

Anna Gzyl

PROBLEMY LABORATORYJNEJ OCENY SKUTECZNOŚCI BEZKOMÓRKOWYCH SZCZEPIONEK PRZECIW KRZTUŚCOWI

Zakład Badania Surowic i Szczepionek Państwowego Zakładu Higieny

Kierownik: Janusz Ślusarczyk

Skład bezkomórkowych szczepionek przeciw krztuścowi jest lepiej zdefiniowany niż pełno-komórkowych, jednak istniejące między nimi różnice zarówno antygenowe jak też różnice w metodach ich odtoksyczniania, prowadzą do odrębności cech każdej z dostępnych szczepionek DTP z komponentem bezkomórkowym. Metody stosowane do laboratoryjnego określania mocy szczepionek pełno-komórkowych nie są skuteczne w oznaczaniu mocy szczepionek bezkomórkowych. Wyniki przeprowadzonych badań terenowych wskazują na potrzebę dokładnej analizy i oceny bezpieczeństwa oraz skuteczności szczepionek DTP z bezkomórkowym komponentem krztuścowym, koniugowanych dodatkowo z innymi antygenami szczepionkowymi (np. Hib) dla wszystkich komponentów z osobna, a następnie po koniugacji. Mechanizmy niekorzystnych interakcji zachodzące w wyniku koniugacji i wpływające na słabszą odpowiedź ochronną są jak do tej pory mało poznane.

Słowa kluczowe: krztusiec, bezkomórkowa szczepionka przeciwkrztuścowa, markery odpowiedzi immunologicznej, szczepionki koniugowane

Key words: pertussis, acellular pertussis vaccine, markers of immune response, conjugated vaccines

WSTĘP

Od połowy XX wieku szczepienia przeciw krztuścowi przeprowadza się masowo stosując szczepionki pełno-komórkowe (wP – whole cell pertussis). Pomimo wcześniejszych wieloletnich sukcesów tych szczepień w kontroli zachorowań na krztusiec, wiele krajów rezygnuje z ich masowego stosowania, wobec istnienia bezpieczniejszej alternatywy w postaci szczepionek bezkomórkowych (aP – acellular pertussis). Skład szczepionek DTWP nie jest jednoznacznie określony jak to ma miejsce w przypadku DTaP. Wynika to ze stosowania w produkcji zawiesiny pełnych komórek *B. pertussis*, co w zależności od technologii produkcji wpływa z powodu różnic w zawartości antygenów (tj. toksyna krztuścowa, LPS, czy hemaglutynina włókienkowa) na ich immunogenność, odczynowość i własności ochronne (1–4). Jedynymi zaleceniami Światowej Organizacji Zdrowia (ŚOZ) dotyczący-

mi produkcji komponenty krztuścowej szczepionki DTwP jest obowiązkowe stosowanie szczepów *B. pertussis*, zawierających pełen skład aglutynogenów 1, 2 i 3. Do dopuszczenia do obrotu poszczególnych serii szczepionek DTwP stosowany jest zalecany przez ŚOZ oraz Farmakopeę Europejską (FE) czynny domózgowy test przeprowadzany na myszach białych (test Kendrick), którego wyniki korelują ze skutecznością ocenianą w badaniach terenowych u ludzi (5–6).

Różnice w technologii produkcji poszczególnych komponentów aP szczepionek DTP (źródło antygeny szczepionkowe, metody oczyszczania, liczba oraz zawartość poszczególnych składników, metody inaktywacji, zawartość oraz typ adiuwanty oraz innych składników) (tabela I) wyrażają się różnicach skuteczności, immunogenności oraz odczynowości poszczególnych szczepionek. Wyznaczenie optymalnej zawartości każdego ze stosowanych antygenów szczepionkowych aP w pojedynczej dawce ludzkiej jest bardzo skomplikowane, ze względu na brak zalecanej przez ŚOZ i FE metody określającej zdolność ochronną tych szczepionek. Ani wyniki testu Kendrick, stosowanego do oceny szczepionek DTwP, ani poziom przeciwciał w stosunku do antygenów zawartych w szczepionkach DTaP, nie korelują w sposób jednoznaczny ze stopniem ochrony przed zachorowaniem, dlatego tylko wyniki badań terenowych są wiążące w ocenie ich skuteczności.

