zagrożenia zdrowia publicznego do 2050 r., wytyczony przez WHO (World Health Organization), bez zastosowania nowej zoptymalizowanej szczepionki, może być jednak trudny do zrealizowania [45].

## BCG – HISTORIA POWSTANIA SZCZEPIONKI

Atenuowany szczep BCG uzyskano ze zjadliwego szczepu *Mycobacterium bovis* już prawie sto lat temu, a mimo to nadal szczepionka BCG wytwarzana z jego udziałem jest jedyną dostępną na świecie szczepionką przeciw gruźlicy. Wirulentny *M. bovis*, wyizolowany od krowy z objawami gruźliczego zapalenia przewodów mlecznych, został przesłany w 1901 r. do Instytutu Pasteura w Lille we Francji, w którym Albert Calmette oraz Camille Guérin prowadzili badania nad gruźlicą. W celu zmniejszenia aglutynacji bakterii, do hodowli szczepu nazwanego Nocard prowadzonej na pożywce ziemniaczanej, dodawano wołową żółć. Po 15 pasażach szczepu zauwa-

zono zmiany morfologii kolonii i obniżenie zjadliwości obserwowanej u zakażonych świnek morskich *in vivo*. Ostatecznie w wyniku 230 pasażów *M. bovis* wykonanych w latach 1908-1921 otrzymano atenuowany szczep szczepionkowy, którego bezpieczeństwo i skuteczność potwierdzono na modelu zwierzęcym (świnie morskie, króliki, psy, krowy, konie, kurczaki, naczelnice) [4,27]. W 1921 r. szczepionkę BCG po raz pierwszy podano człowiekowi dożylnie (44 tys. prątków/dawkę), a do 1924 r. zaszczepiono ponad 600 dzieci [4,43]. Następnie szczepionkę podawano w trzech dawkach po 2 mg (6 mg; ~  $2,4 \times 10^8$  CFU) doustnie niemowlętom, później też noworodkom. Obserwowana ówczesnie kliniczna skuteczność szczepionki oceniana była na 90%, a jej akceptowalny profil bezpieczeństwa wpłynął na pozytywne rokowania o możliwości wyeliminowania problemu gruźlicy przez jej powszechne zastosowanie [4,27]. Od 1974 r. szczepienia BCG weszły do Rozszerzonego Programu Szczepień Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, Expanded Program on Immunization). Szacuje się, że do chwili obecnej szczepionkę BCG podano ponad 4 mld ludzi na świecie, co w porównaniu do innych szczepionek klasyfikuje ją na pierwszym miejscu pod względem częstości zastosowania [25,39]. Oszacowano, że ostre miejscowe reakcje, tj. owrzodzenie lub zapalenie węzłów chłonnych występują u mniej niż 1/1 000 zaszczepionych osób. Natomiast rozsiane zakażenie wywołane przez szczep szczepionkowy obserwowane jest u mniej niż 2/1 000 000 zaszczepionych i dotyczy głównie pacjentów z niedoborami odporności [37]. Mimo tak długiej historii stosowania szczepionki BCG sporną kwestią pozostaje rzeczywista ocena jej zdolności do ochrony przeciw zachorowaniom na gruźlicę [6]. Metaanaliza dostępnych danych klinicznych potwierdza jej wysoką, ponad 80%, skuteczność przeciw gruźliczemu zapaleniu opon mózgowym i prosówce u dzieci, jednak w przypadku młodzieży i osób dorosłych, u których występuje największe ryzyko gruźlicy płucnej, skuteczność jest szacowana na 0-80% w zależności od badanej populacji [13,27]. Przyczyny tak dużych różnic w klinicznej skuteczności szczepionki BCG nie zostały jednoznacznie wyjaśnione i pozostają przedmiotem licznych debat naukowych. Na taką rozbieżność wyników mogą wpływać różne czynniki, do których można zaliczyć stosowany podszczep szczepionkowy, sposób podania szczepionki, schemat szczepień, zjadliwość prątków *M. tuberculosis* występujących na danym obszarze, częstość ekspozycji na środowiskowe szczepy prątków (NTM - non-tuberculous mycobacteria), suplementacja, genetyczne podłoże różnic międzypopulacyjnych, częstość występowania przewlekłych zakażeń pasożytniczych jelit, stężenie witaminy D i żelaza u osób szczepionych oraz indywidualne predyspozycje genetyczne [27,33]. Ze względu na obserwowane różnice w skuteczności, a także przeciwwskazania do szczepień BCG u nosicieli wirusa HIV lub osób z innymi zaburzeniami odporności, prowadzone są intensywne prace nad opracowaniem nowej szczepionki, która umożliwiłaby skuteczniejszą walkę z gruźlicą. Potencjalnymi szczepionkami są zarówno szczepionki żywe zawierające rekombinowane szczepy BCG lub *M.*

