

Received: 2015.03.01
Accepted: 2015.08.11
Published: 2015.09.08

Neoglikokoniugaty lipooligosacharydu *Bordetella pertussis* – nowe potencjalne składniki szczepionki przeciwkrztuścowej*

Bordetella pertussis lipooligosaccharide-derived
neoglycoconjugates – new components of pertussis vaccine

Sabina Koj¹, Czesław Ługowski^{1,2}, Tomasz Niedziela¹

¹ Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, Wrocław

² Uniwersytet Opolski, Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Opole

Streszczenie

Krztusiec jest zakaźną chorobą dróg oddechowych wywoływaną przez bakterie Gram-ujemne z gatunku *Bordetella pertussis*. Pomimo powszechnych szczepień przeciwkrztuścowych, w ostatnich latach obserwuje się wzrost zachorowań na krztusiec. Pełnokomórkowe szczepionki przeciwkrztuścowe są skuteczne, lecz reakto-genne, dlatego obecnie stosowane, ulepszone szczepionki zawierają wyłącznie izolowane i zinktywowane antygeny *B. pertussis*. Mniejsza odporność wywołana szczepionkami bezkomórkowymi wskazuje, że są one jednak pozbawione ważnych ochronnych antygenów *B. pertussis*. Szczepionka zawierająca zinktywowaną toksynę krztuśca pobudza wytwarzanie przeciwciał neutralizujących toksynę, lecz nie prowadzi do destrukcji komórki bakteryjnej. Ze względu na to, że w patogenезę krztuśca zaangażowanych jest wiele czynników wirulencji, oprócz aktywności neutralizującej toksynę, w odporności przeciwkrztuścowej niezbędna jest bezpośrednia aktywność bakterio-bójcza. Lipooligosacharyd, jest głównym składnikiem powierzchniowym *B. pertussis* i celem bakterio-bójczych przeciwciał podczas zakażenia. Ze względu na endotoksyczność, LOS jest usuwany z bezkomórkowych szczepionek chroniących przeciwko *B. pertussis*, dlatego też szczepionka otrzymana z wykorzystaniem składników LOS nie jest dotychczas stosowana. Nietoksyczna część LOS *B. pertussis* – oligocukier w połączeniu z białkiem nośnikowym, stanowi immunogeny glikokoniugat o potencjalnym zastosowaniu jako składnik szczepionki przeciwkrztuścowej.

W pracy omówiono przyczyny wzrostu zachorowań na krztuśca. Przedstawiono sytuację epidemiologiczną krztuśca na przestrzeni kilkudziesięciu lat świadczącą o nieskuteczności obecnie stosowanych, bezkomórkowych szczepionek przeciwkrztuścowych. Porównano procesy odpornościowe wywołane zakażeniem *B. pertussis* i indukowane szczepionkami przeciwkrztuścowymi. Wykazano istotny udział przeciwciał bakterio-bójczych skierowanych przeciwko lipooligosacharydowi *B. pertussis* w wywołaniu skutecznej ochrony odpornościowej. Opisano immunogenność i właściwości ochronne antygenów glikokoniugatowych zawierających oligocukrowy składnik LOS *B. pertussis* sugerując jego zastosowanie jako niezbędnego składnika szczepionki przeciwkrztuścowej.

Słowa kluczowe:

Bordetella pertussis • lipooligosacharyd • lipopolisacharyd • glikokoniugat • toksyna krztuśca
• szczepionka przeciwkrztuścowa

*Publikacja powstała w ramach realizacji projektu BioMed -, „Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne” (POIG.01.01.02-02-003/08) finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Poddziałanie 1.1.2).

Summary

Pertussis is a contagious respiratory tract disease caused by the Gram-negative bacterium *Bordetella pertussis*. Despite widespread vaccination, in recent years the pertussis incidence has increased. The whole-cell pertussis vaccine has been very effective but reactogenic. Therefore the improved vaccines contain only a few isolated and inactivated antigens of *B. pertussis*. However, a waning of the acellular vaccine-induced immunity indicates that these vaccines lack some important protective *B. pertussis* antigens. The vaccine containing an inactivated pertussis toxin induces the production of toxin-neutralizing antibodies, but it does not lead to destruction of bacteria. Since many virulence factors are involved in the pathogenesis of pertussis, beside the toxin-neutralizing activity, the direct bactericidal activity is essential in anti-pertussis immunity. Lipooligosaccharide is the main surface component of *B. pertussis*. It is a target for bactericidal antibodies during natural infection. The endotoxic activity of LOS makes it unacceptable for acellular vaccines against *B. pertussis*. However, the non-toxic moiety of the *B. pertussis* LOS-derived oligosaccharide coupled to a carrier protein forms an immunogenic glycoconjugate which has a potential application as a new component of a pertussis vaccine.

In this paper, we present a review of current research and reasons for the increased pertussis incidence. The epidemiologic situation of pertussis in the past decades showing the ineffectiveness of contemporary, acellular pertussis vaccines is also discussed. The immune processes elicited by natural infection with *B. pertussis* were compared to the vaccine-induced immunity. The important role of bactericidal antibodies against lipooligosaccharide was indicated in effective immune defense. In a number of research papers the immunogenicity and protective properties of glycoconjugates containing the oligosaccharide component of *B. pertussis* have been described, and its application as a new component of a pertussis vaccine have been implied.

Keywords: *Bordetella pertussis* • lipooligosaccharide • lipopolysaccharide • glycoconjugate • pertussis toxin • pertussis vaccine

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1168375>

Word count: 6082

Tables: –

Figures: 7

References: 84

Adres autorki: mgr Sabina Koj, Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek, Zakład Immunochemii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, e-mail: sabina.koj@iitd.pan.wroc.pl

Wykaz skrótów: **aP** – przeciwkrztuścowa szczepionka bezkomórkowa (acellular pertussis vaccine), **BSA** – albumina wołowa (bovine serum albumin), **FHA** – hemaglutynina włókienkowa (filamentous hemagglutinin), **Hep** – L-glicero-D-manno-heptoza (L-glicero-D-manno-heptose), **Hex** – heksoza (hexose), **Kdo** – kwas 2-keto-3-deoksy-D-manno-oktulozonowy (2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid); **IgG** – immunoglobuliny G (immunoglobulin G), **LOS** – lipooligosacharyd (lipooligosaccharide), **LPS** – lipopolisacharyd (lipopolysaccharide), **MAC** – kompleks atakujący błonę (membrane-attack complex), **P** – grupa fosforanowa (phosphate), **PT** – toksyna krztuśca (pertussis toxin), **TtD** – toksoid tężca (tetanus toxoid), **wP** – przeciwkrztuścowa szczepionka pełnokomórkowa (whole-cell pertussis vaccine).

WSTĘP

Krztusiec najczęściej występuje u niemowląt oraz małych dzieci, u których objawia się długotrwałym, napadowym kaszlem („whooping cough”) z towa-

rzyszącymi wymiotami, sinicą i bezdechem. W epoce przedszczepionkowej, powszechnie występujący krztusiec był jedną z najczęstszych przyczyn zgonów wśród dzieci do 9 roku życia [9]. Od wielu lat krztusiecowi zapobiega się przez powszechne szczepienia, jednak

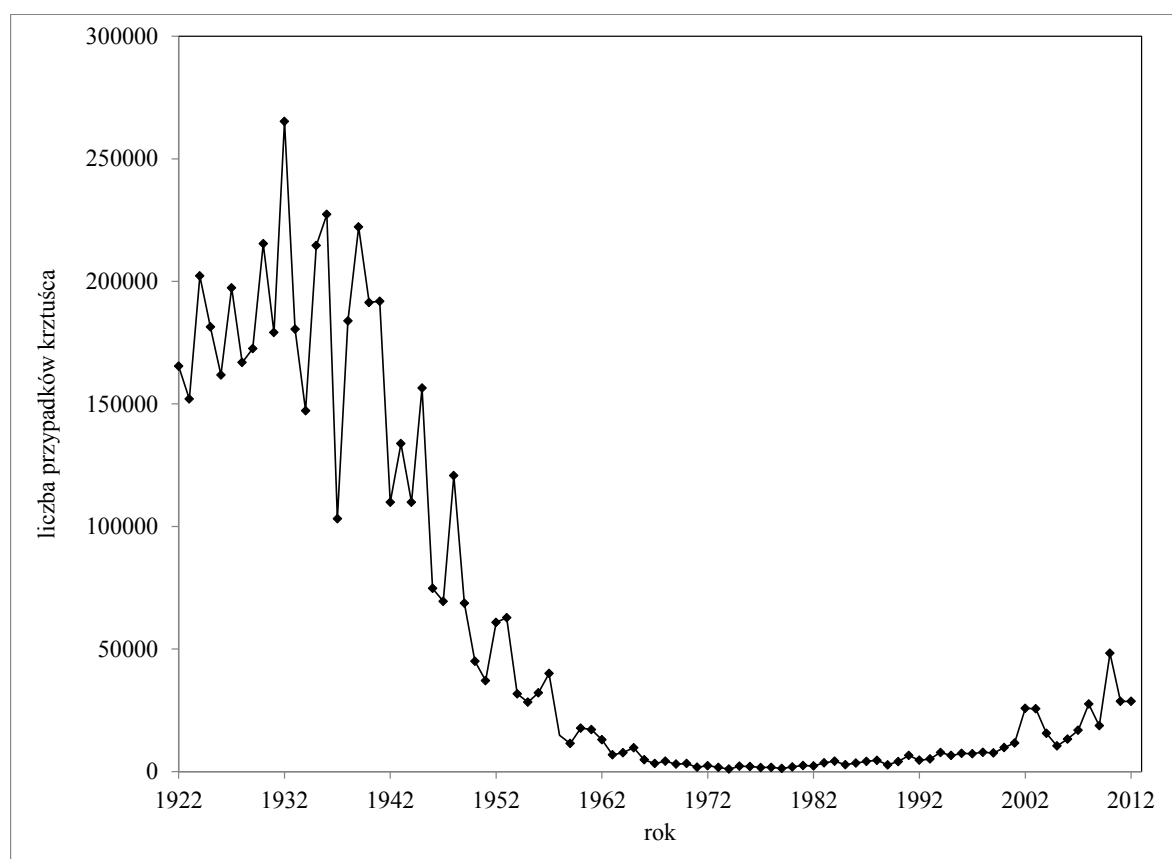
w ostatnich latach obserwuje się wzrost zapadalności na tę chorobę. Badania przyczyn wzrostu zachorowań na krztusiec oraz identyfikacja składników *B. pertussis* niezbędnych w ochronnej odpowiedzi immunologicznej są prowadzone w celu zdefiniowania optymalnego składu antygenowego skutecznej szczepionki przeciwkrztuścowej.

STAN EPIDEMIOLOGICZNY KRZTUŚCA

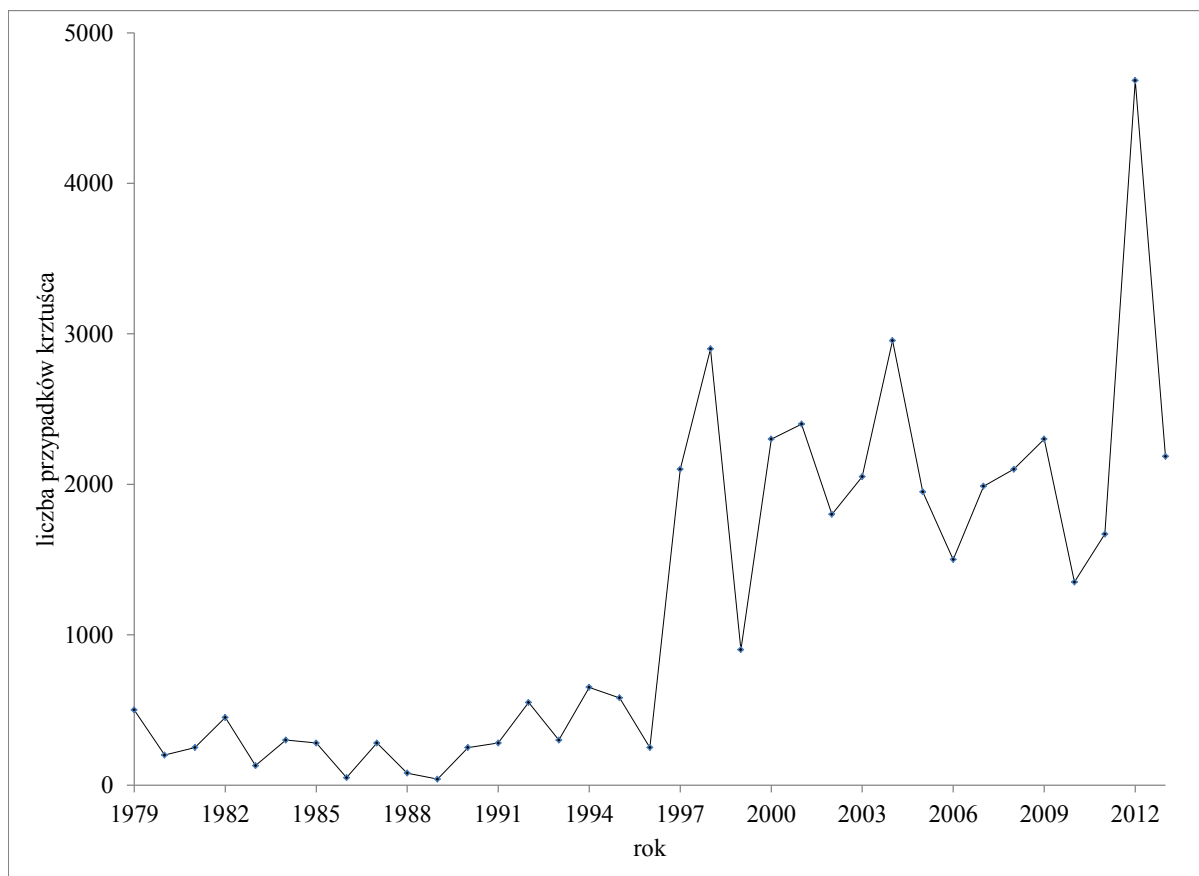
Pomimo powszechnych szczepień, krztusiec nadal stanowi na świecie jedną z 10 głównych przyczyn zgonów wśród dzieci poniżej 5 roku życia [5]. Według najnowszych ustaleń Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), *B. pertussis* jest odpowiedzialna za około 300 tys. przypadków śmiertelnych wśród dzieci każdego roku. W 2008 r. odnotowano 16 mln przypadków krztuśca na całym świecie, natomiast 195 tys. dzieci zmarło z powodu tej choroby [9,78]. Największa liczba przypadków śmiertelnych z powodu krztuśca występuje w południowej Azji oraz Afryce, w krajach o niskim poziomie zaszczepienia [5]. W ciągu ostatnich lat pojawiły się jednak lokalne epidemie krztuśca w Australii, Irlandii, Anglii i Stanach Zjednoczonych, a zatem w krajach, w których od kilkadziesiąt lat stosowana jest powszechna immunizacja przeciwkrztuścowa.

Według danych statystycznych Centrum Zwalczania i Zapobiegania Chorobom (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) wprowadzenie pełnokomórkowej szczepionki przeciwkrztuścowej w Stanach Zjednoczonych w 1940 r. spowodowało, że liczba przypadków zachorowań przekraczająca 100 tys. rocznie spadła poniżej 10 tys. w 1965 r. (ryc. 1). Od roku 1980 liczby zaczęły stopniowo wzrastać i do 2013 r. odnotowywano więcej niż 24 tys. przypadków rocznie. Szczepionkę bezkomórkową wprowadzono w tym kraju do powszechnego użytku w latach 90 ub.w. Obecnie krztusiec jest chorobą powracającą w krajach, w których od wielu lat są stosowane ochronne szczepienia przeciwkrztuścowe [5].

W Stanach Zjednoczonych jest to choroba endemiczna ze szczytem zachorowań występującym co 2-5 lat. W 2010 r. w Kalifornii odnotowano 7200 przypadków krztuśca, w tym 10 było śmiertelnych wśród niemowląt [79]. Wówczas liczba zachorowań była tam najwyższa od 1947 r. [34]. W 2014 r. liczba wzrosła do 11164 przypadków. W roku 2012 epidemia krztuśca wybuchła również w Waszyngtonie [11]. W Stanach Zjednoczonych w 2014 r. odnotowano 48277 przypadków krztuśca. W krajach Europy Zachodniej krztusiec postrzegany jest również jako choroba powracająca, obecnie z częstością zakażeń wynoszącą 1-9% [56]. W Polsce, na podstawie danych



Ryc. 1. Liczby przypadków krztuśca odnotowanych przez CDC w latach 1922 do 2014 w Stanach Zjednoczonych, na podstawie [9]



Ryc. 2. Dane dotyczące liczby przypadków krztusca odnotowanych przez PZH w latach 1979 do 2013 w Polsce, na podstawie [59]

Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego - PZH, zaobserwowano od połowy lat 90 ub.w. wzrost zachorowań na krztusiec (ryc. 2). W 2013 r. stwierdzono 2185 przypadków, a w 2012 roku wykazano najwyższą prawie od 40 lat liczbę zachorowań, tj. 4684. Był to około trzykrotny wzrost liczby zachorowań w porównaniu z rokiem 2011 (1669 przypadków) [59,84].

Zwiększająca się liczba zachorowań na krztusiec w latach 1980-2000 w Stanach Zjednoczonych wynikała pośrednio z pojawienia się ruchów antyszczepionkowych, które przeciwstawiły się stosowaniu szczepionki przeciwkrztuscowej z powodu obserwowanych działań niepożądanych [52]. Działania te oraz reaktywność pełnokomórkowej szczepionki (wP) przyczyniły się do wprowadzenia szczepionek bezkomórkowych (aP) [9,52,78]. Problem nawrotu krztusca w następstwie wprowadzenia szczepionek aP, może być związany z niewystarczającą i krótkotrwałą odpornością wywołaną przez te szczepionki [13]. Długoterminowe badania odporności poszczepiennej wykazały, że szczepionki aP są mniej skuteczne niż pełnokomórkowe [13,14,26,39,40,41,63,78]. Za powód zwiększającej się zachorowalności na krztusiec uznaje się również pojawienie się zmienionych antygenowo szczepów *B. pertussis*, przed którymi nie chronią stosowane szczepionki [55,65]. Rosnąca liczba odnotowanych przypad-

ków krztusca wynika także ze stosowania w diagnostyce zakażeń ulepszonych metod wykrywania *B. pertussis* (m.in. zastosowanie PCR i badań serologicznych w detekcji bakterii). Rozważanych jest wiele przyczyn, jednak wzrost zachorowań na krztusiec w przypadku pojawienia się populacji o zbyt małym odsetku osób zaszczepionych lub o obniżonej odporności przeciwkrztuscowej może doprowadzić do epidemii.

Największa liczba zachorowań na krztusiec występuje wśród niemowląt. W epidemiologii krztusca obserwuje się także wzrost zachorowań wśród osób w wieku 9 lat i powyżej [4]. W USA odsetek przypadków krztusca u dzieci w wieku 10 lat zwiększał się stopniowo od 15% w latach 1977-1979 do 49% w latach 1997-2000 [61]. Występowanie zachorowań na krztusiec wśród wszystkich grup wiekowych, potwierdza krótkotrwałą odporność przeciwkrztuscową wywołaną zarówno zakażeniem bakteriami, jak i indukowaną szczepionkami. Z tego powodu w programie szczepień przeciwkrztuscowych w wielu krajach wprowadzono dawkę przypominającą [25,28]. W Polsce od 2005 r. zaobserwowano poprawę sytuacji epidemiologicznej krztusca, związaną z wprowadzeniem w 2003 r. szczepionki przypominającej u dzieci w 6 roku życia. Liczba przypadków zachorowań na krztusiec może być zaniżona ze względu na to, że wśród nastolatków oraz osób dorosłych, objawy krztusca

często przypominają wirusowe zakażenie dróg oddechowych. W takich przypadkach, szeroko akceptowane kryterium kliniczne - napadowy kaszel jest nieodpowiednim wskaźnikiem zakażenia *B. pertussis*. Diagnostyka krztuśca oparta jedynie na objawach klinicznych sprawia, że 1 na 5 przypadków jest błędnie identyfikowany, co przyczynia się do rozprzestrzeniania krztuśca w populacji, szczególnie wśród nieuodpornionych dzieci poniżej 1 roku życia [75]. Rozwiązaniem może być rozszerzenie programu szczepień na wszystkie grupy wiekowe [14].

Próby ulepszenia szczepionek przeciwkrztuścowych, polegają na poszerzaniu ich właściwości ochronnych, w celu wywołania długotrwałej i skutecznej odporności poszczepiennej. Modyfikacje składu szczepionek są możliwe dzięki postępowi w poznaniu mechanizmów wirulencji *B. pertussis*. W ulepszaniu szczepionek są także pomocne informacje wynikające z odczytania sekwencji całego genomu *B. pertussis* szczepu Tohama [60].

KRZTUŚCIEC – MOLEKULARNE PODSTAWY PATOGENEZY I CZYNNIKI WIRULENCJI *BORDETELLA PERTUSSIS*

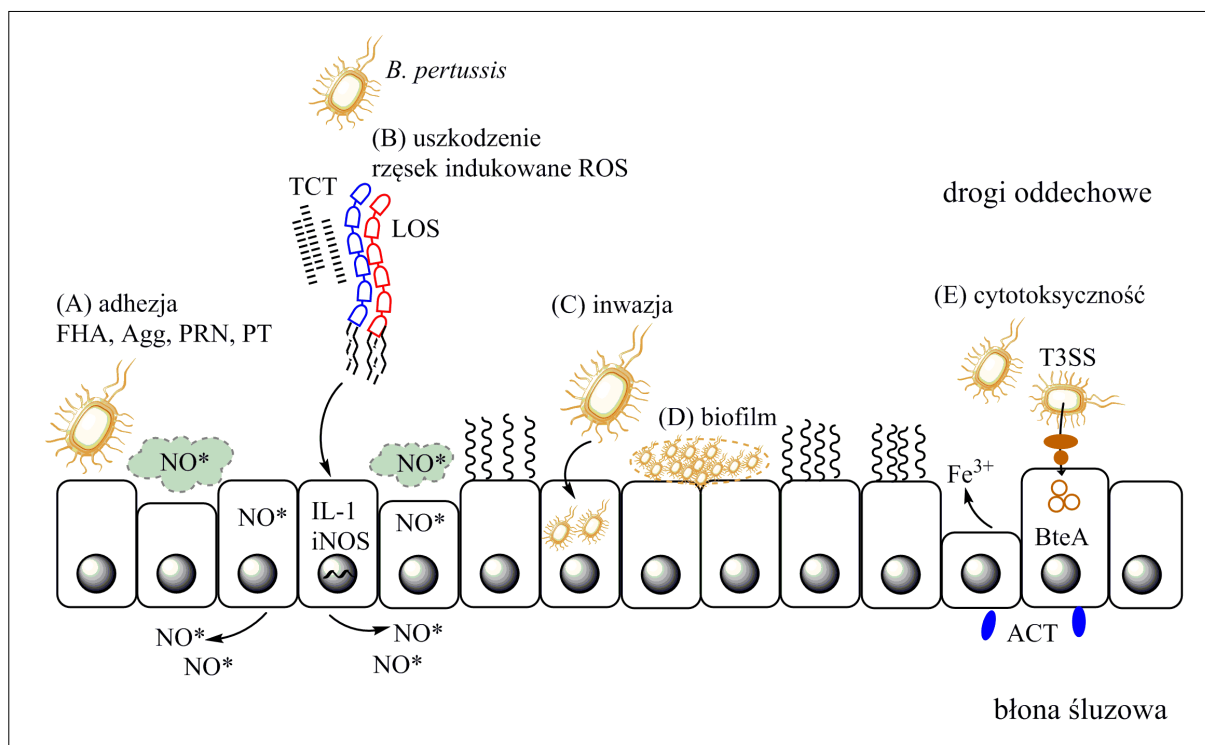
Zakażenie *B. pertussis* rozpoczyna się od kolonizacji dróg oddechowych gospodarza (ryc. 3, kolejne etapy oznaczano A-E) [19,69]. Bakteria oddziałuje z komórkami nabłonka błony śluzowej wykorzystując czynniki wirulencji czego wynikiem jest adhezja *B. pertussis* do komórek urzęsionych (A). Do adhezyn *B. pertussis* należą białka - hemaglutynina włókienkowa (FHA), fimbrie (Agg, Fim) i pertaktyna (PRN). FHA i fimbrie wiążą usulfonowane cukry rozpowszechnione na komórkach dróg oddechowych i w wydzielinach. Bakteria wytwarza również białkowe toksyny ułatwiające adhezję i transmisję, do których należą toksyna krztuśca (PT), cyklaza adenylowa (ACT, AC-Hly) i system wydzielniczy typu III (T3SS). PT ułatwia adhezję *B. pertussis* do makrofagów naśladując eukariotyczne P- i E-selektyny i zwiększając ekspresję receptora dopełniacza typu 3 (CR3), do którego wiąże się FHA. Peptydoglikan uwalniany ze ściany komórkowej *B. pertussis* - cytotoksyna tchawicza (TCT) oraz składnik zewnętrznej błony komórkowej - lipooligosacharyd (LOS) działając synergistycznie niszczą urzęsione komórki nabłonka układu oddechowego przez inicjację uwalniania reaktywnych form tlenu (ROS), takich jak tlenek azotu (NO'), w wyniku aktywacji syntazy tlenu azotu typu II indukowanej interleukiną 1 (iNOS) w sąsiadujących komórkach nieurzęsionych – komórkach wydzielających śluz (B) [24]. Uszkodzone i sparaliżowane rzęski nie usuwają śluzu, który gromadzi się w drogach oddechowych uniemożliwiając mechaniczne usuwanie bakterii. LOS aktywuje szlak sygnałowy TLR-4 wywołując także wytwarzanie cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6). TCT hamuje syntezę DNA w komórkach nabłonkowych tchawicy powodując cytotoksyczne zmiany w komórkach urzęsionych. Toksyna dermonekrotyczna (DNT) - polipeptyd cytoplazmatyczny, który wywołuje stan zapalny, skurcz naczyń krwionośnych oraz patologiczne zmiany martwicze w miejscu kolonizacji. *B. pertussis* jest również

zdolna do bezpośredniej inwazji komórek nabłonkowych (C) za pośrednictwem FHA, która zwiększając ekspresję cząsteczki adhezyjnej ICAM-1 umożliwia wniknięcie bakterii do komórki. Podobnie do innych patogenów błon śluzowych, *B. pertussis* również tworzy biofilm na powierzchni nabłonka oddechowego (D), który powstaje w następstwie ekspansji klonalnej przyłączonych bakterii tworzących makrokolonie w materiale składającym się z egzopolisacharydów, białek, lipidów i DNA. Utworzenie biofilmu ułatwia komórkom bakteryjnym kolonizację i przeżycie w drogach oddechowych, chroniąc przed siłami obronnymi organizmu. ACT oraz T3SS wraz z białkiem efektorowym BteA zaburzają wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe wywołując cytotoksyczność, która zwiększa dostępność alternatywnych źródeł żelaza (Fe⁺³) niezbędnych w procesach komórkowych bakterii oraz ekspozycję miejsc wiążących krypt w błonie podstawnej, pozwalając na silniejsze przyłączenie patogenu (E).