KORELACJA MARKERÓW WZBUDZANEJ HUMORALNEJ ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ ZE SKUTECZNOŚCIĄ SZCZEPIONEK DTaP

Brak powszechnie wykazywanej korelacji między ochroną przed zachorowaniem na krztusiec a indukcją serologicznych markerów tej ochrony w stosunku do antygenów zawartych w szczepionkach DTaP, sprawia trudności we wprowadzaniu nowych lub w modyfikowaniu już istniejących szczepionek DTaP, bez przeprowadzania nowych badań klinicznych (7). Badania immunogenności 13 szczepionek DTaP wykazały w surowicach osób zaszczepionych statystycznie znamienne wzrost miana przeciwciał w stosunku do antygenów obecnych w danej szczepionce i w większości przypadków poziom przeciwciał równał się lub przewyższał poziom wykazywany w surowicach dzieci szczepionych DTwP (8). Poziom immunogenności badanych szczepionek DTaP był bardziej wyrównany niż w przypadku uodpornienia DTwP (1), choć różnice w immunogenności poszczególnych szczepionek DTaP również były widoczne i np. z dwóch szczepionek zawierających taką samą ilość PT (Pertussis Toxin- toksyna krztuścowa), jedna indukowała 2-krotnie wyższe miano przeciwciał niż druga. Podłoże takich różnic w immunogenności nie jest znane i może wynikać ze swoistego sposobu łączenia komponent, interferencji chemicznej lub immunologicznej pomiędzy antygenami lub innymi składnikami szczepionki (1).

W kilku badaniach terenowych poddano analizie utrzymywanie się skuteczności w miarę upływu czasu, (średnio 2–3 lata od podania ostatniej dawki szczepionki) oraz odpowiedź serologiczną oznaczoną przed narażeniem na zachorowanie, skorelowaną z poziomem zachorowań, które wystąpiły w okresie późniejszym (9, 10). Badania szwedzkie wskazują, że 23 miesiące po szczepieniu skuteczność szczepionki DTaP z pięcioskładnikowym komponentem bezkomórkowym była nadal wysoka (75.4%) (9). W surowicach krwi od 85% osób szczepionych stwierdzono wysokie poziomy przeciwciał anty-PRN/FIM2+3 (PRN – pertactin-pertaktyna, FIM2+3 – Fimbriae – aglutynogeny fimbrialne typu 2 i 3), natomiast wysokie poziomy przeciwciał anty-PT/FHA (FHA – Filamentous Haemagglu-

Tabela I. Charakterystyka szczepionek DTaP
Table I. Characteristics of the DTaP vaccines

PT (μg)	FHA (μg)	PRN (μg)	Fim (2+3) μg	aP	Dopuszczalne minimalne wartości zdołności ochronnej		Odtoksyznianie	Adiu- want (Al/mg)	Rozcien- czalnik	Środek konserwu- jący	Śladowe ilości	Koniu- gacja z
					moc D (Lf)	moc T (Lf)						
3,5- 50	0-35	0-8	0-10	- PT, - PT+FHA - PT+FHA+PRN - PT+FHA+PRN + Fim2 - PT+FHA+PRN + Fim2+Fim3	6,7-29 EU: 25 USA: 15	5-15 EU: 7 USA: 6	- formaldehyd, - glutaraldehyd, - formaldehyd + glutaraldehyd, - genetyczne, - H_2O_2 , - czteronitro- metan	0,17-0,75	- PBS - sól	- tiomersal, - fenoksy- etanol	- formaldehyd - żelatyna - polisorbit80 - glutaraldehyd	- Hib - Polio - HBV

tynin – hemaglutynina włókienkowa) stwierdzono zaledwie u 25% badanych. Z kolei skuteczność amerykańskiej szczepionki DTwP (28.5%) oraz szczepionki DTaP z dwuskładnikowym komponentem krztuścowym (42.4%) była zdecydowanie niższa (9).

