

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Mr. sci. med. dr. Tatjana I. Plješa

Uporedno ispitivanje vakcinalnih sojeva i  
cirkulišućih izolata *Bordetella pertussis* u  
Republici Srbiji

**doktorska disertacija**

Beograd, 2013. godina

UNIVERSITY OF BELGRADE  
MEDICAL FACULTY

Mr. sci. med. dr. Tatjana I. Plješa

Comparative analysis of *Bordetella  
pertussis* vaccine strains and circulating  
isolates in the Republic of Serbia

**Doctorial Dissertation**

Belgrade, 2013.

Mentor:

Doc. dr. Ivana Ćirković, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Prof. dr. Tatjana Pekmezović, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, predsednik

Prof. dr. Slobodanka Đukić, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, član

Prof. dr. Marina Milenković, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, član

Datum odbrane:

*Anastasiji*

*i*

*Magdaleni*

Ponekad, na stepenicama života napredujemo za stepenicu više, čvrstim, odlučnim korakom, nekad se vrtoglavo penjemo napred a nekad nas okolnosti vraćaju po koji stepenik nazad. Sve su to stepenice na putu ličnog napretka i usavršavanja koje u toku života, kao teren u ratu, osvajamo, gubimo i ponovo osvajamo. Uspeha u borbi sa ovim stepenikom mog života ne bi bilo da nije bilo dragih osoba čija mi je snaga davala vetar u leđa. Za sve to bih želela da se zahvalim...

Mom mentoru, Doc. dr. Ivani Ćirković, koja je nesebično uložila veliki deo sebe u ovo istraživanje i svojim znanjem, dobronamernošću i strpljenjem pomogla da ova disertacija ugleda svetlost dana.

Prof. dr. Tatjani Pekmezović, prof. dr. Slobodanki Đukić i prof. dr. Marini Milenković na razumevanju i nesebičnoj stručnoj pomoći.

Kolegama iz Instituta za virusologiju, vakcine i serume – Torlak na podršci, stručnoj i prijateljskoj pomoći, posebno dr Gordani Dakić, koja mi je otvorila vrata proizvodnje vakcina i nesebično uvela u svet *Bordetella pertussis*.

Prof. dr Qiushui He i njegovim saradnicima Dr. sci. Annika Elomaa i Dr. sci. Teemu Kallonen iz Referentne laboratorije za pertusis, Instituta za javno zdravlje u Turku, u Finskoj, za izuzetnu saradnju, pomoć i ljubaznost.

Mojim roditeljima, koji su uvek bili tu za mene, kao čvrsti oslonac i oaza ljubavi na mom životnom putu.

Mom bratu Saši i njegovoj porodici, izvoru pozitivne energije.

Mom Igoru i mojim zvezdama vodiljama, Anastasiji i Magdaleni, koji čine smisao mog života i bez čije ljubavi i podrške bi sve izgubilo na značaju.

## Usporedno ispitivanje vakcinalnih sojeva i cirkulišućih izolata *Bordetella pertussis* u Republici Srbiji

Masovna primena vakcinacije je značajno smanjila incidenciju velikog kašlja, međutim došlo je do ponovnog povećanja broja obolelih, čak i u zemljama sa visokim obuhvatom imunizacije. U Srbiji, celocelijska vakcina protiv velikog kašlja se koristi od 1957. godine. S druge strane, u biotehnološkoj industriji se sve više koristi tehnologija za jednokratnu upotrebu. Delovi opreme koji su unapred fabrički pripremljeni i sterilisani gama zracima su uglavnom brži, jednostavniji za upotrebu i jeftiniji za montažu i korišćenje od sličnih čeličnih i fiksiranih delova. "WAVE" bioreaktor je dobro poznati uređaj za pripremu ćelijskih kultura i kultivaciju različitih mikroorganizama. U cilju praćenja bakterijske populacije *B. pertussis*, ispitana su četiri vakcinalna soja i 77 sojeva izolovanih u periodu od 1953. do 2011. Pored toga, cilj ove studije je bilo ispitivanje mogućnosti kultivacije *B. pertussis* u "WAVE" bioreaktoru za jednokratnu upotrebu i poređenje dva metoda za koncentrovanje i prečišćavanje (mikrofiltracije i centrifugiranja), kao koraka u proizvodnji vakcine protiv velikog kašlja. Metod ispitivanja je uključivao serotipizaciju fimbrija (Fim), genotipizaciju pertaktina (*prn*) i S1 subjedinice pertusis toksina (*ptxA*) i PFGE analizu. Jedan od četiri soja koja ulaze u sastav DTP vakcine koju proizvodi Institut Torlak, Beograd, soj *B. pertussis* 1772/57, je korišćen za kultivaciju u "WAVE" bioreaktoru. Kontrolne kulture su kultivisane u Roux bocama. Uzorci kultura su testirani kontrolama čistoće kulture, određivanjem biomase, merenjem pH vrednosti, određivanjem potence i specifične toksičnosti. Rezultati analize ispitivanih sojeva ukazuju da je došlo do promene genotipa iz *ptxA2* u *ptxA1* u kasnim 60.-im godinama XX veka. U periodu od 1961. do 1979. genotip *ptxA1* je bio podjednako učestao kao genotip *ptxA2*. Posle toga, u periodu od 1980. do 1989. predominantni ptx genotip je bio *ptxA1*. Ponovno pojavljivanje alela *ptxA2* je praćeno dodavanjem dva nova soja u sastav vakcine, 1985. godine, koja su sadržala *ptxA1* alel. Alel *prn1* je bio dominantan među izolatima u Srbiji, iako su posle 1981. godine u cirkulaciji bili i sojevi sa alelima *prn3* i *prn11*. Alel *prn2* je utvrđen kod samo jednog soja iz 1984., dva soja iz 2000. i poslednja tri izolovana soja, iz 2011. godine. Serotip Fim<sub>2,3</sub> je potpuno nestao među izolatima pre 1980. godine i od tada je serotip Fim<sub>2</sub> dominantan. Utvrđeno je da četiri vakcinalna soja imaju različite PFGE profile. Od 56 izolata koji su testirani PFGE analizom, 22 soja su imala različite profile.

Jedinstvene srpske profile (BpSBR) je imalo 43% ispitivanih sojeva. Rezultati ukazuju da se populacija cirkulišućih izolata *B. pertussis* u Srbiji razlikuje u odnosu na populacije ove bakterije u drugim zemljama sa visokim obuhvatom vakcinacije, a razlog tome može biti specifična kompozicija vakcine protiv velikog kašlja koja se koristi u Srbiji. Upotreba „*WAVE*“ bioreaktora se pokazala svrsishodnom za kultivaciju *B. pertussis* tokom proizvodnje vakcine protiv velikog kašlja. Kulture dobijene ovim metodom kultivacije su ispunjavale sve kriterijume kontrolnih testova uz tendenciju porasta dobijene biomase u slučaju dalje optimizacije uslova kultivacije. Sve dobijene inaktivisane, koncentrovane i prečišćene bakterijske suspenzije *B. pertussis* 1772/57, dobijene koncentrovanjem i prečišćavanjem kultura metodama mikrofiltracije i centrifugiranja, ispunjavaju sve zadate zahteve u pogledu sterilnosti, potence i specifične toksičnosti, pa bi mogle biti upotrebljene za izradu vakcine protiv velikog kašlja.

Ključne reči: *Bordetella pertussis*, pertusis toksin, pertaktin, veliki kašalj, *WAVE* bioreaktor, jednokratna upotreba, vakcina protiv velikog kašlja

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Mikrobiologija

## Comparative analysis of *Bordetella pertussis* vaccine strains and circulating isolates in the Republic of Serbia

Mass vaccination has significantly reduced the incidence of pertussis; however, the disease is re-emerging even in some countries with high vaccination coverage. In Serbia, whole cell pertussis vaccine was introduced in 1957. At the other side, disposable technology is increasingly used in the biotechnology industry. Preassembled, gamma-irradiated assemblies are generally faster, easier, and cheaper to set-up than their steel and fixed-pipe counterparts. The *WAVE* Bioreactor is well established device for cell culture and propagation of different microorganisms. To monitor changes in bacterial population, four vaccine strains and 77 isolates collected from 1953 to 2011 were studied. Also, the aim of this study was to investigate the possibility of cultivating *Bordetella pertussis* in the disposable *WAVE* Bioreactor as a step in pertussis vaccine production. The methods included serotyping of fimbriae (Fim), genotyping of pertactin (*prn*) and pertussis toxin S1 subunit (*ptxA*) and PFGE analysis of vaccine strains and isolates. *B. pertussis* vaccine strain 1772/57, one of the four vaccine strains included in the DTP vaccine produced in the Torlak Institute, Belgrade was used for cultivation in *WAVE* bioreactor. Control cultures were carried out in Roux flasks. Samples were tested for bacterial purity, biomass determination, pH value, potency and specific toxicity. Regarding *B. pertussis* strains analysis, shift from *ptxA2* to *ptxA1* has been observed in isolates since the late of 1960s. In the period 1961-1979 genotype *ptxA1* became as common as genotype *ptxA2*. After that, during the period of 1980–1989, the predominant *ptx* genotype was *ptxA1*. Re-appearance of the *ptxA2* allele followed an addition of the two strains harboring *ptxA1* in the vaccine in 1985. The allele *prn1* was predominant among the Serbian isolates, though *prn3* and *prn11* have been detected since 1981. The *prn2* allele was only found in one strain isolated in 1984, two of the four strains isolated in 2000 and three last isolated strains from 2011. Serotype Fim2.3 disappeared before 1980 and serotype Fim2 became predominant since then. The four vaccine strains represented four PFGE profiles. The 56 isolates tested by PFGE produced 22 distinct profiles. Twenty-four (43%) isolates had unique Serbian profiles (BpSBR). The results of this present study indicate that the *B. pertussis* population in Serbia is different from other vaccinated populations and that this difference may be related to the vaccine used. Our study shows that the *WAVE* Bioreactor is useful for



cultivation of *B. pertussis* as a step in pertussis vaccine production. All samples of harvests of vaccine strain *B. pertussis* 1772/57, passed all quality control requirements with tendency of the biomass increase in a case of further process optimization. All inactivated, concentrated and purified bacterial suspension *B. pertussis* 1772/57, processed by microfiltration and centrifugation methods fulfil all sterility, potency and specific toxicity requirements, so it could be used for the production of pertussis vaccine.

Key words: *Bordetella pertussis*, pertussis toxin, pertactin, pertussis, WAVE Bioreactor, disposables, pertussis vaccine

Academic Expertise: Medicine

Special Academic Expertise: Microbiology

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Veliki kašalj.....	2
1.2 <i>Bordetella pertussis</i> - osnovne karakteristike.....	2
1.2.1 Morfološke karakteristike.....	2
1.2.2 Biohemijske karakteristike.....	2
1.3 Faktori virulencije <i>B. pertussis</i> .....	4
1.3.1 Toksini.....	4
1.3.1.1 Pertusis toksin (PT).....	4
1.3.1.2 Lipopolisaharid (LPS).....	5
1.3.1.3 Dermonekrotišući toksin (DNT).....	6
1.3.1.4 Trahealni faktor kolonizacije (TCF).....	6
1.3.1.5 Trahealni citotoksin (TCT).....	7
1.3.1.6 Adenilat ciklaza toksin (ACT).....	7
1.3.2 Adhezini.....	8
1.3.2.1 Filamentozni hemaglutinin (FHA).....	8
1.3.2.2 Pertaktin (PRN).....	9
1.3.2.3 Fimbrije (FIM).....	9
1.3.3 Regulacija faktora virulencije.....	10
1.4 Genetika <i>B. pertussis</i> i varijacije sojeva.....	11
1.4.1 Metode genotipizacije.....	11
1.4.2 Genom i genomska plastičnost <i>B. pertussis</i> .....	12
1.4.3 Polimorfizam pojedinačnih nukleotida.....	13
1.4.3.1 Polimorfizam subjedinice 1 pertusis toksina.....	13
1.4.3.2 Polimorfizam promotora pertusis toksina (ptxP).....	14
1.4.3.3 Polimorfizam pertaktina.....	14
1.4.3.4 Varijacije drugih faktora virulencije.....	15
1.5 Patogeneza <i>B. pertussis</i> infekcije.....	15
1.6 Klinička slika velikog kašlja.....	16
1.6.1 Definicija oboljenja.....	17
1.7 Dijagnostika velikog kašlja.....	18
1.7.1 Kultivacija <i>B. pertussis</i> .....	18
1.7.1.1 Uzorci za izolaciju <i>B. pertussis</i> .....	19
1.7.1.2 Transportne podloge.....	20
1.7.1.3 Hranljive podloge za kultivaciju <i>B. pertussis</i> .....	20
1.7.1.4 Uslovi kultivacije <i>B. pertussis</i> .....	21
1.7.2 Identifikacija <i>B. pertussis</i> .....	22
1.7.2.1 Mikroskopski pregled kolonija.....	22
1.7.2.2 Provera biohemijskih karakteristika kolonija.....	22
1.7.2.3 Serotipizacija kolonija.....	23
1.7.3 Molekularne tehnike.....	23
1.7.3.1 Lančana reakcija polimeraze (PCR).....	23
1.7.3.2 Esez direktne imunofluorescencije (DFA).....	23
1.7.4 Serološke tehnike.....	24
1.7.4.1 ELISA test.....	24
1.7.4.2 Mikroaglutinacija.....	25
1.8 Terapija velikog kašlja.....	25
1.9 Epidemiologija velikog kašlja.....	25

1.9.1	Epidemiologija velikog kašlja u Srbiji .....	26
1.10	Ponovni porast broja obolelih od velikog kašlja („Re-emergence of pertussis“)	27
1.11	Vakcine protiv velikog kašlja.....	28
1.11.1	Istorijat proizvodnje vakcine protiv velikog kašlja .....	28
1.11.2	Tipovi vakcina protiv velikog kašlja .....	29
1.11.2.1	Celoćelijska pertusis vakcina (wP) .....	30
1.11.2.2	Acelularna pertusis vakcina (aP).....	30
1.11.2.3	Mehanizam dejstva celoćelijske i acelularne pertusis vakcine .....	31
1.11.3	Proizvodnja vakcine protiv velikog kašlja u Srbiji.....	32
1.11.4	Proizvodnja u bioreaktorima za jednokratnu upotrebu.....	35
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	38
3.	MATERIJAL I METODE .....	41
3.1	Izbor sojeva <i>B. pertussis</i> .....	42
3.2	Kultivacija sojeva .....	42
3.3	Laboratorijske metode za tipizaciju sojeva.....	43
3.3.1	Serotipizacija fimbrija (Fim) .....	43
3.3.2	Genotipizacija PtxS1 subjedinice (ptxA) pertusis toksina .....	43
3.3.3	Genotipizacija prn alela pertaktina .....	43
3.3.4	Analiza PFGE profila .....	44
3.4	Izrada inokuluma za kultivaciju u „WAVE“ bioreaktoru.....	44
3.4.1	Uslovi kultivacije u „WAVE“ bioreaktoru.....	44
3.5	Kontrolne kulture .....	45
3.6	Procesni kontrolni testovi .....	45
3.6.1	Kontrola čistoće bakterijske kulture .....	45
3.6.2	Određivanje biomase .....	46
3.6.2.1	Određivanje optičke gustine.....	46
3.6.2.2	Određivanje suve mase bakterija.....	46
3.6.3	Merenje pH vrednosti .....	46
3.7	Inaktivacija, koncentrovanje i prečišćavanje .....	46
3.7.1	Centrifugiranje.....	47
3.7.2	Mikrofiltracija.....	47
3.7.2.1	Mikrofiltracija kulture kultivisane u Roux bocama (R2).....	47
3.7.2.2	Mikrofiltracija kulture kultivisane u „WAVE“ bioreaktoru (W2)....	48
3.8	Stabilizacija proizvedenih bakterijskih suspenzija .....	48
3.9	Kontrola kvaliteta bakterijskih suspenzija.....	49
3.9.1	Uzorkovanje.....	49
3.9.2	Metode za određivanje parametara.....	49
3.9.3	Biološki kontrolni testovi .....	49
3.9.3.1	Test određivanja aktivnosti (potence) .....	50
3.9.3.2	Test određivanja specifične toksičnosti.....	51
3.10	Statistička obrada podataka .....	51
4.	REZULTATI .....	52
4.1	Sojevi <i>B. pertussis</i> .....	53
4.1.1	Epidemiološki podaci .....	53
4.1.2	Serotipizacija fimbrija .....	58
4.1.3	Genotipizacija PtxS1 subjedinice (ptxA) pertusis toksina .....	59
4.1.4	Genotipizacija prn alela pertaktina .....	60
4.1.5	Sumirana analiza serotipova i genotipova <i>B. pertussis</i> u različitim vremenskim periodima .....	61

4.1.6	Analiza PFGE profila .....	62
4.2	Ispitivanje primene „WAVE“ sistema u proizvodnji vakcine protiv velikog kašlja .....	65
4.2.1	Uporedna kultivacija B. pertussis 1772/57 u Roux bocama i „WAVE“ bioreaktoru.....	65
4.2.1.1	Čistoća kulture.....	65
4.2.1.2	Mikroskopski pregled.....	65
4.2.1.3	Određivanje aglutinogena .....	65
4.2.1.4	Poređenje pH vrednosti .....	66
4.2.1.5	Poređenje biomase.....	67
4.2.2	Inaktivacija, koncentrovanje i prečišćavanje kultura B. pertussis 1772/57 kultivisanih u Roux bocama i u „WAVE“ bioreaktoru .....	68
4.2.2.1	Sterilnost.....	68
4.2.2.2	Mikroskopski pregled.....	68
4.2.2.3	Određivanje aglutinogena .....	68
4.2.2.4	Porast biomase tokom koncentrovanja.....	69
4.2.2.5	Test aktivnosti (potence) .....	71
4.2.2.6	Test specifične toksičnosti (MWGT) .....	71
5.	DISKUSIJA .....	72
6.	ZAKLJUČCI .....	85
7.	SKRAĆENICE .....	89
8.	LITERATURA .....	92

# **1. UVOD**

## 1.1 Veliki kašalj

Veliki kašalj (pertusis), ozbiljno oboljenje respiratornog trakta, uzrokuje Gram negativna bakterija *Bordetella pertussis*. Pertusis je visoko kontagiozno oboljenje i često se širi kašljanjem i kihanjem među bliskim kontaktima, u porodici i zajednici (Anderson and May 1982; Bisgard et al. 2004; Wendelboe et al. 2007; Wearing and Rohani 2009). Bolest je posebno opasna u neonatalnoj populaciji, koja još uvek nije uredno vakcinisana, gde može doći do fatalnog ishoda.

Prvu epidemiju velikog kašlja i kliničku sliku oboljenja je opisao Guillaume de Baillou u Parizu 1578. godine. Naziv roda bakterije je dodeljen prema Jules Bordet-u koji je sa Octave Gengou izvršio prvu izolaciju i kultivaciju uzročnika 1906. godine.

## 1.2 *Bordetella pertussis*- osnovne karakteristike

U rodu *Bordetella*, koji pripada familiji *Alcaligenaceae*, nalazi se osam vrsta od kojih su tri vrste značajne za humanu patologiju: *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* i *Bordetella bronchiseptica* (Tabela 1).

