MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2012, 64: 277 - 283

Częstość występowania przeciwciał dla lipopolisacharydów pałeczek *Bordetella parapertussis* u osób z przewlekłym kaszlem w Polsce

Seroprevalence of antibodies against lipopolysaccharides of *Bordetella parapertussis* in patients with prolonged caught in Poland

Natalia Rokosz, Karolina Śmietańska, Waldemar Rastawicki, Marek Jagielski

Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Przeprowadzone badania wykazały, że pałeczki *Bordetella parapertussis* są istotnym bakteryjnym czynnikiem powodującym zapalenie układu oddechowego u osób w Polsce. Przeciwciała klasy IgA dla LPS pałeczek parakrztuśca na poziomie diagnostycznie znamiennym wykryto w 11,9%, klasy IgG w 12,2% i klasy IgM w 9,6% próbkach surowicy uzyskanych od osób z przewlekłym kaszlem. Mając na uwadze fakt, że laboratoria mikrobiologiczne nie wykorzystują powszechnie metod hodowlanych i genetycznych do diagnostyki parakrztuśca w naszym kraju, poszukiwanie przeciwciał dla LPS pałeczek *B. parapertussis* w próbkach surowicy osób z przewlekłym kaszlem może być cennym uzupełnieniem badań prowadzonych w kierunku bakteryjnych zakażeń układu oddechowego.

Słowa kluczowe: *parakrztusiec, LPS, Bordetella parapertussis, przeciwciała, Polska*

ABSTRACT

Introduction: *Bordetella parapertussis* is a bacterium closely related to *Bordetella pertussis*, also causes a pertussis – like symptoms in humans. Because of unsatisfactory level of routine microbiological diagnosis of *B. parapertussis* infections in Poland most of parapertussis cases are not reported. The aim of the presented study was to investigate incidence of *B. parapertussis* in patients with cough in Poland using serology method.
Methods: Serum IgA, IgG and IgM antibodies were determined in 1192 serum samples obtained from patients with respiratory infections and chronic cough and who were previously suspected of *B. pertussis* infection. As a control we used 258 sera from healthy people – blood donors. The LPS antigen was extracted by Westphal method from wild *B.*

parapertussis strain isolated in Poland. For exclusion of possible false positive results with *B. pertussis* some of the sera were tested against the purified pertussis toxin (PT).
Results: The diagnostically significant level of IgA antibodies to LPS of *B. parapertussis* was detected in 11.9%, IgG in 12.2% and IgM in 9.6% serum samples. More often the antibodies were diagnosed in women than in men. In 63 serum samples, previously positive in NovaTec ELISA with mixed antigen of pertussis toxin and filamentous hemagglutinin we found also IgA and IgG antibodies to LPS of *B. parapertussis*. However, after use of purified pertussis toxin antigen in ELISA we confirmed the *B. pertussis* infections only in 28 cases.
Conclusions: This study shows that *B. parapertussis* is a serious causative agent of infections in patients with prolonged caught in Poland. The serodiagnosis of parapertussis should be conducted with sera obtained from patients suspected in clinical investigation for pertussis but negative in serological investigation with purified pertussis toxin antigen.