*tuberculosis*; wektorowe szczepionki konstruowane na bazie wirusa krowianki lub adenowirusa; szczepionki podjednostkowe z adiuwantem, zawierające antygeny *M. tuberculosis* oraz szczepionki całokomórkowe, zawierające szczepy *M. indicus pranii*, *M. vaccae* lub *M. tuberculosis*. W czasie badań laboratoryjnych znajduje się ponad 20 preparatów, z których co najmniej 16 jest na etapie badań przedklinicznych, natomiast 14 w fazie badań klinicznych [13,19,21,23,45]. Prace nad opracowaniem nowej szczepionki przeciwgruźliczej są żmudne, długotrwałe, kosztowne i wymagają międzynarodowej współpracy. Powołanie organizacji non-profit „Inicjatywa na rzecz szczepień przeciwko gruźlicy” (TBVI Tuberculosis Vaccine Initiative), która wspiera i integruje działania badawczo-rozwojowe mające na celu opracowanie nowej szczepionki przeciw gruźlicy jest istotnym elementem strategii walki z tą chorobą [33]. Profil bezpieczeństwa szczepionki BCG i jej potwierdzona skuteczność przeciw najcięższym postaciom gruźlicy, uzasadnia konieczność jej nieprzerwanego i powszechnego stosowania do czasu opracowania udoskonalonej wersji, zwiększającej skuteczność szczepień [21].

## ATENUACJA 1908-1921

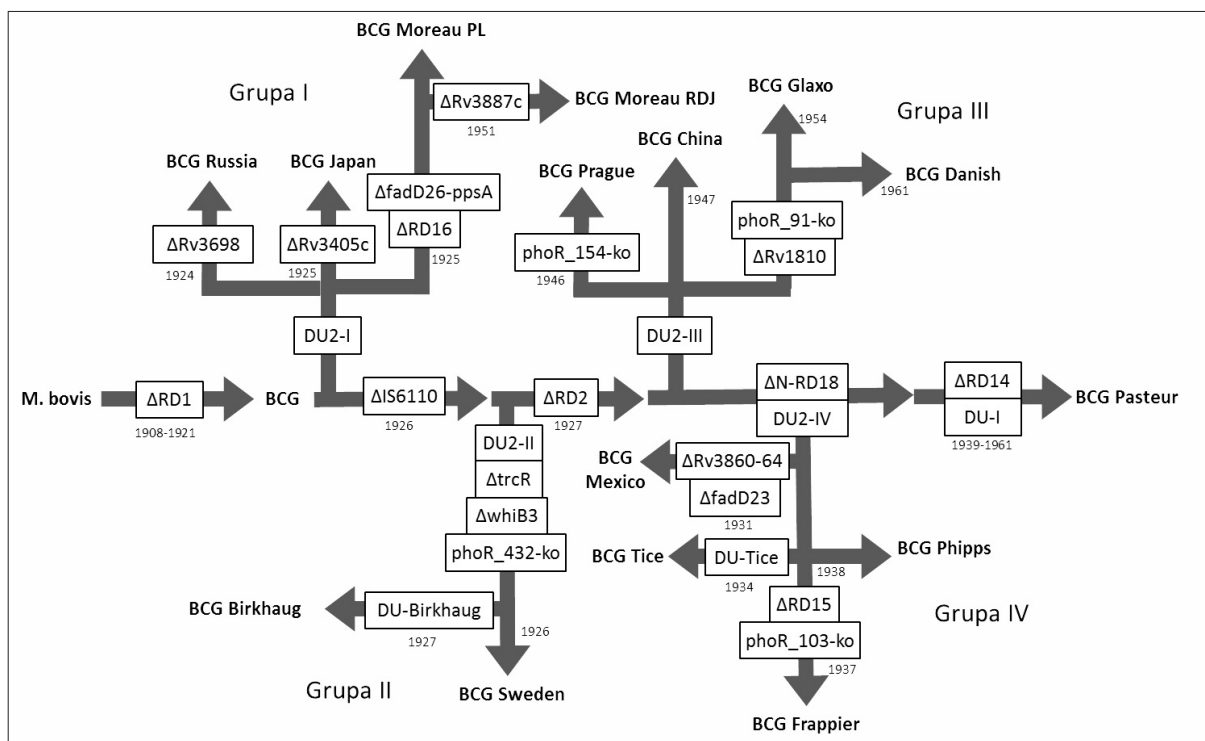
Dokładne odtworzenie procedur, które doprowadziły do atenuacji rodzicielskiego *M. bovis* stało się niemożliwe, ponieważ oryginalny szczep uzyskany przez Calmette oraz Guérin został utracony podczas I Wojny Światowej [43]. Badania porównawcze genomów wirulentnego szczepu *M. tuberculosis* H37Rv, atenuowanego szczepu *M. tuberculosis* H37Ra, wirulentnego szczepu *M. bovis* i atenuowanego szczepu szczepionkowego *M. bovis* BCG, podjęto w latach 90 ub.w., przy czym dokładność zastosowanych metod m.in. hybrydyzacji subtraktywnej oraz mikromacierzy była zbyt mała, aby zaobserwować różnice typu mutacji punktowych (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) [25]. Pierwszymi zidentyfikowanymi markerami obniżonej zjadliwości szczepu *M. bovis* BCG były opisane przez Mahairas i wsp. [29] trzy delecje w regionach RD (region of deletion): RD1, RD2 oraz RD3. Wykazano, że wszystkie przebadane podszczepy BCG były pozbawione regionu RD1, który był obecny u zjadliwych szczepów *M. bovis* i *M. tuberculosis*. Niedawne badania potwierdziły, że wśród 124 epitopów zdolnych do interakcji z ludzkimi komórkami T, większość (117) została zlokalizowana w obrębie RD1, a zatem nie była obecna wśród wszystkich badanych podszczepów BCG [46]. Region RD1 obejmuje fragment genomu o wielkości około 9,5 kbp i składa się z dziewięciu genów (*Rv3871-Rv3879c*), kodujących jeden z pięciu występujących u *M. tuberculosis* białkowych systemów sekrecji typu VII – system ESX-1 [11,14,27]. Dwa geny *Rv3874* i *Rv3875* położone w obrębie locus RD1, odpowiadające za syntezę niskocząsteczkowych białek sekrecyjnych, odpowiednio białka przesączu hodowli CFP-10 (Culture Filtrate Protein 10) oraz wczesnego białka antygenowego ESAT-6 (Early Secretory Antigenic 6-kDa), są uznawane za główne mediatory wirulencji prątków. Transport obu białek odbywa się za pośrednictwem aparatu sekrecyjnego, w skład