### 1.2.1 Morfološke karakteristike

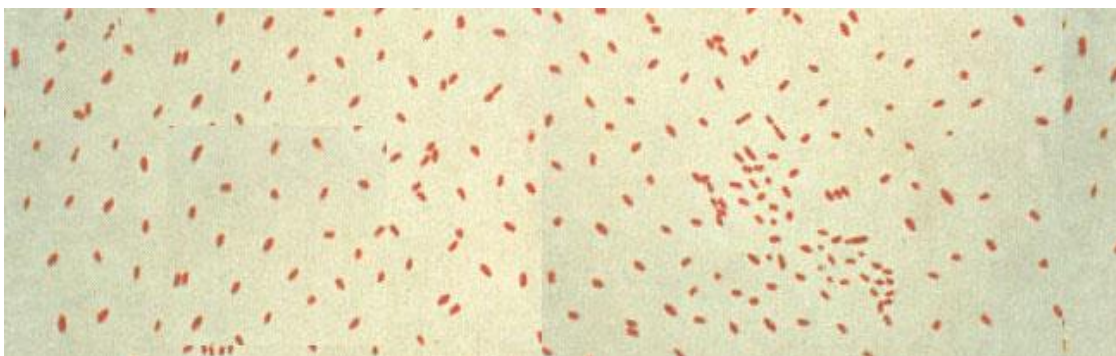
Rod *Bordetella* čine aerobni, asporogeni, sitni kokobacili. Boje se po Gramu negativno, pri čemu na polovima intenzivnije (bipolarno bojenje). Njihova dužina se kreće od 0,5 do 1,0  $\mu\text{m}$ , a širina od 0,2 do 0,3  $\mu\text{m}$ . Raspoređeni su pojedinačno ili u parovima, a veoma retko obrazuju sitne lance. Kod sveže izolovanih sojeva može se uočiti tanka kapsula. Neke vrste imaju peritrihijalne flagele, a neke fimbrije. Ove bakterije ponekad pokazuju polimorfizam (Slika 1).

### 1.2.2 Biohemijske karakteristike

*B. pertussis* je biohemijski neaktivna bakterija, ne fermentuje ugljene hidrate, ne rastvara želatin, ne redukuje nitrate. Ne koristi citrate kao izvore ugljenika, ne produkuje indol i acetilmetilkarbinol. *B. pertussis* ne stvara  $\text{H}_2\text{S}$ , a većina sojeva su katalaza pozitivni. *B. pertussis* je oksidaza pozitivna, ali ureaza negativna bakterija.

Tabela 1. Bakterije roda *Bordetella* - izvor infekcije i oboljenja

Vrsta	Domaćin / poreklo	Oboljenje
<i>B. pertussis</i>	Čovek	Veliki kašalj
<i>B. parapertussis</i>	Čovek, ovca	Veliki kašalj, pneumonija
<i>B. bronchiseptica</i>	Sisari	Respiratorna oboljenja
<i>B. holmesii</i>	Čovek	Septikemija, kašalj
<i>B. avium</i>	Ptice	Rinotraheitis
<i>B. trematum</i>	Čovek	Otitis media, infekcija rana
<i>B. hinzii</i>	Živina, čovek	Oportunističke infekcije kod ljudi
<i>B. petrii</i>	Okolina, čovek	Oportunističke infekcije kod ljudi
<i>B. ansorprii</i>	Čovek	Oportunističke infekcije kod ljudi

Slika 1. *Bordetella pertussis*. Bojenje po Gramu. (CDC)

### 1.3 Faktori virulencije *B. pertussis*

*B. pertussis* proizvodi veliki broj faktora virulencije, koji se grubo mogu podeliti na toksine i adhezine (Tabela 2)

#### 1.3.1 Toksini

##### 1.3.1.1 Pertusis toksin (PT)

Pertusis toksin je najpoznatiji toksin koji proizvodi isključivo *B. pertussis*. Srodne vrste *B. parapertussis* i *B. bronchiseptica* imaju skoro intaktan *ptx* operon (Arico and Rappuoli, 1987), ali ne proizvode pertusis toksin zbog tačkastih mutacija na *ptx* promoteru koje sprečavaju ekspresiju gena (Arico and Rappuoli, 1987; Marchitto et al., 1987; Gross et al., 1992). Toksin se sastoji iz pet subjedinica, koje su kodirane genima *ptxA* do *ptxE* (Locht and Keith, 1986; Nicosia et al., 1986). Po građi je tipičan AB egzotoksin, u kome A subjedinica (*ptxA*) ima enzimsku aktivnost ADP-riboziltransferaze, a B subjedinica (od *ptxB* do *ptxE*) se vezuje za proteine receptora (Katada and Ui, 1982; Tamura et al., 1983). Toksin se sintetizuje u citoplazmi, a zatim se transportuje uobičajenim putem, ali se oslobađanje u periplazmatički prostor obavlja specifičnim transportnim sistemom kodiranim *ptl* (eng. *pertussis toxin liberation*) genima.

Tabela 2. Faktori virulencije *B.pertussis* i njihova uloga u patogenezi oboljenja

Faktor virulencije	Toksin / Adhezin	Mehanizam delovanja
Pertusis toksin (PT)	Toksin i adhezin	Faktor stimulacije limfocitoze, vezivanje za respiratorni epitel
Adenilat ciklaza toksin (ACT)	Toksin	Antiinflamatorni i antifagocitni faktor
Trahealni citotoksin (TCT)	Toksin	Lokalno oštećenje tkiva respiratornog trakta
Dermonekrotišući toksin (DNT)	Toksin	Oštećenje tkiva respiratornog trakta
Lipopolisaharid (LPS)	Endotoksin	Endotoksična aktivnost



Filamentozni hemaglutinin (FHA)	Adhezin	Vezivanje za respiratorni epitel
Pertaktin (PRN)	Adhezin	Vezivanje za respiratorne cilijarne ćelije
Fimbrije (Fim)	Adhezin	Kritična uloga kao adhezina
Faktor rezistencije na ubijanje A (BrkA)	Adhezin	Rezistencija na delovanje sistema komplementa
Trahealni faktor kolonizacije (TCF)	Adhezin	Adhezin u traheji
Vag8	Adhezin	Protein spoljašnje membrane

Subjedinica A postaje aktivna posle odvajanja od subjedinice B, u citosolu ćelije domaćina (Kaslow and Burns, 1992). U citosolu, toksin katalizuje transfer ADP-riboze iz nikotinamid-dinukeotida (NAD) do  $\alpha$ -subjedinice G proteina, izazivajući njegovu inaktivaciju (Katada et al., 1983; Bokoch and Gilman, 1984). Kao posledice ovog procesa nastaju preosetljivost na histamin, povećano lučenje insulina kao i mnogi stimulatorni imunološki efekti (Parfentjev and Goodlin, 1948; Parfentjev and Schleyer, 1949; Carbonetti et al., 2004; Mattoo and Cherry, 2005). Takođe, pertusis toksin uzrokuje limfocitozu, leukocitozu i smanjenu hemotaksu limfocita, monocita i neutrofila (Morse, 1965; Morse and Bray, 1969; Morse and Morse, 1976; Morse, 1977; Meade et al., 1984; Brito et al., 1997; Lyons, 1997). Takođe, pertusis toksin deluje i kao vrlo jak adjuvans za druge antigene (Ryan et al., 1998), pa stimuliše produkciju antitela na druge antigene u sastavu kombinovanih vakcina. Iako se PT prvenstveno smatra toksinom, on takođe deluje i kao adhezin, pa omogućava vezivanje bakterije za ćelije cilijarnog epitela (Tuomanen and Weiss, 1985; Carbonetti et al., 2003). PT je antigen koji se nalazi u sastavu svih celoćelijskih i acelularnih vakcina protiv velikog kašlja.

### **1.3.1.2 Lipopolisaharid (LPS)**

LPS je prema dejstvu i gradi endotoksin i ima pirogeni, mitogeni i toksični ulogu (Ayme et al., 1980; Watanabe et al., 1990). LPS *B. pertussis* se značajno razlikuje po svojoj građi od LPS-a *B. parapertussis* i LPS-a *B. bronchiseptica* jer ne sadrži O-antigen (Peppler, 1984). LPS *B. pertussis* se sastoji iz molekula lipida A, razgranatog

oligosaharidnog jezgra i trisaharida (Lebbar et al., 1986; Caroff et al., 1990; Lasfargues et al., 1993). Funkcija LPS-a u patogenezi velikog kašlja nije u potpunosti jasna. Razlike u strukturi LPS-a kod *B. pertussis*, *B. parapertussis* i *B. bronchiseptica* mogu uticati i na njegovu specifičnost (Harvill et al. 2000). O-antigen LPS-a *B. parapertussis* i *B. bronchiseptica* se smatra značajnim u rezistenciji na dejstvo komplementa (Harvill et al., 2000). Nedostatak O-antigena kod LPS-a *B. pertussis* se kompenzuje rezistencijom na dejstvo seruma, koja se odvija delimično nezavisno od *BrkA* gena (eng. *Bordetella resistance to killing*) i pomoću strukturalno različitog LPS-a (Pishko et al., 2003; Schaeffer et al., 2004). S druge strane, ovaj mehanizam dejstva čini posebno interesantnim činjenica da je *BrkA* poznat kao inhibitor baktericidne aktivnosti sistema komplementa (Barnes and Weiss, 2001).

#### **1.3.1.3 Dermonekrotišući toksin (DNT)**

DNT je pojedinačni polipeptidni lanac od oko 160 kDa koji funkcioniše kao tipičan toksin AB tipa sa N-terminalnim domenom za vezivanje na receptore ćelija domaćina i C-terminalnim enzimskim domenom. Posle endocitoze, DNT se otpušta uz pomoć enzima ćelija domaćina (Matsuzawa et al., 2004). Kada se DNT ubrizga intradermalno miševima, indukuje lokalne nekrotične lezije. Kada se miševima ubrizga intravenozno, letalan je čak i u minimalnim dozama (Iida and Okonogi, 1971). Takođe, DNT indukuje izrazite morfološke promene i stimuliše replikaciju DNK (Horiguchi et al., 1991; Horiguchi et al., 1993). Efekti DNT-a u patogenezi pertusis infekcije nisu u potpunosti jasni, jer je pokazano da nefunkcionalni DNT ne utiče na virulenciju *B. pertussis*. (Weiss and Goodwin, 1989).

#### **1.3.1.4 Trahealni faktor kolonizacije (TCF)**

Trahealni faktor kolonizacije (TCF), kodiran *tcfA* genima, je autotransporter koga sadrži isključivo *B. pertussis*. TCF se produkuje kao prekursor od 90 kDa koji se vezuje za površinu ćelije. Zatim se transformiše u funkcionalnu formu od 60 kDa koja nema mogućnost vezivanja za površinu ćelije. Smatra se da TCF deluje na kolonizaciju traheje jer je utvrđeno da sojevi *B. pertussis* deficijentni u TCF-u manje efikasno mogu da kolonizuju traheju domaćina (Finn and Stevens, 1995).

### 1.3.1.5 Trahealni citotoksin (TCT)

Trahealni citotoksin (TCT) ne kontrolišu *BvgAS* geni (eng. *Bordetella virulence genes*) koji kontrolišu ekspresiju najvećeg broja gena za faktore virulencije *B. pertussis*, jer je TCT komponenta ćelijskog zida bakterije (Rosenthal et al., 1987; Cookson et al., 1989b). Najveći broj drugih bakterija reciklira ovu komponentu nazad u citoplazmu, dok se kod roda *Bordetella* sekrecija TCT-a odvija neprestano usled postojanja nefunkcionalnog transportnog sistema (Jacobs et al., 1995; Parkhill et al., 2003). TCT može da uzrokuje uvećanje mitohondrija, kidanje ćelijskih veza, ekstruziju cilijarnih ćelija i inhibiciju sinteze DNK kod animalnih ćelija (Goldman et al., 1982; Cookson et al., 1989a). Eksperimentalno je utvrđeno, u uzorcima humanih biopsija, da TCT uzrokuje gubitak cilijarnih ćelija, uvećanje ćelija i oštećenje mitohondrija (Wilson et al., 1991). Gubitak cilijarnih ćelija dovodi do poremećaja mukocilijarnog čišćenja bronha.

### 1.3.1.6 Adenilat ciklaza toksin (ACT)

ACT je bifunkcionalna kalmodulin-osetljiva adenilat ciklaza i hemolizin (Mattoo and Cherry, 2005). Pripada RTX familiji kalcijum-zavisnih citotoksina koji formiraju pore (Rose et al., 1995; Rhodes et al., 2001). ACT je strogo kontrolisan *Bvg+* fazom (Mattoo and Cherry, 2005) i prvo se sintetiše kao protoksin od 1706 aminokiselina (Glaser et al., 1988; Hewlett et al., 1989). C-terminalni domen posreduje u transportu N-terminalnog domena koji ima aktivnost adenilat ciklaze u citoplazmu ćelije domaćina (Hewlett et al., 1989; Rogel et al., 1989; Bellalou et al., 1990). Međutim, najveći broj molekula ACT se ne transportuje već ostaje na površini bakterijske ćelije. Smatra se da filamentozni hemaglutinin ima značajnu ulogu u adherenciji ACT na površinu bakterijske ćelije (Zaretzky et al., 2002). ACT deluje citotoksično i inhibira fagocitozu, pa ACT-deficijentni sojevi ne mogu da izazovu letalnu infekciju kod miševa (Weiss and Goodwin, 1989; Khelef et al., 1993; Weingart et al., 2000; Weingart and Weiss, 2000). ACT može da suprimira imunski odgovor, inhibicijom ekspresije CD40 na površini ćelije domaćina i IL-12 (Skinner et al., 2004). Takođe, može da inhibira p38 MAP kinaza put (Skinner et al., 2004). Primarni cilj delovanja ACT su polimorfonuklearni neutrofili (Mattoo and Cherry, 2005). Utvrđeno je da sve vrste roda *Bordetella* koje mogu inficirati sisare sadrže ACT (Mattoo and Cherry, 2005). ACT antigen se nalazi kao komponenta u sastavu celocelijskih vakcina, ali se ne sadrži ni u jednoj od registrovanih acelularnih pertusis vakcina (Mattoo and Cherry, 2005).

### 1.3.2 Adhezini

#### 1.3.2.1 Filamentozni hemaglutinin (FHA)

FHA je izrazito jak imunogen i stoga se nalazi kao komponenta u najvećem broju acelularnih vakcina i u svim dostupnim celocelijskim pertusis vakcinama. Ekspresiju FHA kontrolišu *Bvg+* (i *Bvgi*) faze (Mattoo and Cherry, 2005). Gen koji kodira FHA je *phaB* i regulisan je aktivatorom transkripcije *BvgA* (Boucher et al., 1997). FHA se sintetiše kao prekursor od 367 kDa a zatim se modifikuje posle translacije u funkcionalnu formu od 220 kDa (Relman et al., 1989). Transportuje se kroz spoljašnju membranu FhaC segmentom koji deluje kao specifična pora za FHA (Jacob-Dubuisson et al., 1999; Guedin et al., 2000). Zrela proteinska forma nastaje van spoljašnje membrane (Coutte et al., 2001; Coutte et al., 2003b). FHA i FhaC pripadaju dvopartnersko sekrecionom sistemu (eng. *two-partner secretion system*, TPS). Iako se FHA transportuje van ćelije putem TPS sistema, jedan broj molekula FHA ostaje vezan na ćelijskoj površini i ima ulogu adhezina (Jacob-Dubuisson et al., 1996). RGD segment filamentoznog hemaglutinina omogućava vezivanje za makrofage i bronhijalne epitelne ćelije, a domen koji prepoznaje ugljene hidrate (eng. *carbohydrate recognition domain*, CRD) omogućava vezivanje za makrofage i cilijarni respiratorni epitel. Lecitinski segmenti filamentoznog hemaglutinina omogućavaju vezivanje za ne-cilijarni epitel (Relman et al., 1990; Menozzi et al. 1991; Prasad et al., 1993; Ishibashi et al., 1994; Ishibashi et al., 2001). S druge strane, mesto slično lektinu je neophodno za hemaglutininsku aktivnost FHA (Menozzi et al., 1991). Vezivanje FHA za ćeliju domaćina aktivira NF- $\kappa$ B što dovodi do akumulacije leukocita i aktivacije bakterijske infekcije (Tosi et al., 1992; Bloemen et al., 1996). Vezivanje FHA omogućava bakteriji da adheriše za epitel pluća i traheje, a otpuštanje FHA sa površine ćelije doprinosi širenju bakterija (Coutte et al., 2003a). FHA je takođe povezan sa apoptozom humanih ćelija sličnih makrofagima udruženom sa TNF- $\alpha$  (Abramson et al., 2001) i supresijom produkcije IL-12, pa na taj način vrši modulaciju imunskog odgovora (McGuirk et al., 2000; McGuirk and Mills, 2000). Postoje oprečna mišljenja o značaju FHA kao komponente pertusis vakcina. Neke studije su pokazale da su celocelijske vakcine sa niskom koncentracijom FHA visoko efikasne (Edwards et al., 1995). S druge strane, drugi autori tvrde da su acelularne vakcine koje sadrže FHA kao komponentu efikasnije od onih koji nemaju FHA u svom sastavu (Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines, 1988; Storsaeter et al., 1990; Storsaeter and Olin, 1992; Cherry 1997).

Takođe, postoje i izveštaji da FHA antigen nema značajnu ulogu u zaštiti od infekcije (Cherry et al., 1998; Storsaeter et al., 1998).

### **1.3.2.2 Pertaktin (PRN)**

Pertaktin, poznat i kao P.69, je protein spoljašnje membrane od 69 kDa koji deluje kao autotransporter, tj. sam sebe transportuje iz ćelije, na energetske nezavistan način. (Henderson and Nataro, 2001). Ekspresija PRN je regulisana *BvgA* operonom (Montaraz et al., 1985; Charles et al., 1989). PRN se sastoji se od šesnaestostrukih paralelnih  $\beta$ -heliksa i vezuje se čvrsto za eukariotske ćelije svojim RDG domenom, (Emsley et al., 1994; Emsley et al., 1996). Prema jednoj grupi autora, PRN omogućava vezivanje za CHO ćelije i druge ćelijske linije (Everest et al., 1996), dok drugi autori tvrde da bakterijski mutanti bez PRN se ne razlikuju značajno u adherenciji na ćelije ili kolonizaciji respiratornog trakta miševa od divljih tipova (Roberts et al., 1991). Međutim, klinička ispitivanja vakcina su pokazala da je PRN izuzetno važan adhezini. Pretpostavlja se da su antitela na PRN čak najznačajnija u zaštiti od *B. pertussis* infekcije (Cherry et al., 1998; Storsaeter et al., 1998). Antitela na PRN, ali ne i na PT, FHA ili fimbrije su neophodna da bi ćelija domaćina efikasno izvršila fagocitozu (Hellwig et al., 2003). Takođe, utvrđeno je da su acelularne vakcine koje sadrže PRN višestruko efikasnije. (Gustafsson et al., 1996; Cherry, 1997). Sve registrovane celocelijske vakcine sadrže pertaktin. Mehanizam zaštite putem PRN antigena se sprovodi antitelima koja sprečavaju adheziju bakterija na ćelijsku površinu (Mattoo and Cherry, 2005).

### **1.3.2.3 Fimbrije (FIM)**

Fimbrijalni proteini određuju tri serotipa *B. pertussis*: Fim2, Fim3 i Fim2,3. Tip fimbrija je determinisan ekspresijom *fimD* gena (Willems et al., 1993; Geuijen et al., 1997). Geni za Fim2 i Fim3 kodiraju dve velike fimbrijalne subjedinice i nisu povezani ni na koji način i odvojeno ih reguliše *BvgAS* sistem (Livey et al., 1987; Mooi et al., 1987; Willems et al., 1990).