Słabą skuteczność DTwP (Connaught USA) powiązano z niższą indukcją przeciwciał w stosunku do PRN, Fim2/3 i PT (11). Korelację skuteczności z poziomem przeciwciał, oznaczonym przed i po narażeniu w stosunku do PRN i PT, wykazano w badaniach przeprowadzonych w Erlangen (7), w których niski poziom przeciwciał w stosunku do PRN wiązano z wrażliwością na zachorowanie na krztusiec (67% szans na rozwój choroby), a wysoki poziom PRN/PT korelował z odpornością. W badaniach terenowych przeprowadzonych we Włoszech, pomimo obserwowanej wysokiej skuteczności szczepionki DTaP z trzyskładnikowym komponentem krztuścowym, wykazano spadek stężenia przeciwciał anty PT/FHA/PRN w ciągu 33 miesięcy po szczepieniu (10). Wyniki omawianych badań wskazują, że odpowiedź ochronna indukowana szczepieniem nie w każdym przypadku odpowiada poziomowi przeciwciał w oznaczanych surowicach. Potwierdzeniem tego wniosku jest fakt, że szczepionki o podobnej immunogenności mogą posiadać różną skuteczność. Np. dla szczepionki DTaP z dwuskładnikowym komponentem krztuścowym produkcji SKB, w dwóch badaniach terenowych przeprowadzonych w Szwecji, wykazano wysoką immunogenność przy niskiej skuteczności (9,12). Natomiast trzy szczepionki z jedno- [Amvax] (11,13), dwu- [Biken] (14) oraz pięcio- [Pasteur] (9,10) składnikowym komponentem krztuścowym wykazywały podobną immunogenność do DTaP3 SKB – jednak ich skuteczność była niższa niż w przypadku szczepionki SKB.

Korelacja ochrona/immunogenność w przypadku DTaP, jeśli istnieje – dotyczyć może raczej swoistej odpowiedzi dla danej szczepionki określonego producenta. Można przypuszczać, że swoiste ochronne mechanizmy indukowane w wyniku szczepienia określoną szczepionką DTaP są nieco odmienne i wynikają z zawartości różnych antygenów lub antygenów, przygotowanych za pomocą różnych metod oczyszczania i odtoksyczniania. Generalnie obserwuje się, że szczepionki DTaP z chemicznie odtoksycznianym składnikiem PT indukują niższe poziomy przeciwciał anty-PT w porównaniu do DTwP (9,12). Odmianą sytuację notuje się w przypadku szczepionki DTaP o niskiej zawartości antygeny PT, uzyskiwanego drogą rekombinacji, inaktywowanego i stabilizowanego formaliną, co wskazuje, że ten sposób odtoksyczniania może nadawać szczepionce lepsze własności immunogenne przy niższej zawartości antygeny (mniejsza destrukcja ochronnych epitopów) (9,12).

JEDNOCZESNE PODANIE DTaP Z INNYMI SZCZEPIONKAMI ORAZ KONIUGOWANE Z INNYMI KOMPONENTAMI

Ze względu na fakt, że nie stwierdzono niekorzystnych interakcji przy równoczesnym podawaniu DTaP oraz szczepionek polio, Hib, MMR, varicella, HepB, w zależności od wieku i wcześniejszego dawkowania DTaP, szczepionki te można podawać dziecku w czasie jednej wizyty w różne miejsca stosując oddzielne strzykawki. Typowo, odczyny po jednoczesnych szczepieniach są jedynie nieznacznie większe niż oczekiwane w przypadku podania najbardziej reaktywnej szczepionki pojedynczo i są mniej nasilone, niż nakładanie się odczynów powstających przy osobnym szczepieniu tymi szczepionkami. Dalszą redukcję odczynowości może zapewnić stosowanie szczepionek koniugowanych.

Ze względu na możliwość obniżenia się ich skuteczności, immunogenności czy bezpieczeństwa w wyniku koniugowania szczepionek, monitorowanie znanych i/lub poszukiwanie nowych serologicznych markerów wzbudzonej poprzez szczepienie odpowiedzi immunologicznej posiada ogromne znaczenie. Możliwość interakcji i/lub interferencji antygenowej, wpływającej na odpowiedź immunologiczną wielokrotnie obserwowano w badaniach klinicznych oraz pracach doświadczalnych (15,16,17). Np. interferencja *via* adiuwant może pojawić się, kiedy jeden lub więcej składników danej kombinacji, (np. pełne komórki *B. pertussis*) jest mitogenem/i komórek B i aktywatorem/i dopełniacza, co najczęściej prowadzi do obniżonej odpowiedzi na jedną ze składowych danej kombinacji w wyniku antygenowego współzawodnictwa, (np. współzawodnictwo epitopów komórek T w prezentowaniu antygeny przez cząsteczki MHC). Inną przyczyną obniżonej odpowiedzi może być epitopowo-swoista supresja odpowiedzi w wyniku wcześniejszego podania szczepionki z antygenem, skoniugowanym z nośnikiem białkowym tj. toksoidem tężcowym, co w przypadku Hib może powodować obniżoną odpowiedź na cząsteczki polisacharydowe. Dodatkowo obniżona odpowiedź na jeden lub kilka składników szczepionki koniugowanej może wynikać z antygenowego współzawodnictwa o adiuwant, co indukuje zmiany stosunku antygen/adjuwant (15).