Key words: *parapertussis, LPS, Bordetella parapertussis, antibodies, Poland*

WSTĘP

Pałeczki *Bordetella parapertussis* odpowiedzialne są za wywoływanie ostrej, zakaźnej choroby dróg oddechowych, zwanej parakrztuścem. Objawy zachorowania przypominają objawy charakterystyczne dla krztuśca, choć są zazwyczaj łagodniejsze. Zwykle utrzymuje się długotrwały kaszel lub kaszel napadowy powodujący czasami wymioty (1). Ponadto u dzieci parakrztusiec może powodować ostre zapalenie oskrzeli (5,14). Krztusiec rzekomy jest głównie chorobą wieku dziecięcego, ale obserwuje się przypadki zachorowań także wśród młodzieży i osób dorosłych z obniżoną odpornością. U niemowląt zakażenie *B. parapertussis* może mieć bardziej niebezpieczny przebieg niż u osób starszych i może doprowadzić nawet do zgonu dziecka. Ponieważ zakażenia pałeczkami *B. parapertussis* jak i *B. pertussis* wywołują podobne objawy chorobowe nie jest możliwe ich rozróżnienie w badaniach klinicznych. Przyjmuje się, że 20-30% osób z przewlekłym kaszlem, klinicznie podejrzanych o krztusiec, może być zakażonych pałeczkami *B. parapertussis* (3). Rutynowo wykonywana serodiagnostyka laboratoryjna krztuśca w Polsce, oparta głównie na oznaczaniu komercyjnymi zestawami ELISA poziomu swoistych przeciwciał dla toksyny krztuścowej czy też włókienkowej hemaglutyniny w próbkach surowicy osób z przewlekłym kaszlem nie pozwala na określenie poziomu przeciwciał swoistych dla pałeczek *B. parapertussis*, odpowiedzialnych za wywoływanie parakrztuśca. Co więcej, z tego powodu, że przeciwciała dla włókienkowej hemaglutyniny mogą być stymulowane zarówno podczas zakażenia pałeczkami *B. pertussis* jak i *B. parapertussis* część wyników uzyskanych przy użyciu tego antygenu może być błędnie interpretowanych jako dodatnie w kierunku krztuśca.

Ponieważ jak dotychczas nie wykonuje się w Polsce badań serologicznych w kierunku parakrztuśca, a izolację pałeczek z rodzaju *Bordetella* czy też rutynowe badania metodami biologii molekularnej przeprowadzają tylko nieliczne laboratoria, nie jest znana częstość występowania parakrztuśca w naszym kraju. Jest to o tyle istotne, że zarówno acelularne oraz pełnokomórkowe szczepionki przeciwkrztuścowe nie zabezpieczają przed zakażeniem pałeczkami *B. parapertussis* (4,6,8,12,13).

Podobieństwo budowy antygenowej pałeczek *B. parapertussis* i *B. pertussis* sprawia, że trudno jest dobrać odpowiedni, wysoce swoisty antygen przydatny w serodiagnostyce parakrztuśca. W prezentowanej pracy podjęliśmy próbę zastosowania lipopolisacharydów uzyskanych z pałeczek *B. parapertussis* do poszukiwania swoistych przeciwciał dla tych drobnoustrojów u osób z przewlekłym kaszlem w Polsce.

MATERIAŁ I METODY

Surowice ludzkie. Do badań użyto 1192 próbek surowicy, w tym 720 uzyskanych od mężczyzn i 472 od kobiet. Wszystkie próbki surowicy uzyskano w latach 2009-2011 od osób z objawami infekcji układu oddechowego, objawiającej się między innymi przewlekłym kaszlem, podejrzanych w badaniu klinicznym o krztusiec. W większości tych próbek, w uprzednio wykonanych badaniach odczynem ELISA firmy NovaTec, określono poziom przeciwciał klasy IgA i IgG dla antygenów pałeczek *B. pertussis*. W odczynie firmy NovaTec jako antygen producent zastosował mieszaninę toksyny krztuścowej i włókienkowej hemaglutyniny. Wiek badanych osób wahał się od 1 roku do 86 lat. Dodatkowo do badań użyto 258 próbek surowicy uzyskanych od osób klinicznie zdrowych – krwiodawców.