Velike subjedinice, Fim2 i Fim3 utiču na adheziju za epitelne ćelije dok mala subjedinica FimD deluje na adherenciju za monocite (Mooi et al., 1992; Hazenbos et al., 1995). Velike subjedinice se vezuju za hondroitin sulfat, heparin sulfat i dekstran sulfat

regionom sličnim fibronektinu (Geuijen et al., 1996). Fimbrije su neophodne za replikaciju *B. pertussis* u nazofarinksu (Mooi et al., 1992; Geuijen et al., 1997). Takođe, one imaju značajnu ulogu u kolonizaciji bakterija i perzistenciji infekcije (Mattoo et al., 2000), kao i u inhibiciji bakterijskog ubijanja koje vrše plućni makrofagi. (Vandebriel et al., 2003). Utvrđeno je da fimbrije utiču i na stvaranje biofilma *B. pertussis* (Irie et al., 2004). Dokazano je da antitela na fimbrije doprinose zaštiti od velikog kašlja. (Miller et al., 1943; Cherry et al., 1998; Storsaeter et al., 1998). Acelularne vakcine koje sadrže Fim2 i Fim3 pokazuju značajno bolju efikasnost od vakcina u čijem sastavu nema fimbrija (Olin et al., 1997). Posle opservacija u Velikoj Britaniji, gde je uočeno da se serotip cirkulišućih sojeva *B. pertussis* promenio posle uvođenja vakcinacije, SZO je dala preporuku po kojoj bi sve celocelijske vakcine trebalo da sadrže oba serotipa (WHO, 1979.).

### 1.3.3 Regulacija faktora virulencije

Glavni regulator ekspresije gena kod roda *Bordetella* je *BvgAS* – dvokomponentni sistem sa višestepenom fosforilacijom (Uhl and Miller, 1994; Uhl and Miller, 1996a), kodiran *BvgAS* lokusom. Komponenta *BvgA* se vezuje za DNK i aktivira transkripciju gena virulencije, a komponenta *BvgS* deluje kao senzor i kao regulator (Stibitz and Yang, 1991). Ekspresija gena koju kontroliše *BvgAS* se može podeliti u tri faze: *Bvg+-*, *Bvg--* i *Bvgi*. U *Bvg+-* fazi, detektor u periplazmičnom domenu *BvgS* komponente prenosi signale iz sredine do transmitterskog domena u citoplazmi, koji vrši autofosforilaciju. To dovodi do prenosa fosforil grupe do primajućeg domena, koji prenosi fosforil grupu do histidina na histidin-fosfotransferskom domenu (HPD) ili do molekula vode. Zatim, C-terminalni kraj HPD-a može da aktivira *BvgA* putem prenosa fosforil grupe do *BvgA* ili nazad do primajućeg domena. Aktivacija *BvgA* na ovaj način dovodi do ekspresije *vag* gena (eng. *vir-activated genes*), tako što se *BvgA* veže za njihov promoter. Ovi geni kodiraju najznačajnije faktore virulencije: pertusis toksin, filamentozni hemaglutinin, fimbrije, pertaktin, adenilat ciklazu i dermonekrotišući toksin. Kada je *BvgA* komponenta neaktivna, dolazi do ekspresije *Bvg*-specifičnih gena (*vrg* geni). Smatra se da je *Bvg+-* faza virulenta faza, jer je aktivna kada *B. pertussis* vrši kolonizaciju respiratornog trakta, dok se *Bvg--* faza smatra avirulentnom, ali njena uloga nije u potpunosti razjašnjena. Intermedijarna (*Bvgi*) faza se aktivira u posebnim uslovima i tokom nje bakterija pokazuje karakteristike i *Bvg+-* i *Bvg--* faze. Ovo

pokazuje da *BvgAS* dvokomponentni sistem kontroliše gene vrlo kompleksnim mehanizmom. U *BvgI*--fazi, bakterija postaje rezistentna na ograničavanje nutritijenata i ima smanjene mogućnosti da kolonizuje respiratorni trakt, ali se sumnja da ova faza ima ulogu u transmisiji (Knapp and Mekalanos, 1988; Miller et al., 1992; Cotter and Miller, 1994; Uhl and Miller, 1994; Merkel and Stibitz, 1995; Martinez de Tejada et al., 1996; Uhl and Miller, 1996a; Uhl and Miller, 1996b; Cotter and Miller, 1997; Deora et al., 2001; Stockbauer et al., 2001; Mattoo and Cherry, 2005; Williams and Cotter, 2007).

Takođe, *B. pertussis* ima još jedan dvokomponentni sistem za regulaciju gena- *RisAS* (eng. *reduced intracellular survival*). Ovaj sistem nije u potpunosti razjašnjen, ali se smatra da učestvuje u regulaciji ekspresije *Bvg*-- gena i intracelularnom preživljavanju bakterija (Jungnitz et al., 1998; Stenson et al., 2005).

## 1.4 Genetika *B. pertussis* i varijacije sojeva

### 1.4.1 Metode genotipizacije

Proučavanje genetike *B. pertussis* se vrši na različitim nivoima i u upotrebi je veliki broj raznovrsnih metoda. Značajna otkrića u genetici su postignuta proučavanjem različitih mutacija bakterija i tipizacijom gena analizom polimorfizma pojedinačnih nukleotida – SNP (eng. *single nucleotide polymorphism*). Proučavanje varijacija sojeva *B. pertussis* metodama genotipizacije danas uključuje veliki broj metoda, kao što su:

- Analiza polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata - RFLP (eng. *restriction fragment length polymorphism*) (van der Zee et al., 1996; van Loo et al., 1999)
- Tipizacija „*multilocus*“ sekvenci - MLST (eng. *multilocus sequence typing*) (van Loo et al., 2002)
- Analiza broja varijabilnih ponavljajućih parova - MLVA (eng. *multilocus variable number of tandem repeats analysis*)
- Elektroforeza u pulsirajućem polju - PFGE (eng. *pulsed-field gel electrophoresis*)

Među nabrojanim metodama, najčešće korišćene su MLVA i PFGE. Schouls i saradnici su 2004. godine objavili metod za izvođenje MLVA (Schouls et al., 2004) koji je kasnije dopunjen (Litt et al., 2009; Kurniawan et al., 2010). Izvršeno je uporedno ispitivanje mogućnosti diskriminacije između različitih metoda za genotipizaciju *B.*

*pertussis* sojeva i utvrđeno je da najveći stepen diskriminacije ima metod PFGE, gde je indeks razlikovanja (eng. *diversity index* )  $DI=95$ , a zatim MLVA ( $DI=76$ ) i MLST ( $DI=72$ ) (Advani et al., 2009).

#### **1.4.2 Genom i genomska plastičnost *B.pertussis***

Prvi kompletan opis genoma *B. pertussis* je objavljen 2003. godine (Parkhill et al., 2003), i to genom soja Tohama I, koji je izolovan u Japanu 50.-ih godina XX veka, a koristi se kao vakcinalni soj u proizvodnji acelularnih pertusis vakcina. Genom soja Tohama I se sastoji od 4 086 186 bp, 3 816 gena od kojih je 358 pseudogena (9,4%), tri rRNK operona, 51 tRNK i 261 IS elemenata od kojih je 238 tipa IS481. Opisano je da se samo jedan plazmid prirodno nalazi u sastavu *B. pertussis*. Uloga plazmida i razlog njegovog postojanja nisu u potpunosti jasni jer nije dokazano da on kodira nijedan od gena rezistencije. Takođe, prisustvo plazmida nije široko rasprostranjeno među kliničkim izolatima *B. pertussis* (Kamachi et al., 2006).

Pojam genomske plastičnosti je vrlo rasprostranjen među bakterijama i uključuje rearanžiranje DNK, inverzije, duplikacije, delecije DNK, dobijanje ili gubitak genetskih informacija, integraciju horizontalno stečene DNK (Dobrindt and Hacker, 2001). Opisana je pojava genomske plastičnosti i među sojevima *B. pertussis*. Tokom epidemija velikog kašlja, uočene su inverzije u genomu cirkulišućih sojeva *B. pertussis*, koje su dovele do promena u redosledu gena (Stibitz and Yang, 1999). U laboratorijskim uslovima, genom *B. pertussis* pokazuje stabilnost, naročito u pogledu nastanka inverzija (Brinig et al., 2006), mada to može biti i posledica adaptacije pojedinačnog soja na laboratorijske uslove s obzirom da su drugi autori pokazali da se inverzije mogu javiti i kod laboratorijskih sojeva (Stibitz and Yang, 1997). Navedeni podaci mogu pobuditi sumnju u tačnost i preciznost podataka dobijenih prvom genotipizacijom soja Tohama I u okviru prvog projekta sekvencioniranja bordetela i dovesti u pitanje dalje njihovo korišćenje za poređenje sa drugim sojevima (Parkhill et al., 2003). Dosadašnja ispitivanja nisu pokazala da su tokom vremena sojevi *B. pertussis* primili genetski materijal, već da je došlo do promene broja gena i promena u genetskom materijalu različitih linija u okviru vrste (Caro et al., 2006; Bouchez et al., 2008; Caro et al., 2008; King et al., 2008).



### 1.4.3 Polimorfizam pojedinačnih nukleotida

Karakterizacija faktora virulencije *B. pertussis* je pokazala da su mnogi od njih polimorfni. Genotipizacija faktora virulencije sojeva iz različitih kolekcija i kliničkih izolata, izvršena u različitim zemljama, je pokazala da je široko rasprostranjena pojava antigenske divergencije cirkulišućih i vakcinalnih sojeva. Smatra se da se promena alela iz vakcinalnih u nevakcinalne tipove događa 15 do 30 godina posle uvođenja vakcinacije (Kallonen and He, 2009).

#### 1.4.3.1 Polimorfizam subjedinice 1 pertusis toksina

Do sada je literaturno opisano osam tipova subjedinica 1 pertusis toksina (Mooi, 2010). Koriste se tri nomenklature za označavanje tipova:

- Prva, gde se tipovi označavaju kao *S1A*, *S1B*, *S1D*, *S1E*, *S1F* i *S1G* (Mooi et al., 2000; Poynten et al., 2004)
- Druga, gde se tipovi označavaju kao *ptxA1*, *A2*, *A4* i *A5* (Caro et al., 2005)
- Treća, gde se tipovi označavaju kao *ptxA1*, *A2*, *A3* i *A4* (Fry et al., 2001).

Najčešće korišćena nomenklatura je treća, prema Fry i saradnicima iz 2001. godine. Sve mutacije subjedinice pertusis toksina (*ptxA*) dovode do promena u sastavu aminokiselina i iz tog razloga ne mogu biti neme, tj moraju da se eksprimiraju. Takođe, one se pojavljuju u regionima koji su T ćelijski epitopi (Mooi et al., 1998). Objavljen je veliki broj izveštaja o pojavi nevakcinalnih tipova *ptxA* u periodima 15 do 39 godina posle uvođenja vakcinacije (Mooi et al., 1998; Mastrantonio et al., 1999; Mooi et al., 1999; Cassidy et al., 2000; Fry et al., 2001; Gzyl et al., 2001; Weber et al., 2001; Fiett et al., 2003; Peppler et al., 2003; Kodama et al., 2004; Poynten et al., 2004; Elomaa et al., 2005; Hallander et al., 2005; Fingerhann et al., 2006; Lin et al., 2006; Borisova et al., 2007; Njamkepo et al., 2008). Hronološki gledano, smatra se da je do promena kod subjedinice 1 pertusis toksina došlo pre promena u strukturi pertaktina. Najveći broj vakcina sadrži *ptxA2* i/ili *ptxA3* alel, koji su prisutni u sojevima prevakcinalne ere (Elomaa et al., 2005; Cassidy et al., 2000; Advani et al., 2004). Soj Tohama, od koga se proizvodi acelularna pertusis vakcina je po tipu *ptxA2/prn1* (Pereira et al., 2005). U populaciji, po implementaciji vakcinacije "vakcinalne tipove" su postepeno zamenili "nevakcinalni tipovi" sojeva.

#### **1.4.3.2 Polimorfizam promotora pertusis toksina (*ptxP*)**

Opisan je veliki broj varijacija kod promotera pertusis toksina. Do danas je pronađeno 14 različitih alela (Advani et al., 2009; Mooi et al., 2009; Mooi, 2010). Mutacije regiona promotera se javljaju na mestu gde se aktivator transkripcije *BvgA* komponente vezuje. (Mooi et al., 2009). Veliki broj varijacija ukazuje da su ove komponente od izuzetne važnosti za modulaciju ekspresije pertusis toksina u cilju supresije imunskih reakcija domaćina ili u sticanju prednosti nad drugim sojevima. Pokazano je da su varijacije *ptxP* povezane i sa povećanom kolonizacijom bakterija kod eksperimentalnih miševa (van Gent et al., 2011b).

#### **1.4.3.3 Polimorfizam pertaktina**

Do danas je opisano 13 alela pertaktina (Mooi, 2010). Kao i kod pertusis toksina, promene iz vakcinalnih tipova pertaktina u nevakcinalne tipove su primećene 15 do 30 godina od uvođenja vakcinacije (Mooi et al., 1998; Mastrantonio et al., 1999; Mooi et al., 1999; Cassidy et al., 2000; Fry et al., 2001; Gzyl et al., 2001; Weber et al., 2001; Fiett et al., 2003; Pepler et al., 2003; Kodama et al., 2004; Poynten et al., 2004; Elomaa et al., 2005; Hallander et al., 2005; Fingerhann et al., 2006; Lin et al., 2006; Borisova et al., 2007; Njamkepo et al., 2008). Polimorfizam *prn* alela je vezan za region 1, koji se nalazi neposredno do RDG segmenta koji učestvuje u adheziji (Inatsuka et al., 2010; Advani et al., 2004). Najveći broj vakcina sadrži soj koji ima *prn1* alel ili *prn7* alel, koji odgovaraju genotipovima sojeva iz prevakcinalne ere (He et al., 2008). Međutim, posle uvođenja masovne vakcinacije, došlo je do izmene trenda sojeva u populaciji, tako da su "nevakcinalni tipovi" sojeva sa predominantnim *prn2* tipom alela zamenili "vakcinalne tipove". U modernim izolatima *prn2* tip je najzastupljeniji (Elomaa et al., 2005; Cassidy et al., 2000; Celentano et al., 2005; Advani et al., 2004). Varijacije pertaktina se najčešće dešavaju na dva imunodominantna regiona, koji se nazivaju region 1 i region 2, iako su opisane i varijacije na drugim genima (Li et al., 1992). Varijacija u regionu 1 se ogleda u broju ponavljajućih sekvenci aminokiselina GGxxP (glicin-glicin-x-xprolin). Region 1 se nalazi u blizini RGD domena koji je uključen u vezivanje bakterije za receptore domaćina (Leininger et al., 1991; Leininger et al., 1992). Region 2 se sastoji od ponavljajućih sekvenci aminokiselina PGP (prolin-glutamin-prolin) koji su identifikovani kao epitopi koje prepoznaju humani B limfociti (Charles et al., 1991). Antitela na ove regione mogu da interferiraju sa funkcijom

pertaktina, pa varijacije na ovim regionima predstavljaju prednost bakterije (Emsley et al., 1996; Mooi et al., 1998).

#### 1.4.3.4 Varijacije drugih faktora virulencije

Mnogi geni koji kodiraju druge faktore virulencije *B. pertussis* se smatraju polimorfnim (Kallonen and He, 2009; Mooi, 2010). Polimorfizam pokazuju (van Loo et al., 2002; Packard et al., 2004; Kallonen and He, 2009):

- *fim2* (2 alela)
- *fim3* (4 alela)
- *tcfA* (6 alela)
- *ptxC* (2 alela)
- *ompQ* (2 alela)
- *vag8* (2 alela),
- *bapC* (2 alela)
- *cyaA* (2 alela)
- *phaB* (2 alela)

## 1.5 Patogeneza *B. pertussis* infekcije

Razvoj infekcije izazvane sa *B. pertussis* se može podeliti u četiri faze:

- 1) Vezivanje za ćeliju domaćina
- 2) Izbegavanje mehanizama odbrane domaćina
- 3) Izazivanje lokalnih oštećenja
- 4) Sistemske manifestacije

Nastanak infekcije započinje vezivanjem *B. pertussis* za cilijarne epitelne ćelije gornjeg respiratornog trakta uz pomoć dejstva različitih faktora virulencije (FHA, FIM, PT, LPS, TcfA, BrkA, Vag8 i PRN). Zatim, pomoću ACT-a i PT-a, bakterija izbegava odgovor imunskog sistema domaćina. ACT ulazi u neutrofile i katalizuje povećanu proizvodnju cAMP-a koji vrši detoksifikaciju ćelija i onemogućava fagocitozu. PT takođe sprečava fagocitozu i makrofagno ubijanje, inhibicijom migracije limfocita i makrofaga. Lokalna oštećenja cilijarnog epitela nastaju dejstvom TCT-a u najvećoj meri, ali i delovanjem DNT-a i verovatno ACT-a. Najznačajnija manifestacija bolesti, paroksizmalni kašalj, nastaje kao posledica ovih oštećenja. Međutim, trajanje kašlja je

duže od trajanja lokalnog oštećenja epitela, pa se smatra da još neki, do sada neidentifikovani toksin utiče na njegov nastanak. Za razliku od drugih teških bakterijskih infekcija, u kojima su sistemske manifestacije najvažnije, *B. pertussis* infekcija je jedinstvena po tome što kod nje nisu prisutni direktni, fizički evidentni sistemski znaci. Ponekad se javlja encefalopatija, ali ona je najčešće posledica sekundarnog efekta anoksije koja nastaje kao posledica paroksizmalnog kašlja. Najznačajniji laboratorijski pokazatelj infekcije, leukocitoza sa limfocitozom, je posledica delovanja PT-a. Takođe, PT uzrokuje i hiperinsulinemiju, koja se može javiti kod dece, u formi hipoglikemije (Mattoo and Cherry, 2005).

## **1.6 Klinička slika velikog kašlja**

Posle inicijalne infekcije, inkubacioni period najčešće traje od 7 do 10 dana, ali može da varira od 4 do 21 dan (Stechenberg, 2008). Progresija oboljenja tipično teče kroz tri stadijuma: kataralni, paroksizmalni i konvalescentni. U prvom, kataralnom stadijumu, simptomi podsećaju na druge respiratorne infekcije i najčešće obuhvataju kijavicu, konjunktivalnu iritaciju, umeren kašalj i blagu groznicu. U ovom stadijumu se najčešće bolest ne dijagnostikuje kao pertusis, već kao drugo respiratorno oboljenje. U kataralnom stadijumu, obolela osoba je najkontagioznija i bolest se nesmetano širi. Drugi stadijum, paroksizmalni, se odlikuje produženim paroksizmalnim kašljem, koji se razvija posle dve do tri nedelje od početka oboljenja. Prilikom kašlja se čuje karakterističan zvuk, kada se pacijent bori za dah između epizoda kašljanja. Drugi, prateći simptomi mogu biti povraćanje posle kašlja i subkonjunktivalna krvarenja. Paroksizmalni stadijum može da traje do 6 nedelja. Težina i učestalost kašlja se smanjuje tokom vremena ulaskom u treći, konvalescentni stadijum, koji može trajati nedeljama ili čak mesecima (Singh and Lingappan, 2006; Stechenberg, 2008). Atipična klinička slika (izostanak specifičnog paroksizmalnog kašlja) se može javiti kod dece, ali najčešće se javlja kod odraslih i adolescenata. Simptomi kod adolescenata i odraslih su najčešće blaži jer su ovi pacijenti najčešće delimično zaštićeni prethodnim vakcinacijama ili infekcijama. U ovoj populaciji oboljenje se najčešće pogrešno interpretira kao bronhitis. Kod odraslih osoba pertusis je često perzistentna bolest sa kašljem koji može trajati od 36 do 54 dana pa čak i do 123 dana (Gilberg et al., 2002; von König et al., 2002). Takođe, klinička slika kod odraslih može da uključuje teškoće sa disanjem, povraćanje posle kašljanja, pojačano znojenje, sinkope i encefalopatiju

(von König et al., 2002, Postels-Multani et al., 1995; De Serres et al., 2000, Jenkins and Clarke, 1981 Halperin and Marrie, 1991) sa komplikacijama kao što su prelom rebara, nastanak hernija, inkontinencija urina ili bol u leđima (Postels-Multani et al., 1995; De Serres et al., 2000). Objavljeni su izveštaji o disekciji karotidne arterije (Skowronski et al., 2003) kao i slučajevi sa fatalnim ishodom (Mertens et al. 1999) kao komplikacije pertusisa odraslih.

