

Received: 2016.02.10
Accepted: 2016.11.18
Published: 2017.05.09

Znaczenie szczepów *Bordetella pertussis* niewytwarzających czynników zjadliwości w epidemiologii krztuśca*

The importance of *Bordetella pertussis* strains which do not produce virulence factors in the epidemiology of pertussis

Maciej Polak, Anna Lutyńska

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

Streszczenie

W ostatnich latach, w krajach o wysokim poziomie zaszczepienia przeciw krztuścowi wyizolowano szczepy *Bordetella pertussis*, które utraciły zdolność do wytwarzania niektórych antygenów: pertaktyny – Prn, toksyny krztuścowej – Ptx, hemaglutyniny włóknikowej – FHA, fimbrii typu 2 i 3 – Fim 2 i 3, czynnika kolonizacji tchawicy – TcfA. Pojawienie się takich izolatów może być wynikiem naturalnej ewolucji *B. pertussis* lub stanowić mechanizm adaptacyjny, umożliwiając zwiększone krążenie patogenu wśród osób zaszczepionych przeciw krztuścowi. Większość dotychczas opisanych mutacji decydujących o braku ekspresji dotyczyła utraty zdolności wytwarzania Prn. Zmutowane szczepy Prn⁻ wyizolowano od osób chorych w krajach stosujących do powszechnych szczepień bezkomórkowe szczepionki przeciw krztuścowi (aP). Zwiększającą się częstość izolacji mutantów Prn⁻ skorelowano z czasem stosowania szczepionek aP. W większości przypadków, rozprzestrzenianie się izolatów Prn⁻ powiązano z powstaniem niezależnych mutacji, a nie ekspansją pojedynczego klonu. Mutanty Prn⁻ dotychczas izolowano od osób chorych wykazujących typowe kliniczne objawy krztuśca, które nie różniły się od objawów zakażenia szczepami dzikimi. Wyniki badań przeprowadzonych zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* wykazały, że izolaty Prn⁻, Ptx⁻, FHA⁻ zachowały właściwości cytotoksyczne, a poza izolatami Ptx⁻, zachowały cechy pełnej zjadliwości wyrażonej efektem letalnym u myszy eksperymentalnie zakażanych donosowo. Wyjaśnienie znaczenia wykrytych mutacji w poziomie zjadliwości oraz transmisji *B. pertussis* w związku ze stałym wzrostem zachorowań na krztuśca na świecie jest niezbędne do opracowania nowych, zoptymalizowanych strategii poprawy profilaktyki krztuśca.

Słowa kluczowe:

B. pertussis • izolaty niewytwarzające antygenów szczepionkowych • pertaktyna

Summary

Bordetella pertussis strains, which have lost the ability to produce antigens, such as pertactin - Prn, pertussis toxin - Ptx, filamentous haemagglutinin - FHA, fimbriae type 2 and 3 - Fim 2 and 3, tracheal colonization factor - TcfA, have recently been isolated in countries with a high vaccination coverage. The emergence of such isolates might have resulted from *B. pertussis* natural evolution course or adaptive mechanisms, allowing increased circulation of the pa-

*Praca została wykonana w ramach realizacji projektu badawczego nr 2013/09/N/NZ7/03563 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

thogen in vaccinated populations. So far, the majority of described mutants were deficient in the Prn production. Prn deficient isolates were found in countries which use acellular pertussis vaccines (aP) in routine immunization programmes. The increase of frequency of Prn⁻ strains isolation was correlated with the period of routine vaccination with aP vaccines. In most countries, the spread of these isolates has resulted from independent mutations rather than from the expansion of a single clone. Prn⁻ isolates were collected from patients showing typical clinical symptoms of pertussis found for Prn⁺ strains. Results of *in vitro* and *in vivo* studies have shown that Prn⁻, Ptx⁻ and FHA⁻ isolates retain cytotoxic properties, and besides Ptx⁻ isolates, were lethal in intranasally infected mice. Further explanation of the impact of antigen deficiencies on virulence and transmission of *B. pertussis* in the context of the continuous increase of pertussis incidence is necessary to develop a new, optimized strategy of pertussis prevention.

Keywords: *B. pertussis* • vaccine antigen deficient isolates • pertactin

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1237416>
DOI: 11.1111/1111.111.
Word count: 6082
Tables: 2
Figures: 1
References: 100

Adres autora: mgr inż. Maciej Polak, Zakład Badania Surowic i Szczepionek, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; e-mail: mpolak@pzh.gov.pl

Wykaz skrótów: **aP** – szczepionka bezkomórkowa przeciw krztuścowi (acellular pertussis vaccine), **BvgAS** – dwuskładnikowy system regulacji ekspresji genów kodujących czynniki zjadliwości *Bordetella* (*Bordetella* virulence genes activator/sensor regulation system), **FHA** – hemaglutynina włókienkowa (filamentous hemagglutinin), **Fim** – fimbrie (fimbriae), **Prn** – pertaktyna (pertactin), **Ptx** – toksyna krztuścowa (pertussis toxin), **PtxA** – podjednostka S1 toksyny krztuścowej (pertussis toxin S1 subunit), **TcfA** – czynnik kolonizacji tchawicy A (tracheal colonization factor A), **LOS** – lipooligosacharyd, **wP** – szczepionka całokomórkowa przeciw krztuścowi (whole-cell pertussis vaccine).

WSTĘP

Krztusiec jest zakaźną chorobą układu oddechowego, występującą zarówno u dzieci jak i osób dorosłych [42,86]. Przebieg kliniczny krztuśca zależy od wielu czynników, w tym: wieku chorego, występowania innych chorób towarzyszących (zwłaszcza układu oddechowego) oraz poziomu odporności na krztusiec - naturalnej lub poszczepiennej. Typowym objawem klinicznym krztuśca, występującym najczęściej u niezaszczepionych lub nie w pełni zaszczepionych dzieci, jest długotrwały kaszel napadowy, któremu często towarzyszy odkrztuszanie lepkiej, śluzowatej płwociny, a niekiedy wymioty i duszności [6]. U osób dorosłych i starszych dzieci, które w przeszłości przebyły chorobę lub zostały zaszczepione, a także u dzieci, które nie zostały zaszczepione zgodnie z obowiązującym schematem szczepień, choroba może występować w postaci atypowej z łagodnymi napadami kaszlu lub ich całkowitym brakiem.

Czynnikiem etiologicznym krztuśca są małe, Gram-ujemne pałeczki *Bordetella pertussis* przenoszone drogą

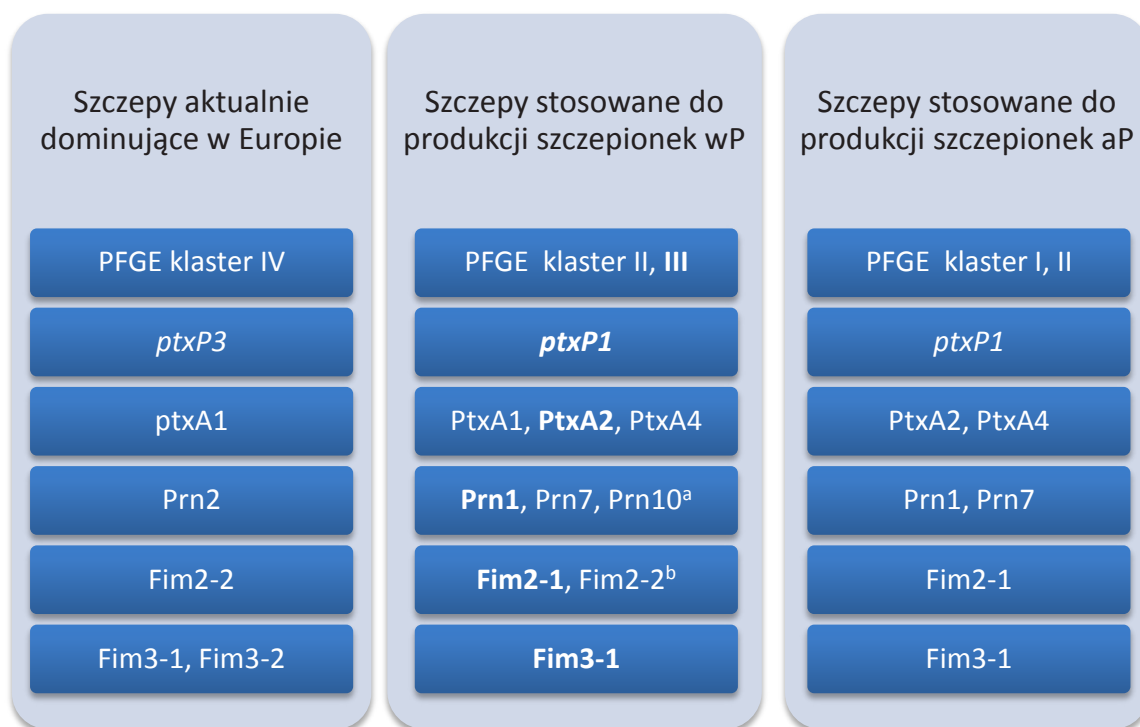
powietrzno-kropelkową przez bezpośredni kontakt z osobą chorą. Po zakażeniu, pałeczki krztuśca wytwarzają wiele czynników zjadliwości, które można podzielić na toksyny i adhezyny. Do najlepiej poznanych adhezyn należą: aglutynogeny (AGGs; w tym fimbrie - Fim), hemaglutynina włókienkowa (FHA), pertaktyna (Prn), czynnik kolonizacji tchawicy (TcfA). Wśród toksyn istotnych w etiopatogenezie krztuśca najlepiej scharakteryzowano: toksynę krztuścową (Ptx), cyklazę adenylową (ACT), toksynę dermonekrotyczną (DNT), cytotoksynę tchawiczą (TCT), lipooligosacharyd (LOS), system wydzielniczy typu III (T3SS). Czynniki zjadliwości *B. pertussis* umożliwiają bakteriom adhezję do nabłonka błony śluzowej dróg oddechowych (FHA, Prn, Fim), bezpośrednią inwazję komórek nabłonka (Prn, FHA), niszczenie rzęsek układu oddechowego (TCT, LOS), tworzenie biofilmu (FHA, polisacharyd Bps) oraz modulowanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza (Ptx, ACT, FHA, Fim, BrkA, Prn, TCT, LOS) [22,25,58]. Wytwarzanie większości czynników zjadliwości oraz wielu innych białek umożliwiających m.in. przeżycie bakterii poza organizmem, uczestniczących w metabolizmie komórkowym oraz jego regulacji jest kontrolowane

przez dwuskładnikowy system regulacji BvgAS (*Bordetella virulence genes activator/sensor regulation system*) [58]. W wyniku zmian warunków środowiska zewnętrznego następuje zależna od BvgAS aktywacja jednej z trzech tzw. faz *B. pertussis* (Bvg⁺, Bvg⁻, Bvg^d). Skuteczna kolonizacja i rozwój zakażenia dróg oddechowych jest uwarunkowany indukcją fazy Bvg⁺, w której m.in. dochodzi do ekspresji genów kodujących czynniki zjadliwości.