Odczyn immunoenzymatyczny ELISA. Badania przeprowadzono na płytkach metapleksowych firmy Nunc (Maxisorp) zgodnie z procedurą podaną uprzednio, z uwzględnieniem niezbędnych modyfikacji, oznaczając poziom przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM (10). Do opłaszczania płytek polistyrenowych użyto oczyszczonego preparatu antygenu somatycznego (endotoksyny) pałeczek *B. parapertussis* w stężeniu użytkowym 25 μg/ml. Endotoksyna ta została uzyskana uprzednio w Zakładzie Bakteriologii NIZP-PZH metodą Westphala z dzikiego szczepu *B. parapertussis* izolowanego w Polsce. Dodatkowo, w celu oceny poziomu przeciwciał dla toksyny krztuścowej *B. pertussis* w badaniach prowadzonych odczynem ELISA wykorzystano wysoce oczyszczony preparat toksyny krztuścowej otrzymany ze Statens Serum Institut w Kopenhadze, Dania. Stężenie użytkowe toksyny krztuścowej wynosiło 1 μg/ml.

Statystyczne opracowanie wyników. Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego InStat$_{tm}$ (Instant Biostatistics). Obliczano średnią arytmetyczną wartość miana przeciwciał i odchylenie standardowe. Istotność różnic w częstości wykrywania przeciwciał w próbkach surowicy osób chorych i osób z grupy kontrolnej oceniano testem niezależności chi-kwadrat z zastosowaniem poprawki Yatesa. Za znamienne statystycznie przyjęto różnice, gdzie poziomy istotności p były mniejsze od 0,05 ($p<0,05$).

WYNIKI

W celu określenia częstości występowania i poziomu przeciwciał dla antygenów somatycznych pałeczek *B. parapertussis* u osób zdrowych zbadano próbki surowicy uzyskane od 258 krwiodawców – klinicznie zdrowych osób powyżej 20 roku życia. Na podstawie uzyskanych wyników badań odczynem ELISA obliczono średnie wartości poziomu przeciwciał, odchylenie standardowe oraz wartości indeksu przeciwciał, które należy przyjąć

za diagnostycznie znamienne. Indeks ten wyznaczano na poziomie średniej arytmetycznej wartości przeciwciał powiększonej o trzy odchylenia standardowe.

Przeprowadzone badania wykazały obecność przeciwciał dla antygenów somatycznych *B. parapertussis* w 253 (21,2%) próbkach surowicy osób chorych z przewlekłym kaszlem i 37 (14,3%) próbkach surowicy krwiodawców. Z danych zawartych w tabeli I wynika, że przeciwciała te na poziomie diagnostycznie znamiennym wykrywano we wszystkich klasach przeciwciał w próbkach surowicy uzyskanych zarówno od osób chorych jak i krwiodawców. I tak przeciwciała klasy IgA wykryto w 142 (11,9%), klasy IgG w 146 (12,2%) i klasy IgM w 114 (9,6%) próbkach surowicy osób chorych oraz odpowiednio w 15 (5,8%), 16 (6,2%) i 14 (5,4%) próbkach surowicy krwiodawców.

Tabela I. Występowanie przeciwciał dla antygenów pałeczek *B. parapertussis* w próbkach surowicy osób chorych z przewlekłym kaszlem oraz osób zdrowych (krwiodawców).

Badana grupa osób (liczba)	Liczba i odsetek próbek surowicy, w których wykryto przeciwciała na poziomie diagnostycznie znamiennym:								
	IgA			IgG			IgM		
	L (%)	Chi^2	p	L (%)	Chi^2	p	L (%)	Chi^2	p
Osoby z kaszlem (1192)	142 (11,9%)	7,6	p<0,05	146 (12,2%)	7,2	p<0,05	114 (9,6%)	4,0	p<0,05
Osoby zdrowe - -krwiodawcy (258)	15 (5,8%)	-	-	16 (6,2%)	-	-	14 (5,4%)	-	-

Statystyczna analiza uzyskanych wyników wykazała, że w próbkach surowicy uzyskanych od osób z objawami zakażenia układu oddechowego przeciwciała dla antygenów *B. parapertussis* wykrywano we wszystkich klasach immunoglobulin statystycznie istotnie częściej niż w próbkach surowicy osób zdrowych (p<0,05).

Diagnostycznie znamienny poziom przeciwciał dla endotoksyny *B. parapertussis*, we wszystkich trzech klasach immunoglobulin, częściej stwierdzano w próbkach surowicy uzyskanych od kobiet niż od mężczyzn (Tabela II).

Tabela II. Występowanie przeciwciał dla antygenów pałeczek *B. parapertussis* u osób chorych z przewlekłym kaszlem w zależności od płci.

Badana grupa osób	Liczba próbek	Liczba i odsetek próbek surowicy, w których wykryto przeciwciała na poziomie diagnostycznie znamiennym:		
		IgA	IgG	IgM
Kobiety	720	99 (13,8%)	103 (14,3%)	82 (11,4%)
Mężczyźni	472	43 (9,1%)	43 (9,1%)	32 (6,8%)

Przeciwciała klasy IgA dla antygenów pałeczek *B. parapertussis* najczęściej wykrywano w próbkach surowicy uzyskanych od osób w wieku 11- 20 lat, natomiast klasy IgG w próbkach surowicy uzyskanych od osób w wieku 11 – 40 lat. Przeciwciała klasy IgM najczęściej wykrywano u osób od 6 do 20 roku życia. U osób starszych, wraz z wiekiem, odsetek wyników dodatnich w tej klasie immunoglobulin gwałtownie spadał (Tabela III).

Tabela III. Występowanie przeciwciał dla antygenów pałeczek *B. parapertussis* u osób chorych z przewlekłym kaszlem w zależności od wieku.

Wiek badanych osób (lata)	Liczba próbek	Liczba i odsetek próbek surowicy, w których wykryto przeciwciała na poziomie diagnostycznie znamiennym:		
		IgA	IgG	IgM
<6	183	4 (2,2%)	6 (3,3%)	6 (3,3%)
6-10	124	18 (14,5%)	12 (9,7%)	26 (21,0%)
11-20	186	37 (19,9%)	34 (18,3%)	21 (21,0%)
21-40	287	39 (13,6%)	52 (18,1%)	32 (11,1%)
41-60	235	26 (11,1%)	26 (11,1%)	18 (7,7%)
>60	169	18 (9,5%)	13 (7,7%)	10 (5,9%)

Porównanie wyników uzyskanych w prezentowanej pracy z wynikami badań przeprowadzonych uprzednio w kierunku zakażeń wywoływanych przez pałeczki *B. pertussis* wykazało, że w kilku procentach próbek surowicy uzyskanych od osób z przewlekłym kaszlem wykrywane były przeciwciała zarówno dla antygenów somatycznych *B. parapertussis* jak i dla mieszaniny antygenów toksyny krztuścowej i włókienkowej hemaglutyniny pałeczek *B. pertussis* (Tabela IV). Łącznie, przeciwciała klasy IgA bądź IgG dla obydwu patogenów wykryto w 63 próbkach surowicy.

Tabela IV. Porównanie częstości wykrywania odczynem ELISA przeciwciał dla antygenów lipopolisacharydowych pałeczek *B. parapertussis* oraz dla mieszaniny antygenów toksyny krztuścowej i włókienkowej hemaglutyniny (test komercyjny firmy NovaTec) pałeczek *B. pertussis* u osób chorych z przewlekłym kaszlem.

Klasa przeciwciał	Liczba próbek	Liczba (odsetek) próbek z wynikiem:				Liczba (odsetek) wyników zgodnych
		B. parapertusis + B. pertussis +	B. parapertusis + B. pertussis -	B. parapertusis - B. pertussis +	B. parapertusis - B. pertussis -	
IgA	1005	31	81	117	776	807 (80,3%)
IgG	1015	46	72	164	733	779 (76,7%)

W ostatnim etapie badań, w celu rozróżnienia zakażeń wywoływanych przez obydwa pokrewne patogeny, postanowiono określić poziom przeciwciał dla wysoce oczyszczonej toksyny krztuścowej, uważanej za swoisty antygen wyłącznie pałeczek *B. pertussis*, we wszystkich 63 próbkach surowicy. Przeprowadzone badania wykazały diagnostycznie znamienny poziom przeciwciał klasy IgA i IgG dla toksyny krztuścowej w 28 (44,4%) próbkach surowicy.