Najčešće komplikacije bolesti su: apnea, pneumonija, pneumotoraks, teška plućna hipertenzija, neurološki ispadi i encefalopatija.

Difencijalna dijagnoza bolesti najčešće uključuje infekciju uzrokovanu sa *Mycoplasma pneumoniae*, sinuzitis, druge infekcije gornjeg respiratornog trakta, astmu, laringitis i cističnu fibrozu (Yaari et al., 1999; Singh and Lingappan, 2006; Stechenberg, 2008).

### 1.6.1 Definicija oboljenja

Postoje tri internacionalne preporuke za dijagnozu pertusisa:

- Preporuka Svetske zdravstvene organizacije (SZO) je da je klinički slučaj pertusisa slučaj koji je dijagnostikovao lekar ili slučaj pacijenta koji kašlje najmanje dve nedelje sa bar jednim od sledećih simptoma: paroksizmalni kašalj, huk pri inspirijumu, povraćanje posle kašljanja bez drugog objašnjivog povoda. Laboratorijsku dijagnozu bi trebalo postaviti izolacijom *B. pertussis* ili detekcijom genskih sekvenci primenom metode lančane reakcije polimeraze (PCR) ili serološkom reakcijom uzoraka parnih seruma. Klinički potvrđen slučaj pertusisa se definiše kao slučaj koji ispunjava kliničku definiciju bez laboratorijske potvrde. Laboratorijski potvrđen slučaj mora da ispunjava i kliničke kriterijuma. (WHO, 2003)
- Definicija Centra za prevenciju i kontrolu bolesti (eng. Center for Disease Control, CDC) glasi: “oboljenje sa kašljanjem koje traje najmanje dve nedelje udruženo sa jednim od simptoma kao što su karakterističan paroksizmalni kašalj, povraćanje posle kašljanja bez drugog objašnjivog povoda (prema izveštaju lekara)“. Ova definicija kliničkog slučaja je odgovarajuća za endemske ili sporadične slučajeve. U slučaju većeg broja obolelih, slučaj se može definisati kao oboljenje sa kašljanjem koje traje najmanje dve nedelje (prema izveštaju lekara). Kriterijumi za laboratorijsku dijagnozu pertusisa su: izolacija *B. pertussis* iz kliničkog uzorka ili detekcija metodom PCR. CDC posebno ne

preporučuje metode direktne imunofluorescencije zbog niske osetljivosti i varijabilne specifičnosti i serološke metode zbog nedostatka standardizacije. CDC klasifikuje slučajeve kao:

- „moguće“- ako ispunjavaju kliničku definiciju ali koji nisu laboratorijski potvrđeni i epidemiološki povezani sa laboratorijski potvrđenim slučajem.
- „potvrđene“- ako su potvrđeni izolacijom u kulturi uz akutnu bolest sa kašljanjem bilo koje dužine trajanja ili ako ispunjavaju kliničke kriterijume uz pozitivan PCR rezultat ili ako ispunjavaju kliničke kriterijume uz epidemiološku povezanost sa drugim slučajem koji je potvrđen izolacijom ili PCR metodom (CDC, 2010a).
- Definicija kliničkog slučaja pertusisa prema Evropskom centru za prevenciju i kontrolu bolesti (ECDC) je “da je to svaka osoba koja kašlje više od dve nedelje sa jednim od sledećih simptoma: paroksizmalni kašalj, huk pri inspirijumu, povraćanje posle kašljanja ili svaka osoba kod koje lekar dijagnostifikuje pertusis ili svaka epizoda apnee kod dece. Laboratorijski dijagnostikovani slučaj je slučaj koji je potvrđen bar jednim od testova: izolacija *B. pertussis* iz kliničkog uzorka, detekcija nukleinskih kiselina *B. pertussis* iz kliničkog uzorka i nalaz specifičnih antitela. ECDC definiše i epidemiološke kriterijume slučaja kao epidemiološku povezanost sa interhumanim prenošenjem bolesti. ECDC klasifikuje različite slučajeve kao:
  - A. mogući slučaj- svaka osoba koja ispunjava kliničke kriterijume
  - B. verovatni slučaj- svaka osoba koja ispunjava kliničke kriterijume uz epidemiološku povezanost
  - C. potvrđen slučaj- svaka osoba koja ispunjava kliničke kriterijume uz laboratorijsku potvrdu oboljenja (EU Commission Decision, 2008)

## 1.7 Dijagnostika velikog kašlja

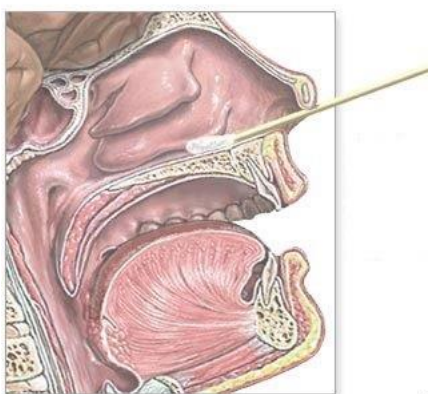
### 1.7.1 Kultivacija *B. pertussis*

U ranim fazama bolesti kultivacija je metod izbora, naročito kod dece mlađeg uzrasta kod kojih imunski odgovor na serološke testove može biti slab (UTUlab, 2009). Izolacija *B. pertussis* i kultivacija na hranljivim podlogama se koristi samo u prve dve nedelje bolesti, jer osetljivost ove metode opada posle druge nedelje obolevanja. (Wood

and McIntyre, 2008). Rezultat može biti lažno negativan zbog prethodne upotrebe antibiotika. (UTUlab, 2009). Zbog svega ovoga negativna kultura ne znači da sa sigurnošću može da se odbaci dijagnoza pertusisa.

#### 1.7.1.1 Uzorci za izolaciju *B. pertussis*

Uzimanje uzorka za mikrobiološko testiranje kod sumnje na pertusis je kritični deo postavljanja dijagnoze. Pošto se *B. pertussis* vezuje za cilijarni epitel u nazofarinksu gornjeg respiratornog trakta (Loeffelholz, 2003), uzorci briseva iz usta i grla su neadekvatni. Uzorci se uzimaju nazofaringealnim brisom izrađenim od dakrona, rejona ili kalcijum-alginata (Slika 2) (Finger and von Koenig, 1996; UTUlab, 2009; HUSLAB, 2011). Pamučni brisevi se ne preporučuju za uzimanje nazofaringealnog brisa jer mogu imati toksično dejstvo na *B. pertussis* (Cloud, 2002; Loeffelholz, 2003). Brisevi od kalcijum alginata se ne preporučuju za PCR analize jer mogu inhibitorno uticati na kvalitet reakcije. Dakronski i rejonski brisevi su najbolji izbor (Cloud et al., 2002) jer odgovaraju i za kultivaciju i za PCR detekciju. Uzorak se može uzeti i aspiracijom (Slika 3) (Finger and von Koenig, 1996; Tozzi et al., 2005; Wood and McIntyre, 2008). Ovo je metod izbora za uzimanje uzoraka kod dece (Riffelmann et al., 2005). Uzorak se može direktno zasejati na hranljivu podlogu ili se do zasejavanja može držati u transportnoj podlozi.



Slika 2: Nazofaringealni bris (CDC)



Slika 3: Aspiracija (CDC)

### 1.7.1.2 Transportne podloge

*B. pertussis* je bakterija izuzetno osetljiva na faktore spoljašnje sredine. Iz tog razloga uzorci nazofaringealnog brisa ili aspirata se moraju transportovati u roku od 4 časa do mikrobiološke laboratorije. U slučaju kad to nije moguće obezbediti, koriste se različite transportne podloge koje sadrže supstance koje zadovoljavaju nutritivne potrebe ovih bakterija. Jedna od najčešće korišćenih je 1% rastvor Casamino acid-a. Mogućnost izolacije opada kada se transport vrši na 4°C umesto na ambijentalnoj temperaturi ili u slučaju kada on traje duže od 48h (WHO, 2007.).

### 1.7.1.3 Hranljive podloge za kultivaciju *B. pertussis*

Za kultivaciju *B. pertussis* se koriste specijalne hranljive podloge, kao što su Bordet-Gengou (Tabela 3) i Regan-Lowe podloga (Tabela 4) (Finger and von Koenig, 1996). Bordet-Gengou (BG) podloga je najstarija podloga za izolaciju i kultivaciju *B. pertussis*, a naziv je dobila po svojim tvorcima, Jules Bordet-u i Octave Gengou, koji su na njoj prvi put izolovali *B. pertussis* 1906. godine. Priprema se od baze za BG podlogu uz dodatak ovčje defibrinisane krvi i rastvora cefaleksina.

Regan-Lowe (RL) podloga je nastala modifikacijom podloge na bazi uglja koju je Polack, 1947. godine prvi opisao za izolaciju i kultivaciju *B. pertussis*. Današnji sastav podloge odgovara modifikaciji koju su uveli Mishulow, Sharpe i Cohen sa dodatkom cefalosporina prema preporuci Regan i Lowe.

Tabela 3. Sastav Bordet-Gengou podloge

Sastojak	g ml/L
Krompir	75
Glicerol 85%	6
Proteozna Pepton	6
Natrijum hlorid	3,42
Natrijum hidroksid, 1 mol/l	1,8
Bakto agar	18
Voda za injekcije	1000
Defibrinisana ovčja krv	15-30%
Cefaleksin	0,04

pH=7,4 ± 0,2 na 25° C



Tabela 4. Sastav Regan-Lowe podloge

Sastojak	g ml/L
Natrijum hlorid	5
Ugalj	4
Nikotinska kiselina	0,001
Agar	12
Defibrinisana konjska krv	100
Cefaleksin	0,04

pH =7,4 ± 0,2 na 25°C.

#### 1.7.1.4 Uslovi kultivacije *B. pertussis*

Uzorak nazofaringealnog brisa ili aspirat se posle transporta direktno zasejava na RL ili BG podlogu. Svaki uzorak se zasejava na dve agar ploče RL ili BG agara, na jednu sa dodatkom cefaleksina (40 µg/mL) u cilju inhibicije prateće bakterijske flore u uzorku i na jednu ploču bez dodatka antibiotika. Ponekad dolazi do inhibicije i rasta *B. pertussis* na pločama sa cefaleksinom, pa se zato preporučuje uporedno zasejavanje i na ploču bez cefaleksina. Zasejane agar ploče se inkubiraju pod aerobnim uslovima sedam dana na temperaturi od 35±1°C i makroskopski pregledaju na svaka dva dana. *B. pertussis* raste sporije na BG agaru nego na RL agaru, ali prednost BG agara se ogleda u tome što je na njemu moguće razlikovati fazne varijacije bakterije. Poznato je da je ekspresija virulencije *B. pertussis* nestabilna, pa fenotipska virulencija zavisi od uslova spoljašnje sredine i reverzibilno je zavisna od temperature i hemijskih supstanci. Ovaj fenomen se naziva fenotipska modulacija. Iz tog razloga, kolonije *B. pertussis* na BG agaru se mogu javiti u različitim faznim varijacijama:

Faza I – faza ekspresije virulencije, moguća hemoliza

Faze II i III – intermedijarne faze, gubitak hemolize

Faza IV – gubitak ekspresije virulencije, gubitak hemolize (kolonije su grube, veće i bez sjaja).

Tipične kolonije *B. pertussis* su sitne (1 mm u prečniku), sjajne i opisuju se kao kapi žive (Slika 4, Slika 5). Na BG agaru kolonije *B. pertussis* mogu dati hemolizu. Posle izvršene izolacije sumnjivih kolonija, vrši se njihovo presejavanje i identifikacija. (WHO, 2007.).

Slika 4. *B. pertussis* na BG agaruSlika 5. *B. pertussis* na RL agaru

## 1.7.2 Identifikacija *B. pertussis*

### 1.7.2.1 Mikroskopski pregled kolonija

Tipične kolonije *B. pertussis* se na mikroskopskom preparatu, bojenom po Gramu, boje Gram negativno i izgledaju kao sitni kokobacili. Takođe, mogu biti intezivnije obojeni na polovima (bipolarno bojenje) (WHO/IVB/04.14, 2007.).

### 1.7.2.2 Provera biohemijskih karakteristika kolonija

Sumnjivim kolonijama se testiraju biohemijske karakteristike u cilju razlikovanja od drugih vrsta sličnog makroskopskog i mikroskopskog izgleda, naročito od *B. parapertussis*. Testiraju se:

- produkcija oksidaze
- produkcija ureaze
- produkcija nitrat-reduktaze
- hidroliza ugljenih hidrata

Kolonije *B. pertussis* su oksidaza pozitivne, ureaza i nitrat-reduktaza negativne i ne hidrolizuju ugljene hidrate. Za razliku od njih, *B. parapertussis* je oksidaza negativna, a ureaza pozitivna i takođe nitrat-reduktaza negativna i ne hidrolizuje ugljene hidrate (WHO, 2007).

### **1.7.2.3 Serotipizacija kolonija**

Serotipizacijom se vrši detekcija fimbrija *B. pertussis*, Fim 2 i Fim 3, upotrebom monoklonskih antitela, testom aglutinacije na pločici (WHO, 2007).

## **1.7.3 Molekularne tehnike**

### **1.7.3.1 Lančana reakcija polimeraze (PCR)**

PCR se može koristiti za dijagnostiku velikog kašlja u ranim stadijumima bolesti. Najpouzdaniji rezultat se dobija kada se koristi za detekciju uzročnika u periodu od prve do šeste nedelje bolesti (He et al., 1993). Detekcija se može izvršiti i u fazama kada više nema vijabilnih bakterija u bolesničkom materijalu. Iz tog razloga, primena PCR tehnike je značajno unapredila dijagnostiku velikog kašlja (He et al., 1996). Metod dijagnostike se najčešće zasniva na detekciji sekvence IS481, koja je prisutna u genomu *B. pertussis* u više od 200 kopija (Parkhill et al., 2003). Detekcija ove sekvence povećava osetljivost metoda, ali i povećava mogućnost nalaza lažno-pozitivnih rezultata koji nastaju kao posledica kontaminacije. Iz tog razloga, prilikom izvođenja testa moraju se strogo poštovati propisane mere kontrole i opreza (Lievano et al., 2002). Takođe, neke druge vrste roda *Bordetella*, kao što su *B. holmesii*, neki sojevi *B. bronchiseptica* i *B. parapertussis* takođe sadrže sekvencu IS481 u svom genomu, što utiče na specifičnost detekcije *B. pertussis* (Loeffelholz et al., 2000; Reischl et al., 2001; Templeton et al., 2003; Register and Sanden, 2006; Bokhari et al., 2011). Opisano je više od 100 različitih protokola za detekciju DNK *B. pertussis* primenom PCR tehnike (Kretsinger et al., 2006). Pored detekcije IS481, u cilju povećanja specifičnosti predloženi su i drugi ciljevi detekcije kao što su promotor pertusis toksina, porinski gen, porinski promotor i *recA* gen (Farrell et al., 2000; Qin et al., 2002; Antila et al., 2006; Knorr et al., 2006; Qin et al., 2007; Guthrie et al., 2008; Fry et al., 2009)

### **1.7.3.2 Esez direktne imunofluorescencije (DFA)**

Metodom DFA (eng. *direct immunofluorescence assay*, DFA) se ranije vršila direktna detekcija antigena *B. pertussis* u bolesničkom materijalu. Međutim, uočeno je da ova metoda može dati lažno pozitivne rezultate usled pojave unakrsne reaktivnosti sa

normalnom florom nazofarinksa. Procenjuje se da je osetljivost DFA oko 50%, a specifičnost oko 90%.

#### ***1.7.4 Serološke tehnike***

U kasnim fazama bolesti, kada se više ne može izvršiti ni kultivacija *B. pertussis* ni PCR detekcija, preporučuje se primena seroloških tehnika za određivanje antitela. Serološke tehnike su korisne kod adolescenata i odraslih, koji najčešće dolaze na pregled u kasnim fazama bolesti sa simptomima produženog kašlja (Cherry et al., 2005). Uzorci za serološku dijagnostiku su jedan ili dva seruma. Preporuka je da se prvi uzorak seruma uzme posle druge nedelje bolesti (akutni serum), a drugi uzorak četiri nedelje posle uzimanja prvog seruma (konvalescentni serum) (Wood and McIntyre, 2008). Porast titra kod dva konsektivna uzorka seruma se smatra značajnim ukoliko pacijent nije vakcinisan u poslednjih 12 meseci. (Guiso et al., 2010). Serološka dijagnostika jednog uzorka seruma sa dobro definisanim kriterijumom prihvatljivosti se može koristiti, ali je interpretacija rezultata otežana i nije u potpunosti pouzdana. Od seroloških tehnika, koriste se imunoadsorpcioni enzimski test (ELISA test) i test mikroaglutinacije.

##### ***1.7.4.1 ELISA test***

ELISA test je najčešće korišćen serološki test za dijagnostiku velikog kašlja. Kao antigen se može koristiti prečišćeni nedetoksifikovani pertusis toksin (PT) gde se određuje količina anti-PTIgG antitela. Kriterijumi prihvatljivosti se kreću od 50 do 120 IU/mL. (Xing et al. 2009; Riffelmann et al. 2010). Pored dijagnostike, ELISA test se koristi i za određivanje IgG, IgM i IgA antitela za razlikovanje infekcije od porasta antitela indukovano vakcinacijom. Kao antigen se koristi cela bakterijska ćelija *B. pertussis*. (UTUlab 2008; HUSLAB 2010; Yhtyneet Medix laboratoriot 2011). Procenjuje se da je osetljivost testa 85-93% u zavisnosti od starosne grupe pacijenata, a da je specifičnost oko 95% kod nevakcinisane dece (European Centre for Disease Prevention and Control, 2012).

#### 1.7.4.2 Mikroaglutinacija

Metodom mikroaglutinacije u mikrotitracionoj ploči se određuje titar antitela na antigene *B. pertussis*. Kao antigen se koristi inaktivisana, prečišćena, koncentrovana suspenzija *B. pertussis*, koncentracije 10 OU/mL. Smatra se da je ovaj metod ima manju specifičnost i osetljivost od ELISA testa ali se primenjuje u slučajevima kada ELISA test nije dostupan (WHO, 2007).