Brak jednoznacznej korelacji między skutecznością szczepionek a poziomem wzbudzonej humoralnej odpowiedzi sprawia, że skuteczność szczepionek DTaP skoniugowanych z IPV, Hib, HBV, w porównaniu do szczepionek składowych sprzed koniugacji może zostać właściwie oznaczona jedynie w kontrolowanych badaniach terenowych.

Modele zwierzęce badań mogą dostarczyć pewnych danych na temat skuteczności indukcji odpowiedzi przeciwciał w stosunku do antygenów, dla których istnieje udowodniona korelacja immunologiczna ze stopniem ochrony (D, T, Hib).

W badaniach terenowych wykazano, że niektóre DTaP były w stanie indukować swoistą odpowiedź anti-D na poziomie wyższym niż wymagany i oznaczany jako minimum potrzebne do ochrony, ale był on znacznie niższy w porównaniu do odpowiedzi uzyskiwanej po podaniu DTwP (15). Miano przeciwciał anti-D w ciągu 4–5 lat obniżyło się o 50% w surowicach osób szczepionych DTaP w stosunku do osób uodpornianych DTwP, co może wskazywać na potrzebę podania dodatkowej dawki przypominającej. Ponadto w doświadczeniach laboratoryjnych wykazano, że niektóre ze szczepionek DTaP nie były w stanie indukować wymaganego przez Farmakopeę Europejską minimum zdolności ochronnych przed intoksykacją, tzw. mocy D (≥ 30 IU/dawkę). Spostrzeżenie o niekorzystnym wpływie koniugowania DTaP w porównaniu do DTwP i DT tj. obniżenie się immunogenności oraz mocy komponenty D, potwierdzono w badaniach doświadczalnych przeprowadzanych na zwierzętach (16).

Jak do tej pory nie wiadomo, czy i w jakim stopniu może to mieć znaczenie kliniczne. Wykrytej zależności do tej pory nie skorelowano z określonym składem DTaP, koniugowaniem z komponentami Hib, IPV, HBV, czy też z zawartością (Lf) toksoidu D. W ostatnich badaniach terenowych przeprowadzonych we Włoszech i w Senegalu (12,17) uwzględniono również ocenę szczepionek DTaP/DTwP, które nie spełniały wymagań Farmakopei Europejskiej, jeśli chodzi o moc D. Szczepionki DT oraz szczepionka DTaP z pięcio-składnikowym komponentem krztuścowym (spełniające wymogi Farmakopei Europejskiej), indukowały wzrost przeciwciał anti-D większy niż minimum wymagane do ochrony, a szczepionki DTwP i DTaP z dwuskładnikowym komponentem krztuścowym (niespełniające wymagań mocy Farmakopei Europejskiej), indukowały znacząco niższy poziom odpowiedzi przeciwciał anti-D.

Odpowiedź humoralna w stosunku do komponenty tężcowej w kohortach dzieci szczepionych DTaP nie wykazywała oznak redukcji poziomu przeciwciał po upływie 4–5 lat po szczepieniu, wskazując, że interferencja antygenowa w tym przypadku nie zachodzi.

Koniugacja komponenty Hib z DTaP w porównaniu do DTwP okazała się wpływać niekorzystnie na poziom indukowanej immunogenności w stosunku do Hib (15). Wykazano, że przy oddzielnych iniekcjach DTaP oraz Hib w to samo miejsce, odpowiedź przeciwciał jest 5–15 niższa w porównaniu do sytuacji, kiedy iniekcje stosuje się w dwa różne miejsca. Podobnie badania przeprowadzone w Anglii wykazały 10-krotnie niższą odpowiedź na antygen Hib po podaniu DTaP-Hib w stosunku do DTwP-Hib. Po podaniu DTaP i DTwP poziom przeciwciał w stosunku do Hib, świadczący o minimalnej ochronie przed zakażeniem *H. influenzae* typu b wzrósł odpowiednio u 79% oraz 98% (15). Różne DTaP i mniej skuteczne DTwP indukują niższe poziomy przeciwciał anti-Hib niż skuteczne DTwP i DT, a różnice z upływem czasu w poziomie spadku miana przeciwciał nasilały się. Zatem wykazane interferencje przy stosowaniu tych szczepionek muszą znaleźć odzwierciedlenie w stosowanym schemacie szczepień (16).