którego wchodzi m.in. białko transbłonowe (Rv3877) i dwie ATPazy (Rv3870 i Rv3871). Rola systemu sekrecyjnego należącego do extRD1 (extended RD1) w interakcji z komórkami gospodarza jest bardzo różna i obejmuje m.in. wpływ na lizę komórek, formowanie ziarniaków, hamowanie wydzielania cytokin, blokowanie dojrzewania fagosomów, hamowanie sygnalizacji makrofagów czy też funkcji komórek dendrytycznych i limfocytów T [14]. Inaktywacja genów *cfp-10* i *esat-6* lub genów aparatu sekrecyjnego wywołuje skutek obserwowany podczas usunięcia całego locus RD1, wyrażający się obniżoną zjadliwością *M. tuberculosis* [27,41]. Interesujące jest to, że delecja RD1 odgrywająca główną rolę w atenuacji BCG, nie jest funkcjonalnie odwracalna. Doświadczalnie wbudowanie utraconego fragmentu RD1 do genomu szczepu szczepionkowego nie przywracało pełnej zjadliwości, a zmutowany szczep *M. tuberculosis* z usuniętym z genomu regionem RD1 charakteryzował się nadal większą wirulencją niż BCG, co potwierdza, że istnieją inne dodatkowe mechanizmy składające się na całość kształt atenuacji szczepu szczepionkowego [15,26,27]. Jeden z nich może być związany z występowaniem mutacji zmiany ramki odczytu powodującej inaktywację genu *phoT*, związanego z wirulencją *M. bovis* [12]. Porównanie zsekwencjonowanych genomów *M. bovis* BCG Pasteur [8], *M. bovis* AF2122/97 [16] i *M. tuberculosis* H37Rv [11], wykazało liczne różnice w postaci delekcji, duplikacji i mutacji punktowych. Według Liu i wsp. [27] utrata zjadliwości szczepu *M. bovis* wywołana 230 pasażami była związana zarówno z delecją w regionie RD1 jak i kumulacją mutacji typu SNP. Wykazano, że niektóre mutacje punktowe typowe dla BCG miały znaczenie funkcjonalne, np. SNP w genie *pykA* umożliwił wzrost BCG na podłożu z glicerolem [20], SNP w genie *mmaA3*, kodującym metylotransferazę kwasu mnikolowego, hamował wytwarzanie kwasu metoksy-mikolowego u „późnych” podszczepów BCG [3], a SNP w genie *sigK* zmniejszał syntezę białek MPB83 i MPB70 [9]. W celu sprawdzenia, które z wykrytych różnic mogą być markerami pierwotnej atenuacji wszystkich szczepów BCG, przeprowadzono analizę porównawczą 21 genomów *M. bovis* i 13 genomów podszczepów szczepionkowych. Ze zidentyfikowanych 186 mutacji typu SNP, 115 może mieć potencjalny związek z obniżoną wirulencją (m.in. mutacje w genach *kdpD*, *senX3*, *regX3*, *pkS12*), to jednak wymaga dalszych badań funkcjonalnych [15]. Badania nad wyjaśnieniem procesu atenuacji BCG obejmują poza analizami sekwencji DNA badania różnic syntezy poszczególnych białek BCG [8,30]. Podstawową rolę w adaptacji *M. bovis* BCG wywołanej selekcyjną presją pasażowania, związaną z wykorzystaniem glicerolu jako źródła węgla, przypisuje się występowaniu SNP w genie *pykA* w obecności funkcjonalnej kinazy pirogronianowej i wysokiej transkrypcji *glpD2* [20]. Zmiany metaboliczne zostały także zaobserwowane w genach związanych z degradacją i modyfikacją kwasów tłuszczowych, ponieważ ekspresja genów *fadD2*, *fadE35* i *fadAB*, a także *desA1* i *desA3* została znacznie obniżona u BCG w porównaniu do prątków zjadliwych [8].