Adhezyny i toksyny *B. pertussis* działając synergistycznie umożliwiają bakterii kolonizację nosogardła, tchawicy i płuc gospodarza oraz wywołanie uogólnionych zmian zapalnych i patologicznych. Składniki te powodują uniecznienienie ruchu rzęsek prowadzące do niezdolności usuwania śluzu z dróg oddechowych, co jest główną przyczyną długotrwałego kaszlu. Większość z czynników wirulencji *B. pertussis* jest jednocześnie antygenami dla przeciwciał i komórek T umożliwiając eliminację patogenu z organizmu.

Podczas zakażeń dróg oddechowych, *B. pertussis* wiążąca urzęsione komórki nabłonka, jest rozpoznawana przez rezydujące i infiltrujące komórki wrodzonego układu odpornościowego [34]. Receptory PRR (pattern recognition receptor) tych komórek rozpoznają ewolucyjnie konserwatywne składniki *B. pertussis*. I tak receptor Toll-like 4 (TLR-4) komórek dendrytycznych (DC) wiąże lipooligosacharyd *B. pertussis*. Antygeny immunomodulujące *B. pertussis* - LOS, PT, ACT i TCT wywołują wytwarzanie cytokin prozapalnych, głównie IL-1 i TNF- α , które stymulując fagocytozę zapoczątkowują eliminację bakterii. Komórki dendrytyczne przetwarzają i prezentują antygeny bakteryjne komórkom T. Wytwarzanie interleukiny 12 przez komórki odporności wrodzonej wywołuje polaryzację odpowiedzi komórek T w kierunku komórek T pomocniczych typu 1 (Th1), natomiast IL-1 β i IL-23 powodują różnicowanie do komórek Th17. IFN- γ jest wydzielany przez DC oraz komórki NK w początkowej fazie zakażenia, a następnie przez Th1 stymuluje rekrutację makrofagów i neutrofilów oraz aktywuje komórki B do wytwarzania przeciwciał opsonizujących i wiążących dopełniacz (IgG2a). Opsonizowane i nieopsonizowane bakterie są wiązane przez neutrofile i makrofagi, a następnie zabijane w wyniku działania reaktywnych form tlenu i azotu.

W zakażeniu wywołanym *B. pertussis* stosuje się terapię antybiotykową [9]. Erytromycyna jest zazwyczaj stosowana, gdy toksyny wydzielone przez bakterię wywo-



Ryc. 3. Oddziaływanie *B. pertussis* z nabłonkiem błon śluzowych układu oddechowego, na podstawie [19]

łały już miejscowe oraz układowe uszkodzenia, które zagrażają życiu. Wynika to z tego, że choroba zwykle jest diagnozowana na podstawie objawów klinicznych (długotrwały, napadowy kaszel) [9,31,37,53,81]. Erytromycyna zastosowana w fazie napadowej krztuśca usuwa bakterie jedynie z górnych dróg oddechowych, zmniejszając transmisję, lecz nie zmienia przebiegu choroby [61,78]. Rozwiązaniem jest zapobieganie zakażeniu *B. pertussis* przez immunizację. Powszechna i skuteczna immunizacja chroniąca przeciwko *B. pertussis*, pozwoli uzyskać kontrolę nad infekcją.

Badania nad patogenезą krztuśca umożliwiają lepsze zrozumienie mechanizmów wirulencji *B. pertussis* i ulepszania szczepionek przeciwkrztuścowych w celu skutecznego zapobiegania zakażeniom i transmisji tej bakterii [31,52,62,64,70].

SZCZEPIONKI PRZECIWKRZTUŚCOWE

Szczepionkę przeciwkrztuścową wprowadzono do powszechnego użycia w 1940 r. Objęcie szczepieniami ochronnymi mieszkańców wielu krajów, spowodowało gwałtowny spadek liczby zachorowań i śmiertelności związanej z krztuścem. Spadek wynikał wówczas z pojawienia się odporności „stada” („herd immunity”), która występuje, gdy w populacji jest przynajmniej 80% osób zaszczepionych. Zmniejsza się wówczas rezerwuuar bakterii *B. pertussis* i w ten sposób chronione są przed zakażeniem osoby z niewykształconą odpornością (m.in. niemowlęta).

Szczepionka pełnokomórkowa jest zawiesiną inaktywowanych chemicznie i/lub termicznie bakterii szczepów *B. pertussis* różniących się typem aglutynogenów 2 i 3 (Agg2 i Agg3). Charakteryzuje się dużą efektywnością (70-90%), lecz jest reaktogenna. Zaobserwowano odczyny miejscowe, takie jak bolesność, obrzęk, rumień w miejscu podania oraz reakcje ogólnoustrojowe o częstotliwości mniejszej niż 1 na 100 podań szczepionki (drgawki gorączkowe, nieprzerwany płacz) i o częstotliwości mniejszej niż 1 na 1000-2000 (zapaść - epizody hipotensyjno-hiporeaktywne). Występowanie encefalopatii, trwałego uszkodzenia mózgu lub ciężkich zaburzeń neurologicznych w następstwie przyjęcia szczepionki pełnokomórkowej nie potwierdzono [78].

Szczepionka przeciwkrztuścowa stosowana powszechnie do immunizacji dzieci w Polsce jest szczepionką pełnokomórkową skojarzoną z antygenami błonicy i tężca (DTP, DTwP, wP). Początkowo (od 1969 r.) do produkcji szczepionki wykorzystywano 6 wyselekcjonowanych szczepów *B. pertussis*. Liczbę szczepów zredukowano w 1978 r. do trzech (186, 606 i 629) stosowanych do chwili obecnej [27]. Szczepionki pełnokomórkowe są przygotowywane z namnożonych komórek *B. pertussis* poddanych inaktywacji chemicznej lub termicznej i odtoksyczeniu formaldehydem. Dawka szczepionki o objętości 0,5 ml zawiera około 20 mld pałeczek krztuśca.

Ze względu na reaktogenność, szczepionki pełnokomórkowe zastąpiono w wielu krajach szczepionkami bezkomórkowymi (acelularnymi), które zawierają oczyszczone i inaktywowane czynniki wirulencji *B. pertussis*. Dostęp-

nych jest wiele preparatów szczepionek bezkomórkowych (DTaP, aP) różniących się składem i zawartością antygenów [22]. Produkowane są szczepionki monowalentne (zawierające PT), biwalentne (PT, FHA), triwalentne (PT, FHA, PRN) i pentawalentne (PT, FHA, PRN, Agg2, Agg3) [25,52,61,71,78]. Szczepionki te oprócz antygenów krztuśca zawierają inaktywowane toksyny - toksoidy tężca (TTd) i błonicy (DTd). Dostępne są także szczepionki DTaP łączone z antygenami wirusa polio (IPV), *Haemophilus influenzae* typu b (Hib) lub wirusa zapalenia wątroby typu B (HepB). Toksoid krztuśca użyty w tych preparatach jest otrzymywany w wyniku chemicznej inaktywacji nadtleniem wodoru, formaldehydem i/lub glutaraldehydem. Szczepionki DTwP oraz większość z DTaP są podawane w 5 dawkach i są rekomendowane do szczepień dzieci w wieku od 6 tygodni do 6 lat. Program szczepień zakłada immunizację trzykrotną w 6, 10 i 14 tygodniu życia (szczepienia pierwotne, „primary series”) oraz pojedynczą dawkę w drugim roku życia (szczepienie uzupełniające, „booster dose”). Natomiast pierwsza dawka przypominająca jest rekomendowana w 6 roku życia. Odporność przeciwkrztuścowa wykształca się około pierwszego roku życia. W pierwszym roku życia dzieci są zatem szczególnie podatne na zakażenia krztuścem. Rezerwuarem krztuśca mogą być osoby dorosłe, wśród których obserwuje się wzrost zachorowań. Z tego powodu dostępne są także szczepionki bezkomórkowe DTaP o zredukowanej zawartości antygenów, które są stosowane jako dawki przypominające u osób dorosłych. Preparaty aP są przygotowane w postaci sterylnych roztworów lub zawierają konserwanty (2-fenoksyetanol, tiomersal). Składniki szczepionek są adsorbowane na wodorotlenku lub solach glinu (adiuwantach). Dodatkowe składniki szczepionek, takie jak formaldehyd, glutaraldehyd, 2-fenoksyetanol, tiomersal, związki glinu mogą wywoływać miejscowe reakcje nadwrażliwości [30].

Badania kliniczne wskazały nietoksyczność, immunogenność (obecność swoistych przeciwciał po upływie 1 miesiąca od podania ostatniej dawki) oraz skuteczność szczepionek bezkomórkowych [10]. W tych badaniach krztusiec definiowano na podstawie objawów klinicznych - wystąpienia kaszlu utrzymującego się przez co najmniej 21 dni z przynajmniej jednym z objawów (napadowy kaszel, „pianie” związane z kaszlem lub wymioty po atakach kaszlu), które następnie potwierdzano w oparciu o hodowlę bakteryjną, serologię oraz epidemiologię. Skuteczność szczepionek Acel-Imune® i Infanrix® była odpowiednio na poziomie 81 i 89%, natomiast porównawczej szczepionki pełnokomórkowej 91-98% [10]. Skuteczność szczepionek ze względu na przyjętą nieprecyzyjną definicję przypadków krztuśca (nie uwzględniano przypadków kaszlu utrzymującego się przez co najmniej 7 dni oraz choroby o łagodnym przebiegu) uważana jest jednak za zawyżoną [14]. Międzynarodowe badania potwierdzają zmniejszającą się skuteczność szczepionek z każdym rokiem po pięciu dawkach DTaP [40,63] oraz zmniejszającą się odporność po DTaP [41]. Wykazano 8-krotny spadek poziomu prze-

ciwciał przeciwko głównemu antygenowi szczepionki aP pomiędzy kolejnymi dawkami szczepień, tj. 3 a 4 dawką [14]. Badania u niemowląt wskazały skuteczność szczepionek bezkomórkowych na poziomie 75-85% [26]. Wykazano także słabszą ochronę przeciwkrztuścową wśród nastolatków w wieku 10-17 lat, którzy otrzymali w dzieciństwie szczepionkę bezkomórkową w porównaniu z tymi, którzy przyjęli szczepionkę pełnokomórkową [39]. Badania te prowadzono podczas epidemii w Kalifornii w latach 2010-2011. Skuteczność szczepionki Tdap u dzieci powyżej 13 roku życia wynosi jedynie 53% [62]. Potencjalne strategie zwiększenia kontroli nad krztuścem obejmują zmiany w programie szczepień, ulepszenie szczepionek bezkomórkowych w celu dodatkowego dawkowania oraz rozwój nowych szczepionek wywołujących długotrwałą odporność.

Ze względu na wieloczynnikowość patogenezę krztuśca nie ustalono dotychczas odpowiedniego markera immunologicznego do oceny skuteczności szczepionek w zapobieganiu krztuścowi [22]. Oznaczenie poziomu przeciwciał nie jest w pełni standaryzowane, dlatego nie jest znaczące w porównywaniu do odporności wywołanej przez szczepionki [78]. Z tego powodu podejmowane są nadal wysiłki w celu identyfikacji i charakterystyki determinant antygenowych *B. pertussis* oraz poznania antygenów odpowiedzialnych za indukcję ochronnej odporności przeciwkrztuścowej.

Najważniejszym antygenem w szczepionkach przeciwkrztuścowych jest inaktywowana toksyna krztuśca, ponieważ jest najbardziej immunogennym składnikiem *B. pertussis* oraz czynnikiem wirulencji wywołującym większość objawów krztuśca [6,67,80]. Immunizacja szczepionką aP powoduje wytwarzanie przeciwciał skierowanych przeciwko toksynie krztuśca [4,80,81]. Duże stężenie przeciwciał anti-PT wiąże się ze zmniejszoną podatnością na zakażenie tym patogenem [62]. Przeciwciała przeciwko PT chronią dzieci przed rozwojem ciężkiej postaci krztuśca [34]. Skuteczność trójwalentnej szczepionki DTaP jest jednak niższa przeciwko krztuścowi niż przeciwko tężcowi oraz błonicy [73]. W przeciwieństwie do tężca i błonicy, w przypadku których wszystkie objawy chorób wywołują toksyny, w patogenezę krztuśca jest zaangażowanych wiele czynników wirulencji. W celu zapewnienia optymalnej odpowiedzi ochronnej szczepionka przeciwkrztuścowa, powinna być kompozycją wielu ochronnych antygenów *B. pertussis*. Z powodu ich różnorodności oraz złożonych mechanizmów patogenezę krztuśca, w odporności przeciwkrztuścowej jest wymagane zapewnienie szerokiej ochrony - w postaci neutralizacji toksyn, blokowania adhezji bakterii, opsonizacji, aktywacji dopełniacza i zabijania bakterii.

Antygeny stosowane w szczepionkach przeciwkrztuścowych to białkowe czynniki wirulencji. Białka te, a zwłaszcza toksyna krztuśca i pertaktyna, ulegają dryfowi antygenowemu, który polega na wytwarzaniu nowych, zmienionych antygenowo postaci białek w celu

uniknięcia odpowiedzi odpornościowej gospodarza [21,27,55]. Zmienność strukturalna powoduje, że białka szczepów wywołujących krztusiec różnią się strukturalnie od białek będących składnikami szczepionek, zarówno pełnokomórkowej jak i aP. Wówczas *B. pertussis* ze zmienionymi głównymi epitopami antygenów może unikać odpowiedzi przeciwkrztuścowej gospodarza indukowanej szczepionkami. W Polsce, mimo stosowania od 1960 r. obowiązkowych szczepień przeciw krztuścowi, odnotowano w latach 1997-1998 epidemiczny wzrost zachorowań [83]. W okresie 1996-2001 skuteczność szczepionki wP u dzieci w wieku 2-5 lat zmniejszyła się z 97 do 73%, natomiast u dzieci w wieku 6-9 lat obniżyła się z 84 do 69% [78]. Wówczas wzrost zachorowań nie był powiązany ze spadkiem poziomu zaszczepienia, lecz wynikał z pojawienia się szczepów, na które nie działały skutecznie mechanizmy odporności organizmu indukowane podaniem szczepionek. Były to szczepy *B. pertussis* o odmiennych profilach genetycznych pertaktyny i podjednostki S1 toksyny krztuśca [27]. Zmiany w genomach krążących szczepów *B. pertussis* izolowanych w latach 1999-2005 wykryto również w Finlandii [21], Holandii (badano izolaty z okresu 1949-2008) [55] oraz Australii. Natomiast brak znaczących zmian genetycznych wśród izolatów z lat 1935-2009 wykazano w USA [65]. Identyfikowane są także szczepy *B. pertussis*, które nie syntezują PT, PRN oraz FHA, czyli trzech antygenów wchodzących w skład preparatów aP i w ten sposób szczepy te unikają odpowiedzi wywołanej szczepionkami [55]. Rozpowszechnione są również szczepy o allelach *ptxP3* (zastępujące *ptxP1*) wykazujące zwiększone wytwarzanie PT, które mogą opóźniać odpowiedź immunologiczną, pogarszać stan chorego oraz zwiększać transmisję *B. pertussis* [55]. Adaptacja bakterii przez zmiany genetyczne wynika m.in. z presji selekcyjnej wywołanej stosowaniem szczepionek. Szczepionka wP indukuje odpowiedź immunologiczną przeciwko wielu antygenom *B. pertussis*, lecz o względnie niskim poziomie przeciwciał, natomiast aP wywołuje reakcję jedynie przeciwko kilku antygenom, lecz uzyskiwane miano przeciwciał jest wysokie [55]. Zatem zastosowanie wP zapoczątkowało adaptacyjne mutacje *B. pertussis*, natomiast szczepionki aP potęgują zmiany w antygenach, PT, FHA, Fim i PRN. Badania polimorfizmu antygenowego izolatów klinicznych wskazują zatem na potrzebę okresowej zmiany szczepów stosowanych do produkcji szczepionek (zastosowanie szczepów przeważających obecnie w populacji) [16,55] lub zastosowania antygeny charakteryzującego się stabilnością ewolucyjną [8].

Badania nad stosowanymi szczepionkami wskazują na potrzebę wprowadzenia szczepionki, która wykazywałaby minimalne działania niepożądane, efektywność porównywalną do szczepionki pełnokomórkowej, skład pozwalający na zminimalizowanie wpływu zjawiska dryfu antygenowego oraz zdolność do indukcji przeciwciał ochronnych. Spadek odporności wywołanej bezkomórkowymi szczepionkami przeciwkrztuścowymi wskazuje, że brakuje w nich ważnych antygenów ochronnych *B. pertussis*.

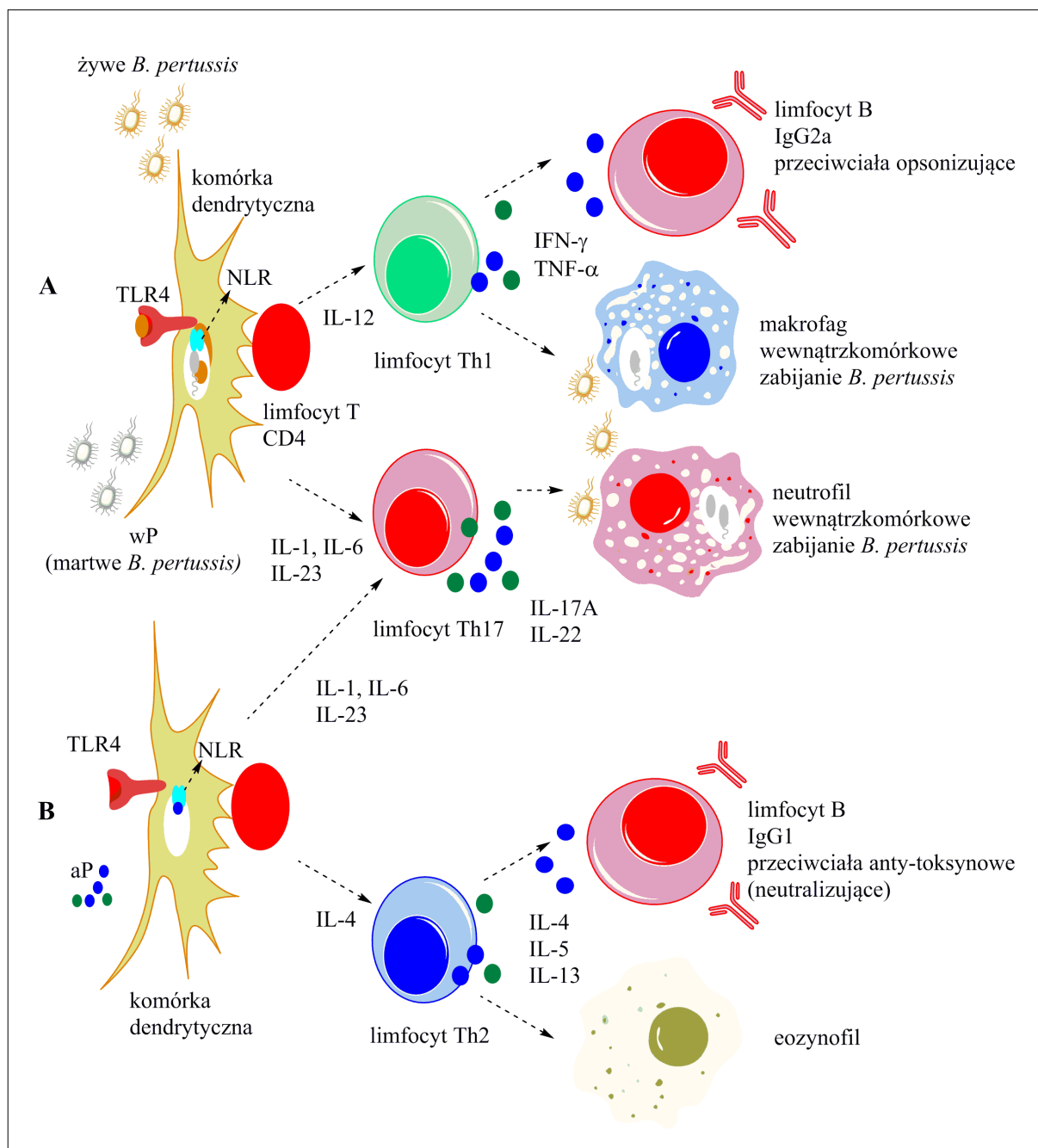
ODPORNOŚĆ PRZECIWKRZTUŚCOWA.

ODPORNOŚĆ PRZECIWKO *B. PERTUSSIS* PODCZAS ZAKAŻENIA

Podczas zakażenia, drobnoustroje *B. pertussis* przylegają do komórek urzęsionych nabłonka oddechowego gospodarza. Zewnątrzkomórkowa bakteria może być zniszczona za pośrednictwem aktywacji dopełniacza (C) z udziałem przeciwciał, które rozpoznają i wiążą antygeny powierzchniowe [76]. Zakażenie *B. pertussis* indukuje wytwarzanie IgG przeciwko składnikom powierzchniowym - LOS, FHA, PRN w surowicy i IgA w tkance limfoidalnej oraz wydzielanie na powierzchnię błon śluzowych. Przeciwciała te są obecne również w płucach. Przeciwciała takie są obecne w surowicy pacjentów podczas zakażenia oraz po ozdrowieniu. Weiss i wsp. [76] wykryli obecność immunoglobulin G3 (IgG3) swoistych dla LOS u pacjentów z zakażeniem wywołanym *B. pertussis* oraz wykazali ich aktywność bakterio-bójczą. Badania Trollfors i wsp. [72] przeprowadzone wśród dzieci z zakażeniem *B. pertussis* potwierdziły, że układ odpornościowy gospodarza reaguje na LOS *B. pertussis* wykazując bakterio-bójczą aktywność przeciwciał skierowanych przeciwko LOS. Przeciwciała przeciwko *B. pertussis* działają przez neutralizację toksyn, hamowanie wiązania bakterii do komórek nabłonkowych dróg oddechowych, ułatwienie pochłonięcia bakterii oraz destrukcji przez makrofagi i neutrofile. Przeciwciała zdolne do związania antygeny bakteryjnego i aktywacji dopełniacza stanowią przeciwciała bakterio-bójcze, które są niezbędne w odporności przeciwbakteryjnej.

Antygeny powierzchniowe bakterii *B. pertussis*, takie jak lipooligosacharyd w wyniku związania TLR-4 aktywują wytwarzanie interleukin prozapalnych (IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, IFN- γ) przez komórki dendrytyczne i makrofagi [34,54] (ryc. 4 A). Cytokiny te promują indukcję i dojrzewanie komórek T pomocniczych typu 1 (Th1) i Th17 z komórek T naiwnych. Cytokiny wydzielane przez komórki T, interferon- γ przez komórki Th1 oraz IL-17 przez komórki Th17 wzmagają wytwarzanie przeciwciał opsonizujących oraz przyciągają i aktywują makrofagi i neutrofile do pochłonięcia i wewnątrzkomórkowego zabicia bakterii w wyniku działania NO [34,76].

Odpowiedź odpornościowa gospodarza wywołana zakażeniem *B. pertussis* obejmuje zarówno ochronę skierowaną przeciwko bakteriom krążącym pozakomórkowo, jak i przeciwko bakteriom, które pokonały mechanizmy odporności gospodarza i wniknęły do komórek. Do oddziaływań bakterii znajdujących się w cytoplazmie komórek z sIgA może dochodzić podczas transcytozy tych immunoglobulin. Skuteczna ochrona immunologiczna wywołana aktywnością komórek układu odporności wrodzonej, a zapoczątkowana obecnością przeciwciał bakterio-bójczych i aktywacją dopełniacza, zapobiega cytotoksyczności spowodowanej wniknięciem *B. pertussis* do komórek. Szczepionka przeciwkrztuścowa powinna zatem wywoływać wytwarzanie przeciwciał o aktywności bakterio-bójczej zdolnej do bezpośredniej eliminacji bakterii z dróg oddechowych.



Ryc. 4. Mechanizmy odporności przeciwko *B. pertussis* indukowane podczas zakażenia (żywe *B. pertussis*) oraz w wyniku zastosowania szczepionek, pełnokomórkowej (wP, A) i bezkomórkowej (aP, B), na podstawie [54], zmodyfikowano

ODPORNOŚĆ INDUKOWANA PRZECIWKRZTUŚCOWĄ SZCZEPIONKĄ PEŁNOKOMÓRKOWĄ

Szczepionka pełnokomórkowa wywołuje wytwarzanie bakteriobójczych przeciwciał o ochronnych właściwościach podobnie jak czynią to komórki *B. pertussis* podczas zakażenia. Wytworzone przeciwciała rozpoznają antygeny powierzchniowe i promują zabijanie bakterii z udziałem dopełniacza. Badania Weiss i wsp. [76] potwierdziły, że mimo rozwiniętych mechanizmów adaptacji *B. pertussis* do układu odpornościowego gospodarza,

przeciwciała bakteriobójcze mogą pokonać bariery ochronne bakterii (m.in. mechanizmy oporności BrkA) prowadząc do ich unieszkodliwienia i zabicia.

Szczepionka pełnokomórkowa składa się z zabitych bakterii *B. pertussis*, których antygeny powierzchniowe stanowią wzorce molekularne związane z patogenem (PAMPs). Antygeny te włączając lipooligosacharyd (LOS) będący głównym składnikiem ekspozowanym na powierzchni tej bakterii, aktywują komórki dendrytyczne i makrofagi do wytwarzania prozapalnych inter-

leukin (IL-12, IL-23) [33,50] (ryc. 4 A). Pod ich wpływem są wytwarzane przeciwciała opsonizujące oraz są aktywne makrofagi i neutrofile zdolne do pochłonięcia i zabicia bakterii. Van den Berg i wsp. [74] wykazali, że immunizacja myszy szczepionką wP, które następnie zakażono donosowo *B. pertussis* wywołując wytwarzanie przeciwciał IgG2a o wysokim mianie, eliminuje bakterie z tchawicy. LOS jako główny składnik *B. pertussis* odpowiedzialny za wytwarzanie IL-12 przez makrofagi jest powodem dużej skuteczności wP. W badaniach nad żywą, atenuowaną szczepionką (zawierającą inaktywowaną genetycznie toksynę krztuśca, DNT poddaną delekcji oraz *B. pertussis ampG* zastąpioną przez *E. coli ampG*), Skerry i wsp. [68] wykazali, że wP indukuje wytwarzanie limfocytów B pamięci immunologicznej oraz przeciwciał z dominującą klasą IgG2a zapewniając długotrwałą odporność przeciwkrztuścową. Mutant ten indukuje także odporność komórkową przez wytwarzanie IFN- γ i IL-12. Skuteczność ochrony wP zmniejszająca się u myszy z defektem IFN- γ R lub na skutek neutralizacji IL-17 potwierdza udział LOS w odporności indukowanej wP przez indukcję Th1 i Th17 [68].