Badania zastosowania innego nośnika niż T w przypadku Hib (np. nośnika błonniczego lub białek CRM lub OMP *N. meningitis*) oraz regulacji zawartości wolnego niezaadsorbowanego białka nośnikowego w szczepionkach polisacharydowych (np. toksoidu tężcowego w HibT) wskazują na możliwość eliminacji lub redukcji wykrytej interferencji. To pozwoliłoby uniknąć supresji układu immunologicznego w stosunku do innych składników w wyniku współzawodnictwa antygenowego oraz supresji swoistych epitopów dla nośnika (18,19).

A Gzyl

PROBLEMS OF THE LABORATORY EVALUATION OF EFFICACY ACELLULAR PERTUSSIS VACCINES

SUMMARY

Although composition of acellular pertussis vaccines is better defined than whole-cell vaccines, differences in the formulation, content, and detoxification of pertussis vaccine antigens led to a unique character of each of differently produced acellular vaccine. Currently used methods for laboratory evaluation of whole-cell pertussis vaccine efficacy were found not suitable for acellular vaccines.

There is a strong need to perform analysis and evaluation of the safety and efficacy profiles of acellular pertussis vaccines combined with other vaccine antigens (e. g. Hib) both before and after conjugation. Mechanisms of interactions seen after conjugation inducing weaker immunogenicity or efficacy are still poorly recognized.

PIŚMIENICTWO

1. Edwards KM, i in. Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: overview and serologic response. *Pediatrics* 1995;96:548.
2. Milstein JB, i in. Global DTP manufacturing capacity and capability. Status report: January 1995. *Vaccine* 1996;14:313–20.
3. Edwards KM, i in. Differences in antibody response to whole-cell pertussis vaccines. *Pediatrics* 1991;88:1019–23.
4. Becker JD, i in. Antibody response to *Bordetella pertussis* antigens after immunization with American and Canadian whole-cell vaccines. *J Pediatr* 1992;121:523–7.

5. 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.
6. The prevention of whooping-cough by vaccination: a Medical Research Council investigation. *BMJ* 1951;1:1463–71.
7. Cherry JD, i in. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine* 1998;16:1906–1998.
8. Decker MD, Edwards KM. Acellular Pertussis vaccines. *Pediatr Clin North Am* 2000;47:309–335.
9. Schmitt HJ, i in. Efficacy of acellular pertussis vaccine in early childhood after household exposure. *JAMA* 1996;257:37.
10. Stehr K, i in. The Pertussis Vaccine Study Group: A comparative efficacy trial in Germany in infants who received either the Lederle/Takeda acellular pertussis component DTP (DTaP) vaccine, the Lederle whole-cell component DTP (DTP) vaccine or DT vaccine. *Pediatrics* 1998; 101:1.
11. Kimura M, Kuno-Sakai H. Current epidemiology of pertussis in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 1990; 9:705.
12. Greco D i in. The Progtretto Pertosse Working Group: A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. *N Engl J Med* 1996;334:341.
13. Storsaeter J, i in. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 1998;16:1907–1918.
14. Fine PEM, Clarkson JA. Reflections on the efficacy of the pertussis vaccines. *Rev Infect Dis* 1987;9:866–83.
15. Sesardic D, i in. Non-pertussis components of combination vaccines: problems with potency testing. *Biologicals* 1999;27:1777–181.
16. Tiru M, i in. Diphtheria antitoxin response to DTP vaccines used in Swedish pertussis vaccine trials, persistence and protection for timing booster. *Vaccine* 2000;18:2295–2306.
17. Simondon F, i in. A randomized double-blind trial comparing a two-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal. *Vaccine* 1997;15:1606.
18. Gupta RK, i in. Evaluation of a guinea pig model to assess interference in the immunogenicity of different components of a combination vaccine comprising diphtheria, tetanus and acellular pertussis (DTaP) vaccine and *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide conjugate vaccine. *Biologicals* 1999;27:167–176.
19. Redhead K, i in. The effect of adsorption with aluminium hydroxide on the reactogenicity of pertussis vaccines. *Biologicals* 1999;27:111.

Otrzymano: 26.11.2004 r.

Adres autora:

Anna Gzyl
Zakład Badania Surowic i Szczepionek
Państwowy Zakład Higieny,
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa