

Anna Gzyl, Ewa Augustynowicz, Grzegorz Gniadek, Janusz Ślusarczyk

ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA SZCZEPÓW *BORDETELLA PERTUSSIS*. CZĘŚĆ II. PERSPEKTYWY NA PRZYSZŁOŚĆ

Zakład Badania Surowic i Szczepionek Państwowego Zakładu Higieny
Kierownik: Janusz Ślusarczyk

W kilku krajach o wysokim poziomie zaszczepienia oraz o długiej historii szczepień przeciw krztuścowi (Holandia, Finlandia, Polska, USA, Francja, Wielka Brytania) odnotowano odmiennosć profili DNA i alleli genów kodujących podjednostkę S1 toksyny krztuścowej (ptx S1) i pertaktynę (prn) wśród szczepów B. pertussis stosowanych do produkcji komponenty krztuścowej szczepionki DTP w porównaniu do szczepów aktualnie izolowanych z materiału klinicznego. Z tych względów badania określające skuteczność szczepionek przeciwkrztuścowych pełnokomórkowych i bezkomórkowych w eliminacji zakażeń szczepami B. pertussis o różnych profilach genetycznych na modelu zwierzęcym pozwolą na ocenę celowości zmiany składu szczepów produkcyjnych.

Słowa kluczowe: zmienność genetyczna, Bordetella pertussis, skuteczność szczepionki DTP, krztusiec

Key words: genetic variability, Bordetella pertussis, efficacy of DTP vaccine, pertussis

WSTĘP

Postęp nauki, jaki dokonał się w ostatnich dekadach, przyniósł wiele wymiernych osiągnięć w wielu dziedzinach medycyny, m.in. w postaci ochrony populacji przed wieloma zakażeniami za pomocą masowych szczepień. W przypadkach błonicy i tężca zaszczepienia osiągnęły wysoką skuteczność. Stabilny obraz kontroli krztuśca został w wielu krajach zakłócony nasileniem się zachorowań pomimo osiągniętego wysokiego stanu uodpornienia (1, 2, 3). Podobnie, pomimo 20-krotnego spadku częstości zakażeń wywoływanych przez *Haemophilus influenzae* w USA i Europie Zachodniej związanego z wprowadzeniem szczepionki przeciw szczepom *H. influenzae* o serotypie b, w latach 1989-1994 odnotowano 2-krotny wzrost zachorowań wywoływanych przez serotypy nie-b (a, c-f oraz nietypowalne szczepy *H. influenzae*) (4, 5, 6). W odniesieniu do odrzy wykazano, że w obecnie występujących dzikich szczepach wirusa doszło do przesunięć antygenowych, których nie stwierdzono u szczepów stosowanych do produkcji szczepionki przeciw odrze. Z tych powodów, pomimo że zmiany te - jak na razie - nie

wpłynęły na nasilenie się zachorowań na odrę, szczepy wirusa odrzy izolowane z przypadków zachorowań wymagają ścisłego monitorowania zmienności genetycznej (7).