Według najnowszych szacunków WHO, rocznie na świecie na krztusiec zapada 16 mln ludzi, z czego około 195000 umiera [98]. W ostatnich dwóch dekadach, mimo stosowania powszechnych szczepień, w wielu krajach rozwiniętych zaobserwowano wzrost zapadalności i umieralności na krztusiec [17,20,42,95]. Wzrost ten powiązано z wieloma różnymi czynnikami, tj. zwiększeniem się świadomości społeczeństwa na temat występowania krztusca, poprawą nadzoru epidemiologicznego i diagnostyki krztusca (wprowadzenie metody PCR), spadkiem jakości szczepionek przeciw krztuścowi, zastąpieniem szczepionek całokomórkowych (wP – whole-cell pertussis vaccine) szczepionkami bezkomórkowymi (aP – acellular pertussis vaccine) w ramach szczepienia podstawowego lub uzupełniającego, wygasaniem ochronnej odpowiedzi immunologicznej wraz z upływem czasu od podania ostatniej dawki szczepionki przeciw krztuścowi oraz zmianami adaptacyjnymi *Bordetella pertussis* [18,32,63]. Innym istotnym czynnikiem, który wpływa na

pojawianie się nowych ognisk epidemii nie tylko krztusca, lecz także innych chorób zakaźnych, którym można zapobiegać szczepieniami, jest zaniechanie szczepień dzieci przez rodziców w wyniku negatywnej działalności ruchów antyszczepionkowych [24]. Odmowa szczepień dzieci przez rodziców z powodów pozamedycznych mogła być jedną z przyczyn epidemii krztusca w Kalifornii w 2010 r., podczas której zarejestrowano ponad 9 tys. zachorowań, a więc najwięcej od 1947 r. [56].

Badania genetyczne wykazały, że krążące w populacji szczepy *B. pertussis* różnią się od szczepów stosowanych do produkcji szczepionek przeciw krztuścowi [2,61,63,64,65,91] (ryc. 1). Wśród obecnie krążących pałeczek krztusca coraz częściej pojawiają się szczepy o odmiennych w stosunku do szczepów szczepionkowych profilach PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), allelach kodujących istotne z punktu widzenia immunogenności czynniki zjadliwości: podjednostkę S1 toksyny krztuścowej (*ptxA*), pertaktynę (*prn*), fimbrie typu 2 i 3 (*fim2*, *fim3*), czy też szczepy zawierające swoistą mutację w promotorze toksyny krztuścowej (*ptxP3*), predysponującą do jej zwiększonej ekspresji [62]. Wyniki badań epidemiologicznych oraz z użyciem zwierząt doświadczalnych potwierdzają, że obserwowane zmiany adaptacyjne mogą wpływać na obniżenie efektywności szczepień oraz wzrost zachorowań na krztusiec [2,31,44,61,62].



Ryc. 1. Różnice w profilu PFGE, *ptxP* oraz wariantach antygenów szczepionkowych pomiędzy krążącymi szczepami *B. pertussis* a szczepami stosowanymi do produkcji szczepionek wP i aP. Opracowano na podstawie [2,63,64,65,91]; pogrubiona czcionka – szczepy występujące w nadal stosowanej w Polsce szczepionce wP; ^a – tylko w szwedzkiej szczepionce wP, która w 1996 r. została zastąpiona szczepionką aP; ^b – tylko w holenderskiej szczepionce wP, która w 2005 r. została zastąpiona szczepionką aP

W ostatnim czasie, niepokój środowiska naukowego skupia się na rosnącej liczbie przypadków izolacji szczepów *B. pertussis* niewytwarzających pertaktyny (Prn) oraz rzadziej - szczepów niewytwarzających innych antygenów wchodzących w skład powszechnie stosowanych szczepionek przeciw krztuścowi. Przypuszcza się, że pojawienie się tego rodzaju fenotypów *B. pertussis* może być kolejnym mechanizmem adaptacyjnym bakterii. Nowy mechanizm może mieć szczególne znaczenie w przypadku stosowania szczepionek bezkomórkowych (aP – acellular pertussis vaccine), które w przeciwieństwie do szczepionek całokomórkowych (wP – whole-cell pertussis vaccine), zawierają zaledwie kilka antygenów i indukują węższy zakres odporności. W zależności od preparatu, szczepionki aP zawierają 1-5 antygenów: monowalentne zawierają Ptx, diwalentne – Ptx i FHA, triwalentne - Ptx, FHA i Prn, pentawalentne – Ptx, FHA, Prn, Fim2 i Fim3 (tabela 1).

Szczepionki wP, z powodu tego, że są zawiesinami zabitych komórek *B. pertussis* – zawierają wszystkie poznane i dotychczas niezidentyfikowane antygeny. Antygeny znajdujące się w szczepionkach wP są, w porównaniu do antygenów szczepionek aP, słabiej oczyszczone i występują w mniejszym stężeniu. Za pomocą elektroforezy

2D i Western-blot w szczepionkach wP zidentyfikowano około 30 białek immunogennych dla ludzi, w tym: Prn, BrkA (serum resistance protein), białko opiekuńcze GroEL, poryny OmpP i OmpQ, białka o immunogenności wykazanej wcześniej u innych patogenów oraz nowe białka, dla których immunogenność wykazano po raz pierwszy [100]. Istotnym składnikiem szczepionek wP jest LOS, którego obecność, choć wiąże się z reaktogennością szczepionek wP, decyduje w dużym stopniu o ich właściwościach immunogennych i adiuwantowych.

Jak dotąd, wśród opisanych izolatów niewytwarzających czynników zjadliwości zidentyfikowano szczepy *B. pertussis* niezdolne do wytwarzania antygenów stosowanych w szczepionkach aP i wP: pertaktyny (Prn), toksyny krztuścowej (Ptx), hemaglutyniny włóknikowej (FHA), fimbrii (Fim) oraz czynnika kolonizacji tchawicy (Tcfa) – antygeny wchodzącego w skład szczepionek wP (tabela 2).

W artykule, na podstawie piśmiennictwa z ostatnich dwóch dekad, przedstawiono charakterystykę izolatów *B. pertussis*, które nie są zdolne do wytwarzania ww. czynników zjadliwości oraz ich potencjalne znaczenie w epidemiologii krztuśca.

Tabela 1. Charakterystyka jakościowa i ilościowa aktualnie stosowanych szczepionek przeciw krztuścowi

Rodzaj szczepionki	Przeznaczenie	Profilaktyka chorób	Nazwa handlowa	Skład					
				Ptx (µg)	FHA (µg)	Prn (µg)	Fim 2, 3 (µg)		
Bezkomórkowe	Szczepienia podstawowe u dzieci	DTaP	DTaP szczepionka SSI ^a	40	-	-	-		
			Infanrix DTPa	25	25	8	-		
			Tripacel	10	5	3	5		
			DTaP-IPV	Quadracel	10	5	3	5	
			DTaP-IPV+Hib	Infanrix IPV+Hib	25	25	8	-	
			Pentaxim	25	25	-	-		
		DTaP IPV+Hib+HBV	Hexacima	25	25	-	-		
			Infanrix hexa	25	25	8	-		
			Szczepienia przypominające u młodzieży i dorosłych	dTAp	Adacel	2,5	5	3	5
					Boostrix	8	8	2,5	-
				dTAp-IPV	Tdap szczepionka SSI	20	-	-	-
					Boostrix Polio	8	8	2,5	-
Całokomórkowe	Szczepienia podstawowe u dzieci	DTwP	DTP ^b	Trzy szczepy <i>B. pertussis</i> 186/65, 606/77, 629/65; do 20 mld komórek <i>B. pertussis</i> /dawkę					

^a – monowalentna szczepionka przeciw krztuścowi stosowana w Danii; ^b – całokomórkowa szczepionka przeciw krztuścowi stosowana w Polsce; DTPa – szczepionka przeciw błonicy, tężcowi, krztuścowi – bezkomórkowa (Diphtheria-Tetanus-Pertussis acellular); DTwP – szczepionka przeciw błonicy, tężcowi, krztuścowi – całokomórkowa (Diphtheria-Tetanus-Pertussis whole-cell); IPV: szczepionka przeciw poliomyelitis – inaktywowana (Inactivated Polio Virus); Hib – szczepionka przeciw zakażeniom wywołanym przez *H. influenzae* typ b; HBV – szczepionka przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby typu B (Hepatitis B virus); Ptx – toksyna krztuścowa (Pertussis toxin); FHA – hemaglutynina włóknikowa (Filamentous Haemagglutinin); Prn – pertaktyna (Pertactin); Fim 2, 3 – fimbrie typu 2, 3 (Fimbriae 2, 3)