DYSKUSJA

Ze względu na różnice w budowie chemicznej liposacharydy ściany komórkowej pałeczek *B. pertussis* określane są jako lipooligosacharydy (LOS) natomiast pałeczek *B. parapertussis* jako lipopolisacharydy (LPS) (2,7,9). Badania prowadzone przez *Trollfors* i wsp. (11) wykazały, że w przebiegu krztuśca wytwarzane są przeciwciała zarówno dla lipooligosacharydów jak i dla lipopolisacharydów natomiast w przebiegu parakrztuśca,

wyłącznie dla lipopolisacharydów pałeczek *B. parapertussis*. W prezentowanej przez nas pracy badaliśmy jedynie poziom przeciwciał dla LPS pałeczek *B. parapertussis* o osób z przewlekłym kaszlem. Jednakże, wśród zbadanych próbek surowicy, we wcześniej przeprowadzonych badaniach odczynem ELISA firmy NovaTec, wykryto podwyższony poziom przeciwciał klasy IgA i IgG dla preparatu, będącego mieszaniną toksyny krztuścowej i włókienkowej hemaglutyniny *B. pertussis,* odpowiednio w 148 i w 210 przypadkach. Uzyskanie takich wyników, sugerowałoby, że surowice te zostały uzyskane od osób z krztuścem. Nie mniej jednak, w 63 próbkach surowicy uzyskanych od tych osób wykryto podwyższony poziom przeciwciał dla LPS pałeczek *B. parapertussis*. W dalszych badaniach, obecność wysoce swoistych przeciwciał dla oczyszczonego preparatu toksyny krztuścowej, swoistego wyłącznie dla pałeczek *B. pertussis*, potwierdzono jedynie w 28 próbkach. Uzyskanie fałszywie dodatnich wyników z antygenem LPS *B. parapertussis* w przypadku badania próbek surowicy uzyskanych od osób z krztuścem, w świetle wyników uzyskanych przez *Trollfors* i wsp., mogło wiązać się z obecnością nieswoistych przeciwciał dla lipopolisacharydów pałeczek *B. parapertussis*. Oczywiście nie można również wykluczyć, że osoby te były jednocześnie zakażone obydwoma patogenami. W pozostałej grupie 35 surowic, w których nie wykryto przeciwciał dla toksyny krztuścowej, dodatnie wyniki w odczynie ELISA firmy NovaTec związane były prawdopodobnie z obecnością przeciwciał dla włókienkowej hemaglutyniny, swoistej dla obydwu gatunków pałeczek *Bordetella*. Wykrycie w tych próbkach przeciwciał dla LPS pałeczek *B. parapertussis* sugeruje, że osoby od których je uzyskano mogły chorować na parakrztusiec. Przeprowadzone badania wykazały, że w przypadku serologicznej diagnostyki krztuśca, należy posługiwać się wyłącznie antygenem toksyny krztuścowej, swoistym wyłącznie dla pałeczek *B. pertussis*. Z kolei, w serodiagnostyce parakrztuśca, prowadzonej odczynem ELISA z antygenem LPS, należy spodziewać się nieswoistych wyników związanych z obecnością przeciwciał dla lipopolisacharydów pałeczek *B. parapertussis* u osób z krztuścem. W takim przypadku, w celu potwierdzenia zakażenia pałeczkami parakrztuśca, należy wykluczyć w badanych próbkach surowicy obecność przeciwciał dla toksyny krztuścowej.

Podsumowując wyniki badań należy stwierdzić, że pałeczki parakrztuśca są istotnym czynnikiem bakteryjnym powodującym zapalenie układu oddechowego u osób w Polsce. Komercyjne testy ELISA stosowanie powszechnie do serologicznej diagnostyki krztuśca nie umożliwiają wykrycia zakażeń wywoływanych przez *B. parapertussis*. Mając na uwadze fakt, że laboratoria mikrobiologiczne nie wykorzystują powszechnie metod hodowlanych i genetycznych do diagnostyki parakrztuśca, zachorowania te nie są w Polsce właściwie wykrywane. Wydaje się, że poszukiwanie przeciwciał dla LPS pałeczek *B. parapertussis* w próbkach surowicy osób z przewlekłym kaszlem byłoby cennym uzupełnieniem badań prowadzonych w kierunku zakażeń wywoływanych przez pałeczki z rodzaju *Bordetella*.

PIŚMIENNICTWO

1. California Department of Public Health –July 2011 *B. parapertusiss* Infection: Public Health Recommendations. 2011.
2. *Caroff M, Chaby R, Karibian D i inni*. Variations in the carbohydrate regions of *Bordetella pertussis* lipopolycaccharides: electrophoretic, serological, and structurals features. J Bacteriol 1990; 172: 1121-8.

3. *Elahi S, Thompson DR, Strom S, O'Connor B* i inni. Infection with *B. parapertussis* but not *Bordetella pertussis* causes pertussis-like disease in older pigs. Infect Dis 2008;198: 384-92.
4. *Feunou Feunou P, Bertout J, Locht C*. T- and B-cell-mediated protection induced by novel, live attenuated pertussis vaccine in mice. Cross protection against parapertussis. PloS ONE 2010;5.
5. *Khelef N, Danve B, Quentin-Millet MJ, Guiso N*. *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*: Two immunologically distinct species. Infect Immun 1993; 61: 486-90.
6. *Lavine J, Broutin H, Harvill TE* i inni. Imperfect vaccine-induced immunity and whooping cough transmission to infants. Vaccine 2010; 29:11-6.
7. *LeDur A, Caroff M, Chaby R, and Szabo L.* A novel type of endotoxin structure present in *Bordetella pertussis*. Eur J Biochem 1978; 84: 579-89.
8. *Long GH, Karanikas AT, Harvill ET* i inni. Acellular pertussis vaccination facilitates *Bordetella parapertussis* infection in a rodent model of bordetellosis. Proc Biol Sci 2010; 277: 2017-25.
9. *Peppler MS*. Two physical and serological distinct lipopolysaccharide profiles in strains of *Bordetella pertussis* and their phenotypic variants. Infect Immun 1984; 43: 224-32.
10. *Rastawicki W*. Ocena odczynami tradycyjnymi i nowej generacji odpowiedzi humoralnej na antygeny *Mycoplasma pneumoniae* w przebiegu naturalnego zakażenia u ludzi. I. Występowanie i poziom mykoplazmowych przeciwciał u osób klinicznie zdrowych. Med Dośw Mikrobiol 1995; 47: 35-53.
11. *Trollfors B, Lagergard T, Taranger J* i inni. Serum immunoglobulin G antibody responses to *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide and *B. parapertussis* lipopolysaccharide in children with pertussis and parapertussis. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8: 1015-7.
12. *van den Berg BM, Beekhuizen H, Mooi FR, van Furth R.* Role of antibodies against *Bordetella pertussis v*irulence factors in adherence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to human bronchial epithelial cells. Infect Immun 1999; 67: 1050-5.
13. *Zhang X, Rodriguez ME, Harvill ET.* O antigen allows *B. parapertussis* to evade *B. pertussis* vaccine–induced immunity by blocking binding and functions of cross-reactive antibodies. PloS One 2009; 4
14. Zakażenia w pneumonologii u dzieci. *Kulski M.* Zakażenia w otolaryngologii i pneumonologii. Red. *Jahnz-Różyk K, Jurkiewicza D.* Warszawa 2011, 635-7.

Podziękowanie: Składamy podziękowanie Pani Marcie Karpińskiej za pomoc w wykonaniu badań laboratoryjnych.

Otrzymano: 23 XI 2012
Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii NIZP-PZH
e-mail: nrokosz@pzh.gov.pl