Wiele może być czynników odpowiedzialnych za nasilenie się zachorowań, którym od wielu lat skutecznie zapobiega się za pomocą szczepień. Jednym z nich może być spadek jakości szczepionki, np. w wyniku zmian technologicznych procesu produkcyjnego lub na skutek interferencji pomiędzy poszczególnymi składnikami szczepionki skojarzonej. Ponadto zjawisko to można łączyć z obniżeniem wykonawstwa szczepień, zanikaniem odporności poszczepiennej w miarę upływu czasu po szczepieniu, zmianą transmisji zakażenia w różnych grupach wiekowych, czy też ekspansją szczepów antygenowo odmiennych w stosunku do szczepów wchodzących w skład szczepionki (*escape mutants*). Tę ostatnią możliwość, w której spadek skuteczności szczepień może zostać powiązany z powstawaniem zmian w populacjach drobnoustrojów w postaci pojawienia się mutantów mniej wrażliwych lub niewrażliwych na działanie szczepień, łączy się z wieloletnią selekcją spowodowaną immunizacją. Szczepienia w tym wypadku można rozpatrywać jako czynnik selekcyjny, ukierunkowujący ewolucję danego drobnoustroju ku wyeliminowaniu lub obniżeniu częstości pojawiania się szczepów antygenowo identycznych ze szczepami szczepionkowymi (8). Szczepienia mogą być skuteczne do czasu kiedy pojawią się mutanty, których antygenowość nie zostanie zmieniona poprzez mutacje/rekombinacje. W przypadku pojawienia się nowych wariantów antygenowych o zwiększonej zdolności unikania odpowiedzi immunologicznej indukowanej za pomocą szczepień, może dochodzić do osłabienia skuteczności immunizacji. Wydaje się, że istotną rolę w powstawaniu tak zmutowanych szczepów w warunkach ciągłej presji selekcyjnej (masowa immunizacja), może odgrywać indukcja tzw. genów adaptacyjnych. Przyjmuje się, że średnio 10 z 2000 genów typowej komórki bakteryjnej to geny adaptacyjne, z których każdy może występować w co najmniej 1024 (2^{10}) kombinacjach, co daje możliwość przeżycia przynajmniej jednej komórce bakteryjnej o danej kombinacji, w danej populacji, w zmiennych warunkach środowiska (9).

SZCZEPIONKI PEŁNOKOMÓRKOWE PRZECIWKRZTUŚCOWE (*WCV-WHOLE CELL VACCINES*; KOMPONENT wP)

Szczepionki pełnokomórkowe przygotowywane są z namnożonych na podłożu stałym lub płynnym *B. pertussis*, poddawanych inaktywacji chemicznej lub termicznej i odtoksyznieniu formaliną. Pierwszych danych o skuteczności szczepionek przeciwkrztuścowych dostarczyły wyniki kontrolowanych badań terenowych, przeprowadzonych w pierwszej połowie lat czterdziestych XX wieku w Wielkiej Brytanii (10).

Wstępne prace dotyczące szczepionek przeciwkrztuścowych w Polsce pojawiły się w roku 1914 (11), natomiast pierwsze próby szczepień prowadzono od 1923 roku (12, 13, 14, 15). Początkowo szczepienia prowadzono monowalentną szczepionką przeciw krztuścowi, a od drugiej połowy 1960 roku wprowadzono do produkcji oraz do masowych szczepień szczepionkę skojarzoną przeciw błonicy, tężcowi i krztuścowi (Di-Te-Per - *Diphtheria-Tetanus-Pertussis*, obecnie DTP). Do ówczesnej produkcji stosowano świeżo wyizolowane szczepy w I fazie wzrostu, które po przebadaniu w Państwowym Zakładzie Higieny pod względem właściwości antygenowych, morfologicznych i serologicznych przekazywano do Lubelskiej (do zakończenia produkcji DTP w 1964 roku) oraz Warszawskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek „BIOMED” (do zakończenia

produkcji DTP w 1990 roku) oraz Krakowskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek „BIO-MED”, obecnie S.A. (16). Od roku 1969 do produkcji szczepionki wykorzystywano 6 wyselekcjonowanych szczepów *B. pertussis*, które zredukowano w 1978 roku do trzech szczepów stosowanych do chwili obecnej. Do 1992 roku pojedyncza dawka szczepionki wynosiła 1 ml, a od 1993 roku dawkę ustalono zgodnie z międzynarodowym dawkowaniem na 0,5 ml. Zawiera ona maksymalnie do 20 mld pałeczek krztuśca na dawkę.

W 1998 roku zarejestrowano w Polsce produkowane za granicą szczepionki skojarzone z pełnokomórkową komponentą krztuścową: Tetracoq [DTP-IPV] (Aventis Pasteur), Tritanrix [DTP-HBV] (GlaxoSmithKline), a w 2001 roku - D.T.COO [DTP] (Aventis Pasteur).