Ochrona immunologiczna wywołana szczepionką wP zmniejsza się z czasem. Po upływie 4-12 lat od ostatniej dawki DTP obserwuje się małą odporność przeciwkrztuścową lub jej brak. Ochrona wywołana zakażeniem *B. pertussis* również nie jest długotrwała i wynosi 4-20 lat [4,13]. Na skutek obniżającej się z wiekiem odporności, zwiększa się populacja młodzieży i osób dorosłych podatnych na zakażenie *B. pertussis*. Z tego powodu jest zalecana jako dawka przypominająca. Reaktogenność szczepionki pełnokomórkowej oraz występowanie miejscowych reakcji poszczepiennych nasilających się wraz z liczbą podanych dawek sprawiają, że u osób dorosłych jest wymagane stosowanie preparatu bezkomórkowego jako szczepionki przypominającej [78].

ODPORNOŚĆ WYWOŁANA PRZECIWKRTUŚCOWĄ SZCZEPIONKĄ BEZKOMÓRKOWĄ

Stosowane obecnie bezkomórkowe szczepionki przeciwkrztuścowe (aP) zawierają 3-5 antygenów białkowych *B. pertussis* - inaktywowaną toksynę krztuśca, hemaglutyninę włókienną, pertaktynę, fimbrie serotypów 2 i 3. Szczepionki aP w przeciwieństwie do wP i żywych komórek *B. pertussis* nie aktywują makrofagów (brak odpowiedzi typu Th1) oraz nie wywołują wytwarzania przeciwciał opsonizujących IgG2a [34,54,74] (ryc. 4). Gzyl i wsp. [29] potwierdzili, że u myszy zakażonych drogą oddechową lub immunizowanych wP występuje odporność na ponowne zakażenie *B. pertussis* z odpowiedzią cytokin IFN- γ , IL-12, TNF- β i odpowiedzią przeciwciał klasy IgG2a (ryc. 4 A). Szczepionki aP aktywują komórki dendrytyczne do wytwarzania interleukin (IL-1, IL-6, IL-23) promujących indukcję komórek Th17 (ryc. 4 B). Następnie wydzielane IL-17 i IL-22 przez komórki Th17 przyciągają i aktywują neutrofile do wewnątrzkomórkowego zabijania bakterii. Zaktywowane komórki dendrytyczne wydzielają również IL-4 i promują akty-

wację eozynofilów oraz indukcję przeciwciał IgG1 neutralizujących toksynę (ryc. 4 B). Badania Mahon i wsp. [50] dowodzą, że pod wpływem PT, FHA lub PRN nie jest również wydzielana IL-12, która jest wytwarzana przez makrofagi w wyniku zakażenia *B. pertussis*, stymulacji przez wP lub LOS *B. pertussis*. Zatem, wP wywołuje odpowiedź typu komórkowego z udziałem limfocytów Th1, natomiast szczepionki aP indukują odpowiedź humoralną charakteryzującą się profilem cytokin spolaryzowanym w kierunku Th2 [52], która opóźnia usunięcie bakterii. Szczepionki aP nie aktywują TLR-4, natomiast pobudzone są jedynie receptory NLR (NOD-like receptors) [54]. W badaniach z zastosowaniem myszy Gzyl i wsp. [29] wykazali, że szczepionki aP opóźniają eliminację bakterii z płuc (16-27 dni) po zakażeniu w porównaniu do eliminacji bakterii u zwierząt uprzednio immunizowanych wP (3-7 dni).

Odporność indukowaną szczepionką aP stanowią przeciwciała antytoksynowe, a więc działające przez neutralizację toksyn *B. pertussis*. Nie zapewnia ona udziału przeciwciał opsonizujących komórkę bakteryjną oraz zabijania bakterii z udziałem makrofagów. Szczepionka aP nie dostarcza zatem pełnej odporności przeciwkrztuścowej. Brak aktywności bakteriobójczej w odporności indukowanej szczepionką bezkomórkową [77] może być jednym z powodów małej skuteczności tej szczepionki.

Ochrona immunologiczna przeciwko krztuścowi u dzieci zaszczepionych preparatem aP jest krótkotrwała i zmniejsza się w kolejnych latach od immunizacji. Powodem krótkotrwałej odporności indukowanej przez stosowane szczepionki jest szybki spadek poziomu produkowanych przeciwciał w czasie od 3 do 5 lat [15,17]. W badaniach podczas epidemii krztuśca w Kalifornii w 2010 r. wykazano 98% ochrony wywołanej 5 dawkami szczepionki DTaP w pierwszym roku od jej podania wśród dzieci w wieku 4-10 lat. Obserwowano, że ochrona zmniejszała się do < 90% po 3 latach oraz 71% po 5 latach [17]. Odporność utraciło 15% osób w ciągu 5 lat od przyjęcia szczepionki aP [55]. Zmniejszająca się odporność wywołana szczepionką przeciwkrztuścową przyczynia się do zwiększenia populacji osób podatnych na zachorowanie zwiększając ryzyko epidemii.

Badania nad stosowanymi obecnie szczepionkami bezkomórkowymi wskazują zatem na potrzebę otrzymania szczepionki zdolnej do wytwarzania przeciwciał o aktywności bakteriobójczej i generowania długotrwałej odpowiedzi immunologicznej. Odporność wywołana na skutek aktywacji komórek pamięci immunologicznej przy kontakcie z bakterią powinna zapewnić opsonizację i zniszczenie komórki, a przez to zwiększać skuteczność szczepionek przeciwkrztuścowych.

OPTIMALNA ODPOWIEDZ PRZECIWKRTUŚCOWA. UDZIAŁ ENDOTOKSYNY W ODPOWIEDZI ODPORNOŚCIOWEJ

Badania nad odpornością przeciwkrztuścową wskazują, że skuteczna szczepionka powinna dostarczać odporno-

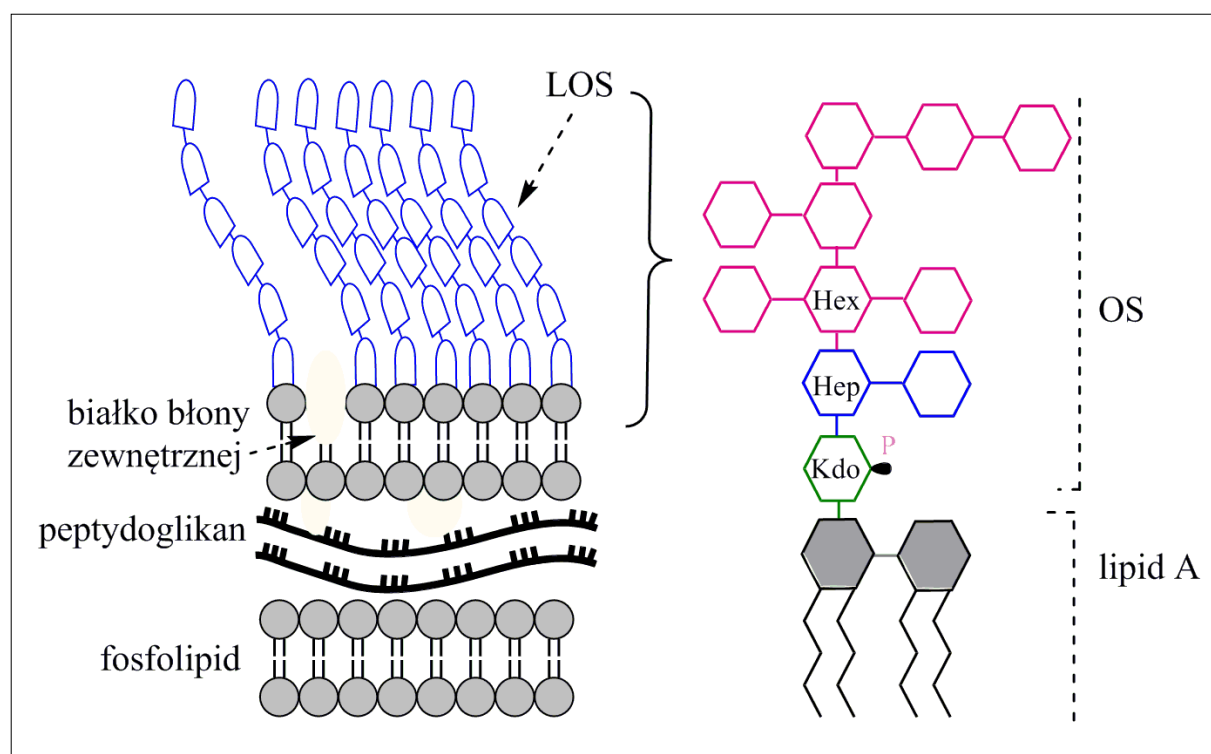
ści funkcjonalnej głównie w postaci neutralizacji toksyn i zabijania bakterii [76]. Ograniczona skuteczność obecnie stosowanych szczepionek przeciwkrztuścowych wynika z tego, że ich składniki nie wywołują pełnej ochronnej odpowiedzi immunologicznej. Główny antygen szczepionek bezkomórkowych, toksoid krztuśca jest niezbędny jako antygen wywołujący wytwarzanie przeciwciał neutralizujących toksynę [67]. Szczepionki bezkomórkowe indukują wytwarzanie przeciwciał swoistych dla PT na poziomie porównywalnym lub wyższym niż wP [20]. Szczepionka pełnokomórkowa zapewnia wytwarzanie przeciwciał przeciwko wielu czynnikom wirulencji *B. pertussis* zwiększając skuteczność ochrony przeciwkrztuścowej. Niepełna odpowiedź immunologiczna wywołana szczepionką aP wynika z tego, że przeciwciała skierowane przeciwko toksynie krztuśca zmniejszają toksyczne działanie *B. pertussis* na komórki gospodarza, lecz nie zabijają bakterii [76]. Z tego powodu stosowane obecnie szczepionki chronią przed rozwojem ostrych stanów chorobowych w krztuścu, jednak nie zapewniają usunięcia bakterii z zakażonego organizmu. Eliminacja bakterii jest najlepszą obroną przeciw krztuścowi, gdyż np. zapobiega przekazywaniu bakterii wśród niemowląt, u których w wyniku zakażenia *B. pertussis* rozwija się ta zagrażająca życiu choroba.

Do uzyskania efektywnej szczepionki przeciwkrztuścowej rozwiązaniem jest wykorzystanie jako antygeny składnika powierzchniowego komórki bakteryjnej. Wówczas w odpowiedzi immunologicznej na ten antygen są generowane przeciwciała, które rozpoznają struk-

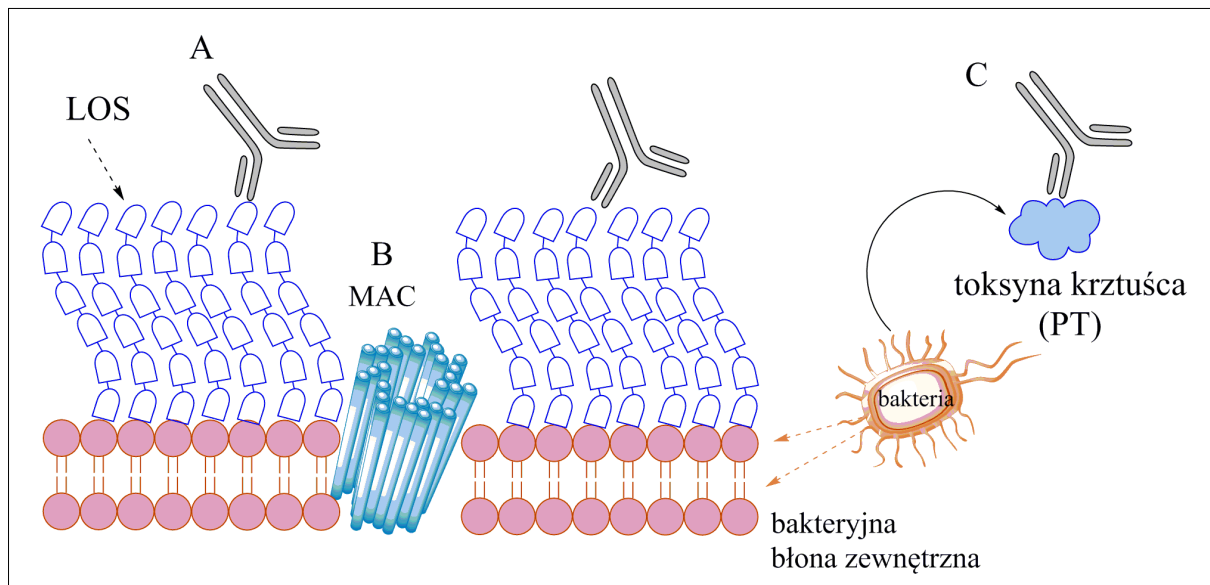
tury powierzchniowe bakterii i z udziałem dopełniacza atakują błonę zewnętrzną wykazując aktywność bakteriobójczą. Celem ataku bakteriobójczego skierowanego przeciwko *B. pertussis* może być ekspozycja na powierzchni komórki bakteryjnej lipooligosacharydu (LOS), gdyż jest głównym antygenem powierzchniowym *B. pertussis* (ryc. 5) [8]. Znany również jako endotoksyna, LOS nie jest wydzielany przez komórkę bakteryjną i jest cząsteczką ciepłostabilną [8]. LOS *B. pertussis* składa się z lipidu A zakotwiczonego w błonie zewnętrznej komórki bakteryjnej oraz ekspozowanego do środowiska zewnętrznego oligocukru (OS).

W surowicy pacjentów po przebytych zakażeniach *B. pertussis* są znajdowane przeciwciała skierowane przeciwko lipooligosacharydowi [72,76]. Niektóre z przeciwciał przeciwko LOS wykazują aktywność lityczną wobec komórek bakteryjnych i są ochronne w zakażeniach *B. pertussis* [76]. Aktywność bakteriobójcza koreluje z obecnością IgG3 skierowanych przeciwko LOS. Badania z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych wykazały, że aktywność bakteriobójczą mają te przeciwciała, które są swoiste dla oligocukrowego fragmentu LOS *B. pertussis* [2,47,57]. Mountzouros i wsp. [57] wykazali, że monoklonalne IgG3 swoiste dla oligocukru chroniły myszy przed śmiertelnym zakażeniem wywołanym przez podanie zawiesiny bakterii *B. pertussis* w aerozolu.

Połączenie dwóch aktywności przeciwciał – zdolności do neutralizacji toksyny krztuśca oraz bakteriobójczości wydaje się niezbędne w odporności przeciwkrztuścowej



Ryc. 5. Struktury powierzchniowe *B. pertussis* oraz schemat struktury lipooligosacharydu (LOS) na podstawie [8], zmodyfikowano



Ryc. 6. Odpowiedź immunologiczna przeciwko LOS *B. pertussis* i toksynie krztuśca

(ryc. 6, kolejne etapy oznaczono A-C). Przeciwciała anty-endotoksynowe rozpoznają i wiążą antygeny powierzchniowe *B. pertussis* – LOS (A), a następnie inicjują kaskadę reakcji obronnych prowadzących do zniszczenia komórki bakteryjnej z udziałem kompleksu atakującego błonę (MAC, B). Natomiast przeciwciała skierowane przeciwko toksynie krztuśca neutralizują skutki toksyczne *B. pertussis* (C).

Endotoksyna *B. pertussis* ma strukturę lipopolisacharydu typu półszorstkiego (S/R-LPS), który zawiera jedną podjednostkę oligocukrową, natomiast jest pozbawiony polisacharydu łańcucha O-swoistego i dlatego jest określany jako lipooligosacharyd [7,48]. LOS jest zbudowany z lipidu A i dodekasaacharydu, który składa się z oligocukru rdzenia podstawionego dystalnym trójczkiem. Lipid A jest regionem odpowiedzialnym za endotoksyczność lipopolisacharydu [7], która wyklucza zastosowanie LOS jako antygeny szczepionkowe w natywnej postaci.

Lipopolisacharydy w postaci wolnej i związanej z komórką bakteryjną są toksyczne i reaktogenne. LPS są antygenami T-niezależnymi - nie są zdolne do aktywacji limfocytów Th i wywołania wytwarzania komórek pamięci immunologicznej. Wytworzone przeciwciała przeciwko LPS są w większości immunoglobulinami klasy IgM [7]. Przeciwciała otrzymane w wyniku immunizacji LOS *B. pertussis* nie chronią podczas ponownego kontaktu z bakteriami *B. pertussis* [12]. Lipopolisacharydy w tej postaci są nieodpowiednimi kandydatami do wykorzystania jako antygeny szczepionkowe.

IMMUNOGENNE POSTACIE LIPOOLIGOSACHARYDU *B. PERTUSSIS* – GLIKOKONIUGATY

W celu wykorzystania inaktywowanych postaci cząsteczek lipopolisacharydów jako antygenów szczepionkowych, są pozbawiane toksycznych aktywności

z zachowaniem struktury epitopów przez usunięcie lipidu A – izolację poli- lub oligosacharydów oraz modyfikowane do antygenów T-zależnych poprzez koniugację z białkami [35,36]. Oligocukry endotoksyn bakteryjnych są zbudowane z reszt cukrowych, których różnorodność strukturalna przewyższa bogactwo struktur aminokwasowych i wpływa na swoistość odpowiedzi immunologicznej. Z tego powodu przeciwciała antyendotoksynowe odznaczają się wysokim powinowactwem i swoistością oddziaływania. Ponadto lipooligosacharydy są składnikami ewolucyjnie stabilnymi. Oligocukier *B. pertussis* występuje w niezmienionej postaci w izolatach klinicznych [1,51]. Konserwatywność tej struktury obserwowano wśród szczepów z okresu przed- i poszczepionkowego. Albitar-Nehme i wsp. [1] oraz Marr i wsp. [51] wykazali brak modyfikacji w strukturze dodekasaacharydowej i całej cząsteczce LOS. Oligocukier w przeciwnieństwie do białkowych antygenów *B. pertussis* nie ulega dryfowi antygenowemu. Ewolucyjna stabilność oraz unikatowość struktury OS *B. pertussis* powoduje, że oligocukier jest właściwym kandydatem szczepionkowym.

Oligocukier wyizolowany z lipooligosacharydu *B. pertussis* połączony z białkiem nośnikowym może stanowić immunogeny i T-zależny antygen. Surowice antykoniugatowe odznaczają się wysokim stężeniem przeciwciał klasy IgG reagujących swoiście z endotoksyną [49]. Szczepionki glikokoniugatowe indukują przeciwciała o wysokim powinowactwie i stymulują pamięć immunologiczną. Glikokoniugaty oligocukrów i nośników białkowych stosuje się jako antygeny w szczepionkach przeciwbakteryjnych [23].

Otrzymanie immunogennego glikokoniugatu w wyniku przyłączenia polisacharydu do białka opisali po raz pierwszy Oswald Avery i Walter Goebel w 1929 r. [3].

W 1980 r. otrzymano pierwszą szczepionkę glikokoniugatową toksoidu błonicy i polisacharydu otoczkowego *Haemophilus influenzae* typu b [25]. Wykazano, że glikokoniugaty oligocukru i nośnika białkowego wykazują cechy serologiczne zdefiniowane przez strukturę chemiczną oligocukru, w większym stopniu niż przez właściwości białka („efekt nośnika”) [3]. Otrzymane antygeny stanowią nowe, tj. niewystępujące w naturze glikokoniugaty („neoglikokoniugaty”) gwarantujące wywołanie swoistej odpowiedzi immunologicznej. Otrzymywanie antygenów w postaci glikokoniugatów zapewnia uzyskiwanie przeciwciał swoistych dla oligocukru i wykazujących aktywność bakteriobójczą [35,36].

Przeciwciała klasy IgG skierowane przeciwko oligocukrowi rdzenia bakterii Gram-ujemnych są ochronne u ludzi. Jennings i Ługowski [35] wykazali, że koniugaty oligocukrów rdzenia *Neisseria meningitidis* z toksoidem tężca są immunogenne, a uzyskane surowice mają aktywność bakteriobójczą przeciwko *N. meningitidis* o identycznym serotypie. Podobnie do *N. meningitidis*, *B. pertussis* zawiera endotoksynę pozbawioną typowego antygeny O [7,48]. Lipooligosacharyd ten nie jest złożoną polimeryczną cząsteczką, która chroni bakterie przed atakiem bakteriobójczych przeciwciał. Badania Weiss i wsp. [76] wykazały, że przeciwciała klasy IgG3 anty-LOS *B. pertussis* uczestniczą w zabijaniu zależnym od dopełniacza.

Nośnikami białkowymi stosowanymi w szczepionkach przeciwbakteryjnych są inaktywowane toksyny bakteryjne (toksoidy). Do nośników szczepionkowych należą: toksoid tężca (TTd), toksoid błonicy (DTd) oraz nietoksyczny wariant toksyny błonicy - CRM₁₉₇ (otrzymany w wyniku mutacji polegającej na zmianie jednego aminokwasu w regionie fragmentu A toksyny błonicy). Białko CRM₁₉₇, które nie jest poddawane działaniu formaldehydu, odznacza się silniejszym „efektem nośnika” i większą immunogennością tworzonych glikokoniugatów niż toksoid błonicy, gdyż jego epitopy dla komórek T są zachowane. Podczas łączenia wielu różnych antygenów szczepionkowych – glikokoniugatów i antygenów białkowych obserwuje się zjawisko interferencji, polegające na zmniejszeniu odpowiedzi immunologicznej na polisacharyd („carrier-induced-epitopic suppression, CIES) lub antygen białkowy („bystander interference”) [18]. Rozwiązaniem jest wprowadzenie nowego nośnika białkowego niewywołującego zjawiska interferencji immunologicznej.

Najpowszechniejszą, dopuszczoną do stosowania u ludzi metodą glikokoniugacji jest reakcja reduktywnej aminacji [32]. Reakcja wymaga obecności aktywnej grupy aldehydowej, która może być wytworzona podczas aktywacji oligocukru pod wpływem reakcji łagodnego utleniania nadjodanem [82]. Grupa aldehydowa reaguje następnie z grupą aminową białka prowadząc do utworzenia stabilnego wiązania kowalencyjnego (zredukowanej zasady Schiffa) w obecności czynnika redukującego. W zależności od liczby dostępnych grup aminowych białka nastę-

puje przyłączenie kilku lub kilkudziesięciu cząsteczek oligocukru. W przypadku toksoidu tężca stosunek oligocukru do białka wynosi zwykle 8-10 cząsteczek OS na cząsteczkę białka. Utworzony typ wiązania w postaci drugorzędowej aminy jest wiązaniem powszechnym w naturalnie występujących białkach. W ten sposób z toksycznej, reaktogennej i T-niezależnej cząsteczki LPS otrzymywany jest nietoksyczny glikokoniugat oligocukru z nośnikiem białkowym o właściwościach immunogennej i T-zależnej antygeny [35].

Spośród składników *B. pertussis* w postaci glikokoniugatów zastosowano oligocukier izolowany z lipooligosacharydu *B. pertussis* w wyniku hydrolizy kwaśnej (dodekasacharyd, kompletny OS). Kimura i wsp. [38] oraz Kübler-Kielb i wsp. [43,44,45,46] opisali otrzymanie odpowiednio immunogennych koniugatów OS *B. pertussis* i hemaglutyniny włókienkowej oraz OS i albuminy wołowej (BSA). Immunogennym składnikiem okazał się również fragment oligocukru *B. pertussis* - pentasacharyd skoniugowany z toksoidem tężca w wyniku reduktywnej aminacji, który został opisany przez Niedzielę i wsp. [58]. Zastosowane w glikokoniugacie pentasacharyd-TTd, typ wiązania oraz nośnik białkowy są powszechnie akceptowane w antygenach szczepionkowych. Glikokoniugat OS-BSA indukował swoiste przeciwciała u myszy [46], natomiast pentasacharyd-TTd był immunogeny u królików [58].

Wszystkie otrzymane koniugaty oligocukru *B. pertussis* i białka nośnikowego wywoływały odpowiedź immunologiczną swoistą dla oligocukru. Reaktywność surowic antykoniugatowych wykazano w testach immunofluorescencyjnych z wykorzystaniem sortera komórek (FACS) zarówno na zabitych jak i żywych komórkach *B. pertussis* [58]. Przeciwciała antyglikokoniugatowe zmniejszały zdolność lipooligosacharydu do indukcji TNF- α , IL-6 i NO w komórkach linii makrofagowej, neutralizując endotoksyczne działanie tego składnika i w konsekwencji zmniejszając proces zapalny [58]. Przeciwciała antykoniugatowe wykazywały aktywność bakteriobójczą swoistą dla LOS *B. pertussis*, prowadząc do zabicia bakterii z udziałem dopełniacza [46]. Bakteriobójcze przeciwciała anty-OS *B. pertussis* powodują *in vivo* eliminację bakterii z zakażonego organizmu [57].

Badania glikokoniugatów oligocukru i nośnika białkowego [58] wskazują, że zastosowanie fragmentu oligocukrowego w tej postaci zapewnia generowanie przeciwciał rozpoznających struktury powierzchniowe *B. pertussis*, podobnie jak czynią to przeciwciała skierowane przeciwko LOS. Glikokoniugat zawierający nietoksyczny oligocukier *B. pertussis* zdolny do indukcji przeciwciał bakteriobójczych jest zatem odpowiednim kandydatem szczepionkowym. W celu wywołania optymalnej odpowiedzi przeciwrztuścowej istotne może się także okazać połączenie aktywności bakteriobójczej i neutralizującej przeciwciał przeciwko *B. pertussis* generowanych w odpowiedzi na antygen szczepionkowy. Taka neutralizacja toksycznych skutków *B. pertussis* może być zapew-

niona przez użycie odpowiedniego białka nośnikowego. Stosowane w glikokoniugatach nośniki białkowe, np. najczęściej używany toksoid tężca, służą jako immunogenne składniki glikokoniugatów, lecz nie wnoszą wkładu w pulę przeciwciał skierowanych przeciwko *B. pertussis*. BSA jest modelowym nośnikiem białkowym i nie jest stosowana w antygenach szczepionkowych. Natomiast, FHA jest adhezyną *B. pertussis*, a zatem podobnie jak LOS składnikiem powierzchniowym. Opisane antygeny przeciwkrztuścowe nie łączą zatem cech składników zapewniających jednoczesną odpowiedź immunologiczną o aktywności neutralizującej i bakteriobójczej skierowaną przeciwko *B. pertussis*.

Takim białkowym składnikiem *B. pertussis* możliwym do zastosowania w neoglikokoniugacie jest toksyna krztuśca. Schneerson i wsp. [66] opisali połączenie toksyny krztuśca z polisacharydem otoczkowym *Streptococcus pneumoniae* (Pn14-PT). Uzyskany nietoksyczny glikokoniugat generuje odpowiedź immunologiczną swoistą dla polisacharydu Pn14. Zjawisko odtoksyczenia toksyny krztuśca zastosowanej jako nośnik białkowy koniugatu nasuwa wniosek, że inaktywacja tej toksyny następuje w wyniku połączenia z fragmentem oligocukrowym. W przypadku koniugatu Pn14-PT, toksyna stanowiła efektywny nośnik białkowy wzmacniający odpowiedź skierowaną przeciwko polisacharydowi.

Połączenie nietoksycznego fragmentu wyizolowanego z LOS *B. pertussis* - oligocukru oraz toksyny krztuśca w postać glikokoniugatu, umożliwia otrzymanie antygeny wywołującego wytwarzanie przeciwciał o aktywnościach neutralizujących i bakteriobójczych. Koj i wsp. [42] uzyskali nietoksyczny i immunogeny glikokoniugat przez kowalencyjne połączenie OS *B. pertussis* i PT w wyniku reakcji reduktywnej aminacji (ryc. 7). Dotychczas przeprowadzone badania aktywności przeciwciał wytworzonych w odpowiedzi przeciwko antygenowi OS-PT dowodzą ich właściwości ochronnych przeciwko *B. pertussis* w warunkach *in vitro* [42]. Glikokoniugat ten może zwiększyć skuteczność szczepionki przeciwkrztuścowej złożonej z antygenów białkowych *B. pertussis*, o antygen indukujący przeciwciała o aktywności bakteriobójczej.

Mimo wykazywanych właściwości potencjalnego antygeny szczepionkowego, tj. immunogenności i zdolności do indukcji przeciwciał o właściwościach ochronnych, dotychczas nie zastosowano glikokoniugatów zawierających składniki *B. pertussis* w preparatach przeciwkrztuścowych. Te właściwości wraz ze zdolnością do wywołania długotrwałej pamięci immunologicznej sprawiają, że te glikokoniugaty mogą stanowić składniki skutecznej szczepionki przeciwkrztuścowej.

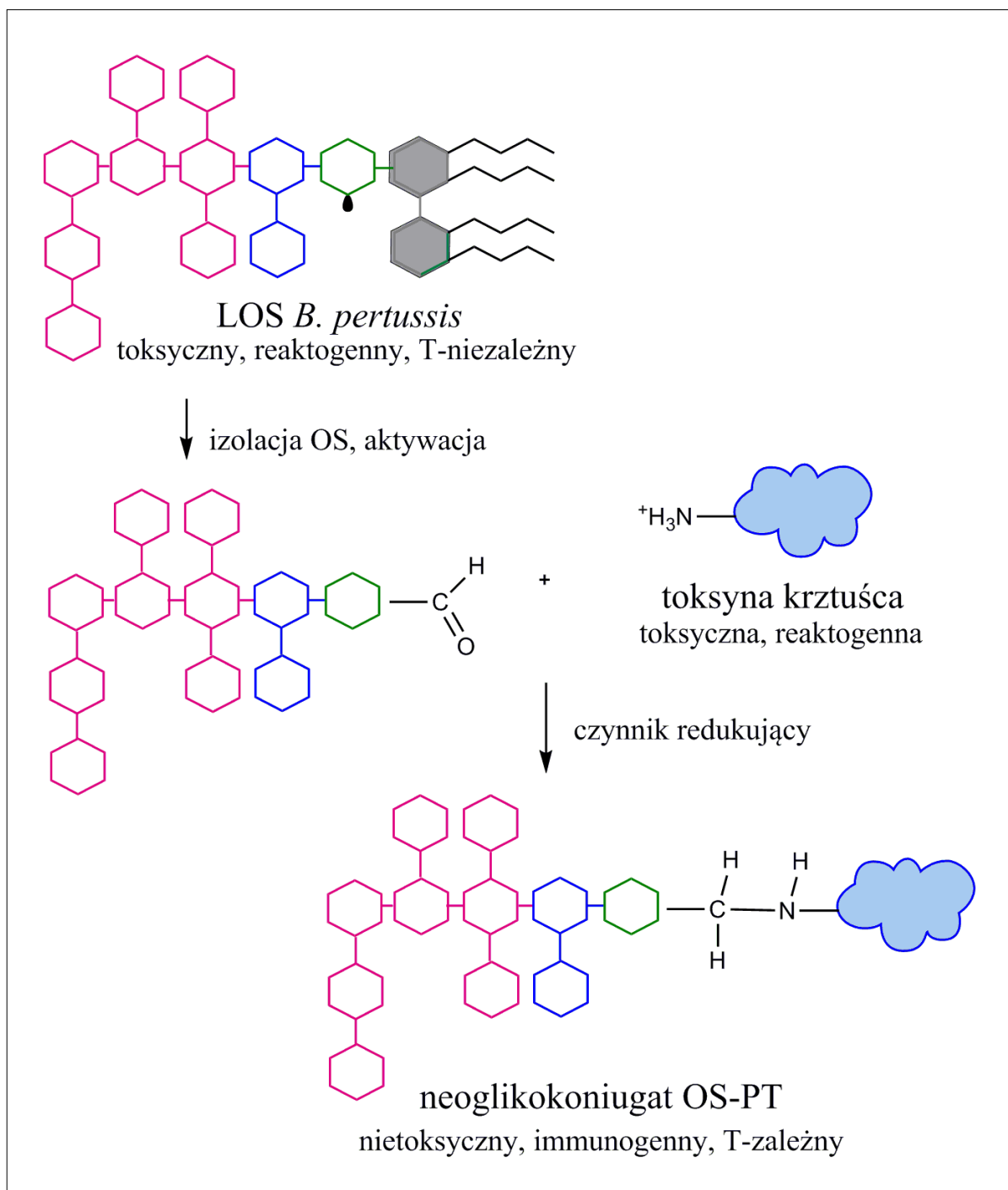
PODSUMOWANIE

Przedstawione informacje wskazują bardzo ważną rolę endotoksyny *Bordetella pertussis* w ochronie odpornościowej organizmu przeciwko krztuścowi - bardzo zakaźnej

chorobie dróg oddechowych. Krztusiec znany również jako koklusz, szczególnie zagraża zdrowiu i życiu niemowląt oraz małych dzieci, u których rozwija się długotrwały i uporczywy kaszel mogący prowadzić do sinicy i bezdechu. Od kilkudziesięciu lat krztuścowi zapobiega się przez szczepienia, jednak zakażenia wywołane przez *B. pertussis* nadal są powszechne.

Dane epidemiologiczne dotyczące krztuśca świadczą o bardzo dobrej skuteczności szczepionek pełnokomórkowych, które gwałtownie zmniejszyły zachorowalność w latach 1960-1980. Jednak w latach 90 ub.w., z powodu reaktogenności szczepionkę pełnokomórkową w wielu krajach zastąpiono szczepionkami bezkomórkowymi, które zawierają wyizolowane antygeny białkowe *B. pertussis*. W ostatnich latach obserwuje się wzrost częstości zachorowań na krztusiec w wielu krajach Europy, Kanadzie i USA [11,56,79,84]. Niewystarczająca skuteczność szczepionek bezkomórkowych jest uznawana za główny powód zwiększającej się zachorowalności na krztusiec. Porównanie odporności wywołanej zakażeniem *B. pertussis* i szczepionkami przeciwkrztuścowymi wskazało, że odpowiedź odpornościowa wzbudzana szczepionką pełnokomórkową przypomina odporność powstającą w wyniku zachorowania na krztusiec oraz jest odmienna od procesów odpornościowych przebiegających w organizmie w wyniku immunizacji szczepionką bezkomórkową. Szczepionki pełnokomórkowe wywołują odpowiedź immunologiczną z udziałem interleukin prozapalnych (IL-1, -6, -12, -23, IFN- γ) oraz przeciwciał opsonizujących IgG2. Szczepionki bezkomórkowe zawierają antygeny, które wywołują wytwarzanie przeciwciał klasy IgG1 neutralizujących skutki toksyczne *B. pertussis*, lecz nie indukują wytwarzanie przeciwciał bakteriobójczych, które są niezbędne do eliminacji bakterii. Liczne badania wykazują, że przeciwciała bakteriobójcze są wytwarzane w odpowiedzi odpornościowej na główny składnik powierzchniowy bakterii Gram-ujemnych - lipooligosacharyd. Wykazano, że w odporności wywołanej zakażeniem *B. pertussis* i szczepionką pełnokomórkową, główną rolę odgrywa także aktywność bakteriobójcza przeciwciał skierowanych przeciwko lipooligosacharydowi. Odporność z udziałem przeciwciał antyendotoksynowych eliminuje bakterie z udziałem dopełniacza i chroni organizm gospodarza przed wniknięciem patogenu do komórek, zapobiegając cytotoksycznym uszkodzeniom i zapewniając w ten sposób skuteczną ochronną odporność przeciwkrztuścową.

Część cukrowa LOS jest bardzo ekspozycja na powierzchni komórki *B. pertussis* stanowiąc główny cel bakteriobójczych przeciwciał. Liczne badania wskazują na wytwarzanie przeciwciał swoistych dla OS *B. pertussis* w wyniku immunizacji glikokoniugatami zawierającymi oligocukrowy fragment endotoksyny *B. pertussis*. Oligocukier izolowany z LOS połączony z nośnikiem białkowym wywołuje wytwarzanie przeciwciał rozpoznających LOS *B. pertussis* i wykazujących aktywność bakteriobójczą przeciwko *B. pertussis*. W celu uzupełnienia aktywności bakteriobójczej o aktywność neu-



Ryc. 7. Proces otrzymywania neoglikokoniugatu ze składników *B. pertussis*, oligosacharydu (OS) i toksyny krztuśca w wyniku reakcji reduktywnej aminacji na podstawie [42]

tralizującą toksynę krztuśca, oligocukier *B. pertussis* połączono z toksyną krztuśca, uzyskując glikokoniugaty antygen o szerokich właściwościach przeciwrztuścowych. Wszystkie opisane glikokoniugaty zawierające oligocukrowy fragment LOS stanowią immunogenne antygeny o właściwościach ochronnych przeciwko zakażeniom *B. pertussis* wskazując na możli-

wość ich zastosowania jako składnika szczepionki przeciwrztuścowej. Prowadzone badania nad przyczynami wzrostu zachorowań na krztusiec pozwalają zatem na zdefiniowanie skutecznej szczepionki oraz wskazują na potrzebę poszerzenia składu obecnie stosowanych preparatów o antygen zapewniający ochronną odporność przeciwrztuścową.