Tabela 2. Charakterystyka izolatów niewytwarzających antygenów szczepionkowych

Fenotyp	Występowanie	Rodzaj mutacji	Właściwości mutantów
Prn ⁻	Francja Finlandia Norwegia Holandia Szwecja Włochy Wielka Brytania Izrael Kanada USA Japonia Australia	insercja IS481 lub IS1002 delecja całego/fragmentu genu <i>prn</i> STOP kodon inwersja promotora <i>prn</i> tranzycja w promotorze <i>prn</i> insercja G do homopolimerycznej sekwencji poli G i przesunięcie się ramki odczytu (mechanizm zmienności fazowej) niezidentyfikowane mutacje występujące poza <i>prn</i>	wywołują zakażenia z typowymi objawami krztuśca zdolne do transmisji u ludzi letalne u myszy po zakażeniu donosowym cytotoksyczne w badaniach <i>in vitro</i> inwazyjne w badaniach <i>in vitro</i>
Ptx ⁻	Francja USA	delecja operonu <i>ptx-ptl</i>	izolowane od chorych z typowymi objawami krztuśca nieletalne u myszy po zakażeniu donosowym cytotoksyczne w badaniach <i>in vitro</i> inwazyjne w badaniach <i>in vitro</i>
FHA ⁻	Francja	kodon STOP	letalne u myszy po zakażeniu donosowym obniżona zdolność do kolonizacji tchawicy (lecz nie płuc) u myszy niższa inwazyjność szczepu FHA ⁻ Prn ⁻ w porównaniu do szczepu referencyjnego Tohama I cytotoksyczne w badaniach <i>in vitro</i>
Fim ⁻	Japonia Kanada	brak danych	mutant typu knock-out: słaba kolonizacja tchawicy, nosogardzieli u myszy
TcfA ⁻	Belgia Holandia Wielka Brytania USA	delecja genu <i>tcfA</i> insercja/delecja G w obrębie homopolimerycznej sekwencji poli G i przesunięcie się ramki odczytu (mechanizm zmienności fazowej)	obniżona zdolność do kolonizacji tchawicy (lecz nie płuc) u myszy

IZOLATY NIETYWARZAJĄCE PERTAKTYNY

Zdecydowana większość mutantów niewytwarzających antygenów szczepionkowych dotyczy izolatów pertaktynoujemnych (Prn⁻). Pertaktyna jest białkiem strukturalnym zewnętrznej błony komórkowej *B. pertussis* należącym do rodziny autotransporterów. Prawdopodobnie pełni funkcję adhezyny, na co wskazuje obecność motywu RGD (Arg-Gly-Asp), który w innych białkach pozwala na wiązanie integryn komórek gospodarza [49,55]. Ponadto, Prn ma właściwości immunomodulacyjne, umożliwiające obniżenie zdolności neutrofilów do skutecznego zniszczenia bakterii [40,85]. Prn ze względu na wysoko immunogenne właściwości wchodzi w skład większości powszechnie stosowanych w krajach rozwiniętych szczepionek aP. Wykazano, że szczepionki aP, które zawierają Prn, w porównaniu do szczepionek pozbawionych tego antygeny, są skuteczniejsze w klinicznej ochronie przed zachorowaniem [59,67]. Przeciwciała przeciw-Prn odgrywają główną rolę w procesie fagocytozy *B. pertussis* [39], a ich poziom w niektórych badaniach z udziałem ludzi korelował z ochroną przed zachorowaniem na krztusiec [30].

O istotnym znaczeniu Prn w indukowaniu odpowiedzi immunologicznej przeciw pałeczkom krztuśca świadczy również wykryty w latach 90 ub.w. polimorfizm pertaktyny – zjawiska uznawanego za potencjalny mechanizm ucieczki drobnoustroju przed poszczepienną odpowiedzią immunologiczną [63]. Polimorfizm Prn dotyczy głównie insercji/delecji powtarzających się motywów (GGXXP)_n, (PQP)_n zlokalizowanych, odpowiednio: w regionie R1 i R2 białka [63]. Dotąd wykryto 13 wariantów Prn [63]. Badania przeprowadzone na modelu mysim wykazały, że zmienność w obrębie pertaktyny może obniżać skuteczność szczepień przeciw krztuścowi [45] oraz zwiększać zdolność bakterii do kolonizacji układu oddechowego [93].

W najnowszych badaniach wykazano pojawienie się szczepów *B. pertussis* niewytwarzających Prn we Francji [7,37], Finlandii [4,99], Holandii [99], Norwegii [99], Szwecji [99], Włoszech [54], Wielkiej Brytanii [79], Izraelu [3], Kanadzie [90], USA [11,71,72,73,88], Australii [48] oraz Japonii [60,68] (tabela 2). W większości zidentyfikowanych izolatów, brak ekspresji Prn nie był wynikiem ekspansji pojedynczego klonu, lecz konsekwencją powstania niezależnych mutacji. Dotychczas opisano

następujące mechanizmy mutacji determinujących fenotyp Prn⁻:

- insercja fragmentu IS481 lub IS1002 w genie kodującym pertaktynę [7,11,37,48,68,72,73,88,90,99];
- delecja całego genu *prn* lub jego różnej długości fragmentów, w tym sekwencji sygnałowej Prn [4,7,11,48,68,79,88,99];
- pojawienie się kodonu STOP w miejscu powodującym przedwczesne zakończenie syntezy białka [48,71,72,73,88,90,99];
- insercja guaniny do homopolimerycznego fragmentu poliG prowadząca do odwracalnego przesunięcia ramki odczytu w mechanizmie zmienności fazowej [48,71];
- inwersja części promotora *prn* [11,71,99];
- tranzycja G→A w pozycji -162 promotora uniemożliwiająca transkrypcję *prn* [90];
- dotychczas niezidentyfikowane mutacje, występujące poza promotorem oraz fragmentem kodującym *prn* [71,90].

Wpływ utraty zdolności syntezy Prn na transmisję, patogenезę *B. pertussis* oraz skuteczność szczepień przeciw krztuścowi pozostaje nadal nie do końca wyjaśniony. Infekcje wywoływane przez izolaty Prn⁻ u noworodków oraz dzieci <6 miesiąca życia, przebiegały z typowymi objawami kaszlu napadowego i nie różniły się od infekcji powodowanych przez szczepy Prn⁺ [5]. Podobnie w retrospektywnych badaniach przeprowadzonych w USA nie wykazano wyraźnych różnic w przebiegu klinicznym krztuśca u dzieci <6 miesiąca życia oraz w starszych grupach wiekowych, poza częstszym bezdechem u chorych zakażonych izolatami Prn⁻ [53]. Jednak wyniki badań efektywności zakażenia izolatami Prn⁻ na modelu mysim mogą wskazywać na ich obniżoną zjadliwość u osobników dorosłych. Szczepy Prn⁻ charakteryzowały się brakiem zdolności skutecznego namnażania się w płucach myszy dorosłych, w porównaniu do osobników młodych. Wyniki tych badań sugerują możliwość występowania zwiększonej liczby przypadków zakażeń bezobjawowych u osób dorosłych, tak trudnych do identyfikacji w nadzorze epidemiologicznym [7]. Mimo że pertaktyna jest uznawana za jedną z głównych adhezyn *B. pertussis*, w większości dotychczas przeprowadzonych badań, jej utrata nie została powiązana z obniżeniem zdolności bakterii do adhezji i wewnątrzkomórkowego zakażenia komórek ssaków [25,85]. Badania *in vitro* na liniach komórkowych J774-A1 i HTE oraz *in vivo* na modelu mysim wykazały, że izolaty Prn⁻ *B. pertussis*, w stosunku do Prn⁺ charakteryzowały się zwiększoną zdolnością do wewnątrzkomórkowego zakażenia, podobną cytotoksycznością oraz letalnością LD₅₀ [7,37,85]. Jednak należy zaznaczyć, że fenotyp Prn⁻, prawdopodobnie, nie jest jedynym czynnikiem predys-

ponującym do zwiększonej inwazyjności bakterii, ponieważ wykazywały ją również aktualnie krążące we Francji szczepy o fenotypie Prn⁺ [10]. Stosunkowo wysoki odsetek izolatów Prn⁻ wśród francuskiej [37], norweskiej [99], kanadyjskiej [90], australijskiej [48], izraelskiej [3], japońskiej [68] i amerykańskiej [71] populacji szczepów *B. pertussis*, jak również francuskiej populacji szczepów *B. parapertussis* [8] sugeruje, że brak syntezy Prn nie wpłynął negatywnie na przeżywalność bakterii w populacjach o wysokim poziomie zaszczepienia przeciw krztuścowi. Izolaty Prn⁻ zachowały zdolność do transmisji wśród ludzi, o czym świadczą dane epidemiologiczne z: 1) Francji, gdzie w 2005 r. wśród wyizolowanych szczepów *B. pertussis* zidentyfikowano 2% mutantów, podczas gdy siedem lat później aż 13% [37]; 2) Australii, gdzie w 2 stanach, w okresie 2008-2012, częstość występowania mutantów wzrosła z około 10% do 78% [48]; 3) Stanach Zjednoczonych, gdzie izolaty Prn⁻ w 2012 r. stanowiły 53% wszystkich izolatów *B. pertussis* zgromadzonych przez CDC (Centers for Disease Control and Prevention) [71]; 4) Izraelu, gdzie w latach 2005-2006 wykryto 6,6% izolatów Prn⁻, a w latach 2013-2014 już pięć razy więcej [3]. W badaniach retrospektywnych przeprowadzonych we Francji, potwierdzono skuteczną transmisję izolatów Prn⁻ wśród osób z pojedynczego gospodarstwa domowego [5]. Zwiększanie się częstości występowania mutantów Prn⁻ wśród aktualnie izolowanych szczepów *B. pertussis*, może wynikać z wytwarzania przez pałeczki krztuśca innych białek, które mogą rekompensować utratę ekspresji *prn* [37].

IZOLATY NIEWYTWARZAJĄCE TOKSYNY KRZTUŚCOWEJ

Toksyna krztuścowa (Ptx) jest uważana za jeden z głównych czynników zjadliwości *B. pertussis*, należy do toksyn o budowie typu AB. Podjednostka enzymatyczna S1 toksyny krztuścowej jest ADP-rybozylotransferaza, która inaktywując białka Gi/o doprowadza do niekontrolowanego wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego cAMP i tym samym do zakłóceń przekaźnictwa sygnałów w komórkach gospodarza [25,55]. Następstwa fizjologiczne aktywności Ptx są uzależnione od typu komórek eukariotycznych i mogą się objawiać m.in. uczuleniem na histaminę, wzrostem sekrecji insuliny czy limfocytozą [51]. Ponadto, Ptx może wykazywać działanie immunosupresyjne wobec określonych szlaków indukcji odporności wrodzonej i nabytej [12,13,15,16,84].