SZCZEPIONKI BEZKOMÓRKOWE PRZECIWKRZTUŚCOWE (*ACV-ACCELULAR VACCINE*; KOMPONENT aP)

Badania immunochemiczne doprowadziły do izolacji i charakterystyki wielu biologicznie aktywnych substancji produkowanych przez *Bordetella pertussis*, pozwalając na lepsze zrozumienie patogenezy choroby oraz odpowiedzi immunologicznej powstałej w wyniku zakażenia naturalnego oraz w wyniku szczepienia. Wiedza ta przyczyniła się również do opracowania szczepionek bezkomórkowych oraz do ulepszenia diagnostyki serologicznej krztuśca (17, 18). Dotychczas producenci włączyli w skład bezkomórkowych szczepionek przeciwkrztuścowych od jednego do czterech oczyszczonych antygenów *B. pertussis* (toksyna krztuścowa, pertaktyna, hemaglutynina włókienkowa, aglutynogeny) - w różnej kombinacji. Pozostałe antygeny tj.: cyklaza adenyloza, lipopolisacharyd, toksyna oskrzelowa i ciepłowrażliwa toksyna dermonekrotyczna są poddawane badaniom ich przydatności jako potencjalnych antygenów wchodzących w skład przyszłych szczepionek. Pierwsze szczepionki bezkomórkowe opracowano i wprowadzono do powszechnego programu szczepień ochronnych w Japonii w 1981 roku. Były to szczepionki dwóch typów, w zależności od proporcji zawartości toksyny krztuścowej, hemaglutyniny włókienkowej oraz fimbrii: (i) typu Biken (podobna zawartość toksyny i hemaglutyniny włókienkowej: 12,5-24 µg/dawkę) oraz (ii) typu Takeda (wyższa zawartość hemaglutyniny włókienkowej - 30-40 µg niż toksyny krztuścowej - 5 µg + fimbrie serotypu 2-1 µg) (19). Dotychczas produkowane bezkomórkowe szczepionki przeciwkrztuścowe są uzyskiwane na bazie oczyszczonych oraz odtoksycznionych antygenów izolowanych ze szczepów bakteryjnych.

Rejestrację krztuścowych szczepionek bezkomórkowych skojarzonych, ze względu na mniejszą reaktożenność oraz bardziej określony skład, rozpoczęto w Polsce w 1998 roku. Kolejno zarejestrowano:

- Infanrix [DTaP]-producent: GlaxoSmithKline (1998);
- DTaP [DTaP] oraz DTaP-IPV [DTaP-IPV] - producent: Statens Serum Institute (SSI) (1999);
- Tripacel [DTaP] - producent: Aventis Pasteur (1999);
- Infanrix-HepB [DTaP+HBV], Infanrix-IPV-HIB [DTaP+IPV+Hib] producent: GlaxoSmithKline (1998).

Wyżej wymienione szczepionki mają zróżnicowaną zawartość poszczególnych antygenów. Zawartość antygeny toksyny krztuścowej obecnej we wszystkich w/w preparatach jest najwyższa (40 µg) w przypadku szczepionek DTaP i DTaP-IPV produkcji SSI,

natomiast najniższa (10 μg) w przypadku Tripacelu. Włókienkowa hemaglutynina oraz pertaktyna są nieobecne tylko w DTaP i DTaP-IPV. Zawartość włókienkowej hemaglutyniny waha się od 5 μg w szczepionce Tripacel do 25 μg w szczepionkach: Infanrix, Infanrix-HepB, Infanrix-IPV-HIB, natomiast zawartość pertaktyny waha się w granicach od 3 μg (Tripacel) do 8 μg (Infanrix, Infanrix-HepB, Infanrix-IPV-HIB). Tripacel dodatkowo zawiera 5 μg antygenów fimbrii.

Różny skład i zawartość antygenów stosowanych przez poszczególnych producentów wynika z braku sprecyzowanych zaleceń WHO i Farmakopei Europejskiej co do obecności i zawartości poszczególnych antygenów w szczepionkach bezkomórkowych.

PERSPEKTYWY SKUTECZNOŚCI SZCZEPIEŃ ZA POMOCĄ SZCZEPIONEK WCV I ACV

Zachorowalność na krztusiec skutecznie kontrolowano poprzez obowiązkowe szczepienia pełnokomórkową szczepionką przeciw krztuścowi, wprowadzaną do obowiązkowych schematów szczepień w różnych krajach w latach 1940-1960. Masowe szczepienia ochronne doprowadziły do 8-15-krotnego spadku zachorowań na krztusiec w latach 90-tych w stosunku do lat 70-tych. W Polsce obowiązkowe szczepienia przeciw krztuścowi wprowadzono w 1960 roku. Ich wynikiem był 100-krotny spadek zapadalności do początku lat 80-tych. Pomimo wysokiego poziomu zaszczepienia w wielu krajach, np. w USA, Kanadzie, Szwecji, Holandii oraz Australii od lat 80-tych obserwuje się stopniowy wzrost zachorowań na krztusiec. W Polsce w latach 90-tych wzrost zachorowań na krztusiec osiągnął poziom zapadalności przypominający sytuację w latach 70-tych. W naszym kraju w latach 1997-1998 odnotowano epidemiczny wzrost zachorowań na krztusiec (20). Nasilenie zachorowań wystąpiło wśród dzieci powyżej 5 lat (21). Przy czym wzrost ten nie powiązany jest ze spadkiem poziomu zaszczepienia, z kolei niepublikowane wyniki analiz jakości komponenty krztuścowej szczepionki DTP wskazują, że w latach 1992-1997 w związku z obniżeniem liczby bakterii na pojedynczą dawkę ludzką realna wartość uodparniająca była niższa w stosunku do wartości osiągniętej przed 1992 i po 1997 roku.

Wyniki przeprowadzonych badań (omówione w części I pracy) wskazują, że istotną rolę w nasilaniu się zachorowań na krztusiec może odgrywać pojawienie się szczepów odpornych na działanie szczepień. Prace prowadzone w Zakładzie Badania Surowic i Szczepionek w ramach projektu badawczego KBN wskazują, że szczepy *B. pertussis* o odmiennym profilu genetycznym podjednostki S1 toksyny krztuścowej i pertaktyny są eliminowane w znacznie mniejszym stopniu z tkanki płucnej zwierząt uprzednio uodpornionych szczepionką DTP w stosunku do szczepów obecnie stosowanych do produkcji.

Na pojawienie się takich mutantów *B. pertussis* mogą nakładać się dodatkowe czynniki, które komplikują cały obraz szeroko rozumianej skuteczności szczepień przeciw krztuścowi. Odpowiedź po szczepieniu szczepionką pełnokomórkową określonej produkcji może być zróżnicowana w różnych krajach lub miejscach jej zastosowania, ponieważ - jak obliczono - 38 producentów szczepionki pełnokomórkowej na świecie stosuje aż 46 różnych szczepów *B. pertussis* (tab. 1) (22). Od 1979 roku zalecenia WHO wskazują na obowiązek produkcji szczepionki krztuścowej na bazie wyselekcjonowanych szczepów *B. pertussis*, zawierających pełny skład aglutynogenów 1, 2 i 3. Brak zaleceń

Tabela I. Producenci szczepionki DTP i szczepionkowe szczepy *B. pertussis* na świecie w 1996 [zmodyfikowano wg Milstein i wsp. (22)]

Table I. Manufacturers of DTP vaccines and *B. pertussis* vaccine strains in the world in 1996 [modified acc. Milstein et al. (22)]