PISMIENICTWO

- [1] Albitar-Nehme S., Basheer S.M., Njamkepo E., Brisson J.R., Guiso N., Caroff M.: Comparison of lipopolysaccharide structures of *Bordetella pertussis* clinical isolates from pre- and post-vaccine era. *Carbohydr. Res.*, 2013; 378: 56-62
- [2] Archambault D., Rondeau P., Martin D., Brodeur B.R.: Characterization and comparative bactericidal activity of monoclonal antibodies to *Bordetella pertussis* lipo-oligosaccharide A. *J. Gen. Microbiol.*, 1991; 137: 905-911
- [3] Avery O.T., Goebel W.F.: Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins: II. Immunological specificity of synthetic sugar-protein antigens. *J. Exp. Med.*, 1929; 50: 533-550
- [4] Bechini A., Tiscione E., Boccalini S., Levi M., Bonanni P.: Acellular pertussis vaccine use in risk groups (adolescents, pregnant women, newborns and health care workers): a review of evidences and recommendations. *Vaccine*, 2012; 30: 5179-5190
- [5] Black R.E., Cousens S., Johnson H.L., Lawn J.E., Rudan I., Bassani D.G., Jha P., Campbell H., Walker C.F., Cibulskis R., Eisele T., Liu L., Mathers C., Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF: Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet*, 2010; 375: 1969-1987
- [6] Burns D.L., Kenimer J.G., Manclark C.R.: Role of the A subunit of pertussis toxin in alteration of Chinese hamster ovary cell morphology. *Infect. Immun.*, 1987; 55: 24-28
- [7] Caroff M., Brisson J., Martin A., Karibian D.: Structure of the *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. *FEBS Lett.*, 2000; 477: 8-14
- [8] Caroff M., Karibian D.: Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr. Res.*, 2003; 338: 2431-2447
- [9] Centers for Disease Control and Prevention: Pertussis Chapter - Epidemiology of Vaccine-Preventable Diseases. The Pink Book: Course Textbook. 2015
- [10] Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Pertussis vaccination: use of acellular pertussis vaccines among infants and young children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm. Rep.*, 1997; 46: 1-25
- [11] Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Pertussis epidemic - Washington, 2012. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 2012; 61: 517-522
- [12] Chaby R., Caroff M.: Lipopolysaccharides of *Bordetella pertussis* endotoxin. W: Pathogenesis and immunity in pertussis. John-Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom 1988, 247-271
- [13] Cherry J.D.: Epidemic pertussis in 2012 — the resurgence of a vaccine-preventable disease. *N. Engl. J. Med.*, 2012; 367: 785-787
- [14] Cherry J.D.: Why do pertussis vaccines fail? *Pediatrics*, 2012; 129: 968-970
- [15] Chodorowska M., Kuklińska D.: Krztusiec u młodzieży i osób dorosłych. *Przegl. Epidemiol.*, 2001; 55: 189-195
- [16] Chodorowska M., Kuklińska D.: Restrykcyjna analiza DNA pałeczek *Bordetella pertussis* wyizolowanych od chorych na krztusiec w 1968 roku i w latach 1995-98 oraz szczepów *B. pertussis* stosowanych do produkcji krajowej szczepionki przeciwkrztuscowej. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 2001; 52: 111-117
- [17] Clark T.A.: Changing pertussis epidemiology: everything old is new again. *J. Infect. Dis.*, 2014; 209: 978-981
- [18] Dagan R., Poolman J., Siegrist C.A.: Glycoconjugate vaccines and immune interference: a review. *Vaccine*, 2010; 28: 5513-5523
- [19] 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
- [20] Edwards K.M., Berbers G.A.: Immune responses to pertussis vaccines and disease. *J. Infect. Dis.*, 2014; 209 (Suppl. 1): S10-S15
- [21] Elomaa A., He Q., Minh N.N., Mertsola J.: Pertussis before and after the introduction of acellular pertussis vaccines in Finland. *Vaccine*, 2009; 27: 5443-5449
- [22] Farizo K.M., Burns D.L., Finn T.M., Gruber M.F., Pratt R.D.: Clinical evaluation of pertussis vaccines: US Food and Drug Administration regulatory considerations. *J. Infect. Dis.*, 2014; 209 (Suppl. 1): S28-S31
- [23] Finco O., Rappuoli R.: Designing vaccines for the twenty-first century society. *Front. Immunol.*, 2014; 5: 12
- [24] Flak T.A., Goldman W.E.: Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell. Microbiol.*, 1999; 1: 51-60
- [25] Guiso N.: *Bordetella pertussis* and pertussis vaccines. *Clin. Infect. Dis.*, 2009; 49: 1565-1569
- [26] Guiso N.: *Bordetella pertussis*: why is it still circulating? *J. Infect.*, 2014; 68 (Suppl. 1): S119-S124
- [27] Gzyl A., Augustynowicz E., Gniadek G., Ślusarczyk J.: Zmienność genetyczna szczepów *Bordetella pertussis*. Część II. Perspektywy na przyszłość. *Przegl. Epidemiol.*, 2003; 57: 193-200
- [28] Gzyl A., Augustynowicz E., Rabczenko D., Gniadek G., Ślusarczyk J.: Pertussis in Poland. *Int. J. Epidemiol.*, 2004; 33: 358-365
- [29] Gzyl A., Augustynowicz E., Zawadka M., Rabczenko D., Ślusarczyk J.: Ocena efektywności pełnokomórkowych i bezkomórkowych szczepionek przeciw krztuscowi w eliminacji eksperymentalnego zakażenia myszy *Bordetella pertussis*. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 2007; 59: 123-135
- [30] Heidary N., Cohen D.: Hypersensitivity reactions to vaccine components. *Dermatitis*, 2005; 16: 115-120
- [31] Heininger U.: Recent progress in clinical and basic pertussis research. *Eur. J. Pediatr.*, 2001; 160: 203-213
- [32] Hermanson G.T.: The reactions of bioconjugation. W: Techniques (Third Edition). Academic Press, 2013, 229-258
- [33] Higgins S.C., Jarnicki A.G., Lavelle E.C., Mills K.H.: TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J. Immunol.*, 2006; 177: 7980-7989
- [34] Higgs R., Higgins S.C., Ross P.J., Mills K.H.: Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunol.*, 2012; 5: 485-500
- [35] Jennings H.J., Ługowski C.: Immunochemistry of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. *J. Immunol.*, 1981; 127: 1011-1018
- [36] Jennings H.J., Ługowski C., Ashton F.E.: Conjugation of meningococcal lipopolysaccharide R-type oligosaccharides to tetanus toxoid as route to a potential vaccine against group B *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.*, 1984; 43: 407-412
- [37] Kerr J.R., Matthews R.C.: *Bordetella pertussis* infection: pathogenesis, diagnosis, management, and the role of protective immunity. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2000; 19: 77-88
- [38] Kimura A., Beurret M., Cowell J.L.: Immunogenic conjugates of nontoxic oligosaccharide derived from *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide. Patent EP0471954. 1992
- [39] Klein N.P., Bartlett J., Fireman B., Rowhani-Rahbar A., Baxter R.: Comparative effectiveness of acellular versus whole-cell pertussis vaccines in teenagers. *Pediatrics*, 2013; 131: e1716-e1722
- [40] Klein N.P., Bartlett J., Rowhani-Rahbar A., Fireman B., Baxter R.: Waning protection after fifth dose of acellular pertussis vaccine in children. *N. Engl. J. Med.*, 2012; 367: 1012-1019

- [41] Koepke R., Eickhoff J.C., Ayele R.A., Petit A.B., Schauer S.L., Hopfensperger D.J., Conway J.H., Davis J.P.: Estimating the effectiveness of tetanus-diphtheria-acellular pertussis vaccine (Tdap) for preventing pertussis: evidence of rapidly waning immunity and difference in effectiveness by Tdap brand. *J. Infect. Dis.*, 2014; 210: 942-953
- [42] Koj S., Niedziela T., Ługowski C.: *Bordetella pertussis* LOS-derived oligosaccharide with pertussis toxin glycoconjugate and its application in the prophylaxis and treatment of infections caused by *Bordetella pertussis*. Patent WO/2014/195881. 11.12.2014
- [43] Kubler-Kielb J.: Conjugation of LPS-derived oligosaccharides to proteins using oxime chemistry. *Methods Mol. Biol.*, 2011; 751: 317-327
- [44] Kubler-Kielb J., Pozsgay V.: A new method for conjugation of carbohydrates to proteins using an aminoxy-thiol heterobifunctional linker. *J. Org. Chem.*, 2005; 70: 6987-6990
- [45] Kubler-Kielb J., Vinogradov E., Ben-Menachem G., Pozsgay V., Robbins J.B., Schneerson R.: Saccharide/protein conjugate vaccines for *Bordetella* species: preparation of saccharide, development of new conjugation procedures, and physico-chemical and immunological characterization of the conjugates. *Vaccine*, 2008; 26: 3587-3593
- [46] Kubler-Kielb J., Vinogradov E., Lagergård T., Ginzberg A., King J.D., Preston A., Maskell D.J., Pozsgay V., Keith J.M., Robbins J.B., Schneerson R.: Oligosaccharide conjugates of *Bordetella pertussis* and *Brachispira* induce bactericidal antibodies, an addition to pertussis vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 4087-4092
- [47] Le Blay K., Caroff M., Blanchard F., Perry M.B., Chaby R.: Epitopes of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides as potential markers for typing of isolates with monoclonal antibodies. *Microbiology*, 1996; 142: 971-978
- [48] Le Dur A., Caroff M., Chaby R., Szabó L.: A novel type of endotoxin structure present in *Bordetella pertussis*. Isolation of two different polysaccharides bound to lipid A. *Eur. J. Biochem.*, 1978; 84: 579-589
- [49] Ługowski C., Niedziela T., Jachymek W.: Endotoksyny bakteryjne: struktura, aktywności biologiczne, szczepionki koniugatowe. *Mikrobiol. Med.*, 1996; 4: 28-39
- [50] Mahon B.P., Ryan M.S., Griffin F., Mills K.H.: Interleukin-12 is produced by macrophages in response to live or killed *Bordetella pertussis* and enhances the efficacy of an acellular pertussis vaccine by promoting induction of Th1 cells. *Infect. Immun.*, 1996; 64: 5295-5301
- [51] Marr N., Novikov A., Hajjar A.M., Caroff M., Fernandez R.C.: Variability in the lipooligosaccharide structure and endotoxicity among *Bordetella pertussis* strains. *J. Infect. Dis.*, 2010; 202: 1897-1906
- [52] Marzouqi I., Richmond P., Fry S., Wetherall J., Mukkur T.: Development of improved vaccines against whooping cough: current status. *Hum. Vaccin.*, 2010; 6: 543-553
- [53] 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
- [54] Mills K.H., Ross P.J., Allen A.C., Wilk M.M.: Do we need a new vaccine to control the re-emergence of pertussis? *Trends Microbiol.*, 2014; 22: 49-52
- [55] 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
- [56] 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
- [57] Mountzouros K.T., Kimura A., Cowell J.L.: A bactericidal monoclonal antibody specific for the lipooligosaccharide of *Bordetella pertussis* reduces colonization of the respiratory tract of mice after aerosol infection with *B. pertussis*. *Infect. Immun.*, 1992; 60: 5316-5318
- [58] Niedziela T., Letowska I., Lukaszewicz J., Kaszowska M., Czarnecka A., Kenne L., Ługowski C.: Epitope of the vaccine-type *Bordetella pertussis* strain 186 lipooligosaccharide and antiendotoxin activity of antibodies directed against the terminal pentasaccharide-tetanus toxoid conjugate. *Infect. Immun.*, 2005; 73: 7381-7389
- [59] Paradowska-Stankiewicz I., Rudowska J.: Pertussis in Poland in 2010. *Przegl. Epidemiol.*, 2012; 66: 211-214
- [60] 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
- [61] Pichichero M.E., Rennels M.B., Edwards K.M., Blatter M.M., Marshall G.S., Bologna M., Wang E., Mills E.: Combined tetanus, diphtheria, and 5-component pertussis vaccine for use in adolescents and adults. *JAMA*, 2005; 293: 3003-3011
- [62] Robbins J.B., Schneerson R., Kubler-Kielb J., Keith J.M., Trollfors B., Vinogradov E., Shiloach J.: Toward a new vaccine for pertussis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014; 111: 3213-3216
- [63] Sato H., Sato Y.: Experience with diphtheria toxoid-tetanus toxoid-acellular pertussis vaccine in Japan. *Clin. Infect. Dis.*, 1999; 28 (Suppl. 2): S124-S130
- [64] Sato Y., Sato H.: Development of acellular pertussis vaccines. *Biologicals*, 1999; 27: 61-69
- [65] Schmidtke A.J., Boney K.O., Martin S.W., Skoff T.H., Tondella M.L., Tatti K.M.: Population diversity among *Bordetella pertussis* isolates, United States, 1935-2009. *Emerg. Infect. Dis.*, 2012; 18: 1248-1255
- [66] Schneerson R., Levi L., Robbins J.B.: Pertussis toxin used as a carrier protein with non-charged saccharides in conjugate vaccines. Patent US 5445817 A. 1995
- [67] Sheu G.C., Wo Y.Y., Yao S.M., Chou F.Y., Hsu T.C., Ju C.L., Cheng Y., Chang S.N., Lu C.H.: Characteristics and potency of an acellular pertussis vaccine composed of pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and pertactin. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2001; 34: 243-251
- [68] Skerry C.M., Mahon B.P.: A live, attenuated *Bordetella pertussis* vaccine provides long-term protection against virulent challenge in a murine model. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2011; 18: 187-193
- [69] Smith A.M., Guzmán C.A., Walker M.J.: The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2001; 25: 309-333
- [70] Tan Y., Fleck R.A., Asokanathan C., Yuen C.T., Xing D., Zhang S., Wang J.: Confocal microscopy study of pertussis toxin and toxoids on CHO-cells. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2013; 9: 332-338
- [71] Tondella M.L., Carlone G.M., Messonnier N., Quinn C.P., Meade B.D., Burns D.L., Cherry J.D., Guiso N., Hewlett E.L., Edwards K.M., Xing D., Giammanco A., Wirsing von König C.H., Han L., Hueston L. i wsp.: International *Bordetella pertussis* assay standardization and harmonization meeting report. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States, 19-20 July 2007. *Vaccine*, 2009; 27: 803-814
- [72] Trollfors B., Lagergård T., Taranger J., Bergfors E., Schneerson, Robbins J.B.: 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: 1015-1017
- [73] Trollfors B., Taranger J., Lagergård T., Lind L., Sundh V., Zackrisson G., Lowe C.U., Blackwelder W., Robbins J.B.: A placebo-controlled trial of a pertussis-toxoid vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 1995; 333: 1045-1050

- [74] Van den Berg B.M., David S., Beekhuizen H., Mooi F.R., van Furth R.: Protection and humoral immune responses against *Bordetella pertussis* infection in mice immunized with acellular or cellular pertussis immunogens. *Vaccine*, 2000; 19: 1118-1128
- [75] Van den Brink G., Wishaupt J.O., Douma J.C., Hartwig N.G., Versteegh F.G.: *Bordetella pertussis*: an underreported pathogen in pediatric respiratory infections, a prospective cohort study. *BMC Infect. Dis.*, 2014; 14: 526
- [76] Weiss A.A., Mobberley P.S., Fernandez R.C., Mink C.M.: Characterization of human bactericidal antibodies to *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, 1999; 67: 1424-1431
- [77] Weiss A.A., Patton A.K., Millen S.H., Chang S.J., Ward J.I., Bernstein D.I.: Acellular pertussis vaccines and complement killing of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, 2004; 72: 7346-7351
- [78] WHO: Pertussis vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol. Rec.*, 2010; 85: 385-400
- [79] Winter K., Harriman K., Zipprich J., Schechter R., Talarico J., Watt J., Chavez G.: California pertussis epidemic, 2010. *J. Pediatr.*, 2012; 161: 1091-1096
- [80] Wong K.H., Skelton S.K.: New, practical approach to detecting antibody to pertussis toxin for public health and clinical laboratories. *J. Clin. Microbiol.*, 1988; 26: 1316-1320
- [81] Wood N., McIntyre P.: Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediat. Respir. Rev.*, 2008; 9: 201-211
- [82] Woodward M.P., Young W.W.Jr., Bloodgood R.A.: Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. *J. Immunol. Methods*, 1985; 78: 143-153
- [83] Zieliński A., Borys D.: Problem nawrotu zachorowań na krztusiec. *Przegl. Pediatr.*, 2002; 32: 273-277
- [84] Zieliński A., Czarkowski M.P., Sadkowska-Todys M.: Infectious diseases in Poland in 2012. *Przegl. Epidemiol.*, 2014; 68: 177-185
-

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.