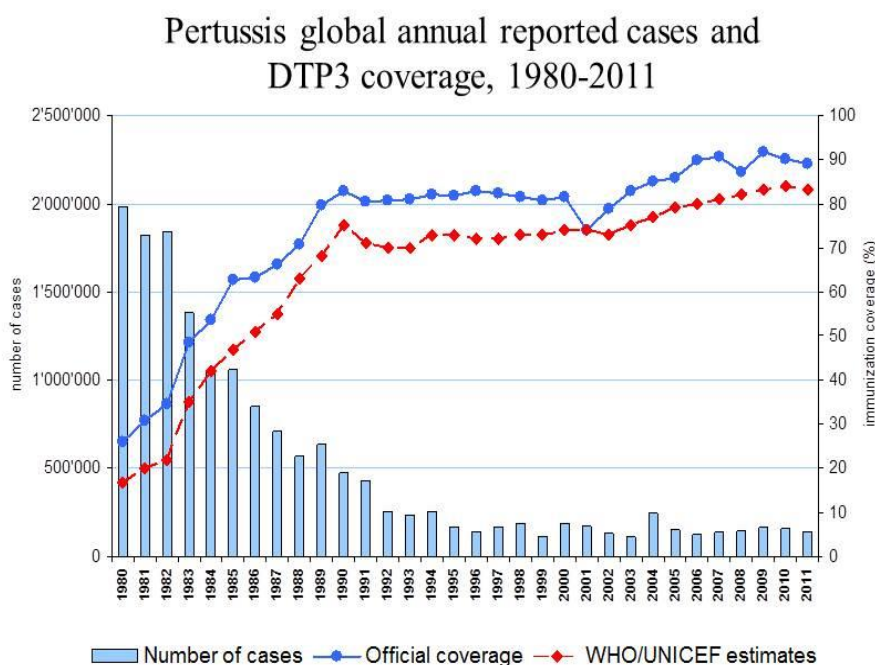
### 1.8 Terapija velikog kašlja

Antibiotska terapija velikog kašlja je uspešna ukoliko se primeni u ranim fazama oboljenja, u prve dve nedelje bolesti (KTL, 2007). U terapiji se koriste makrolidni antibiotici (eritromicin, azitromicin i klaritromicin), koji dostižu visoke koncentracije i u respiratornim sekretima i intracelularno (Hoppe, 1998). Pojava rezistencije *B. pertussis* na makrolidne antibiotike je veoma retka (Bass et al., 1969; Halperin et al., 1997; Tiwari et al., 2005). U slučaju alergije na makrolidne antibiotike preporučuje se terapija sa sulfametoksazol/trimetoprimom (KTL, 2007). Primena antibiotika nema efekta u kasnim fazama bolesti. Produženi paroksizmalni kašalj može trajati nedeljama i mesecima posle eliminacije bakterija iz respiratornih puteva, pa je u ovoj fazi upotreba antibiotika neopravdana. Altunaiji i saradnici su zaključili da antibiotska terapija efikasno eliminiše *B. pertussis* iz nazofarinksa i pacijenta čini neinfektivnim ali da ne utiče na klinički tok bolesti (Altunaiji et al., 2007). Takođe, nije dokazano da antibiotska profilaksa kontakata ima efekta, a postoji opasnost od nastanka neželjenih reakcija na primenjene antibiotike. S druge strane, CDC preporučuje „razmatranje“ hemoprofilakse bazirano na infektivnosti pacijenta i intenzitetu izlaganja kontakata, potencijalnim posledicama razvoja teških formi oboljenja i mogućnostima za sekundarnu ekspoziciju visokorizičnih kontakata kao što su deca mlađa od 12 meseci (Tiwari et al., 2005).

### 1.9 Epidemiologija velikog kašlja

Prema procenama SZO u 2008. godini je bilo oko 16 miliona slučajeva velikog kašlja u svetu (WHO, 2010a), sa 195 000 procenjenih smrtnih slučajeva u dečjoj populaciji (Black et al., 2010). Najveći broj smrtnih slučajeva je bio u Africi, Istočnom Mediteranu i Jugoistočnoj Aziji (Black et al., 2010). Procenjuje se da je stopa smrtnosti 1–3,9% u

zemljama u razvoju (Tan et al., 2005; WHO, 2005) (Slika 6). Epidemije velikog kašlja se najčešće javljaju ciklično u periodima od po dve do pet godina i danas kao i u vremenima pre uvođenja vakcinacije (Mattoo and Cherry, 2005). Prisustvo cikličnih epidemija u istim intervalima kao i u prevakcinalnom dobu ukazuje da se vakcinacijom kontroliše oboljenje, ali ne i cirkulacija *B. pertussis* u humanoj populaciji (Cherry, 1996). Vakcinacija protiv velikog kašlja, upotrebom celocelijske vakcine, je uvedena u periodu od 1940. do 1960. godine i veoma uspešno je redukovala stopu morbiditeta i mortaliteta od ovog oboljenja u svetu.



Source: WHO/IVB database, 2012  
194 WHO Member States.  
Data as of August 2012.

Date of slide: 20 August 2012

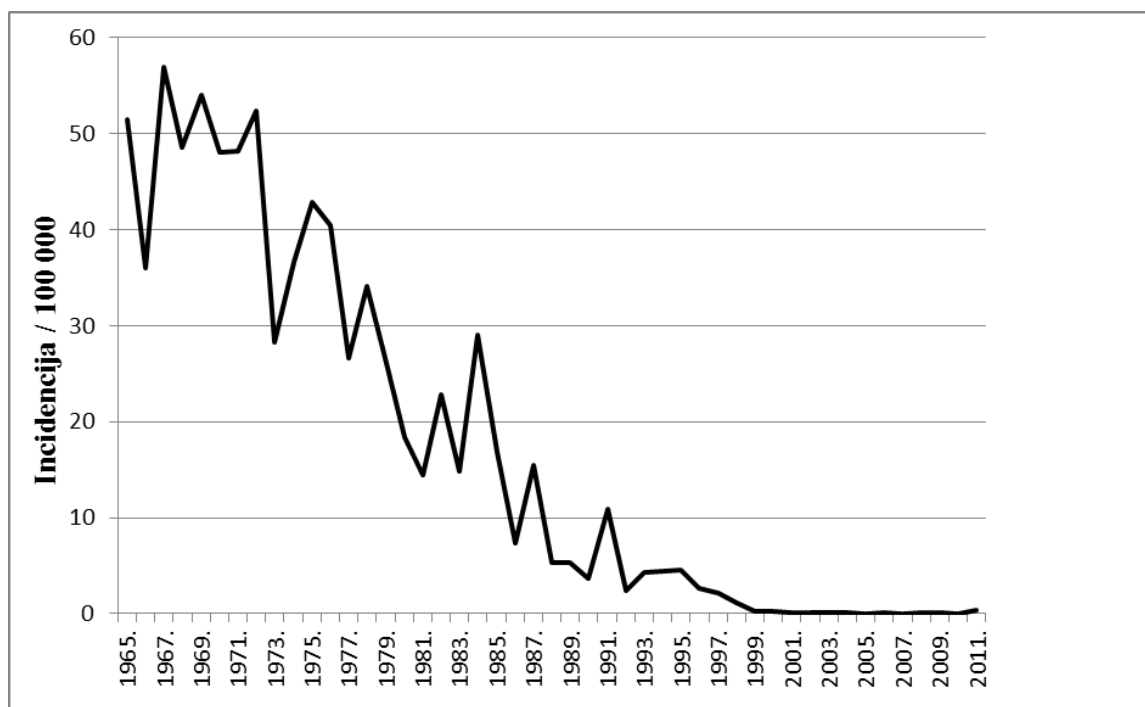


Slika 6: Broj registrovanih i broj procenjenih slučajeva velikog kašlja u svetu, sa obuhvatom vakcinacije u periodu 1980. do 2011. prema izveštaju SZO.

### ***1.9.1 Epidemiologija velikog kašlja u Srbiji***

Veliki kašalj je oboljenje koje se obavezno prijavljuje u Republici Srbiji („Službeni glasnik RS” 98/05, čl. 21), i registruje se u Izveštaju o zaraznim bolestima, Instituta za javno zdravlje Srbije „dr Milan Jovanović-Batut“. Incidencija oboljenja u Srbiji je u

stalnom opadanju od uvođenja vakcinacije krajem '50.-ih i početkom '60.-ih godina XX veka (Grafikon 1).



Grafikon 1. Incidencija velikog kašlja u Republici Srbiji u periodu od 1965. do 2011. godine.

### **1.10 Ponovni porast broja obolelih od velikog kašlja („Re-emergence of pertussis“)**

Ponovni porast broja obolelih od velikog kašlja je primećen u mnogim zemljama sa dugom istorijom vakcinacije i visokim obuhvatom vakcinacije (Mooi et al., 2001; WHO, 2012., Mooi et al., 2000, Celentano et al., 2005), kao što su Argentina (Hozbor et al., 2009), Kanada (Skowronski et al., 2002; Ntezayabo et al., 2003), Sjedinjenje Američke Države (Yih et al., 2000; CDC, 2002a; CDC, 2003a; Tanaka et al., 2003), Australija (McIntyre et al., 2002; Spokes and Gilmour, 2011), Holandija (de Melker et al., 2000), Izrael (Moerman et al., 2006), Španija (Crespo et al., 2011) i Finska (Elomaa et al., 2005) dok je u Republici Srbiji trend obolevanja još uvek u opadanju (Dakic et

al., 2010). Razlozi za porast evidentiranog broja obolelih nisu u potpunosti razjašnjeni, ali se pretpostavlja da uključuju bolju edukaciju i svest o oboljenju, bolje dijagnostičke metode i načine izveštavanja, opadanje stečenog imuniteta tokom vremena ali i adaptaciju *B. pertussis* na imunitet stečen vakcinacijom (He and Mertsola, 2008) i pojavu antigenske divergencije pertaktina i pertusis toksina *B. pertussis* između cirkulišućih i vakcinalnih sojeva (Hallander et al., 2005; He et al., 2008; Kallonen et al., 2011; Mooi et al., 2001; Perreira et al., 2005).

## 1.11 Vakcine protiv velikog kašlja

### 1.11.1 Historijat proizvodnje vakcine protiv velikog kašlja

Posle prve uspešne izolacije *B. pertussis*, 1906. godine koji su izvršili Bordet i Gengou, započet je rad na razvoju vakcine protiv velikog kašlja. Prvi pokušaji datiraju iz dvadesetih godina XX veka kada je dr Louis Sauer napravio prvu inaktivisanu pertusis vakcinu u bolnici „Evanston Hospital“ u Čikagu. Zatim, 1925. godine, danski lekar Thorvald Madsen prvi vrši testiranje celocelijske vakcine na većem broju ispitanika, u cilju kontrole epidemije na Farskim ostrvima (Baker et al., 2004). Najznačajnije rezultate na razvoju vakcine su postigli Eldering i Kendrick, koji su tokom tridesetih i četrdesetih godina XX veka intenzivno radili na proizvodnji efikasne i bezbedne pertusis vakcine, uveli su testove neophodne za kontrolu vakcine i pratili su dužinu i efikasnost stečenog imuniteta posle vakcinacije. U toku 1942. godine izvršili su prvo kombinovanje pertusis vakcine sa toksoidima difterije i tetanusa i pripremili prvu difterija-tetanus-pertusis (DTP) vakcinu (Kendrick and Eldering, 1934; Eldering and Kendrick, 1938; Kendrick et al., 1947). Posle ovih ispitivanja, započeta je masovna proizvodnja i od 1940. godine počinje distribucija vakcina po Sjedinjenim američkim državama (SAD), da bi 1943. godine Američka akademija pedijatara odobrila rutinsku upotrebu vakcine. Od tada se kombinovana DTP vakcina koja sadrži celocelijsku pertusis komponentu koristi za imunizaciju u celom svetu. Posle uvođenja vakcinacije u SAD i Evropi, zabeležen je drastičan pad incidencije, pa je na primer u SAD registrovana 150 puta manja incidencija obolevanja posle započinjanja vakcinacije (Mattoo and Cherry, 2005).

U Srbiji se vakcinacija protiv velikog kašlja primenjuje već više od 60 godina, a koristi se celocelijska vakcina u sastavu DTP vakcine, koju od 1957. godine proizvodi Institut



za virusologiju, vakcine i serume Torlak. Ova vakcina se za razliku od vakcina drugih proizvođača, sastoji od četiri soja. Dva vakcinalna soja su izolovana 50-ih godina XX veka, dok su druga dva soja izolovana 80-ih godina XX veka. Današnja kompozicija vakcine se koristi od 1985. godine. Izbor vakcinalnih sojeva je vršen na osnovu serotipa, imunogenosti i specifične toksičnosti (Dakic, 2010, Pljesa, 2013.)

Posle 40 godina primene celocelijske pertusis vakcine u svetu, zbog pojave učestalih neželjenih efekata prilikom vakcinacije u Japanu, japanski naučnik Yuji Sato je razvio acelularnu pertusis vakcinu (aP) koja je sadržala purifikovani filamentozni hemaglutinin. Satova acelularna pertusis vakcina se koristi u Japanu od 1981. godine (Sato et al., 1984). Kasnije verzije acelularne pertusis vakcine koje se koriste u drugim zemljama sadrže i druge faktore virulencije (pertusis toksin, pertaktin, fimbrije) i nalaze se u sastavu kombinovane difterija-tetanus-acelularni pertusis (DtaP) vakcine.

### ***1.11.2 Tipovi vakcina protiv velikog kašlja***

Za prevenciju velikog kašlja, danas su u svetu komercijalno dostupna dva tipa vakcine (Tabela 5):

- celocelijska vakcina (eng. *whole-cell pertussis vaccine, wP*), koja sadrži inaktivisanu celu bakterijsku ćeliju *B. pertussis*
- acelularna vakcina (eng. *acelular pertussis vaccine, aP*), koja sadrži purifikovane komponente bakterijske ćelije *B. pertussis*

Različiti proizvođači koriste različite vakcinalne sojeve, koji uglavnom predstavljaju kliničke izolate iz perioda od 1940. do 1960. godine. Takođe, postoji značajna heterogenost različitih studija koja komplikuje uporedno ispitivanje efikasnosti i efektivnosti različitih vakcina. Zaštita od teških oblika velikog kašlja u najranijem uzrastu dece se postiže posle prve serije vakcinacije sa celocelijskom ili acelularnom vakcinom (WHO, 2010a.). Iako je pojava lokalne i sistemske reaktogenosti češće povezana sa wP vakcinama, oba tipa vakcina, wP i aP, su dokazano sigurne za upotrebu (WHO, 2010a.). S obzirom da su acelularne pertusis vakcine višestruko skuplje u odnosu na celocelijske, za mnoge zemlje ne postoji značajna opravdana dobrobit od uvođenja acelularnih vakcina, pa se još uvek u velikom delu sveta koriste celocelijske vakcine. Samo u zemljama gde povećana reaktogenost može biti smetnja sprovođenju visokog obuhvata vakcinacije, uvođenje acelularne vakcine može biti mehanizam za poboljšanje prihvatljivosti vakcinacije. U tim slučajevima, SZO preporučuje izmenu u

kalendaru vakcinacije kojim se uvodi acelularna vakcina kao buster doza ili tokom celog ciklusa vakcinacije (WHO, 2010a.).

Tabela 5. Tipovi i sastav vakcina protiv velikog kašlja

Tip	Sastav
Celoćelijska (wP)	Inaktivisana <i>B. pertussis</i> suspenzija
Acelularna (aP)	PT PT i FHA PT, FHA i PRN PT, FHA, PRN, Fim2 i Fim3

#### 1.11.2.1 Celoćelijska pertusis vakcina (wP)

Celoćelijske vakcine su bazirane na standardizovanim bakterijskim kulturama, proizvedenim od vakcinalnih sojeva *B. pertussis*, koje su inaktivisane toplotom ili hemijski, a zatim prečišćene i koncentrovane. Način proizvodnje wP vakcina se razlikuje od proizvođača do proizvođača, pa međusobno one pokazuju značajnu heterogenost. Kao vakcinalni sojevi se najčešće koriste sojevi izolovani u zemlji proizvođača, ali takođe u nekim zemljama se koriste i sojevi dobijeni i iz drugih izvora (Gzyl et al., 2004; Elomaa et al., 2009; Hozbor et al., 2009; Litt et al., 2009). Najveći broj wP vakcina se kombinuje sa difterijskim i tetanusnim toksoidima, ali i sa drugim vakcinama kao što su: *Haemophilus influenzae* tip b (Hib) vakcina, hepatitis B virus vakcina (HBV) i inaktivisana vakcina protiv poliovirusa (IPV). Sve wP vakcine sadrže aluminijumove soli (aluminijum hidroksid ili aluminijum fosfat) kao adjuvans, a neke sadrže i tiomersal ili druge konzervanse ako su u višedoznim pakovanjima. Vakcine koje sadrže wP se ne smeju zamrzavati i čuvaju se na temperaturi od 2–8°C.

#### 1.11.2.2 Acelularna pertusis vakcina (aP)

Razvoj acelularne pertusis vakcine je započet kada je došlo do pojačane zabrinutosti javnosti SAD, Japana i nekih evropskih država zbog pojave neželjenih reakcija kod primene wP vakcine. (Miller et al., 1981; Cowan et al., 1993). Prve aP vakcine su

proizvedene u Japanu i SAD. (Sato and Sato, 1999). Pokazano je da aP vakcine pružaju zaštitu od velikog kašlja i da se bolje podnose nego wP vakcine (Zhang et al. 2011). U svetu postoji veliki broj različitih formulacija aP vakcina, a najveći broj se proizvodi od vakcinalnog soja Tohama, koji je poreklom iz Japana. PT, detoksifikovan formaldehidom ili genetski izmenjen, se nalazi u sastavu svih komercijalnih aP vakcina. Smatra se da hemijska detoksifikacija može da utiče na smanjenu produkciju zaštitnih antitela (Sutherland et al., 2011). Danas se u svetu koriste aP vakcine koje sadrže različite kombinacije antigena (PT/FHA, PT/FHA/PRN, PT/FHA/PRN/FIM2/FIM3), ali najčešće mnoge zemlje za imunizaciju koriste najjeftinije proizvode, pa je teško ispitati efekte pojedinačnih vakcina na široj populaciji. Primećeno je da u mnogim zemljama u kojima se već duže vreme koriste aP vakcine, naročito one koje sadrže samo PT bez drugih komponenti, dolazi do pojave povećanog broja obolelih od velikog kašlja (Advani et al., 2011). Najveći broj aP vakcina se kombinuje sa difterijskim i tetanusnim toksoidima, a takođe i sa *Haemophilus influenzae* tip b (Hib) vakcinom, hepatitis B virus vakcinom (HBV) i inaktivisanom vakcinom protiv poliovirusa (IPV). Vakcine koje sadrže aP se ne smeju zamrzavati i čuvaju se na temperaturi od 2–8°C. (WHO, 2010a.)

### ***1.11.2.3 Mehanizam dejstva celocelijske i acelularne pertusis vakcine***

Sa imunološkog aspekta, wP i aP vakcine imaju različite mehanizme dejstva, svojim komponentama indukuju produkciju različitih citokina i stimulišu različit tip imunskog odgovora primaoca (Tabela 6).

Komponente celocelijske (wP) vakcine, naročito LPS i PT, deluju na monocite, koji luče IL-1 $\beta$ , TNF, IL-12 i IL-18. Indukovani IL-1 $\beta$  i TNF daju sa jedne strane systemske i neurološke efekte, a s druge strane deluju na aktivaciju neutrofila. Produkovani IL-12 i IL-18 u sadejstvu sa aktiviranim dendritskim ćelijama indukuje Th1 tip imunskog odgovora, gde dolazi do produkcije IL-2, IFN- $\gamma$  i TNF- $\beta$ . Nastali IL-2 i IFN- $\gamma$  dovode do aktivacije neutrofila, produkcije azot oksida i aktivacije makrofaga koji vrše intracelularno ubijanje i dovode do brzog klirensa bakterija iz pluća. Produkovani TNF- $\beta$  deluje na B ćelije i dovodi do opsonizacije antitelima, koja takođe, preko stvaranja IgG2a antitela doprinosi makrofagnom intracelularnom ubijanju.

S druge strane, imunski odgovor koji stimuliše acelularna vakcina se odvija na drugačiji način, primarno se aktivira humoralni imunski odgovor koji dovodi do inhibicije rasta

bakterije u ranoj fazi i do odloženog klirensa. Komponente PT, PRN i FHA deluju na monocite, koji produkuju IL-10, IL-6 i IL-1ra. IL-6 i IL-1ra deluju anti-inflamatorno, dok IL-10 u saradnji sa aktiviranim dendritskim ćelijama indukuje Th2 tip imunskog odgovora, gde dolazi do produkcije IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13, koji deluju na B ćelije. Aktivirane B ćelije dovode do neutralizacije toksina, inhibicije adherencije i produkcije IgG1, IgG3 i IgE. Smatra se da aP vakcina pruža manji nivo zaštite u odnosu na wP vakcinu, a posledica je potpuno različitog mehanizma indukcije imunskog odgovora.