| Kraj | Producent | Nazwa szczepu | Kraj | Producent | Nazwa szczepu |
|-----------|---|--|-----------|--|---|
| Argentyna | INMCM LCSP | 10536, 40103 10536 | Japonia | CSTRI Takeda Chyba Denka JVI | Tohama Tohama Tohama Tohama 10536L, 134, 509, 2991 |
| Australia | CSL | VP4, VP30, BrII | Meksyk | INH | 134, 509 |
| Brazylia | IB | 165 | Rosja | RPA | 262, 305, 312, 475 |
| Bułgaria | Sofia | 262, 345, 358 | Tajlandia | GPO | 26426 + import |
| Kanada | Connaught IAF | 10536, 1494 311, 333, 336 | Turcja | RS | lokalny + Zagreb |
| Chile | ISP | Tohama | Anglia | Medeva | 3 szczepy |
| Chiny | Beijing Changchun Chengdu Lanzhou Shanghai Wuhan | lokalny szczep 18530 58001, 58031, lokalny lokalny 18530, Shanghai 18530, P56 | USA | | razem 10536, 18398, 18530, 18628, 18904, 19002, 21487, 22402, 24990, Lynch |
| Kolumbia | INSSM | 10536, 18334 | Urugwaj | IHPAB | 137 |
| Chorwacja | Zagreb | 10536 | Wenezuela | INRHH | 134, 509 |
| Kuba | IF | 134, 509 | Wietnam | IVAC | 134, 509 + import |
| DPR Korea | Pyongyang | 134, 509, 622 | Iran | Razi | 134, 509 |
| Ekwador | INHMT | 137, 143 | Węgry | Human | 134, 509, CN2897 |
| Francja | PMSV | IM1414, IM1416 | Indie | Haffkine SSI BioEvans | 134, 509, 10536 134, 509, 6229, 25525 134, 509 |
| Niemcy | Bering | 41405 | Indonezja | BioFarma | PelitalIII, Kitasato |

Tabela I. rozdz. 26, A Gzyl i inni

co do innych swoistych typów antygeny powodował w przeszłości i nadal powoduje szeroką dowolność doboru szczepów przez producentów. Ponadto oprócz różnego składu szczepów, a zatem składu antygenowego szczepionek pełnokomórkowych, poszczególne szczepionki zawierają zróżnicowaną zawartość substancji czynnych: toksyny krztuścowej (0,02-0,68 µg/dawkę), LPS (0,9-2,8µg/ml) i hemaglutyniny włóknikowej (0-1,6 fig/dawkę). Różne szczepionki pełnokomórkowe indukują również zróżnicowany wzrost miana przeciwciał w stosunku do wszystkich znanych antygenów *B. pertussis*. Przypuszczać można, że szczepionki DTP produkowane w fermentorach mogą zawierać niższą zawartość antygenów powierzchniowych niż szczepionki produkowane w warunkach stacjonarnych (22).

Zróżnicowana skuteczność szczepionek bezkomórkowych wprowadzanych do szczepień w danym kraju może wynikać z różnic ukierunkowanej odpowiedzi immunologicznej, wzbudzanej za pomocą szczepień szczepionką pełnokomórkową, produkowaną w oparciu o różne szczepy w różnych krajach. Obecnie dostępne szczepionki bezkomórkowe z reguły zawierają allel *pm1* i *ptxSIB/SID*, a więc, np. w Polsce identyczny ze składem wariantów genów występujących w szczepach produkcyjnych.

Wszystkie przytoczone dane wskazują, że zmienność genetyczna szczepów *B. pertussis* powinna być monitorowana szczególnie ze względu na jej możliwy wpływ na skuteczność szczepień. Większość szczepionek pełnokomórkowych jest produkowana w oparciu o szczepy izolowane 50 lat wcześniej, zatem zastosowanie obecnie izolowanych szczepów teoretycznie może wpłynąć na podniesienie skuteczności szczepień. Dalsze badania dotyczące zdolności ochronnej szczepionek przed zakażeniem szczepami prezentującymi różne typy *prn* i *ptxSl* potwierdzą celowość zmiany składu szczepionek pełnokomórkowych w zależności od profilu wariantów genetycznych dla szczepów izolowanych obecnie w danym kraju. Tego rodzaju analiza zdolności indukcji ochronnej odpowiedzi poszczepiennej przed zakażeniem szczepami wykazującymi różne typy *ptxSl* i *prn* została przeprowadzona przez ośrodek w Belgii (23). Analiza dotyczyła 3 szczepów izolowanych w latach 1993-1996 o wariantach: *ptxSIE/prn1A*, *ptxSIA1pm2* oraz *ptxSIA/prn3*. Uzyskane wyniki badań wskazują, że szczepionka bezkomórkowa produkowana na bazie szczepu *B. pertussis* Tohama o wariacie *SIB/prn1* (producent: GlaxoSmithKline) jest w pełni skuteczna w zwalczaniu zakażenia szczepami *B. pertussis* o różnym profilu genetycznym. Należy zatem oczekiwać, że podobne badania będą prowadzone na większą skalę z uwzględnieniem reprezentatywnej liczby szczepów.

Działania w zakresie zdrowia publicznego poprzez zastosowanie terapii czy masowych szczepień powinny zatem obejmować również prognozy możliwych kierunków ewolucji populacji drobnoustrojów. Zrozumienie struktury i dynamiki rozwoju populacji drobnoustrojów ma podstawowe znaczenie w opracowywaniu skutecznego nadzoru w ochronie zdrowia poprzez przewidywanie środków zaradczych, które mogłyby przeciwdziałać niekontrolowanej ewolucji mikroorganizmów. O wadze tego problemu świadczy powołanie specjalnej grupy naukowców UE ds. opracowania ujednoliconej metodyki serotypowania, elektroforezy pulsacyjnej oraz sekwencjonowania w celu różnicowania szczepów *B. pertussis* izolowanych i badanych w różnych krajach. Ujednolicenie metodyki ma na celu porównywanie danych uzyskanych w różnych laboratoriach w celu wyjaśnienia czy ze względu na stosowanie szczepionek pełnokomórkowych,

produkowanych w oparciu o różne szczepy w różnych krajach obserwowany jest odpowiednio zróżnicowany polimorfizm populacji *B. pertussis* (24).

Niebanalny tytuł jednego z rozdziałów Ewalda: "*WHO needs Darwin*" sam w sobie zapowiada konieczność określenia stabilności ewolucyjnej czynnika zakaźnego w kontroli chorób za pomocą szczepień (25). W przypadku, gdy szczepionki są konstruowane w oparciu o izolaty cechujące się najwyższą zjadliwością wśród szczepów danego gatunku, lub w oparciu o analogi składników odpowiedzialnych za wysoką zjadliwość, zastosowanie szczepień może doprowadzić do takiej sytuacji, że wówczas w populacji będą krążyć szczepy łagodne, a eliminowane będą izolaty o najwyższym zagrożeniu chorobotwórczym. Wówczas, kiedy szczepionki konstruowane będą na bazie szczepów o nie w pełni określonej lub niewystarczającej zjadliwości, szczepienia mogą pozostawiać rezerwar dla organizmów bardziej zjadliwych i mogą skutecznie rozprzestrzeniać się w populacji kiedy spadnie poziom zaszczepienia lub drobnoustroj wytworzy mechanizmy pozwalające na ominięcie obronnej odpowiedzi ochronnej, indukowanej za pomocą szczepień. Można zatem powtórzyć za Ewaldem, że kontrola chorób poprzez szczepienia powinna prowadzić do „udomowienia patogenów”, czyli pokierowania ich ewolucją nie przeciwko nam, lecz z korzyścią dla nas (25), co w przypadku krztuśca nie będzie chyba takie łatwe.

Anna Gzyl, Ewa Augustynowicz, Grzegorz Gniadek, Janusz Ślusarczyk

GENETIC VARIABILITY OF *BORDETELLA PERTUSSIS* STRAINS. PART II. PERSPECIVES

SUMMARY

In some highly immunized countries with long history of pertussis vaccination (The Netherlands, Finland, Poland, USA, France, Great Britain) differences in the DNA patterns and *ptxS1* and *prn* alleles present in *B. pertussis* strains used for production of pertussis component in the DTP vaccine, in comparison to strains presently isolated from clinical materials have been found. Studies on efficacy of whole-cell and acellular pertussis vaccines in elimination of *B. pertussis* strains harbouring different gene variants in a particular country might indicate a need for a change of *B. pertussis* strains used for production of the vaccine against pertussis.

PIŚMIENICTWO

1. Andrews R, Herceq A, Roberts C. Pertussis notifications in Australia. *Commun Dis Intel* 1997;21:145-8.
2. Bass JW, Wittit RR. Return of epidemie pertussis in the United States. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:343-5.
3. Gangarosa EJ, Gałazka AM, Wolfe CR, i in. Impact of anti-vaccine movements on pertussis control: the untold story. *Lancet* 1998;351:356-61.
4. Gilsdorf JR. Antigenic diversity and gene polymorphisms in *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1998;66:5053-9.
5. Urwin G, Krohn JA, Wenger JD, i in. Invasive disease due to *Haemophilus influenzae* serotype f: clinical and epidemiologic characteristics in the *H. influenzae* serotype b vaccine era. *Clin Infect Dis* 1996;22:1069-76.
6. Van Bel kum A, Scherer S, van Leeuwen W, i in. Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1997;65:5017-27.

7. Tarnin A, Rota PA, Wang Z, i in. Antigenic analysis of current wild type and vaccine strains of measles virus. *J Infect Dis* 1994;170:795-801.
8. Spratt BG, Maiden MC. Bacterial population genetics, evolution and epidemiology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999;354:701-10.
9. Kwiatkowska J, Trzeciak T, Słomski R. Powtórzenia DNA. *Postępy Biochemii* 1995;41:15-22.
10. Mc Farlan AM, Topley E, Fisher M. Trial of whooping cough vaccine in city and residential nursery groups. *Brit Med J* 1945;4415:205-9.
11. Biehler M. Bakteriologia i terapia krztuśca (szczepionki kokluszowe). *Med i Kronika Lek* 1914;49:465-75.
12. Bogdanowicz J, Moczulska J. Leczenie kokluszki szczepionką swoistą PZH. *Now Lek* 1932;44:524-9.
13. Frenklowa H. Przyczynki do leczenia krztuśca szczepionką swoistą. *Warsz Czas Lek* 1932;5:105-7.
14. Hryniewiecki S. Swoiste leczenie krztuśca. *Now Lek* 1936;48:445-51.
15. Knichowiecki B. Wyniki stosowania szczepionki kokluszowej w epidemii krztuśca. *Warsz Czas Lek* 1937;23-24:438-9.
16. Turowski G. Z badań nad własnościami antygenowymi *Bordetella pertussis* - praca doktorska, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, UJ, Kraków 1961.
17. Edwards KM. Acellular pertussis vaccines: a solution to the pertussis problem? *J Infect Dis* 1993;168:15-20.
18. Peppoloni S, Pizza M, De Magistris MT, i in. Acellular pertussis vaccine composed of genetically inactivated pertussis toxin. *Physiol Chem Phys Med* 1995;4:335-61.
19. Sato H, Sato Y. Experience with diphtheria toxoid-tetanus toxoid-acellular Pertussis vaccine in Japan. *Clin Infect Dis* 1999;28 Suppl 2:124-30.
20. Zieliński A, Czarkowski MP. Skuteczność szczepień przeciw krztuścowi w okresie epidemii 1997-1998 w Polsce. *Przegl Epidemiol* 2001;55:207-15.
21. Ślusarczyk J, Dulny G, Nowak K, i in. Stan uodpornienia dzieci w wieku lat 6-8 przeciw krztuścowi, tężcowi i błonicy. *Przegl Epidemiol* 2002;56:39-48.
22. Milstein JB, Gellin BG, Kane M, i in. Global DTP manufacturing capacity and capability. Status report: January 1995. *Vaccine* 1996;14:313-20.
23. Boursaux-Eude C, Thiberge S, Caeletti G, i in. Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection: II. Sequence variation and protection induced by a tricomponent acellular vaccine. *Vaccine* 1999;17:2651-60.
24. Mooi FR, Hallander H, Wirsing von König CH, i in. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:174-81.
25. Ewald PW. *The Evolution of Infectious Disease*. New York: Oxford Univ Press; 1994:191-217.

Adres autorów:

Anna Gzyl

Zakład Badań Surowic i Szczepionek Państwowego Zakładu Higieny

ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

tel. (0-prefiks-22) 54-21-213

e-mail: agzyl@pzh.gov.pl