Toksyna krztuścowa jest uznawana za podstawowy i najważniejszy składnik szczepionek aP. Ptx jest silnym immunogenem, który przy braku innych antygenów, może indukować powstawanie odpowiedzi immunologicznej zdolnej do ochrony przed zachorowaniem na krztuśca [89]. W badaniach na modelu mysim przeciwciała przeciw-Ptx zapewniały zwierzętom odporność na eksperymentalne zakażenie *B. pertussis* drogą domową i oddechową [76,77]. Antygen ten ma także właściwości adiuwantowe [55]. Najbardziej immunogenną a zarazem polimorficzną podjednostką Ptx jest podjednostka enzymatyczna S1 (PtxA). Dotychczas, opisano 5

wariantów PtxA, z których PtxA1 i PtxA2 charakteryzują się zwiększoną częstością występowania [63]. Badania na modelu mysim wskazują, że zmienność w obrębie PtxA może być jedną z przyczyn obniżenia skuteczności szczepień przeciw krztuścowi prowadzącej do wzrostu światowych zachorowań na krztusiec [31,46].

Dotychczas szczepy niewytwarzające Ptx, w porównaniu ze szczepami Prn⁻, były izolowane sporadycznie (tabela 2). W ciągu ostatniej dekady, opisano jedynie dwa przypadki zakażeń wywołanych przez szczepy o fenotypie Ptx⁻ oraz jeden przypadek zakażenia szczepem o fenotypie Ptx⁻Prn⁻ [7,37,97]. Szczepy Ptx⁻ zostały wyizolowane we Francji, 7 i 9 lat po wprowadzeniu dawki przypominającej szczepienia szczepionką aP, natomiast szczep Ptx⁻Prn⁻ - w USA, około 20 lat po wprowadzeniu szczepionki aP. Jak dotąd, mechanizm mutacji odpowiedzialny za brak syntezy Ptx został wyjaśniony u dwóch szczepów - w obu przypadkach jego podstawą była delekcja operonu *ptx-ptl*, zawierającego m.in. geny kodujące wszystkie pięć podjednostek Ptx oraz geny odpowiedzialne za sekrecję antygeny [7,97]. Oba szczepy wyizolowano od niezaszczepionych niemowląt, wykazujących charakterystyczne dla krztuśca objawy kliniczne. Opisane wyżej obserwacje objawów klinicznych wraz z obserwacjami obrazów klinicznych zakażeń wywołanych szczepami *B. paraptussis*, po raz kolejny potwierdzają, że toksyna krztuścowa nie jest jedynym czynnikiem odpowiedzialnym za powstanie kaszlu napadowego. Dodatkowe badania izolatów Ptx⁻ wykazały, że nie utraciły zdolności do indukowania apoptozy makrofagów i wnikania do ludzkich komórek nabłonka tchawicy [7,37]. Jednak mutanty Ptx⁻ były niezdolne do namnażania się w płucach myszy i wywoływania efektu letalnego u myszy eksperymentalnie zakażonych drogą donosową [7].

IZOLATY NIEWYTWARZAJĄCE HEMAGLUTYNINY WŁÓKIEKOWEJ

Hemaglutynina włókienkowa (FHA) jest wielkocząsteczkowym białkiem odgrywającym istotną rolę zarówno w patogenezie bakterii, jak i indukcji odpowiedzi immunologicznej przeciw *B. pertussis*. Zawiera trzy rodzaje domen (HBD – Heparin Binding Domain; CRD – Carbohydrate Recognition Domain; RGD – Arg-Gly-Asp), które wiążą bakterie do różnych typów komórek eukariotycznych oraz zewnątrzkomórkowych struktur nabłonka układu oddechowego [52]. Poza adhezją, FHA uczestniczy we wnikaniu bakterii do wnętrza makrofagów i komórek nabłonka [41], wykazuje właściwości immunomodulujące (wpływa na sekrecję pro-, przeciwzapalnych cytokin i aktywację NF-κB) oraz pełni istotną rolę w procesie tworzenia biofilmu [1,15,80]. Hemaglutynina włókienkowa, po toksynie krztuścowej, jest najczęściej występującym składnikiem szczepionki aP. Wykazano, że przeciwciała przeciw-FHA chronią przed zachorowaniem na krztusiec ludzi oraz skutecznie eliminują zakażenie pałeczkami krztuśca u eksperymentalnie zakażanych myszy [14,33,81]. Jednak znane są również wyniki badań, które nie potwierdzają związku między

poziomem przeciwciał przeciw-FHA a ochroną przeciw *B. pertussis* u ludzi i zwierząt [19,76,87].

Dotychczas na świecie zidentyfikowano dwa mutanty niewytwarzające hemaglutyniny włókienkowej (tabela 2). Oba zidentyfikowano we Francji - jeden przed wprowadzeniem szczepień przeciw krztuścowi, drugi po wprowadzeniu szczepień z zastosowaniem szczepionki aP [37]. W przypadku pierwszego szczepu, przyczyną utraty zdolności wytwarzania FHA było pojawienie się kodonu STOP w obrębie genu *fhaB*, w przypadku drugiego - prawdopodobnie, pojawienie się sekwencji insercyjnej w genie *fhaB* [10]. Szczep pochodzący z okresu po wprowadzeniu szczepień z zastosowaniem szczepionki aP był podwójnym mutantem, który utracił możliwość wytwarzania zarówno FHA, jak i Prn. Badania przeprowadzone *in vitro* na liniach komórkowych oraz *in vivo* u zwierząt wykazały, że oba izolaty pozostały cytotoksyczne dla makrofagów oraz letalne dla myszy po eksperymentalnym zakażeniu donosowym [37]. Wykazano także, że szczep FHA⁻Prn⁻ charakteryzował się mniejszą inwazyjnością wobec komórek HTE w porównaniu z inwazyjnością szczepu referencyjnego Tohama [10]. Badania *B. pertussis* z doświadczalnie wyłączonym genem *fhaC*, zaangażowanym w sekrecję FHA, wykazały, że fenotyp FHA⁻ miał obniżoną zdolność do kolonizacji tchawicy, lecz nie płuc u myszy [27,96]. Interesujących danych dotyczących szczepów FHA⁻ dostarczyła analiza transkryptomów różnych izolatów *B. pertussis*, według której bakterie o fenotypie FHA⁻ w przeciwieństwie do szczepów FHA⁺ cechowały się zwiększoną ekspresją genów kodujących podstawowe czynniki zjadliwości (PtxA, Prn, ACT) [10]. Natomiast tego typu różnic nie zaobserwowano między szczepami Prn⁻ i Prn⁺.

IZOLATY NIEWYTWARZAJĄCE FIMBRII

Fimbrie, zwane również pili typu I, są zbudowane ze spolimeryzowanych podjednostek głównych Fim2 lub Fim3 oraz znajdującej się na ich szczycie podjednostki mniejszej FimD [55]. Wiele szczepów *Bordetella* zawiera również geny kodujące inne podjednostki główne (FimX, FimN, FimA), jednak ich produkty dotychczas nie zostały zidentyfikowane [78]. Typ podjednostki głównej fimbrii określa serotyp *B. pertussis*: Fim2, Fim3 albo Fim2,3. Obecnie, w wielu krajach o wysokim poziomie zaszczepienia przeciw krztuścowi dominuje serotyp Fim3. Podjednostki główne fimbrii są kodowane przez geny *fim2* i *fim3*, podlegające regulacji przez system BvgAS oraz mechanizm zmienności fazowej, polegający na zmianie długości homopolimerycznych powtórzeń poliC w promotorach obu genów [55]. Oba geny kodujące Fim2 i Fim3 wykazują niewielki polimorfizm. Dotychczas zidentyfikowano 2 allele *fim2* i 5 alleli *fim3* [63,83]. Fimbrie prawdopodobnie uczestniczą w kolonizacji nabłonka oddechowego oraz modulowaniu odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Podjednostki główne oraz podjednostka mniejsza Fim zawierają regiony wiążące heparynę, które przyłączają się do zewnątrzkomórkowej macierzy nabłonka oddechowego oraz fibronektyny

[27,28]. Ponadto, podjednostka FimD przyłącza się do VLA-5 makrofagów, co stymuluje wytwarzanie integryny CR3 - receptorów FHA [55]. Fimbrie wykazują właściwości przeciwpalnicze i hamują zabijanie bakterii przez makrofagi w płucach [55]. Ze względu na właściwości immunogenne fimbrie są istotnym składnikiem szczepionek wP i niektórych szczepionek aP [19,57,74,87]. Badania kliniczne wykazały, że obecność Fim2 oraz Fim3 w szczepionkach aP, zwiększa ich skuteczność w porównaniu ze szczepionkami niezawierającymi fimbrii [67].

Dotychczas opisano trzy izolaty o fenotypie Fim⁻, niewytwarzające Fim2 i Fim3, dwa z nich pochodzą z Japonii, jeden z Kanady [60,83]. Bakterie wyizolowano w okresie powszechnego stosowania szczepień aP. Przyczyny występowania fenotypu Fim⁻ nie zostały dotychczas wyjaśnione. Nie wiadomo, czy brak wytwarzania fimbrii wynikał z czasowego wyłączenia ekspresji genów w mechanizmie zmienności fazowej, czy też był konsekwencją mutacji powodujących stałą inaktywację ekspresji *fim2* i *fim3*. Uwzględniając to, że fimbrie uczestniczą w kolonizacji dróg oddechowych i modulowaniu odpowiedzi immunologicznej gospodarza, zagadkowy pozostaje także wpływ fenotypu Fim⁻ na transmisję i patogenność *B. pertussis*. Badania *in vivo* z użyciem szczepów *B. pertussis* z doświadczalnie wyłączoną syntezą fimbrii wskazują na utratę zdolności bakterii do efektywnej kolonizacji tchawicy i nosogardzieli [27,55] oraz nasiloną w porównaniu do szczepów dzikich reakcję zapalną gospodarza na zakażenie [96].

IZOLATY NIETYWARZĄCE CZYNNIKA KOLONIZACJI TCHAWICY

Czynnik kolonizacji tchawicy jest unikatowym auto-transporterem *B. pertussis*, który nie występuje u blisko spokrewnionych gatunków *B. parapertussis* i *Bordetella bronchiseptica* [26]. Cechą charakterystyczną TcfA jest duża zawartość proliny w łańcuchu polipeptydowym oraz obecność motywu RGD. Podczas zakażenia, TcfA uczestniczy w kolonizacji nabłonka tchawicy [51]. Prawdopodobnie, TcfA jest antygenem zaangażowanym w powstawanie ochronnej odpowiedzi immunologicznej przeciw pałeczkom krztuśca, za czym może przemawiać wysoki stopień polimorfizmu kodującego go genu – *tcfA* [61].

Izolaty *B. pertussis*, które nie wytwarzały czynnika kolonizacji tchawicy opisano w Belgii, Wielkiej Brytanii, Holandii i USA, a więc w krajach z długą historią szczepień wP [69,92,91] (tabela 2). Ich występowanie, podobnie jak w przypadku izolatów Prn⁻, nie było spowodowane rozpowszechnieniem się klonów TcfA⁻, lecz pojawieniem się mutacji w obrębie różnych linii *B. pertussis* [92]. Do mutacji odpowiedzialnych za fenotyp TcfA⁻ zalicza się: delecję genu *tcfA* oraz insercję/delecję pojedynczego nukleotydu G w obrębie homopolimerycznej sekwencji poliG, co powoduje przesunięcie ramki odczytu *tcfA* i przedwczesne zakończenie syntezy białka [92,95]. Drugi typ mutacji jest związany z występowaniem zmienności fazowej *B. pertussis*, czyli może, przez włączenie/

wyłączenie ekspresji genów, łatwo ulec rewersji [29]. Wpływ utraty zdolności wytwarzania TcfA na wirulencję *B. pertussis* nie został jeszcze poznany, jednak wyniki badań *in vivo* z udziałem zwierząt sugerują, że synteza tego antygeny może mieć znaczenie dla przeżywalności bakterii. Finn i Stevens [26] wykazali, że mutant *tcfA* 10 razy słabiej kolonizował tchawicę w porównaniu ze szczepem dzikim, natomiast był równie efektywny w kolonizacji płuc. Jednak brak syntezy TcfA przez blisko spokrewnione gatunki *B. parapertussis* i *B. bronchiseptica*, może świadczyć o tym, że jego utrata u *B. pertussis* może być kompensowana przez inne białka [92].

PRESJA SZCZEPIEN A WYSTĘPOWANIE IZOLATÓW NIETYWARZĄCYCH ANTYGENÓW SZCZEPIONKOWYCH

B. pertussis, podobnie jak *B. parapertussis*, jest patogenem, który wyewoluował z *Bordetella bronchiseptica*. Ewolucja *B. pertussis* była związana z utratą dużej części materiału genetycznego (ponad 1Mpz) oraz powstaniem wielu pseudogenów (9,4%) [23,70]. W obrębie usuniętych lub inaktywowanych genów znalazły się m.in. *loci* odpowiedzialne za transport błonowy, metabolizm niskocząsteczkowych substancji, regulację ekspresji genów oraz syntezę struktur powierzchniowych. Utrata wielu genów mogła być następstwem adaptacji bakterii do nowego gospodarza lub braku skutecznej presji selekcyjnej dla ich zachowania. Przyczyną utraty wielu genów była aktywność sekwencji insercyjnych (IS). IS są obecne w genomie *B. pertussis* w dużej liczbie, przy czym najbardziej ekspansywną jest IS481 – sekwencja, która w referencyjnym szczepie *B. pertussis* Tohama I, występuje 238 razy [70]. Badania genomów bakterii wyizolowanych na przestrzeni kilku ostatnich dziesięcioleci wykazały, że utrata materiału genetycznego była procesem ciągłym, obejmującym także współczesną populację *B. pertussis* [9,38,45]. Krążące obecnie izolaty zawierają więcej sekwencji insercyjnych niż izolaty pochodzące z okresu przed wprowadzeniem szczepień przeciw krztuścowi [9,43]. Wskazuje to, że gatunek ten nieustannie ewoluje i stale podlega zmianom adaptacyjnym. Utrata materiału genetycznego u *B. pertussis* zdarza się niezależnie od regionu pochodzenia izolatów oraz poziomu zaszczepienia przeciw krztuścowi badanej populacji [45]. Jednak w krajach o wysokim poziomie zaszczepienia przeciw krztuścowi, obecność presji selekcyjnej w postaci odpowiedzi immunologicznej wzbudzonej szczepieniami może być istotnym czynnikiem wpływającym na kierunek obserwowanych zmian genetycznych. Przypuszcza się, że wieloletnie, masowo prowadzone szczepienia doprowadziły do pojawienia się nowych szczepów *B. pertussis* o obniżonej wrażliwości na działanie odpowiedzi immunologicznej indukowanej przez stosowanie szczepień (tzw. *escape mutants*). Przemawiają za tym szeroko opisywane zmiany, jakie zaszły w ciągu dwóch ostatnich dekad w strukturze genetycznej *B. pertussis*, a które obejmowały nasilenie się istotnego z punktu widzenia odpowiedzi immunologicznej polimorfizmu alleli genów kodujących wiele białek oraz mutację promotora toksyny krztuścowej, prowadzącą do zwiększenia jej syn-

tezy [31,46,61,62,64,93]. Podobne znaczenie mogą mieć mutacje prowadzące do zahamowania syntezy antygenów wchodzących w skład stosowanych szczepionek przeciw krztuścowi.

Utrata zdolności ekspresji pewnych immunogenów szczepionkowych wydaje się mieć szczególne znaczenie dla adaptacji bakterii do odpowiedzi immunologicznej wzbudzonej w populacji przez stosowanie szczepionek bezkomórkowych. Ze względu na to, że szczepionki całokomórkowe indukują odpowiedź immunologiczną przeciw wielu antygenom, wyłączenie ekspresji jednego z nich może mieć niewielki wpływ na wzrost przeżywalności bakterii. W przypadku presji selekcyjnej w postaci powszechnego stosowania szczepionek aP, które zawierają 1-5 antygenów indukują wąski zakres odpowiedzi immunologicznej, utrata ekspresji choćby jednego z antygenów szczepionkowych może znacząco zwiększyć przeżywalność bakterii. Pojawienie się izolatów niewytwarzających antygenów szczepionkowych może być wynikiem zastąpienia szczepionek wP szczepionkami aP.

Hipotezę potwierdzają dane na temat częstości izolacji bakterii niewytwarzających pertaktyny na świecie [4,7,37,68,72]. Większość opisanych mutantów Prn⁻ została wyizolowana w okresie, w którym rutynowo stosowano szczepionki aP zamiast wP. Zaobserwowano, że wraz z wydłużaniem się czasu powszechnego stosowania szczepionek aP, tj. presji indukowanej z ich udziałem, wzrósł udział izolatów Prn⁻ w populacji *B. pertussis* [3,37,48,68,71]. Za przedstawioną hipotezę przemawia również to, że w Rosji [47] i Senegalu [66], krajach nadal powszechnie stosujących szczepionki wP oraz w Danii [99], kraju stosującym szczepionkę aP zawierającą jedynie Ptx, dotychczas nie zidentyfikowano izolatów Prn⁻. Jednak, wzrost częstości występowania izolatów Prn⁻ również wśród pałeczek *B. parapertussis*, teoretycznie niepodlegających presji selekcyjnej szczepionek aP, zaobserwowany we Francji, może sugerować, że mutacje Prn⁻ mogą być skutkiem naturalnej ewolucji bakterii, która może być wzmacniana przez aktualny status immunologiczny populacji bardziej niż przez samą presję selekcyjną związaną ze stosowaniem szczepionek aP [36]. Ponadto, najnowsze dane z ostatniej epidemii krztuśca w Japonii [60] oraz z 2014 r. z Francji wykazały spadek częstości występowania izolatów Prn⁻ w stosunku do lat poprzednich [36]. Jest to zastanawiające, jeśli przyjmujemy, że brak wytwarzania tego antygeny w warunkach powszechnego stosowania szczepień zwiększa przewagę selekcyjną mutantów Prn⁻ nad szczepami dzikimi. Aby w pełni zrozumieć związek między szczepionkami aP a powstaniem izolatów Prn⁻ należy przeprowadzić szersze badania obejmujące izolaty pochodzące z krajów stosujących różne strategie szczepień, pochodzące sprzed okresu stosowania szczepionek aP oraz obserwować aktualne trendy dotyczące występowania mutantów Prn⁻.

W przeciwieństwie do izolatów Prn⁻, pałeczki krztuśca niewytwarzające pozostałych antygenów wchodzą-

cych w skład szczepionek aP (Ptx, FHA lub Fim) były izolowane sporadycznie. Według Hegerle i Guiso [36] przyczyny tego stanu rzeczy mogą być następujące:

- antygeny strukturalne błony komórkowej, tj. Prn i Fim, podlegają silniejszej presji immunologicznej niż antygeny wydzielane na zewnątrz komórki (Ptx, FHA);
- szczepienia z udziałem aP wywierają silniejszą presję selekcyjną na Prn niż Fim, ponieważ: (i) Prn występuje w szczepionkach aP 3- i 5-walentnych, podczas gdy Fim – jedynie w 5-walentnych; (ii) większość krążących obecnie izolatów *B. pertussis* ma Fim3, przeciw którym pentawalentne szczepionki aP indukują słabszą, w porównaniu do Fim2, odpowiedź immunologiczną.

Mimo rzadkiego występowania izolatów FHA⁻, Ptx⁻ lub Fim⁻ w krążącej populacji *B. pertussis* monitorowanie obecności tych antygenów wśród nowo izolowanych pałeczek krztuśca jest uzasadnione ze względu na rosnącą liczbę izolacji szczepów Prn⁻.

Wśród szczepów *B. pertussis* zidentyfikowano mutanty, które nie wytwarzały czynnika kolonizacji tchawicy. Antygen ten nie występuje w szczepionkach aP, co wyklucza ich rolę w zahamowaniu syntezy TcfA, a sugeruje możliwość wpływu presji z udziałem szczepionek wP lub też stale postępującą redukcję genomu *B. pertussis*. W krajach, w których wyizolowano szczepów TcfA⁻ przez ponad 40 lat stosowano szczepionki wP [92]. Ponadto czynnik kolonizacji tchawicy charakteryzuje się polimorficznością, co sugeruje, że odpowiedź immunologiczna na TcfA może wpływać na przeżywalność bakterii. W takim wypadku zahamowanie ekspresji TcfA, stałe (delecja genu *tcfA*) lub tymczasowe (mutacje homopolimerycznej sekwencji poliG), może być dla bakterii korzystne [92]. Ze względu na to, że w ostatnim czasie, większość rozwiniętych krajów, z wyjątkiem Polski, wprowadziła do powszechnych programów szczepień zamiast szczepionek wP szczepionki aP jest prawdopodobne, że częstość izolacji szczepów TcfA⁻ wśród krążących szczepów może się zmniejszać.

IZOLATY NIETYWARZĄCE ANTYGENÓW SZCZEPIONKOWYCH A EPIDEMIOLOGIA KRZTUŚCA

W krajach o wysokim poziomie zaszczepienia przeciw krztuścowi znajdują się dwie grupy osób o dużej podatności na zakażenie *B. pertussis*:

- niezaszczepione noworodki lub nie w pełni zaszczepione niemowlęta i dzieci oraz
- młodzież, osoby dorosłe i starsze z wygasającą poszczepienną odpowiedzią ochronną przeciw krztuścowi.

Ze względu na rosnącą liczbę doniesień na temat izolacji mutantów niewytwarzających pertaktyny szczególnie aktualne wydaje się postawienie pytania o ich znaczenie w epidemiologii krztuśca w grupach wiekowych

obarczonych dużym ryzykiem zachorowania. W wielu rozwiniętych krajach w ostatnich latach występowały epidemie krztuśca, w których doszło do wzrostu występowania izolatów Prn⁻ w porównaniu do lat poprzednich.

Pojawienie się izolatów niewytwarzających pertaktyny może stanowić mechanizm adaptacyjny bakterii umożliwiający skuteczniejsze zakażenie osób z wygasającą ochroną poszczepienną. Potencjalnie zwiększone krążenie tych mutantów wśród osób dorosłych z wygasającą ochroną poszczepienną może być źródłem zakażeń dla innych grup wiekowych, szczególnie noworodków i niemowląt. Możliwe, że utrata zdolności syntezy Prn, pozwala bakteriom na wcześniejsze zakażenie osób zaszczepionych. Może być to o tyle niebezpieczne, że odporność po szczepieniu szczepionkami aP jest zdecydowanie krótsza w porównaniu do odporności po szczepieniu szczepionkami wP. Badania kohortowe dzieci wykazały, że ryzyko zachorowania na krztusiec w ciągu całego ich życia było większe, kiedy pierwszą dawką szczepienia była szczepionka aP, a nie wP [50,82]. W ostatnich latach, we Francji i Japonii odsetek mutantów Prn⁻ wśród wszystkich izolatów *B. pertussis* wynosił, odpowiednio 13 i 26% [37,60], natomiast w Australii i Stanach Zjednoczonych 78 i 53% [48,71]. Tak częste występowanie izolatów Prn⁻ oraz wyniki badania retrospektywnego przeprowadzonego we Francji [5] sugerują, że mutanty te mogą być zdolne do skutecznej transmisji. Co więcej, wywołane przez nie objawy kliniczne krztuśca były podobne do objawów spowodowanych przez izolaty Prn⁺ [5,21,53], co sugeruje, że utrata zdolności syntezy Prn nie wpłynęła negatywnie na zjadliwość *B. pertussis*. Badania *in vitro* wykazały, że mutanty Prn⁻ były cytotoksyczne dla makrofagów w obecności przeciwciał przeciw-Prn [35] oraz efektywniej kolonizowały płuca myszy immunizowanych szczepionką aP [34,75]. Osoby zaszczepione przynajmniej jedną dawką szczepionki aP miały istotnie większe szanse zakażenia się izolatami Prn⁻ niż szczepami Prn⁺ [53].

Inną istotną kwestią wynikającą z występowania izolatów niewytwarzających antygenów szczepionkowych jest ich znaczenie w diagnostyce zakażeń krztuśca. W państwach, w których podstawą potwierdzeń przypadków podejrzanych o zachorowanie na krztusiec są badania serologiczne, oparte na oznaczaniu miana przeciwciał przeciw-Ptx, ewentualne rozprzestrzenienie się szczepów niewytwarzających toksyny krztuścowej może prowadzić do nieprawidłowego potwierdzania diagnozy klinicznej i do nieprawidłowej oceny zapadalności na

krztusiec [7]. Podobnie identyfikacja molekularna *B. pertussis* obejmująca m.in. wykrywanie promotora Ptx, w wyżej wymienionej sytuacji, może się przyczynić do błędów w nadzorze. Ze względu na rosnącą liczbę izolatów Prn⁻ uzasadnione jest stałe monitorowanie częstości występowania mutacji w obrębie innych antygenów oraz tych fragmentów genomu *B. pertussis*, które są celem diagnostyki molekularnej.

PODSUMOWANIE

Pojawienie się izolatów *B. pertussis* niewytwarzających Prn, Ptx, FHA, Fim lub TcFA, wywołało w środowisku naukowym debatę na temat ich znaczenia w epidemiologii oraz profilaktyce krztuśca na świecie. Cztery pierwsze białka są silnymi immunogenami wchodzącymi w skład szczepionek aP, natomiast TcFA jest jednym z wielu antygenów *B. pertussis* w sposób naturalny obecnych w szczepionkach wP. Przypuszcza się, że pojawienie się zmutowanych szczepów może być wynikiem działania presji odpowiedzi immunologicznej wzbudzonej szczepieniami przeciw krztuścowi. Bakterie, które utraciły zdolność do syntezy, co najmniej jednego z immunogenów szczepionkowych mogłyby, zatem potencjalnie wykazywać obniżoną wrażliwość na poszczepienną odpowiedź immunologiczną (tzw. *escape mutants*). Zwiększone krążenie takich mutantów może stanowić niekorzystną prognozę celowości kontynuacji szczepień z udziałem szczepionek aP, które zawierają jedynie 1-5 antygenów *B. pertussis* i indukują węższy zakres odpowiedzi immunologicznej niż szczepionki wP. Inne wyjaśnienie ich obecności w populacji *B. pertussis* zakłada, że utrata zdolności wytwarzania tych antygenów może być skutkiem naturalnej ewolucji bakterii.

Wśród wyizolowanych mutantów dotychczas dominował fenotyp Prn⁻. Częstość izolacji bakterii o fenotypie Prn⁻ w niektórych krajach skorelowano z długością okresu stosowania szczepionek aP. Objawy kliniczne krztuśca wywołanego przez izolaty Prn⁻ nie różniły się od objawów wywołanych przez izolaty Prn⁺.

Dokładne poznanie wpływu fenotypu Prn⁻ na wirulencję, patogenność, skuteczność transmisji bakterii oraz efektywność prowadzonych szczepień wymaga przeprowadzenia dalszych badań. Poznanie tych zagadnień może być istotne dla zrozumienia przyczyn wzrostu zachorowań na krztusiec na świecie i doprowadzić do opracowania zoptymalizowanych strategii poprawy profilaktyki krztuśca.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abramson T., Kedem H., Relman D.A.: Proinflammatory and proapoptotic activities associated with *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *Infect. Immun.*, 2001; 69: 2650-2658
- [2] Advani A., Hallander H.O., Dalby T., Krogfelt K.A., Guiso N., Njamkepo E., von Könning C.H., Riffelmann M., Mooi F.R., Sandven P., Lutyńska A., Fry N.K., Mertsola J., He Q.: Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Bordetella pertussis* isolates circulating in Europe from 1998 to 2009. *J. Clin. Microbiol.*, 2013; 51: 422-428
- [3] Bamberger E., Abu Raya B., Cohen L., Golan-Shany O., Davidson S., Geffen Y., Srugo I.: Pertussis resurgence associated with pertactin-deficient and genetically divergent *Bordetella pertussis* isolates in Israel. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2015; 34: 898-900
- [4] Barkoff A.M., Mertsola J., Guillot S., Guiso N., Berbers G., He Q.: Appearance of *Bordetella pertussis* strains not expressing the vaccine antigen pertactin in Finland. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2012; 19: 1703-1704
- [5] Bodilis H., Guiso N.: Virulence of pertactin-negative *Bordetella pertussis* isolates from infants, France. *Emerg. Infect. Dis.*, 2013; 19: 471-474
- [6] Bogdanowicz J.: Krztusiec. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1954
- [7] Bouchez V., Brun D., Cantinelli T., Dore G., Njamkepo E., Guiso N.: First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing pertussis toxin or pertactin. *Vaccine*, 2009; 27: 6034-6041
- [8] Bouchez V., Brun D., Dore G., Njamkepo E., Guiso N.: *Bordetella parapertussis* isolates not expressing pertactin circulating in France. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2011; 17: 675-682
- [9] Bouchez V., Caro V., Levillain E., Guigon G., Guiso N.: Genomic content of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in areas of intensive children vaccination. *PLoS One*, 2008; 3: e2437
- [10] Bouchez V., Hegerle N., Strati F., Njamkepo E., Guiso N.: New data on vaccine antigen deficient *Bordetella pertussis* isolates. *Vaccines*, 2015; 3: 751-770
- [11] Bowden K.E., Williams M.M., Cassiday P.K., Milton A., Pawloski L., Harrison M., Martin S.W., Meyer S., Qin X., DeBolt C., Tasslimi A., Syed N., Sorrell R., Tran M., Hiatt B., Tondella M.L.: Molecular epidemiology of the pertussis epidemic in Washington State in 2012. *J. Clin. Microbiol.*, 2014; 52: 3549-3557
- [12] Bradford P.G., Rubin R.P.: Pertussis toxin inhibits chemotactic factor-induced phospholipase C stimulation and lysosomal enzyme secretion in rabbit neutrophils. *FEBS Lett.*, 1985; 183: 317-320
- [13] Brandt S.J., Dougherty R.W., Lapetina E.G., Nidel J.E.: Pertussis toxin inhibits chemotactic peptide-stimulated generation of inositol phosphates and lysosomal enzyme secretion in human leukemic (HL-60) cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985; 82: 3277-3280
- [14] Cahill E.S., O'Hagan D.T., Illum L., Redhead K.: Mice are protected against *Bordetella pertussis* infection by intra-nasal immunization with filamentous haemagglutinin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1993; 107: 211-216
- [15] Carbonetti N.H.: Immunomodulation in the pathogenesis of *Bordetella pertussis* infection and disease. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2007; 7: 272-278
- [16] Carbonetti N.H., Artamonova G.V., Andreasen C., Dudley E., Mays R.M., Worthington Z.E.: Suppression of serum antibody responses by pertussis toxin after respiratory tract colonization by *Bordetella pertussis* and identification of an immunodominant lipoprotein. *Infect. Immun.*, 2004; 72: 3350-3358
- [17] Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Pertussis epidemic-Washington, 2012. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 2012; 61: 517-522
- [18] Cherry J.D.: Pertussis: challenges today and for the future. *PLoS Pathog.*, 2013; 9: e1003418
- [19] Cherry J.D., Gornbein J., Heining U., Stehr K.: A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine*, 1998; 16: 1901-1906
- [20] Chiappini E., Stival A., Galli L., de Martino M.: Pertussis re-emergence in the post-vaccination era. *BMC Infect. Dis.*, 2013; 13: 151
- [21] Clarke M., McIntyre P.B., Blyth C.C., Wood N., Octavia S., Sintchenko V., Giles L., Quinn H., Hill V., Hanly G., Lan R., Marshall H.S.: The relationship between *Bordetella pertussis* genotype and clinical severity in Australian children with pertussis. *J. Infect.*, 2016; 72: 171-178
- [22] de Gouw D., Diavatopoulos D.A., Bootsma H.J., Hermans P.W., Mooi F.R.: Pertussis: a matter of immune modulation. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2011; 35: 441-474
- [23] Diavatopoulos D.A., Cummings C.A., Schouls L.M., Brinig M.M., Relman D.A., Mooi F.R.: *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. *PLoS Pathog.*, 2005; 1: e45
- [24] Dubé E., Vivion M., MacDonald N.E.: Vaccine hesitancy, vaccine refusal and the anti-vaccine movement: influence, impact and implications. *Expert Rev. Vaccines*, 2015; 14: 99-117
- [25] Fedele G., Bianco M., Ausiello C.M.: The virulence factors of *Bordetella pertussis*: talented modulators of host immune response. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2013; 61: 445-457
- [26] Finn T.M., Stevens L.A.: Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol. Microbiol.*, 1995; 16: 625-634
- [27] Geuijen C.A., Willems R.J., Bongaerts M., Top J., Gielen H., Mooi F.R.: Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. *Infect. Immun.*, 1997; 65: 4222-4228
- [28] Geuijen C.A., Willems R.J., Mooi F.R.: The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars. *Infect. Immun.*, 1996; 64: 2657-2665
- [29] Gogol E.B., Cummings C.A., Burns R.C., Relman D.A.: Phase variation and microevolution at homopolymeric tracts in *Bordetella pertussis*. *BMC Genomics*, 2007; 8: 122
- [30] Gustafsson L., Hallander H.O., Olin P., Reizenstein E., Storsaeter J.: A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 1996; 334: 349-355
- [31] Gzyl A., Augustynowicz E., Gniadek G., Rabczenko D., Dulny G., Slusarczyk J.: Sequence variation in pertussis S1 subunit toxin and pertussis genes in *Bordetella pertussis* strains used for the whole-cell pertussis vaccine produced in Poland since 1960: efficiency of the DTwP vaccine-induced immunity against currently circulating *B. pertussis* isolates. *Vaccine*, 2004; 22: 2122-2128
- [32] He Q., Mertsola J.: Factors contributing to pertussis resurgence. *Future Microbiol.*, 2008; 3: 329-339
- [33] He Q., Viljanen M.K., Olander R.M., Bogaerts H., De Grave D., Ruuskanen O., Mertsola J.: Antibodies to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis* and protection against whooping cough in schoolchildren. *J. Infect. Dis.*, 1994; 170: 705-708
- [34] Hegerle N., Dore G., Guiso N.: Pertactin deficient *Bordetella pertussis* present a better fitness in mice immunized with an acellular pertussis vaccine. *Vaccine*, 2014; 32: 6597-6600
- [35] Hegerle N., Guiso N.: Antibody-mediated inhibition of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-haemolysin-induced macrophage cytotoxicity is influenced by variations in the bacterial population. *Microbiology*, 2014; 160: 962-969

- [36] Hegerle N., Guiso N.: *Bordetella pertussis* and pertactin-deficient clinical isolates: lessons for pertussis vaccines. *Expert Rev. Vaccines*, 2014; 13: 1135-1146
- [37] Hegerle N., Paris A.S., Brun D., Dore G., Njamkepo E., Guillot S., Guiso N.: Evolution of French *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* isolates: increase of *Bordetellae* not expressing pertactin. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012; 18: E340-E346
- [38] Heikkinen E., Kallonen T., Saarinen L., Sara R., King A.J., Mooi F.R., Soini J.T., Mertsola J., He Q.: Comparative genomics of *Bordetella pertussis* reveals progressive gene loss in Finnish strains. *PLoS One*, 2007; 2: e904
- [39] Hellwig S.M., Rodriguez M.E., Berbers G.A., van de Winkel J.G., Mooi F.R.: Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity. *J. Infect. Dis.*, 2003; 188: 738-742
- [40] Inatsuka C.S., Xu Q., Vujkovic-Cvijin I., Wong S., Stibitz S., Miller J.F., Cotter P.A.: Pertactin is required for *Bordetella* species to resist neutrophil-mediated clearance. *Infect. Immun.*, 2010; 78: 2901-2909
- [41] Ishibashi Y., Relman D.A., Nishikawa A.: Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and $\alpha 5 \beta 1$ integrin. *Microb. Pathog.*, 2001; 30: 279-288
- [42] Jakinovich A., Sood S.K.: Pertussis: still a cause of death, seven decades into vaccination. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2014; 26: 597-604
- [43] Kallonen T., Gröndahl-Yli-Hannuksela K., Elomaa A., Lutyńska A., Fry N.K., Mertsola J., He Q.: Differences in the genomic content of *Bordetella pertussis* isolates before and after introduction of pertussis vaccines in four European countries. *Infect. Genet. Evol.*, 2011; 11: 2034-2042
- [44] King A.J., Berbers G., van Oirschot H.F., Hoogerhout P., Knipping K., Mooi F.R.: Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity. *Microbiology*, 2001; 147: 2885-2895
- [45] King A.J., van Gorkom T., van der Heide H.G., Advani A., van der Lee S.: Changes in the genomic content of circulating *Bordetella pertussis* strains isolated from the Netherlands, Sweden, Japan and Australia: adaptive evolution or drift? *BMC Genomics*, 2010; 11: 64
- [46] Komatsu E., Yamaguchi F., Abe A., Weiss A.A., Watanabe M.: Synergic effect of genotype changes in pertussis toxin and pertactin on adaptation to an acellular pertussis vaccine in the murine intranasal challenge model. *Clin. Vaccine. Immunol.*, 2010; 17: 807-812
- [47] Kurova N., Njamkepo E., Brun D., Tseneva G., Guiso N.: Monitoring of *Bordetella* isolates circulating in Saint Petersburg, Russia between 2001 and 2009. *Res. Microbiol.*, 2010; 161: 810-815
- [48] Lam C., Octavia S., Ricafort L., Sintchenko V., Gilbert G.L., Wood N., McIntyre P., Marshall H., Guiso N., Keil A.D., Lawrence A., Robson J., Hogg G., Lan R.: Rapid Increase in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Australia. *Emerg. Infect. Dis.*, 2014; 20: 626-633
- [49] Leininger E., Roberts M., Kenimer J.G., Charles I.G., Fairweather N., Novotny P., Brennan M.J.: Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 345-349
- [50] Liko J., Robison S.G., Cieslak P.R.: Priming with whole-cell versus acellular pertussis vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 2013; 368: 581-582
- [51] Locht C.: Molecular aspects of *Bordetella pertussis* pathogenesis. *Int. Microbiol.*, 1999; 2: 137-144
- [52] Locht C., Bertin P., Menozzi F.D., Renaud G.: The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol. Microbiol.*, 1993; 9: 653-660
- [53] Martin S.W., Pawloski L., Williams M., Weening K., DeBolt C., Qin X., Reynolds L., Kenyon C., Giambrone G., Kudish K., Miller L., Selvage D., Lee A., Skoff T.H., Kamiya H. i wsp.: Pertactin-negative *Bordetella pertussis* strains: evidence for a possible selective advantage. *Clin. Infect. Dis.*, 2015; 60: 223-227
- [54] Mastrantonio P., Spigaglia P., van Oirschot H., van der Heide H.G., Heuvelman K., Stefanelli P., Mooi F.R.: Antigenic variants in *Bordetella pertussis* strains isolated from vaccinated and unvaccinated children. *Microbiology*, 1999; 145: 2069-2075
- [55] Mattoo S., Cherry J.D.: Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2005; 18: 326-382
- [56] McCarthy M.: Vaccine refusal may have contributed to California's 2010 pertussis outbreak, study finds. *Br. Med. J.*, 2013; 347: f6109
- [57] Medical Research Council 1956: VACCINATION against whooping-cough; relation between protection in children and results of laboratory tests; a report to the Whooping-cough Immunization Committee of the Medical Research Council and to the medical officers of health for Cardiff, Leeds, Leyton, Manchester, Middlesex, Oxford, Poole, Tottenham, Walthamstow, and Wembley. *Br. Med. J.*, 1956; 2: 454-462
- [58] Melvin J.A., Scheller E.V., Miller J.F., Cotter P.A.: *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol.*, 2014; 12: 274-288
- [59] Mills K.H., Ryan M., Ryan E., Mahon B.P.: A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 594-602
- [60] Miyaji Y., Otsuka N., Toyozumi-Ajisaka H., Shibayama K., Kamachi K.: Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. *PLoS One*, 2013; 8: e77165
- [61] Mooi F.R.: *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect. Genet. Evol.*, 2010; 10: 36-49
- [62] Mooi F.R., van Loo I.H., van Gent M., He Q., Bart M.J., Heuvelman K.J., de Greeff S.C., Diavatopoulos D., Teunis P., Nagelkerke N., Mertsola J.: *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009; 15: 1206-1213
- [63] Mooi F.R., van der Maas N.A., de Melker H.E.: Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin. *Epidemiol. Infect.*, 2014; 142: 685-694
- [64] Mosiej E., Augustynowicz E., Zawadka M., Dabrowski W., Lutyńska A.: Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates circulating in Poland after 50 years of whole-cell pertussis vaccine use. *J. Clin. Microbiol.*, 2011; 49: 1452-1457
- [65] Mosiej E., Zawadka M., Krysztopa-Grzybowska K., Polak M., Augustynowicz E., Piekarska K., Lutyńska A.: Sequence variation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from Poland in the period 1959-2013. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2015; 34: 147-152
- [66] Njamkepo E., Cantinelli T., Guignon G., Guiso N.: Genomic analysis and comparison of *Bordetella pertussis* isolates circulating in low and high vaccine coverage areas. *Microbes. Infect.*, 2008; 10: 1582-1586
- [67] Olin P., Rasmussen F., Gustafsson L., Hallander H.O., Heijbel H.: Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines. *Lancet*, 1997; 350: 1569-1577
- [68] Otsuka N., Han H.J., Toyozumi-Ajisaka H., Nakamura Y., Arakawa Y., Shibayama K., Kamachi K.: Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. *PLoS One*, 2012; 7: e31985
- [69] Packard E.R., Parton R., Coote J.G., Fry N.K.: Sequence variation and conservation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from the UK. *J. Med. Microbiol.*, 2004; 53: 355-365
- [70] Parkhill J., Sebahia M., Preston A., Murphy L.D., Thomson N.,

- Harris D.E., Holden M.T., Churcher C.M., Bentley S.D., Mungall K.L., Cerdeño-Tárraga A.M., Temple L., James K., Harris B., Quail M.A. i wsp.: Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat. Genet.*, 2003; 35: 32-40
- [71] Pawloski L.C., Queenan A.M., Cassiday P.K., Lynch A.S., Harrison M.J., Shang W., Williams M.M., Bowden K.E., Burgos-Rivera B., Qin X., Messonnier N., Tondella M.L.: Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2014; 21: 119-125
- [72] Queenan A.M., Cassiday P.K., Evangelista A.: Pertactin-negative variants of *Bordetella pertussis* in the United States. *N. Engl. J. Med.*, 2013; 368: 583-584
- [73] Quinlan T., Musser K.A., Currenti S.A., Zansky S.M., Halse T.A.: Pertactin-negative variants of *Bordetella pertussis* in New York State: A retrospective analysis, 2004-2013. *Mol. Cell. Probes*, 2014; 28: 138-140
- [74] Rodríguez M.E., Hellwig S.M., Pérez Vidakovic M.L., Berbers G.A., van de Winkel J.G.: *Bordetella pertussis* attachment to respiratory epithelial cells can be impaired by fimbriae-specific antibodies. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2006; 46: 39-47
- [75] Safarchi A., Octavia S., Luu L.D., Tay C.Y., Sintchenko V., Wood N., Marshall H., McIntyre P., Lan R.: Pertactin negative *Bordetella pertussis* demonstrates higher fitness under vaccine selection pressure in a mixed infection model. *Vaccine*, 2015; 33: 6277-6281
- [76] Sato H., Sato Y.: *Bordetella pertussis* infection in mice: correlation of specific antibodies against two antigens, pertussis toxin, and filamentous hemagglutinin with mouse protectivity in an intracerebral or aerosol challenge system. *Infect. Immun.*, 1984; 46: 415-421
- [77] Sato H., Sato Y.: Relationship between structure and biological and protective activities of pertussis toxin. *Dev. Biol. Stand.*, 1991; 73: 121-132
- [78] Scheller E.V., Cotter P.A.: *Bordetella* filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential. *Pathog. Dis.*, 2015; 73: ftv079
- [79] Sealey K.L., Harris S.R., Fry N.K., Hurst L.D., Gorringer A.R., Parkhill J., Preston A.: Genomic analysis of isolates from the United Kingdom 2012 pertussis outbreak reveals that vaccine antigen genes are unusually fast evolving. *J. Infect. Dis.*, 2015; 212: 294-301
- [80] Serra D.O., Conover M.S., Arnal L., Sloan G.P., Rodriguez M.E., Yantorno O.M., Deora R.: FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One*, 2011; 6: e28811
- [81] Shahin R.D., Amsbaugh D.F., Leef M.F.: Mucosal immunization with filamentous hemagglutinin protects against *Bordetella pertussis* respiratory infection. *Infect. Immun.*, 1992; 60: 1482-1488
- [82] Sheridan S.L., Ware R.S., Grimwood K., Lambert S.B.: Number and order of whole cell pertussis vaccines in infancy and disease protection. *JAMA*, 2012; 308: 454-456
- [83] Shuel M., Jamieson F.B., Tang P., Brown S., Farrell D., Martin I., Stoltz J., Tsang R.S.: Genetic analysis of *Bordetella pertussis* in Ontario, Canada reveals one predominant clone. *Int. J. Infect. Dis.*, 2013; 17: e413-417
- [84] Spangrude G.J., Sacchi F., Hill H.R., van Epps D.E., Daynes R.A.: Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. *J. Immunol.*, 1985; 135: 4135-4143
- [85] Stefanelli P., Fazio C., Fedele G., Spensieri F., Ausiello C.M., Mastrantonio P.: A natural pertactin deficient strain of *Bordetella pertussis* shows improved entry in human monocyte-derived dendritic cells. *New Microbiol.*, 2009; 32: 159-166
- [86] Stefanoff P., Paradowska-Stankiewicz I.A., Lipke M., Karasek E., Rastawicki W., Zasada A., Samuels S., Czajka H., Pebody R.G.: Incidence of pertussis in patients of general practitioners in Poland. *Epidemiol. Infect.*, 2014; 142: 714-723
- [87] Storsaeter J., Hallander H.O., Gustafsson L., Olin P.: Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine*, 1998; 16: 1907-1916
- [88] Theofilis A.G., Cunningham S.A., Chia N., Jeraldo P.R., Quest D.J., Mandrekar J.N., Patel R.: Pertussis outbreak, Southeastern Minnesota, 2012. *Mayo Clin. Proc.*, 2014; 89: 1378-1388
- [89] Thierry-Carstensen B., Dalby T., Stevner M.A., Robbins J.B., Schneerson R., Trollfors B.: Experience with monocomponent acellular pertussis combination vaccines for infants, children, adolescents and adults - a review of safety, immunogenicity, efficacy and effectiveness studies and 15 years of field experience. *Vaccine*, 2013; 31: 5178-5191
- [90] Tsang R.S., Shuel M., Jamieson F.B., Drews S., Hoang L., Horsman G., Lefebvre B., Desai S., St-Laurent M.: Pertactin-negative *Bordetella pertussis* strains in Canada: characterization of a dozen isolates based on a survey of 224 samples collected in different parts of the country over the last 20 years. *Int. J. Infect. Dis.*, 2014; 28: 65-69
- [91] van Gent M., Heuvelman C.J., van der Heide H.G., Hallander H.O., Advani A., Guiso N., Wirsing von König C.H., Vestreim D.F., Dalby T., Fry N.K., Pierard D., Detemmerman L., Zavadilova J., Fabianova K., Logan C. i wsp.: Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998-2012. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2015; 34: 821-830
- [92] van Gent M., Pierard D., Lauwers S., van der Heide H.G., King A.J., Mooi F.R.: Characterization of *Bordetella pertussis* clinical isolates that do not express the tracheal colonization factor. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2007; 51: 149-154
- [93] van Gent M., van Loo I.H., Heuvelman K.J., de Neeling A.J., Teunis P., Mooi F.R.: Studies on Prn variation in the mouse model and comparison with epidemiological data. *PLoS One*, 2011; 6: e18014
- [94] van Hoek A.J., Campbell H., Amirthalingam G., Andrews N., Miller E.: The number of deaths among infants under one year of age in England with pertussis: results of a capture/recapture analysis for the period 2001 to 2011. *Euro Surveill.*, 2013; 18: 20414
- [95] van Loo I.H., Heuvelman K.J., King A.J., Mooi F.R.: Multilocus sequence typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes. *J. Clin. Microbiol.*, 2002; 40: 1994-2001
- [96] Vandebriel R.J., Hellwig S.M., Vermeulen J.P., Hoekman J.H., Dormans J.A., Roholl P.J., Mooi F.R.: Association of *Bordetella pertussis* with host immune cells in the mouse lung. *Microb. Pathog.*, 2003; 35: 19-29
- [97] Williams M.M., Sen K., Weigand M.R., Skoff T.H., Cunningham V.A., Halse T.A., Tondella M.L., CDC Pertussis Working Group: *Bordetella pertussis* strain lacking pertactin and pertussis toxin. *Emerg. Infect. Dis.*, 2016; 22: 319-322
- [98] World Health Organization: WHO - Immunization, Vaccines and Biologicals, Pertussis. [http://www.who.int/immunization/topics/pertussis/en/\(12.12.2015\)](http://www.who.int/immunization/topics/pertussis/en/(12.12.2015))
- [99] Zeddeman A., van Gent M., Heuvelman C.J., van der Heide H.G., Bart M.J., Advani A., Hallander H.O., Wirsing von König C.H., Riffelman M., Storsaeter J., Vestreim D.F., Dalby T., Krogfelt K.A., Fry N.K., Barkoff A.M. i wsp.: Investigations into the emergence of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in six European countries, 1996 to 2012. *Euro Surveill.*, 2014; 19: 20881
- [100] Zhu Y.Z., Cai C.S., Zhang W., Guo H.X., Zhang J.P., Ji Y.Y., Ma G.Y., Wu J.L., Li Q.T., Lu C.P., Guo X.K.: Immunoproteomic analysis of human serological antibody responses to vaccination with whole-cell pertussis vaccine (WCV). *PLoS One*, 2010; 5: e13915

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.