Mehanizam zaštite kod primene wP vakcine odgovara prirodnom putu aktivacije imunskog odgovora prilikom infekcije sa *B. pertussis*. (Barnard et al., 1996; Mahon et al., 2000, Higgs et al., 2012; Ross et al., 2013).

Razlike u najznačajnijem segmentu imunskog odgovora, Th dihotomiji i njihov uticaj na kvalitet i trajanje zaštite posle vakcinacije su predmet brojnih rasprava. Takođe povezanost indukcije Th2 odgovora kao posledice vakcinacije acelularnom vakcinom i nastanka atopijskih bolesti kod dece su ispitivani u različitim studijama (Vaderbriel et al., 2007; Nakajama et al., 2007; Rowe et al., 2005; Bernsen et al., 2003; Carter et al., 2004; Ennis et al., 2004)

Tabela 6. Najznačajnije razlike između celoćelijske i acelularne vakcine protiv velikog kašlja

<b>Celoćelijska vakcina</b>	<b>Acelularna vakcina</b>
Različiti vakcinalni sojevi	Uniformni vakcinalni sojevi
Vakcinalni sojevi iz populacije	Tohama soj
Indukuje i celularni i humoralni imunski odgovor	Indukuje samo humoralni imunski odgovor
Indukuje Th1 tip imunskog odgovora	Indukuje Th2 tip imunskog odgovora

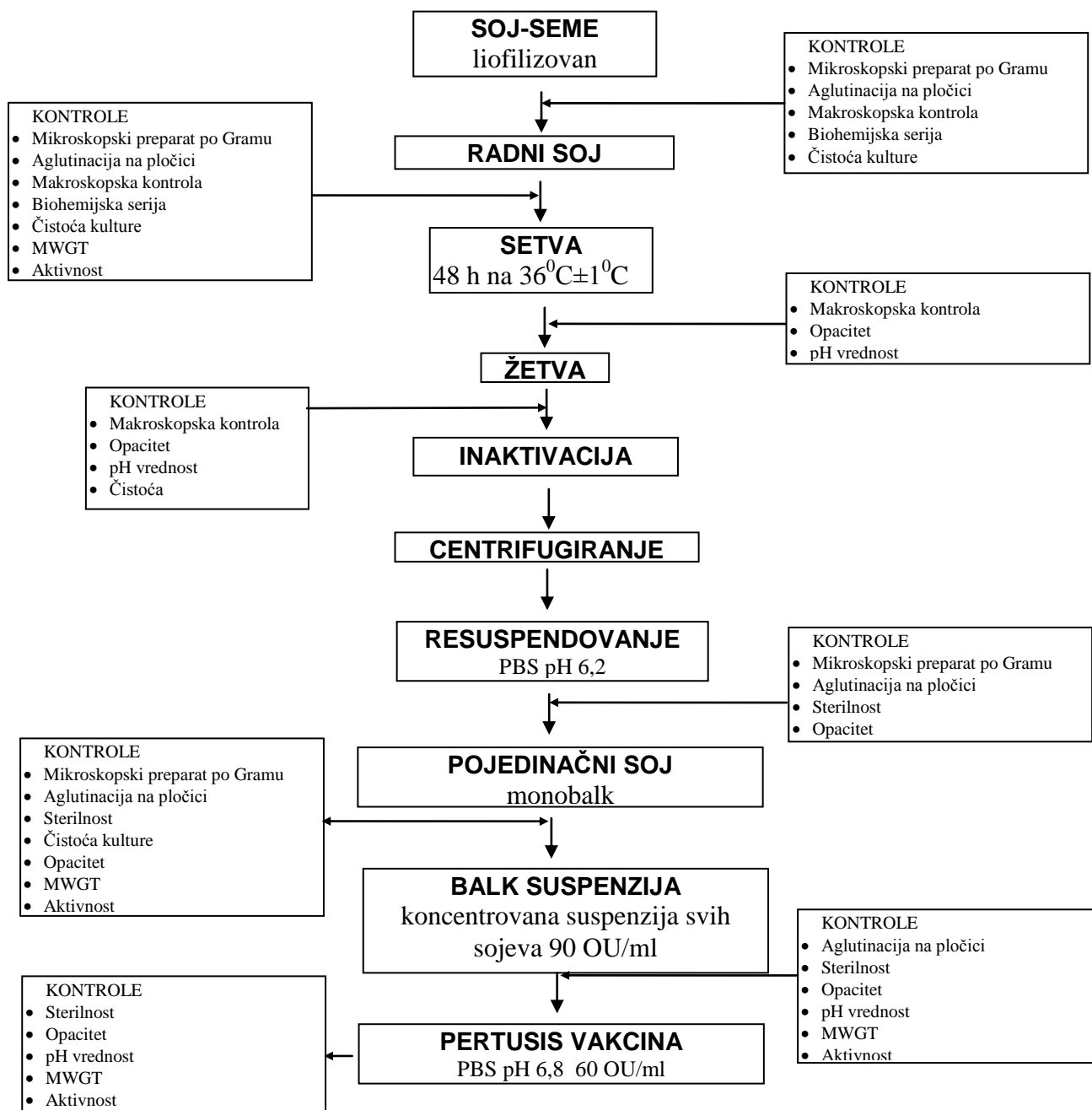
### ***1.11.3 Proizvodnja vakcine protiv velikog kašlja u Srbiji***

U Srbiji se vakcinacija protiv velikog kašlja primenjuje već više od 60 godina, a koristi se celoćelijska vakcina u sastavu DTP vakcine, koju od 1957. godine proizvodi Institut za virusologiju, vakcine i serume Torlak. Za razliku od vakcina drugih proizvođača, pertusis koncentrovana suspenzija koja ulazi u sastav vakcine u Srbiji se sastoji od četiri

soja. Dva vakcinalna soja su izolovana 50-ih godina XX veka, dok su druga dva soja izolovana 80-ih godina XX veka.

Za proizvodnju pertusis koncentrovane suspenzije koriste se odabrani i provereni, liofilizovani sojevi *B. pertussis*. Proizvodni sojevi su soj Bp 2047/57 (Fim 2,3.), soj Bp 1772/57 (Fim 2,3, soj Bp 23/81 (Fim 3) i soj Bp 8/84 (Fim 2). Posle rehidracije sa 1% Casamino acid-om sojevi se kultivisu na BG podlozi. Sojevi se proveravaju kulturelno, morfološki, serološki i biološki, a zatim umnožavaju na modifikovanoj, tečnoj Cohen Wheeler (CW) podlozi. Tehnološki postupak se sastoji iz pripreme inokuluma na BG podlozi, inkubaciji od 48 h na temperaturi od  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , zatim setve i umnožavanja na CW podlozi u Roux-ovim bocama u šejker termostatu na temperaturi od  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 48 h. Sledi žetva i inaktivacija tiomersalom, centrifugiranje i odlivanje supernatanta. Sediment se resuspenduje sterilnim puferovanim fiziološkim rastvorom (eng. *phosphate buffer saline*, PBS) do opaciteta od 90 OU/ml. Sabiranjem suspenzija svakog soja do ukupne zapremine od 1500 ml formira se pul soja/pojedinačni soj (monobalk). Koncentrovana pertusis suspenzija se dobija sabiranjem pulova pojedinačnih sojeva, kombinovanih tako da podjednako budu zastupljeni svi serološki tipovi (Shema 1). Tokom čitavog proizvodnog procesa zahteva se aseptičan rad u prostorijama čistih soba (eng. *cleanroom*). Kontrola proizvodnje obuhvata veliki broj procesnih kontrola: test identiteta, čistoća kulture, odsustvo živih mikroorganizama, određivanje opaciteta, merenje pH vrednosti kao i testove potence i toksičnosti.

Koncentrovanje i prečišćavanje kulture *B. pertussis* je jedan od kritičnih koraka u proizvodnji pertusis koncentrovane suspenzije. U konvencionalnoj proizvodnji se, prema proizvodnim instrukcijama, u te svrhe vrši centrifugiranje kulture u staklenim bocama sa staklenim perlama, odlivanje supernatanta posle završenog centrifugiranja, a zatim resuspendovanje sa PBS-om i puliranje u staklene boce od 2L. Ovaj proces iziskuje veliku količinu staklenog posuđa, sistema za puliranje i resuspendovanje veliki broj procesnih kontrola, značajnu količinu manuelnog rada osoblja i vremenski dugo traje. Dobijeni proizvod, suspenzija pojedinačnog soja, se nalazi u većem broju odvojenih pulova, koje zatim treba kombinovati u koncentrovanu bakterijsku suspenziju *B. pertussis*.



Shema 1. Tok proizvodnje pertusis vakcine

#### ***1.11.4 Proizvodnja u bioreaktorima za jednokratnu upotrebu***

Deo proizvodnje vakcine protiv velikog kašlja koji obuhvata kultivaciju bakterija se odvija ili u staklenim Roux bocama ili u čeličnim fermentorima. Veliki broj manipulacija, kompleksnost opreme, potreba za značajnim brojem osoblja, kao i problematika procesa čišćenja, pranja i validacije komplikuje ovu fazu proizvodnje. Pored toga, sve procese u proizvodnji vakcine je potrebno validirati, strogo kontrolisati i obavljati u specijalno namenjenim prostorima, u skladu sa smernicama dobre proizvođačke prakse (eng. *good manufacturing practice*, GMP).

U biotehnologiji se sve više razvija trend korišćenja bioreaktora za jednokratnu upotrebu kao zamene za stakleno laboratorijsko posuđe i čelične fermentore. Primena ovih bioreaktora smanjuje troškove čišćenja, sterilizacije, kvalifikacije opreme i drugih operacija (Mahajan et al., 2010). Smatra se da oprema koja je unapred fabrički pripremljena i sterilisana za upotrebu omogućava bržu, jeftiniju i bezbedniju instalaciju i rad nego tradicionalna oprema od čelika. Takođe, bioreaktori za jednokratnu upotrebu ispunjavaju sve važeće GMP zahteve. U novije vreme, u proizvodnji antigena je počeo da se koristi tzv. "WAVE" bioreaktor koji se sastoji od pokretne platforme koja omogućava promenljivo talasno kretanje nosača koji drži kesu za jednokratnu upotrebu (eng. *CellBag*) u kojoj se vrši kultivacija mikroorganizama, a koji obezbeđuje i optimalnu temperaturu i uslove kultivacije (Slika 7). Tehnologija "WAVE" bioreaktora otvara nove mogućnosti u proizvodnji vakcina, a njenom primenom pojednostavljuje se faza kultivacije. Objavljena je primena ove metode u proizvodnji različitih bakterijskih i virusnih antigena (Sinclair et al., 2008). Relativno jednostavna instalacija kesa za jednokratnu upotrebu sa već pripremljenim sensorima crevima sa priključcima u velikoj meri smanjuje troškove kultivacije i obezbeđuje sigurnije rukovanje (Eibl et al., 2010). Takođe, troškovi nabavke i instalacije novog „WAVE“ bioreaktora su višestruko niži nego kod novih čeličnih fermentora (Mahajan et al., 2010), što je od velikog značaja kod proizvođača koji sa laboratorijske proizvodnje (u staklenim Roux bocama) prelaze na industrijsku (u bioreaktorima). Takođe, otvara se i mogućnost fleksibilnosti u radu, pošto se na jednoj platformi mogu koristiti kese različitih zapremina i sa različitim sensorima i priključcima, u zavisnosti od potreba proizvodnje. „WAVE“ bioreaktor može koristiti kese do zapremine od 500 litara.

Objavljena je primena ove metode u proizvodnji različitih bakterijskih i virusnih antigena, ali nema podataka o kultivaciji sojeva *B. pertussis* u "WAVE" bioreaktoru (Eibl et al., 2010; Mahajan et al., 2010).



Slika 7. WAVE 20/50 bioreaktor, GE Healthcare

Pored toga, uređaj za tangencijalnu filtraciju FlexStand takođe pripada kompletu opreme za bioreaktorsku proizvodnju primenom "WAVE" tehnologije (Slika 8). FlexStand uređaj, istovremeno koncentruje i prečišćava proizvod odstranjivanjem hranljive podloge, primenom mikrofiltracije - upotrebom filter-kertridža sa porama promera 0,1 $\mu$ m i ispiranjem kulture sa PBS-om u zatvorenom sistemu. Primenom ovog sistema se omogućava da se kultura posle kultivacije u kesi za jednokratnu upotrebu na "WAVE" platformi direktno aseptično priključi na FlexStand uređaj i tako kontinuirano koncentruje i prečišćava. Posle završenog procesa u FlexStand uređaju, proizvod jedne serije pojedinačnog soja se nalazi u jednom sudu, tj. u jednoj "CellBag" kesi za jednokratnu upotrebu.





Slika 8. FlexStand uređaj za tangencijalnu filtraciju, GE Healthcare

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

**U skladu sa podacima izloženim u uvodu, formulisani su sledeći ciljevi istraživanja:**

1. Identifikacija serotipova i genotipova vakcinalnih sojeva i kliničkih izolata *B. pertussis* izolovanih u periodu od 1953. do 2011. godine u Republici Srbiji i poređenje dobijenih rezultata sa rezultatima ispitivanja sojeva u zemljama Evrope, Sjedinjenih američkih država i Australiji.
2. Ispitivanje primene "WAVE" sistema za kultivaciju vakcinalnih sojeva u proizvodnji vakcine protiv velikog kašlja radi dobijanja adekvatno prečišćene, koncentrovane inaktivisane bakterijske suspenzije pojedinačnog soja *B. pertussis* u jednom sudu, a čiji kvalitet zadovoljava sve propisane zahtevane kriterijume.

**U skladu sa osnovnim ciljevima istraživanja, formulisani su sledeći zadaci:**

- Odabrati sojeve *B. pertussis* koji će se koristiti u ispitivanju iz kolekcije kliničkih izolata i vakcinalnih sojeva Instituta za virusologiju, vakcine i serume Torlak, Beograd.
- Na osnovu epidemioloških podataka izabranih kliničkih sojeva *B. pertussis*, uporediti distribucije vakcinisanih i nevakcinisanih pacijenata među obolelima od velikog kašlja kod kojih je izolovana *B. pertussis* u Srbiji i utvrditi prosečne godine starosti obolelih od velikog kašlja kod kojih je izolovana *B. pertussis* u Srbiji u različitim periodima ispitivanja.
- Izvršiti oživljavanje liofilizovanih sojeva i ispitivanje kulturelnih i biohemijskih osobina.
- Izvršiti serotipizaciju fimbrija (Fim) kliničkih izolata i vakcinalnih sojeva.
- Izvršiti genotipizaciju PtxS1 subjednice (*ptxA*) pertusis toksina kliničkih izolata i vakcinalnih sojeva.
- Izvršiti genotipizaciju *prn* alela pertaktina kliničkih izolata i vakcinalnih sojeva.
- Odrediti PFGE profile kliničkih izolata i vakcinalnih sojeva.
- Izvršiti poređenje učestalosti serotipova i genotipova kliničkih izolata u Srbiji i drugim zemljama.
- Izvršiti uporednu kultivaciju jednog vakcinalnog soja *B. pertussis* u Roux bocama i u bioreaktoru za jednokratnu upotrebu u okviru „WAVE“ sistema.

- Tokom kultivacije, uraditi kontrolne testove: kontrolu čistoće kulture, mikroskopski pregled preparata bojenih po Gramu, određivanje aglutinogena, određivanje pH vrednosti i određivanje opaciteta.
- Posle izvršene kultivacije, izvršiti uporedno koncentrovanje i prečišćavanje kultura, konvencionalnim metodom centrifugiranja i metodom mikrofiltracije na FlexStand uređaju u okviru „WAVE“ sistema u cilju dobijanja koncentrovanih bakterijskih suspenzija.
- Odrediti aktivnost (potencu) proizvedenih koncentrovanih bakterijskih suspenzija.
- Odrediti specifičnu toksičnost proizvedenih koncentrovanih bakterijskih suspenzija.
- Ispitati kvalitet proizvedenih bakterijskih suspenzija u odnosu na zahtevani i izvršiti međusobno poređenje kvaliteta bakterijskih suspenzija proizvedenih na različite načine.

# **3. MATERIJAL I METODE**

### **3.1 Izbor sojeva *B. pertussis***

U studiji su ispitivana četiri vakcinalna soja koja se koriste u proizvodnji vakcine protiv velikog kašlja Instituta za virusologiju, vakcine i serume Torlak (soj 2047/57, soj 1772/57, soj 23/81 i soj 8/84) i 77 kliničkih sojeva, izolovanih u periodu od 1953. do 2011. godine, u Republici Srbiji. Svi izolati pripadaju kolekciji sojeva Instituta Torlak. Klinički izolati su podeljeni u grupe prema periodima izolacije. Prvu grupu čine izolati iz prevakcinalnog perioda, od 1953. do 1960. (n=21). Drugu grupu čine izolati iz vremena posle uvođenja vakcinacije u Srbiji, a pre uključivanja dva nova soja u sastav vakcine, od 1961. do 1979 (n=9). Treću grupu čine sojevi izolovani u periodu od 1980. do 1989. (n=34), kada su u sastav vakcine dodata dva nova vakcinalna soja. Četvrtu grupu čine takozvani „savremeni“ izolati iz perioda 1990.-2011. (n=13).

Pronađeni su podaci o uzrastu, polu i vakcinalnom statusu za 83 % pacijenata kod kojih su izolovani ispitivani sojevi.

Za potrebe kultivacije vakcinalnog soja u konvencionalnim Roux bocama (INTOS, Jugoslavija) i u bioreaktoru za jednokratnu upotrebu „WAVE“ sistema (GE Healthcare, SAD) korišćen je vakcinalni soj 1772/57, jedan od četiri soja koji ulaze u sastav vakcine protiv velikog kašlja Instituta Torlak.

### **3.2 Kultivacija sojeva**

Svi ispitivani sojevi su čuvani u liofilizovanom stanju, na temperaturi od  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ . Izabrani sojevi su oživljeni u 1% Casamino acid-u (Becton Dickinson and Co., SAD) i kultivisani 72h na Bordet-Gengou podlozi (Tabela 3) na temperaturi od  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ , a zatim subkultivisani na istoj podlozi u trajanju od 24h (Bouchez et al., 2008).

Vakcinalni sojevi su posle postupka oživljavanja, u proizvodne svrhe kultivisani u tečnoj Cohen-Wheeler podlozi (Tabela 7), u Roux bocama u šejker-termostatu (Mehatronic, Srbija), na temperaturi od  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  i u bioreaktoru za jednokratnu upotrebu "WAVE" sistema sa kontrolisanom oksigenacijom, na temperaturi od  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ , u istoj podlozi.

Tabela 7. Sastav Cohen Wheeler (CW) podloge

Supstanca	g ml/L
NaCl	2,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0,4
L-cystine	0,025
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,41
L-glutaminska kiselina	0,25
kazamino acid	11,35
Skrob	2,0
ekstrakt kvasca	15,0
1 M HCl	10,5

pH=7,3 na 25° C

### 3.3 Laboratorijske metode za tipizaciju sojeva

#### 3.3.1 Serotipizacija fimbrija (*Fim*)

Serotipizacija vakcinalnih sojeva i kliničkih izolata je izvršena metodom aglutinacije na pločici sa monoklonskim antitelima na Fim2 i Fim3 (NIBSC, Velika Britanija). Kao pozitivna kontrola su korišćeni referentni sojevi poznatog serotipa, a kao negativna kontrola je korišćen fiziološki rastvor (Advani et al., 2004, Mooi et al., 2000).

#### 3.3.2 Genotipizacija *PtxS1* subjedinice (*ptxA*) pertusis toksina

Genotipizacija *ptxA* je izvršena primenom *LightCycler* PCR (Roche Diagnostics GmbH, Nemačka) i PFGE (Biorad Laboratories, SAD) prema ustanovljenom protokolu (Advani et al., 2004; Elomaa et al., 2005; Heikkinen et al., 2008). Ovom metodom su utvrđeni različiti aleli: *ptxA1*, *ptxA2*, *ptxA3*, i *ptxA4*. Kao pozitivna kontrola, korišćeni su internacionalni sojevi sa definisanom genotipizacijom *ptxA* alela, a kao negativna kontrola uzorak koji ne sadrži DNK. Ove metode su internacionalno preporučene za epidemiološku tipizaciju sojeva *B. pertussis* (Mooi et al., 2000).

#### 3.3.3 Genotipizacija *prn* alela pertaktina

Genotipizacija *prn* alela je takođe izvršena primenom *LightCycler* PCR i PFGE prema protokolu koji su opisali Advani i saradnici 2004 .godine (Advani et al., 2004). Diferencijacija alela je izvršena prema veličini produkata PCR. Kao pozitivna kontrola

korišćeni su internacionalni sojevi sa definisanom genotipizacijom *prn* alela, a kao negativna kontrola uzorak koji ne sadrži DNK.

### **3.3.4 Analiza PFGE profila**

Izvršeno je određivanje PFGE profila 4 vakcinalna soja i 53 izolata *B. pertussis*. Dobijeni PFGE profili su analizirani primenom *BioNumerics* softvera, (Applied Maths, Ver.3.5, Sint-Martens-Latem, Belgium). Korišćen je metod klastera kao aritmetički klastering (*UPGMA*) tipa dendograma sa *Dice-ovim* koeficijentom sličnosti, 1% optimizacije i 1% tolerancije. Za kontrolu i poređenje PFGE profila korišćeno je šest internacionalnih referentnih sojeva (Mooi et al., 2000) i nomenklatura bazirana na već definisanim profilima koji su proučavani u Finskoj (BpFINR) i Švedskoj (BpSR) (Advani et al., 2004; Elomaa et al., 2005 ).

## **3.4 Izrada inokuluma za kultivaciju u “WAVE” bioreaktoru**

Za izradu primarnog inokuluma *B. pertussis* 1772/57 korišćene su *Roux* boce sa 350mL CW podloge. Zasejane boce su inkubirane 48h na  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  brzinom od 200 rpm u šejker-termostatu.

Posle inkubacije, primarne kulture su testirane procesnim kontrolnim testovima:

- kontrola čistoće bakterijske kulture
- određivanje biomase
- merenje pH vrednosti

Jedan litar inokuluma ( $\text{OD}_{570}=0,6$ ) je korišćen za zasejavanje „WAVE“ bioreaktora koji je sadržavao 5L CW podloge u kesi za jednokratnu upotrebu (Cellbag), zapremine od 10L.

### **3.4.1 Uslovi kultivacije u „WAVE“ bioreaktoru**

Za kultivaciju *B. pertussis* 1772/57 soja u „WAVE“ bioreaktoru korišćen je WAVE 20/50 sistem i kese za jednokratnu upotrebu „Cellbags“ zapremine od 10L (GE Healthcare). Ulazni i izlazni vazduh u kesu je filtriran kroz filtere od  $0,22\ \mu\text{m}$  koji su termostatorirani ugrađenim grejačima u cilju prevencije blokade filtera kondenzacijom. Pritisak unutar kese je održavan konstantnim pomoću povratnih ventila na izduvnom sistemu. Tokom procesa, konstantno je kontrolisana koncentracija rastvorenog



kiseonika pomoću integrisane kontrolne jedinice (*WAVE POD*). U cilju što bolje oksigenacije kulture agitacija je vršena brzinom od 35 rpm pri uglu od 10°. Protok gasova je održavan na 0,1 L/min pri čemu je korišćen vazduh iz prostorije obogaćen sa dodatnim kiseonikom, do 30% zasićenosti. Na platformi uređaja, temperatura kultivacije je bila podešena na 36°C. Kultivacija je trajala sve dok kultura u kesi nije dostigla optičku gustinu  $OD_{570}=0,7$  (što je prosečna optička gustina koja se dobija pri kultivaciji u *Roux* boci). Uzorkovanje kulture je vršeno odmah posle inokulacije, a zatim 22h, 46h, 47h, 49h, 51h i 52h posle pokretanja uređaja. Uzorci su testirani procesnim kontrolnim testovima:

- kontrola čistoće bakterijske kulture
- određivanje biomase
- merenje pH vrednosti

### **3.5 Kontrolne kulture**

Kao kontrolne kulture su korišćene kulture *B. pertussis* 1772/57 kultivisane u *Roux* bocama sa 350mL CW podloge. Boce su inkubirane 48h na temperaturi od  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  pri brzini od 200 rpm u šejker-termostatu. Uzorci su testirani procesnim kontrolnim testovima:

- kontrola čistoće bakterijske kulture
- određivanje biomase
- merenje pH vrednosti

### **3.6 Procesni kontrolni testovi**

#### **3.6.1 Kontrola čistoće bakterijske kulture**

Kulture *B. pertussis* 1772/57 su presejane iz *Roux* boca/*WAVE* bioreaktora sa CW podlogom na BG agar ploče. Zasejane BG ploče su inkubirane 48 h na temperaturi od  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Posle završene inkubacije, izvršena je vizuelna kontrola izraslih kolonija kako bi se utvrdilo da je izrasla čista kultura, bez pristustva kontaminanata i da kolonije morfološki odgovaraju kolonijama *B. pertussis*.

### **3.6.2 Određivanje biomase**

Za određivanje biomase *B. pertussis* soja 1772/57 prilikom kultivacije u Roux bocama i u „WAVE“ bioreaktoru korišćene su dve metode:

- Određivanje optičke gustine
- Određivanje suve mase bakterija

#### **3.6.2.1 Određivanje optičke gustine**

Optička gustina kultura dobijenih kultivacijom soja *B. pertussis* u Roux bocama i u „WAVE“ bioreaktoru merena je tokom celog procesa kultivacije na denzitometru (MA 9507 ISKRA, Jugoslavija) na talasnoj dužini od 570 nm. Proračun merenja je baziran na podacima da 0,2 jedinice optičke gustine ( $OD_{570}=0,2$ ) odgovaraju približno 20 Internacionalnih jedinica opaciteta (20 IOU), što odgovara oko 0,5 g/L suve mase (Thalen et al., 2008).

#### **3.6.2.2 Određivanje suve mase bakterija**

Određivanje suve mase je izvršeno centrifugiranjem po 40 mL bakterijske suspenzije na 8000×g tokom 10 minuta, zatim sušenjem dobijenog taloga 24 h na 108°C, sve dok osušeni talog nije sadržavao manje od 0,5% vode, što je dokazano titracijom sa jodom na analizatoru postotka vlage (Mitsubishi, Japan), (Thalen et al., 2008).

### **3.6.3 Merenje pH vrednosti**

Uzorcima kulture iz Roux boca i WAVE bioreaktora je izmerena pH vrednost na pH-metru (Radiometer, Danska).

## **3.7 Inaktivacija, koncentrovanje i prečišćavanje**

Bakterijske kulture *B. pertussis* 1772/57, dobijene kultivacijom u „WAVE“ bioreaktoru i u Roux bocama su inaktivisane 10% rastvorom tiomersala. Zatim su kulture iz obe kultivacije podeljene u dve podgrupe, kojima je koncentrovanje i prečišćavanje vršeno sa dva različita metoda: centrifugiranjem i mikrofiltracijom (Tabela 8).

Tabela 8. Grupe i podgrupe bakterijskih suspenzija prema načinu kultivacije i metodu koncentrovanja i prečišćavanja

Grupa	Način kultivacije	Podgrupa	Metod koncentrovanja i prečišćavanja
R	<i>Roux</i> boce	R1	centrifugiranje
		R2	mikrofiltracija
W	„WAVE“ bioreaktor	W1	centrifugiranje
		W2	mikrofiltracija

### 3.7.1 Centrifugiranje

Sistemom za sabiranje sa pipetom aseptično je sakupljena kultura iz *Roux* boca (R1) u boce za centrifugiranje sa staklenim perlama. Sistemom, aseptično priključenim na kesu „WAVE“ bioreaktora, uz pomoć peristaltičke pumpe (*Masterflex I/P, Cole-Palmer, SAD*), kultura iz kese (W1) je prebačena u boce za centrifugiranje sa staklenim perlama. Izvršeno je centrifugiranje kultura R1 i W1 u trajanju od 90 minuta na brzini od 3000 obrtaja u centrifugi sa hlađenjem (*Stock Wilhem Marburg 3233, Nemačka*). Posle centrifugiranja odliven je supernatant iz svih boca, a talog bakterijske kulture je resuspendovan PBS-om.

### 3.7.2 Mikrofiltracija

Mikrofiltracija je izvršena upotrebom kertridž-filtera za tangencijalnu filtraciju (*Microfiltration Hollow Fiber Cartridge, 0,1µm, GE Healthcare, SAD*), promera pora od 0,1µm. Filter je instaliran na uređaj za tangencijalnu filtraciju (*FlexStand GE Healthcare, SAD*) sa peristaltičkom pumpom (*Masterflex I/P, Cole-Palmer, SAD*). Tokom procesa mikrofiltracije, kultura je kontinuirano ispirana sa PBS-om u zatvorenom sistemu, a odstranjivanje hranljive podloge je vršeno kroz pore filtera veličine 0,1µm.

#### 3.7.2.1 Mikrofiltracija kulture kultivisane u *Roux* bocama (R2)

Kultura R2 je aseptično sakupljena u jednu bocu od 5L i inaktivisana 10% tiomersalom. Pre početka procesa, merenjem optičke gustine (OD570), određena je početna gustina kulture R2. Posle aseptičnog priključenja boce sa kulturom R2, izvršeno je koncentrovanje i prečišćavanje, propuštanjem bakterijske suspenzije kroz filter-kertridž

uz dodavanje PBS-a kojim se ispira bakterijska kultura, a permeat odbacuje. Proces je ponavljan u nekoliko ciklusa do postizanja potpune obezbojenosti i prozirnosti permeata i željene gustine koncentrovane, prečišćene suspenzije (retenata), koja je trebalo da bude minimalno 3 puta veća od početne vrednosti OD570. Po završetku procesa, suspenziji je dodat 10% rastvor tiomersala do finalne koncentracije od 0,02%. U toku procesa praćeno je zasićenje filtera kontrolom protoka i pritiska, a posle svakog ciklusa merena je zapremina odbačenog permeata i preostalog retenata i određivana je gustina uzorkovanog retenata.

### **3.7.2.2 Mikrofiltracija kulture kultivisane u „WAVE“ bioreaktoru (W2)**

Po završetku kultivacije u kesi za jednokratnu upotrebu u "WAVE" bioreaktoru, izvršena je inaktivacija kulture W2, aseptičnim dodavanjem 10% rastvora tiomersala. Po završenoj inaktivaciji, kesa je aseptično priključena za filter-kertridž za mikrofiltraciju na *FlexStand* uređaju. Pre početka procesa određena je početna optička gustina kulture W2. Koncentrovanje i prečišćavanje je izvršeno propuštanjem bakterijske suspenzije kroz filter-kertridž uz dodavanje PBS-a kojim je ispirana bakterijska kultura, a permeat se odbacivao. Proces je ponavljan u nekoliko ciklusa do postizanja potpune obezbojenosti i prozirnosti permeata i željene gustine koncentrovane, prečišćene suspenzije (retenata), koja je trebalo da bude minimalne gustine OD570=0,9 (što odgovara opacitetu od oko 90 OU/mL). Po završetku procesa, suspenziji je dodat 10% rastvor tiomersala do finalne koncentracije od 0,02%. U toku procesa praćeno je zasićenje filtera kontrolom protoka i pritiska, a posle svakog ciklusa merena je zapremina odbačenog permeata i preostalog retenata i određivana je gustina uzorkovanog retenata.

## **3.8 Stabilizacija proizvedenih bakterijskih suspenzija**

Inaktivisane, koncentrovane i prečišćene bakterijske suspenzije *B. pertussis* 1772/57 (R1, R2, W1 i W2) su skladištene na temperaturi od 4°C u trajanju od najmanje 3 meseca, pre daljeg testiranja, u cilju stabilizacije, tj detoksikacije uz očuvanje aktivnosti i stabilnosti (Spasojevic, 1977; [who.int/biologicals/vaccines/pertussis/en](http://who.int/biologicals/vaccines/pertussis/en)).

## **3.9 Kontrola kvaliteta bakterijskih suspenzija**

### **3.9.1 Uzorkovanje**

Bakterijske suspenzije koje su koncentrovane i prečišćene metodom centrifugiranja (R1 i W1) su uzorkovane:

- pre puštanja u rad centrifuge (po 3 uzorka)
- posle izvršenog resuspendovanja (po 3 uzorka)

Izvršeno je i uzorkovanje bakterijskih suspenzija koje su koncentrovane i prečišćene metodom mikrofiltracije (R2 i W2):

- Pre početka koncentrovanja i purifikacije - po 3 uzorka
- U toku koncentrovanja i purifikacije - po 3 uzorka
- Po završenom procesu – po 3 uzorka

### **3.9.2 Metode za određivanje parametara**

Svim uzorcima dobijenih bakterijskih suspenzija su određeni sledeći parametri:

- Opacitet/optička gustina - merenjem optičke gustine OD570nm i poređenjem sa standardnom krivom.
- Sterilnost proizvoda - testovima kontrole sterilnosti, zasejavanjem tripton soja bujona (Institut Torlak, Srbija) i tioglikolatne podloge (Institut Torlak, Srbija)
- Čistoća kulture - posmatranjem mikroskopskog preparata bojenog po Gramu (Institut Torlak, Srbija)
- Očuvanje fimbrijalnih antigena - aglutinacijom na pločici sa antiserumom AGG1, antiserumom AGG2, antiserumom AGG3, antiserumom AGG14, antiserumom PoliAGG, antiserumom AGGif i PBS-om (NIBSC, Velika Britanija)

### **3.9.3 Biološki kontrolni testovi**

Posle završene stabilizacije u trajanju od minimalno 90 dana, sve inaktivisane, koncentrovane bakterijske suspenzije su kontrolisane biološkim testovima prema Evropskoj Farmakopeji (*Eur.Pharm 6.0.*):

- Određivanje aktivnosti (potence)
- Određivanje specifične toksičnosti

### **3.9.3.1 Test određivanja aktivnosti (potence)**

Potence inaktivisanih, koncentrovanih bakterijskih suspenzija R1, R2, W1 i W2 su determinisane Kendrick-ovim intracerebralnim zaštitnim mišjim testom (eng. *intracerebral mouse protection test*) (WHO, 1977; Council of Europe, 2010; WHO Expert Committee on Biological Standardization, 2007; Kendrick et al., 1947).

U testu je korišćeno 380 belih „Swiss“ miševa, starosti od oko 5 nedelja, podeljenih u grupe sa podjednakom distribucijom polova, težine i starosti. Za svako razređenje standardne vakcine i za svaki ispitivani uzorak je testirana grupa od po 20 miševa u jednoj tegli. Takođe, za svako razređenje kulture u odnosu na broj srednjih letalnih doza (LD50) u sastavu doze za tzv. „challenge“ je korišćena grupa od po 20 miševa. Referentna vakcina i ispitivani uzorci, koji su prethodno svedeni na 15 OU/0,5 mL su razblaženi fiziološkim rastvorom (FR) i od svih su pripremljena po tri razređenja:

Razređenje A - 1:8 (2.0 ml uzorka/vakcine + 14.0 ml FR)

Razređenje B - 1:40 (5.0 ml A + 20.0 ml FR)

Razređenje C - 1:200 (5.0 ml B + 20.0 ml FR).

Internacionalni standard je takođe razređen sa FR tako da je dobijena koncentracija od 4IU/0,5 mL, od koje su takođe pripremljena razređenja A, B i C na prethodno opisan način.

Za svaki uzorak je određena srednja efektivna doza (ED50). Miševima iz svake grupe je ubrizgano 0,5mL odgovarajućeg razblaženja ispitivanih uzoraka. Interval između imunizacije i „challenge“ testa je bio 14 dana. Zahtevano je da najmanje 94% miševa imunizovanih sa referentnom vakcinom i ispitivanim uzorcima preživi do „challenge“ testa, kao i da svi miševi u tom intervalu budu zdravi.

Za izvođenje „challenge“ testa korišćen je internacionalni referentni soj *B. pertussis* 18323. Bakterijska suspenzija *B. pertussis* 18323 je pripremljena od kulture inkubirane 24h na BG agaru. Pripremljena suspenzija, je razređena tako da svaka „challenge“ doza sadrži 100 LD50, što odgovara vrednosti od oko 100 000 klica *B. pertussis*. Imunizovanim miševima je izvršen „challenge“ test intracerebralnim ubrizgavanjem pripremljene „challenge“ doze pod blagom narkozom etrom. U cilju određivanja LD50, razređenja „challenge“ doze su ubrizgana intracerebralno kontrolnim miševima i takođe zasejana na BG agar radi utvrđivanja broja bakterija. Miševi su posmatrani 14 dana. Miševi koji su umrli u toku prva 72 h su isključeni iz testa. Vrednost ED50 za svaki uzorak je određena transformacijom podataka o preživljavanju u linearnu regresiju.

Uzorci su ispunjavali zahtev za adekvatnom potencom, ukoliko je test pokazao da je potencia iznosila minimalno 4,0 IU/0.5mL.

### **3.9.3.2 Test određivanja specifične toksičnosti**

Svim ispitivanim uzorcima je određena specifična toksičnost izvođenjem mišjeg testa dobijanja na težini (eng. *mouse weight gain test*, *MWGT*) (WHO, 1977; Council of Europe, 2010; WHO Expert Committee on Biological Standardization, 2007; Kendrick et al., 1947). U testu je korišćeno 100 belih „Swiss“ miševa težine 14-16g, podeljenih u grupe od po 20 miševa. Izvršena je uniforma distribucija polova, starosti i težine miševa u svakoj grupi. Za testiranje svakog uzorka korišćeno je 20 miševa, kao i 20 miševa za kontrolnu grupu. Svakom mišu je intraperitonealno ubrizgano 0,5 mL uzorka razređenog da odgovara polovini humane doze (15 OU/mL). Svakom mišu iz kontrolne grupe je intraperitonealno ubrizgano 0,5 mL fiziološkog rastvora sa 0,01% timerosala. Merenje težine miševa je vršeno 24 h pre ubrizgavanja, 72 h i 7 dana posle ubrizgavanja. Za svaki test i kontrolu izračunata je prosečna dobijena težina posle 7 dana. Procenat dobijanja u težini je izračunat po formuli:  $x't/x'k \cdot 100$  gde je  $x't$  prosečan dobitak u težini za miševe u testu,  $x'k$  prosečan dobitak u težini za miševe kontrolne grupe. Rezultat specifične toksičnosti se smatrao zadovoljavajućim ukoliko su bili ispunjeni sledeći uslovi:

Srednja težina miševa, 72 h posle ubrizgavanja, nije bila manja od početne težine.

Srednja težina miševa, 7 dana posle ubrizgavanja, nije bila manja od 60% srednje težine kontrolne grupe.

Među 20 miševa u grupi, maksimalan broj uginulih miševa je bio jedan (5%).

## **3.10 Statistička obrada podataka**

Za poređenje učestalosti genotipova i serotipova između četiri ispitivana perioda (1953.–1960., 1961.–1979., 1980.-1989. i 1990.–2011.) korišćen je  $\chi^2$  test. Granicom statističke značajnosti smatrana je verovatnoća od 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Za poređenje vrednosti pH, optičke gustine (OD570) i suve težine korišćen je Studentov T test. Granicom statističke značajnosti smatrana je verovatnoća od 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Vrednost ED50 je određena Probit analizom po Spearman-Kärberu sa intervalom poverenja od 95%.