## ATENUACJA PO 1924 R.

Od 1924 r. rodzicielski szczep *M. bovis* BCG przesyłano z Instytutu Pasteura do wielu laboratoriów na całym świecie w celu uruchomienia produkcji szczepionki. Do 1927 r. aż 60 krajów otrzymało hodowlę prątków BCG. Uzyskane szczepy poddawano konwencjonalnemu pasażowaniu co parę tygodni i mimo wysiłków włożonych w standaryzację tego procesu, odmienne warunki pasażowania w poszczególnych laboratoriach, doprowadziły do wyodrębnienia w wyniku mikroewolucji około 50 różnych siostrzanych podszczepów BCG (ryc. 1), z których obecnie są stosowane głównie: BCG-Pasteur (1173P2), BCG-Japan (Tokyo-172), BCG-Danish (Copenhagen-1331) oraz BCG-Glaxo (1077) [4,25,27]. Około 1924 r. rozpoczął się zatem drugi etap mikroewolucji genomów, związany z dystrybucją szczepów i różnymi warunkami produkcji szczepionki BCG. Po kilku dekadach i setkach pasażów dalsze różnicowanie szczepów zostało zakończone dopiero dzięki zaleceniu wprowadzenia do procesu wytwarzania zwalidowanego systemu serii siewnych. Z tego powodu rozważania dotyczące różnic w resztkowej zjadliwości, efektywności i mechanizmów atenuacji muszą być prowadzone w różnych podszczepach BCG. Pierwszym uzyskanym w 1924 r. podszczepem siostrzanym był BCG-Russia. Kolejne podszczepy „wczesne” to BCG-Japan (1925), BCG-Moreau (1925), BCG-Sweden (1926) oraz BCG-Birkhaug (1927). Dalsza dystrybucja doprowadziła do powstania podszczepów tzw. „późnych”, do których zalicza się m.in. BCG-Tice (1934), BCG-Frappier (1937), BCG-Phipps (1938), BCG-Prague (1946), BCG-China (1947), BCG-Glaxo (1954), BCG-Danish (1961) oraz BCG-Pasteur (1961). Badania porównawcze genomu *M. bovis*, 7 szczepów szczepionkowych i 5 szczepów *M. tuberculosis* pod kątem delekcji pozwoliły na identyfikację 25 regionów RD, przy czym jedynie 3 delekcje (RD1, RD3, Del\_Mb2377c) powiązano z pierwotną atenuacją szczepu BCG, występującą w latach 1908-1921. Pozostałe 22 regiony, zawierające łącznie 52 geny, zostały utracone podczas dystrybucji podszczepów siostrzanych w okresie 1924-1966 [46]. Występowanie delekcji w określonych regionach RD jest swoiste dla poszczególnych grup podszczepów BCG. Zidentyfikowana delecja RD2 jest charakterystyczna dla wszystkich podszczepów „późnych”, delecja N-RD18 występuje u podszczepów „późnych” jednak wyłącznie grupy IV (podział szczepów na grupy omówiono w dalszej części pracy), delecja RD14 dotyczy tylko podszczepu BCG-Pasteur, RD15 BCG-Frappier a RD16 BCG-Moreau [2,5,8,27].

W analizach porównawczych opublikowanych przez Zhanga i wsp. w 2013 r. wykazano podobną wielkość genomu (~4,2 M) i zawartość par GC (~0,65) u 13 badanych podszczepów BCG, a także statystycznie znacznie niższą średnią zmienność SNP między dwoma szczepami szczepionkowymi (0,018 SNP/kb) w porównaniu ze zmiennością wśród badanych szczepów *M. tuberculosis* (0,25 SNP/kb). Jednocześnie udowodniono, że presja selekcyjna w warunkach laboratoryjnych, jakiej poddane były podszczepy BCG, w porównaniu



Ryc. 1. Schemat mikroewolucji podszczerpów BCG [8,22,25,27]

z presją naturalną wywieraną przez system immunologiczny na szczepy *M. tuberculosis*, wpłynęła na większą liczbę utraconych sekwencji RD w ich genomach. Zmienność potwierdzono także podczas porównań genomów szczepu dzikiego *M. tuberculosis* ze szczepami laboratoryjnymi *M. tuberculosis* H37Rv oraz *M. tuberculosis* H37Ra. Różnice genetyczne wywołane ponad 50-letnią presją selekcyjną mogą tłumaczyć zmienność w immunogenności i resztkowej zjadliwości poszczególnych szczepionkowych podszczerpów BCG [46].

Poznanie sekwencji genomu szczepu *M. bovis* BCG Pasteur 117P2 umożliwiło zidentyfikowanie około 4 tys. genów kodujących białka, z których 58 występowało w dwóch kopiach jako skutek obecności dwóch niezależnych duplikacji DU1 oraz DU2. Pierwsza z nich obejmuje fragment wielkości niespełna 30 kbp i jest charakterystyczna wyłącznie dla podszczerpu BCG-Pasteur, natomiast druga występuje w wszystkich podszczerpach BCG, jednak w różnych postaciach, dzielących podszczerpy na cztery grupy (od DU2-I do DU2-IV) [7,8]. Duplikacje DU2-I i DU2-II występują u podszczerpów „wczesnych” (DU2-I: BCG-Moreau, BCG-Japan, BCG-Russian; DU2-II: BCG-Sweden, BCG-Birkhaug), a DU2-III i DU2-IV wyłącznie „późnych” (DU2-III: BCG-China, BCG-Prague, BCG-Glaxo, BCG-Danish; DU2-IV: BCG-Tice, BCG-Frappier, BCG-Pasteur, BCG-Phipps) [8,27]. Dla wszystkich duplikacji typu DU2, wspólne są jedynie trzy geny: *Rv3300c*, kodujący syntetazę pseudourydyny; *phoY1*, kodujący regulator systemu transportu fosforanów oraz *gfpD2*, kodujący dehydrogenazę glicerol-3-fosforanową [8]. Badania porównawcze 13 podszczerpów BCG

z użyciem mikromacierzy, doprowadziły do identyfikacji dwóch innych duplikacji [25]. Pierwsza z nich, swoista wyłącznie dla podszczerpu Tice, tj. DU-Tice, obejmuje obszar 22 kbp i zawiera geny *Rv1782-Rv1800*, kodujące m.in. system sekrecji ESX-5, czyli jedyny poza ESX-1 system związany z wirulencją prątków. W genomie podszczerpu BCG-Birkhaug wykryto duplikację regionu od *trxB/Rv3913* do *rodA/Rv0017c*, zawierającego geny zaangażowane w replikację DNA oraz podziały komórkowe [25].

Znaczące zróżnicowanie genetyczne podszczerpów BCG zaobserwowano także w regionie *phoP-phoR*. PhoP-PhoR tworzy 11-składnikowy system odgrywający zasadniczą rolę w wirulencji *M. tuberculosis*. PhoR jest kinazą histydynową, tj. transbłonowym białkiem przekazującym sygnały ze środowiska za pośrednictwem autofosforylacji, natomiast PhoP jest regulatorem pośredniczącym w ekspresji wielu genów, w tym odpowiedzialnych za biosyntezę lipidów ściany komórkowej oraz genów systemu ESX-1 [8,25,27]. Obszar charakteryzuje duży polimorfizm w obrębie rodziny podszczerpów BCG, co może mieć związek z różnicami w ich resztkowej zjadliwości. Szczepy „wczesne” z grupy I mają insercję IS6110 (1 356 bp) w promotorze genu *phoP* w orientacji przeciwnej. Jak już wykazano, sekwencja IS6110 w orientacji zgodnej z orientacją genu *phoP* zwiększa jego ekspresję, co potwierdzono wśród szczepów *M. bovis* B wyizolowanych od chorych podczas epidemii gruźlicy w Hiszpanii w latach 1995-1998 [25,40]. Podszczerpy BCG-Moreau, BCG-Japan, BCG-Russian charakteryzują się zwiększoną ekspresją *phoP*, jednak ze względu na odmienną orientację insercji IS6110, mechanizm zaobserwowanej nade-

kspresji nie został jeszcze wyjaśniony. Może to jednak tłumaczyć większą resztkową zjadliwość rosyjskiego podszczezu w porównaniu do innych. Mechanizm nie ma jednak charakteru dominującego, gdyż w przypadku BCG-Moreau oraz BCG-Japan (zaliczanych do podszczezów mało reaktogennych) ważniejszymi markerami atenuacji wydają się utrata zdolności do wytwarzania takich czynników wirulencji jak dimikolany trehalozy (PDIMs phthiocerol dimycocerosates) oraz glikolipidy fenolowe (PGLs phenolic glycolipids). Pozostałe podszczezy BCG i aktualnie izolowane szczezy *M. bovis* oraz *M. tuberculosis* nie mają insercji IS6110 w regionie promotora genu *phoP*. Naturalnym mutanem pod względem genu *phoP* okazał się podszczez BCG-Prague, natomiast w genomach BCG-Glaxo, BCG-Danish, BCG-Frappier, BCG-Sweden oraz BCG-Birkhaug wykryto delecje w genie *phoR* [25].

Wykazano ponadto, że blisko spokrewnione z sobą podszczezy "wczesne" należące do grupy II (BCG-Sweden oraz BCG-Birkhaug) jako jedyne zawierają dwie swoiste delecje, do których doszło przed 1926 r. Pierwsza z nich obejmuje fragment 110 pz w regionie *whiB3* (*Rv3416/BCG3486*). Białko WhiB należy do rodziny siedmiu czynników transkrypcyjnych *M. tuberculosis*, które odpowiadają za regulację ekspresji genów w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne, w tym na stężenie tlenu i tlenu azotu oraz dostępność węgla [25,38]. Druga zidentyfikowana delecja dotyczy utraty fragmentu 245 pz w genie *trcR*. Białko TrcR jest regulatorem dwuskładnikowego systemu TrcR-TrcS. Jak wykazano w badaniach z użyciem zwierząt laboratoryjnych oba regiony genomu wykazują potencjalny związek z wirulencją [25,34,42].

Badania porównawcze podszczezów BCG z użyciem mikromacierzy pozwoliły na zidentyfikowanie dwóch delecji swoistych dla podszczezu BCG-Moreau. Pierwsza z nich wiązała się z utratą końcowego fragmentu genu *fadD26* (*Rv2930/BCG2952*) i początkowego fragmentu genu *ppsA* (*Rv2931/BCG2953*), które są częścią locus odpowiedzialnego za syntezę PDIM i PGL, tworzących lipidy ściany komórkowej wirulentnych prątków powiązane z modulacją odpowiedzi immunologicznej gospodarza [18,25,32,35,36]. Brak syntezy tych składników wykazano u trzech dystrybuowanych osobno serii podszczezów BCG (BCG-Moreau, BCG-Japan oraz BCG-Glaxo). Tylko podszczez BCG-Moreau ma delecję fragmentu *fadD26-ppsA*, a zatem fenotyp ten pojawił się prawdopodobnie niezależnie w wyniku różnych mechanizmów [10,25].

Mutacją charakterystyczną wyłącznie dla szczezu BCG-Moreau opisaną po raz pierwszy przez Leunga i wsp. [25] jest delecja w regionie *Rv3887c/BCG3942c*. Gen ten jest częścią systemu sekrecji ESX-2 i koduje błonowe białko transportowe homologiczne do białka, stanowiącego składnik układu wydzielniczego ESX-1, co wskazuje, że może brać również udział w wydzielaniu rodziny

białek Esx [1,25,28]. Późniejsze badania sekwencjonowania genomowego wykonane w Brazylii na stosowanym tam do produkcji rodzimej szczepionki – podszczezie BCG-Moreau (tzw. BCG-Moreau RDJ) potwierdziły obecność delecji w genie *Rv3887c*, jednak innej wielkości niż opisana wcześniej przez Leunga i wsp. (odpowiednio 876 pz oraz 1128 pz) [17,25]. Podszczez brazylijski BCG-Moreau w 1951 r. został przesłany z Brazylii do Francji, skąd 1954 r. trafił do Polski, gdzie rok później z jego udziałem rozpoczęto lokalną produkcję szczepionki BCG [31]. Badania polskich szczezów produkcyjnych z lat 1957-2010 nie potwierdziły występowania delecji w genie *Rv3887c*, co świadczy o jej pojawieniu się w Brazylii po 1951 r. i potwierdza odrębną mikroewolucję podszczezów BCG-Moreau RDJ oraz BCG-Moreau PL [22].

## PODSUMOWANIE

Uporządkowanie zapisów archiwalnych dotyczących dystrybucji szczezu BCG na świecie i prowadzenia badań porównawczych jest utrudnione, ze względu na 100-letnią historię szczepionki. Dostępne dane z lat 50 ub.w. wskazują, że od rozpoczęcia lokalnych produkcji szczepionki BCG w różnych krajach niemal połowa producentów wymieniła stosowane podszczezy produkcyjne przynajmniej jeden raz. Dodatkowe trudności wiążą się z niejasną nomenklaturą, stosowaniem synonimów lub zmianą nazwy w związku ze zmianą wytwórcy lub miejscem wytwarzania [4]. Mimo to, w ciągu 40 lat badań podszczezów BCG zidentyfikowano wiele markerów różniących poszczególne podszczezy siostrzane – od zmian typu SNP po duże rearanżacje genomowe. Niektóre z nich dotyczą dobrze opisanych czynników zjadliwości, tj. ESX-1, *phoP*, czy PDIM/PGL. Należy podkreślić, że znaczenie zidentyfikowanych markerów może być jedynie elementem zespołu czynników związanych ze skutecznością i bezpieczeństwem różnych szczepionek BCG i nie pozwala na tym poziomie wiedzy wyciągnąć jednoznacznych wniosków. Analizy porównawcze skuteczności szczepionek BCG produkowanych z różnych podszczezów na wspólnym modelu zwierzęcym okazały się zaskakująco rozbieżne. Metaanaliza dostępnych danych klinicznych nie przyniosła oczekiwanego rezultatu ze względu na duże różnice metodologiczne, które nawet przy próbie ich pominięcia, nie pozwalają na wysnucie jednoznacznego wniosku o przewadze któregoś z podszczezów. Nadal trudno jest przewidzieć jak długo szczepionka BCG będzie stosowana, ponieważ mimo wielu kontrowersji związanych z dokładnym określeniem jej skuteczności, prace nad opracowaniem preparatu nowej generacji, trwające od wielu lat nie przyniosły jak dotąd wymiernego rezultatu. Istotne dane na temat kolejnych swoistych markerów atenuacji oraz mikroewolucji polskiego podszczezu *M. bovis* BCG mogą przynieść wyniki sekwencjonowania genomowego w porównaniu do dostępnych danych dotyczących innych podszczezów.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Abdallah A.M., Gey van Pittius N.C., Champion P.A.D., Cox J., Luirink J., Vandenbroucke-Grauls C.M., Applmelk B.J., Bitter W.: Type VII secretion - mycobacteria show the way. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2007; 5: 883-891
- [2] Bedwell J., Kairo S.K., Behr M.A., Bygraves J.A.: Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. *Vaccine*, 2001; 19: 2146-2151
- [3] Behr M.A.: BCG-different strains, different vaccines? *Lancet Infect. Dis.*, 2002; 2: 86-92
- [4] Behr M.A., Schroeder B.G., Brinkman J.N., Slayden R.A., Barry C.E.: A point mutation in the *mma3* gene is responsible for impaired methoxymycolic acid production in *Mycobacterium bovis* BCG strains obtained after 1927. *J. Bacteriol.*, 2000; 182: 3394-3399
- [5] Behr M.A., Small P.M.: A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine*, 1999; 17: 915-922
- [6] Behr M.A., Wilson M.A., Gill W.P., Salamon H., Schoolnik G.K., Rane S., Small P.M.: Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*, 1999; 284: 1520-1523
- [7] Brosch R., Gordon S.V., Buchrieser C., Pym A.S., Garnier T., Cole S.T.: Comparative genomics uncovers large tandem chromosomal duplications in *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. *Yeast*, 2000; 17: 111-123
- [8] Brosch R., Gordon S.V., Garnier T., Eiglmeier K., Frigui W., Valenti P., Dos Santos S., Duthoy S., Lacroix C., Garcia-Pelayo C., Inwald J.K., Golby P., Garcia J.N., Hewinson R.G., Behr M.A. i wsp.: Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 5596-5601
- [9] Charlet D., Mostowy S., Alexander D., Sit L., Wiker H.G., Behr M.A.: Reduced expression of antigenic proteins MPB70 and MPB83 in *Mycobacterium bovis* BCG strains due to a start codon mutation in *sigK*. *Mol. Microbiol.*, 2005; 56: 1302-1313
- [10] Chen J.M., Islam S.T., Ren H., Liu J.: Differential productions of lipid virulence factors among BCG vaccine strains and implications on BCG safety. *Vaccine*, 2007; 25: 8114-8122
- [11] Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E. 3rd, Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R. i wsp.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 1998; 393: 537-544
- [12] Collins D.M., Kawakami R.P., Buddle B.M., Wards B.J., de Lisle G.W.: Different susceptibility of two animal species infected with isogenic mutants of *Mycobacterium bovis* identifies *phoT* as having roles in tuberculosis virulence and phosphate transport. *Microbiology*, 2003; 149: 3203-3212
- [13] Frick M.: The TB Vaccines Pipeline. Where are we going, where have we been? W: 2013 Pipeline Report, red. T. Horn, S. Morgan. HIV i-Base/Treatment Action Group, 2013: 263-283
- [14] Ganguly N., Siddiqui I., Sharma P.: Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. *Tuberc. Edinb. Scotl.*, 2008; 88: 510-517
- [15] Garcia Pelayo M.C., Uplekar S., Keniry A., Mendoza Lopez P., Garnier T., Nunez Garcia J., Boschiroli L., Zhou X., Parkhill J., Smith N., Hewinson R.G., Cole S.T., Gordon S.V.: A comprehensive survey of single nucleotide polymorphisms (SNPs) across *Mycobacterium bovis* strains and *M. bovis* BCG vaccine strains refines the genealogy and defines a minimal set of SNPs that separate virulent *M. bovis* strains and *M. bovis* BCG strains. *Infect. Immun.*, 2009; 77: 2230-2238
- [16] Garnier T., Eiglmeier K., Camus J.-C., Medina N., Mansoor H., Pryor M., Duthoy S., Grondin S., Lacroix C., Monsempe C., Simon S., Harris B., Atkin R., Doggett J., Mayes R. i wsp.: The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 7877-7882
- [17] Gomes L.H.F., Otto T.D., Vasconcellos É.A., Ferrão P.M., Maia R.M., Moreira A.S., Ferreira M.A., Castello-Branco L.R.R., Degraive W.M., Mendonca-Lima L.: Genome sequence of *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, the Brazilian vaccine strain against tuberculosis. *J. Bacteriol.*, 2011; 193: 5600-5601
- [18] Hotter G.S., Wards B.J., Mouat P., Besra G.S., Gomes J., Singh M., Bassett S., Kawakami P., Wheeler P.R., de Lisle G.W., Collins D.M.: Transposon mutagenesis of Mb0100 at the *ppe1-nrp* locus in *Mycobacterium bovis* disrupts phthiocerol dimycocerosate (PDIM) and glycosylphenol-PDIM biosynthesis, producing an avirulent strain with vaccine properties at least equal to those of *M. bovis* BCG. *J. Bacteriol.*, 2005; 187: 2267-2277
- [19] Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc: Biuletyn Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc 2014, [http://www.igichp.edu.pl/\(18.08.2015\)](http://www.igichp.edu.pl/(18.08.2015))
- [20] Kaufmann S.H.: Fact and fiction in tuberculosis vaccine research: 10 years later. *Lancet Infect. Dis.*, 2011; 11: 633-640
- [21] Kaufmann S.H., Hussey G., Lambert P.H.: New vaccines for tuberculosis. *Lancet*, 2010; 375: 2110-2119
- [22] Keating L.A., Wheeler P.R., Mansoor H., Inwald J.K., Dale J., Hewinson R.G., Gordon S.V.: The pyruvate requirement of some members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for in vivo growth. *Mol. Microbiol.*, 2005; 56: 163-174
- [23] Krysztopa-Grzybowska K., Brzezińska S., Augustynowicz-Kopec E., Polak M., Augustynowicz E., Lutyńska A.: Descendant of daughter Brazilian BCG Moreau substrain in Poland. *Vaccine*, 2012; 30: 5512-5518
- [24] Krysztopa-Grzybowska K., Lutyńska A.: Advances in the development of new vaccines against tuberculosis. 100 years after the introduction of BCG. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 768-776
- [25] Lawn S.D., Zumla A.I.: Tuberculosis. *Lancet*, 2011; 378: 57-72
- [26] Leung A.S., Tran V., Wu Z., Yu X., Alexander D.C., Gao G.F., Zhu B., Liu J.: Novel genome polymorphisms in BCG vaccine strains and impact on efficacy. *BMC Genomics*, 2008; 9: 413
- [27] Lewis K.N., Liao R., Guinn K.M., Hickey M.J., Smith S., Behr M.A., Sherman D.R.: Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guérin attenuation. *J. Infect. Dis.*, 2003; 187: 117-123
- [28] Liu J., Tran V., Leung A.S., Alexander D.C., Zhu B.: BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Hum. Vaccin.*, 2009; 5: 70-78
- [29] MacGurn J.A., Cox J.S.: A genetic screen for *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective for phagosomal maturation arrest identifies components of the ESX-1 secretion system. *Infect. Immun.*, 2007; 75: 2668-2678
- [30] Mahairas G.G., Sabo P.J., Hickey M.J., Singh D.C., Stover C.K.: Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J. Bacteriol.*, 1996; 178: 1274-1282
- [31] Mattow J., Jungblut P.R., Schaible U.E., Mollenkopf H.J., Lamer S., Zimny-Arndt U., Hagens K., Müller E.C., Kaufmann S.H.: Identification of proteins from *Mycobacterium tuberculosis* missing in attenuated *Mycobacterium bovis* BCG strains. *Electrophoresis*, 2001; 22: 2936-2946
- [32] Olinto M.: The Brazilian experience in prevention of tuberculosis with a concurrent method of BCG vaccination. *Pediatrics*, 1957; 19: 833-843
- [33] Onwueme K.C., Vos C.J., Zurita J., Ferreras J.A., Quadri L.E.: The dimycocerosate ester polyketide virulence factors of mycobacteria. *Prog. Lipid Res.*, 2005; 44: 259-302

- [34] Ottenhoff T.H., Kaufmann S.H.: Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *PLoS Pathog.*, 2012; 8: e1002607
- [35] Parish T., Smith D.A., Kendall S., Casali N., Bancroft G.J., Stoker N.G.: Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, 2003; 71: 1134-1140
- [36] Reed M.B., Domenech P., Manca C., Su H., Barczak A.K., Kreiswirth B.N., Kaplan G., Barry C.E. 3rd.: A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature*, 2004; 431: 84-87
- [37] Rousseau C., Winter N., Pivert E., Bordat Y., Neyrolles O., Avé P., Huerre M., Gicquel B., Jackson M.: Production of phthiocerol dimycoserolates protects *Mycobacterium tuberculosis* from the cidal activity of reactive nitrogen intermediates produced by macrophages and modulates the early immune response to infection. *Cell. Microbiol.*, 2004; 6: 277-287
- [38] Rowland R., McShane H.: Tuberculosis vaccines in clinical trials. *Expert Rev. Vaccines*, 2011; 10: 645-658
- [39] Singh A., Guidry L., Narasimhulu K.V., Mai D., Trombley J., Redding K.E., Giles G.I., Lancaster J.R. Jr, Steyn A.J.: *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 responds to O<sub>2</sub> and nitric oxide via its [4Fe-4S] cluster and is essential for nutrient starvation survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 11562-11567
- [40] Smith K.C., Orme I.M., Starke J.R.: Tuberculosis vaccine. W: S. Plotkin, W. Orenstein, P. Offit (red.) Vaccines. UK, Elsevier Saunders, Oxford, 2008; 857-886
- [41] Soto C.Y., Menéndez M.C., Pérez E., Samper S., Gómez A.B., García M.J., Martin C.: IS6110 mediates increased transcription of the *phoP* virulence gene in a multidrug-resistant clinical isolate responsible for tuberculosis outbreaks. *J. Clin. Microbiol.*, 2004; 42: 212-219
- [42] Stanley S.A., Raghavan S., Hwang W.W., Cox J.S.: Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 13001-13006
- [43] Steyn A.J., Collins D.M., Hondalus M.K., Jacobs W.R., Kawakami R.P., Bloom B.R.: *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 interacts with RpoV to affect host survival but is dispensable for in vivo growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 3147-3152
- [44] Teo S.S., Shingadia D.: BCG vaccine. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2005; 568: 117-134
- [45] Vrba A., Kwiatkowska S.: *Mycobacterium tuberculosis* jako przykład patogenu wewnątrzkomórkowego. Wzajemne relacje między mikro- i makroorganizmem. *Pol. Merkur. Lekarski*, 2009; 27: 508-513
- [46] World Health Organization: Global tuberculosis report 2012. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf) (18.08.2015)
- [47] Zhang W., Zhang Y., Zheng H., Pan Y., Liu H., Du P., Wan L., Liu J., Zhu B., Zhao G., Chen C., Wan K.: Genome sequencing and analysis of BCG vaccine strains. *PLoS One*, 2013; 8: e71243

---

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.