## **4. REZULTATI**

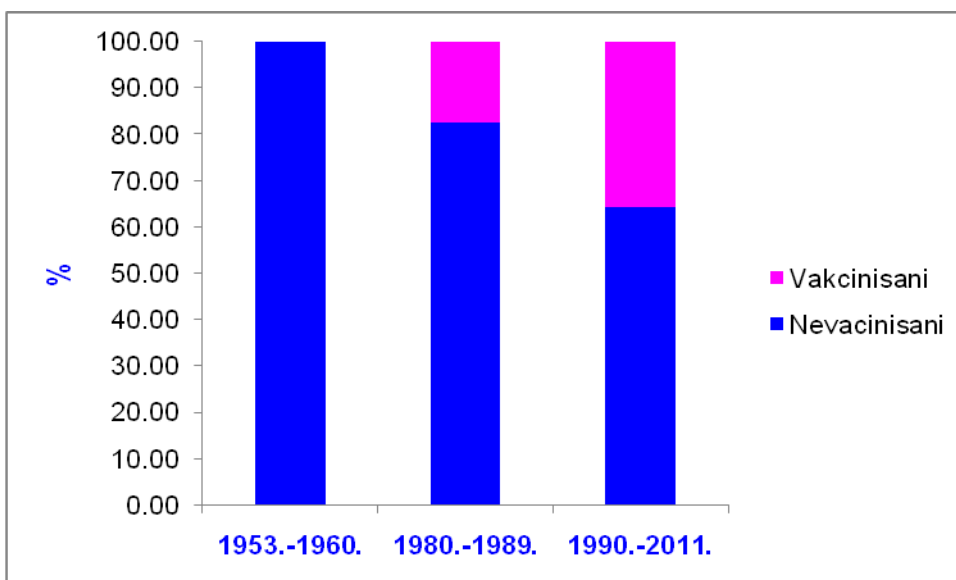


## 4.1 Sojevi *B. pertussis*

### 4.1.1 Epidemiološki podaci

U studiji su ispitana četiri vakcinalna soja (*B. pertussis* 1772/57, *B. pertussis* 2047/57, *B. pertussis* 8/84 i *B. pertussis* 23/81) i 77 kliničkih izolata (Tabela 8). Analizom epidemioloških podataka o vakcinalnom statusu pacijenata od kojih su izolovani ispitivani sojevi je utvrđeno da (Grafikon 2):

- I grupa - Svi sojevi su izolovani od nevakcinisanih pacijenata.
- II grupa - Podaci o pacijentima nisu bili dostupni.
- III grupa - 82,35% sojeva je izolovano od nevakcinisanih pacijenata.
- IV grupa - 64,4% sojeva je izolovano od nevakcinisanih pacijenata.



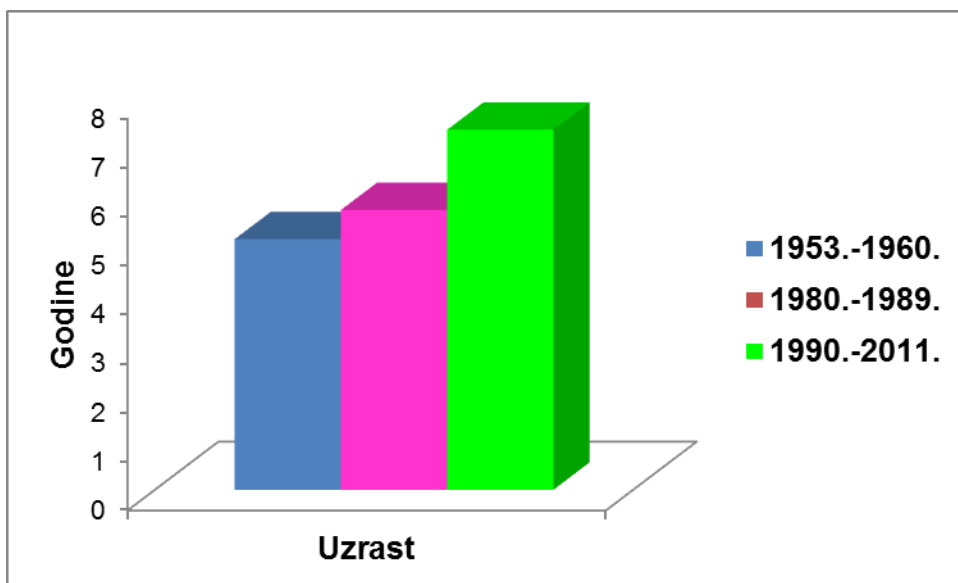
Grafikon 2. Distribucija vakcinalnog statusa pacijenata kod kojih su izolovani ispitivani sojevi *B. pertussis*.

Analizom epidemioloških podataka o uzrastu i polu pacijenata od kojih su izolovani ispitivani sojevi je utvrđeno je da:

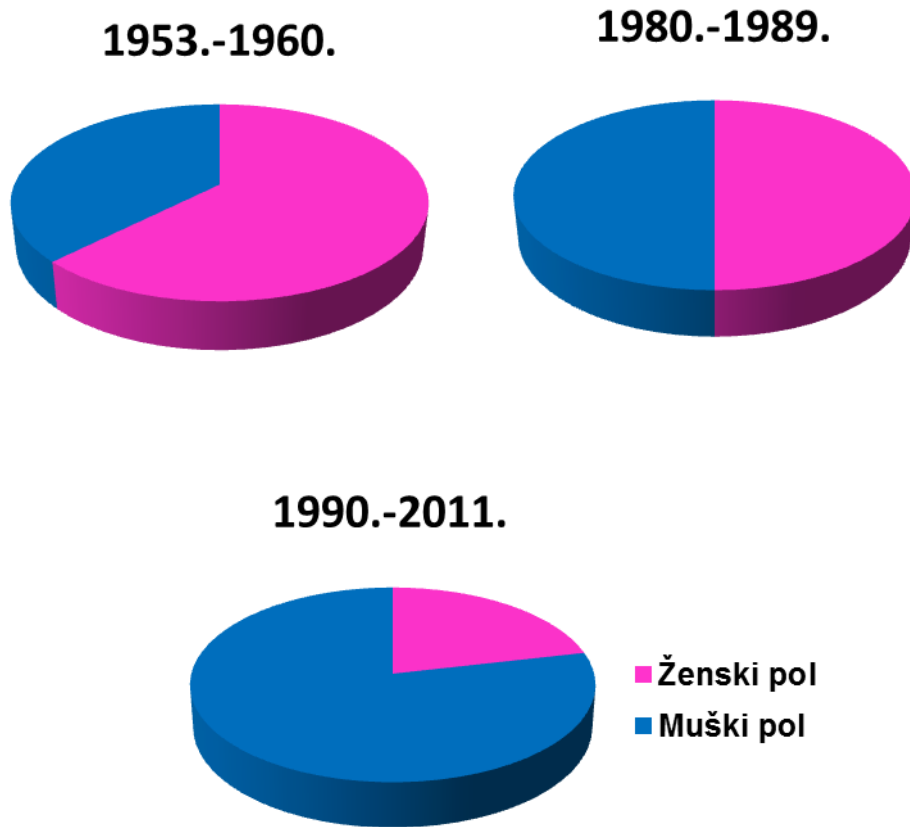
- U prvom ispitivanom periodu, prosečna starost pacijenata je iznosila 5,1 godinu (Grafikon 3), među kojima je bilo 37,5% muškog i 62,5% ženskog pola (Grafikon 4).
- Podaci o pacijentima kod kojih su izolovani sojevi iz druge grupe nisu bili dostupni.
- U trećoj grupi prosečna starost pacijenata je iznosila 5,7 godina (Grafikon 3), sa jednakom distribucijom muškog i ženskog pola (po 50%) (Grafikon 4).

- U četvrtoj grupi prosečna starost pacijenata je iznosila 7,3 godine (Grafikon 3), među kojima je bilo 78,6% muškog i 37,5% ženskog pola. (Grafikon 4).

U celom posmatranom periodu (1953.-2011.) prosečna starost pacijenata kod kojih su izolovani ispitivani sojevi je iznosila 6,1 godina.



Grafikon 3. Prosečna starost pacijenata od kojih su izolovani ispitivani sojevi



Grafikon 4. Distribucija polova pacijenata od kojih su izolovani ispitivani sojevi

Tabela 8. Prikaz karakteristika vakcinalnih i izolovanih sojeva

Oznaka soja	Pol	Godine starosti	Vakcinalni status	Serotip	Prn	PtxA	Godina izolacije	Napomena
22/53	Ž	5	NE	2	1	2	1953.	
124/54	N.P.	N.P.	NE	2	1	2	1954.	
162/54	M	8	NE	2,3	1	2	1954.	
177/54	M	7	NE	2,3	1	2	1954.	
200/54	Ž	4	NE	2,3	1	2	1954.	
38/54	Ž	7	NE	2	1	2	1954.	
40/54	M	5	NE	2	1	2	1954.	
515/55	N.P.	N.P.	N.P.	2	1	2	1955.	
1078/56	Ž	2,5	NE	2,3	1	2	1956.	
1499/56	N.P.	N.P.	N.P.	2,3	1	2	1956.	
1496/57	N.P.	N.P.	NE	2	1	2	1957.	
1611/57	Ž	3	NE	2	1	2	1957.	
1714/57	M	4,5	NE	2,3	1	2	1957.	
1772/57	N.P.	N.P.	N.P.	2,3	1	2	1957.	vakcinalni soj od 1972.
1828/57	Ž	4 meseca	NE	2,3	1	2	1957.	
1881/57	N.P.	N.P.	NE	2,3	1	2	1957.	
2047/57	N.P.	N.P.	N.P.	2,3	1	2	1957.	vakcinalni soj od 1968.
2048/57	M	6	NE	2	1	2	1957.	
1997/58	M	4,5	NE	2,3	1	2	1958.	
2154/58	Ž	7	NE	2,3	1	2	1958.	
3008/60	N.P.	N.P.	N.P.	2,3	1	2	1960.	
33/69	N.P.	N.P.	N.P.	3	1	1	1969.	
90/69	N.P.	N.P.	N.P.	2,3	1	2	1969.	
108/69	N.P.	N.P.	N.P.	2,3	1	2	1969.	
122/69	N.P.	N.P.	N.P.	2,3	1	2	1969.	
258/70	N.P.	N.P.	N.P.	2,3	1	2	1970.	
487/71	N.P.	N.P.	N.P.	2,3	1	2	1971.	

375/71	N.P.	N.P.	N.P.	2,3	1	1	1971.	
849/73	N.P.	N.P.	N.P.	3	1	1	1973.	
885/73	N.P.	N.P.	N.P.	3	1	1	1973.	
55145/80	N.P.	N.P.	N.P.	3	1	1	1980.	
59377/80	N.P.	N.P.	N.P.	3	1	1	1980.	
23/81	Ž	3	DA	3	1	1	1981.	vakcinalni soj od 1985.
29/81	M	6	DA	3	1	1	1981.	
30/81	Ž	3	DA	3	3	1	1981.	
32/81	M	9 meseci	1 doza	3	1	1	1981.	
40311/81	Ž	7	DA	3	1	1	1981.	
1/84	M	6	DA	2	1	1	1984.	
2/84	Ž	6	DA	2	1	1	1984.	
3/84	Ž	4	DA	2	1	1	1984.	
4/84	Ž	6	DA	2	1	1	1984.	
5/84	M	6	DA	2	3	1	1984.	
6/84	M	1	DA	2	1	1	1984.	
7/84	Ž	5	DA	2	1	1	1984.	
8/84	M	4 meseca	NE	2	2	1	1984.	vakcinalni soj od 1985.
9/84	Ž	33	DA	2	1	1	1984.	
10/84	M	N.P.	NE	2	1	1	1984.	
11/84	M	1	NE	3	1	1	1984.	
12/84	M	1	DA	2	1	1	1984.	
14/84	M	13	DA	2	1	1	1984.	
15/84	M	2	DA	2	1	1	1984.	
17/84	M	12	DA	2	1	1	1984.	
18/84	M	16 meseci	2 doze	2	1	1	1984.	
20/84	Ž	5	DA	3	11	1	1984.	
21/84	Ž	10	DA	2	1	1	1984.	
22/84	M	9	DA	3	1	1	1984.	
24/84	Ž	4	DA	3	1	1	1984.	

28/85	M	6	DA	2	1	1	1985.	
50042/86	M	2	NE	2	11	2	1986.	
52121/86	M	3 meseca	NE	2	1	1	1986.	
9783/87	Ž	4,5	DA	2	1	2	1987.	
28270/89	Ž	10	DA	2	11	2	1989.	
28756/89	Ž	9	DA	3	3	1	1989.	
28928/89	Ž	6	DA	2	1	1	1989.	
12/90	M	11	DA	2	11	2	1990.	
51651/90	M	10	DA	2	11	2	1990.	
52376/90	Ž	11	DA	2	1	1	1990.	
53367/90	Ž	9	DA	2	1	1	1990.	
9420/90	M	12	DA	2	1	1	1990.	
53746/91	M	6 meseci	1 doza	2	1	1	1991.	
1/00	M	13	DA	2	11	2	2000.	
6/00	M	1,5	2 doze	3	3	1	2000.	
7/00	M	9	DA	3	2	1	2000.	
8/00	M	12	DA	3	2	1	2000.	
2/11	M	2,5 meseca	NE	2,3	2	1	2011.	
3/11	Ž	2,5	NE	2,3	2	1	2011.	
5/11	M	2 meseca	NE	2,3	2	1	2011.	

Legenda:

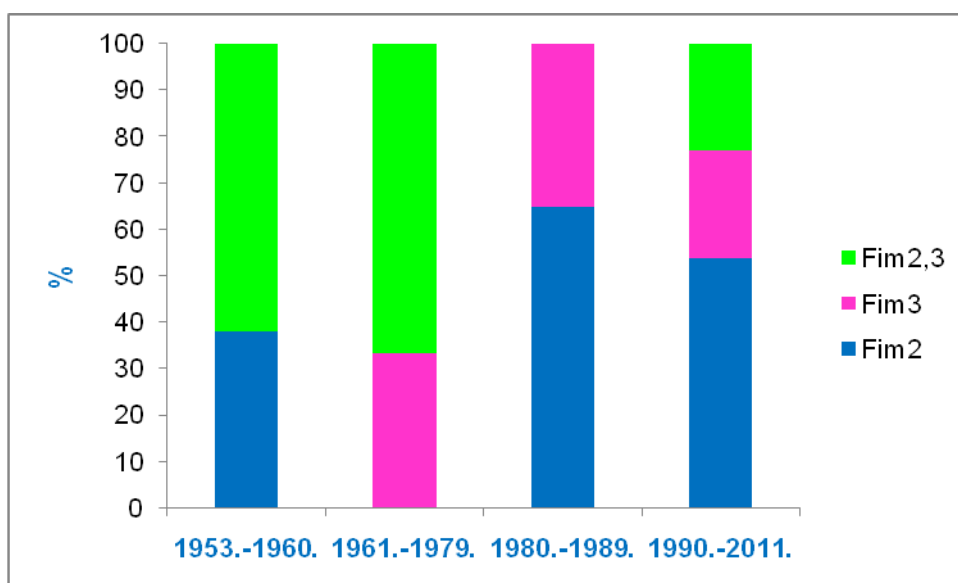
Ž-ženski pol; M-muški pol; N.P.-nema podataka;

#### 4.1.2 Serotipizacija fimbrija

Serotipizacijom fimbrija vakcinalnih sojeva i kliničkih izolata *B. pertussis* utvrđeno je postojanje sva tri serotipa: Fim2, Fim2,3 i Fim3 (Tabela 8).

Među vakcinalnim sojevima utvrđeno je da dva soja (*B. pertussis* 1772/57 i *B. pertussis* 2047/57) imaju Fim2,3 serotip, da soj *B. pertussis* 8/84 ima Fim 2 serotip, a soj *B. pertussis* 23/81 poseduje Fim3 serotip.

Analizom učestalosti serotipova kliničkih izolata u različitim periodima, utvrđeno je da je tokom vremena došlo do značajnih izmena (Tabela 9). Pre uvođenja vakcinacije dominantni serotipovi među izolatima su bili Fim2,3 (62%) i Fim2 (38%). Posle uvođenja vakcinacije došlo je do visoko značajnog ( $P < 0,01$ ) smanjenja učestalosti serotipa Fim2,3. Tako je učestalost serotipa Fim2,3 u trećem i četvrtom periodu iznosila 0% i 23% , u poređenju sa prvim i drugim periodom ( $P = 0,00013$  i  $0,0003$ ) (Grafikon 5). Iako je tokom čitavog ispitivanog vremena došlo do povećanja učestalosti Fim3 serotipa, Fim2 je ostao najdominantniji serotip.



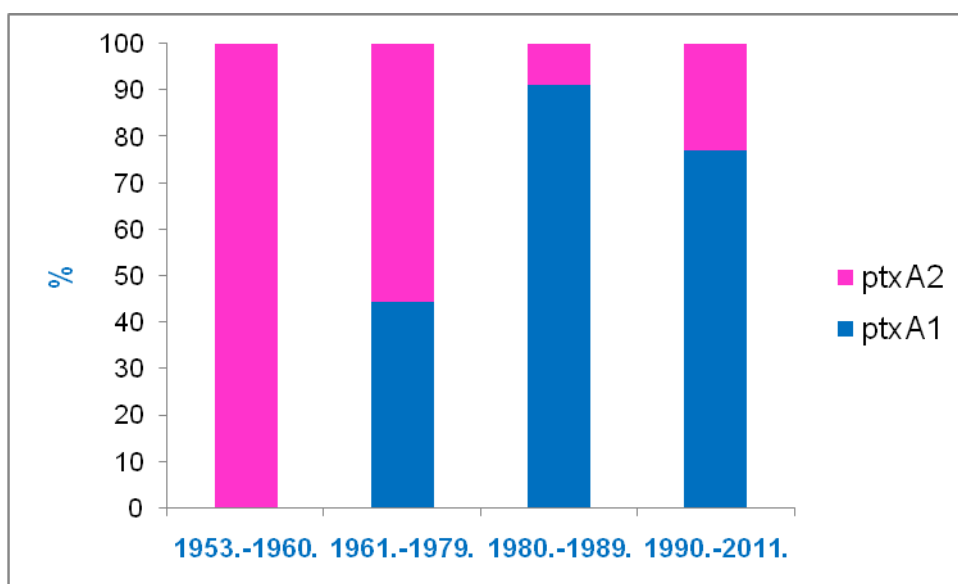
Grafikon 5. Učestalost serotipova izolata *B. pertussis*

#### 4.1.3 Genotipizacija *PtxS1* subjedinice (*ptxA*) pertusis toksina

Genotipizacijom je utvrđeno da vakcinalni sojevi 2047/57 i 1772/57 imaju *ptxA2* genotip, dok sojevi 23/81 i 8/84 pokazuju *ptxA1* genotip *PtxS1* subjedinice pertusis toksina (Tabela 8)

Utvrđeno je da su svi klinički izolati iz perioda 1953.-1960. genotipa *ptxA2*. Primećena je promena genotipa iz *ptxA2* u *ptxA1* kod sojeva koji su izolovani posle kraja 60.-ih godina XX veka. Utvrđeno je da je u periodu 1961.-1979. došlo do izjednačavanja učestalosti genotipova *ptxA1* i *ptxA2*. U periodu posle toga, od 1980.-1989., došlo je do dominacije *ptxA1* genotipa (91,2%). Međutim, ponovno pojavljivanje izolata sa *ptxA2* genotipom je primećeno 1985. godine posle uvođenja dva nova soja u sastav vakcine, za

koja je utvrđeno da imaju *ptxA1* genotip (23/81 i 8/84). Tokom perioda 1990.-2011., oba tipa *ptxA* genotipa su bila zastupljena među izolatima (Tabela 9, Grafikon 6)



Grafikon 6. Učestalost genotipova PtxS1 subjediniice (*ptxA*) pertusis toksina izolata *B. pertussis* u Srbiji

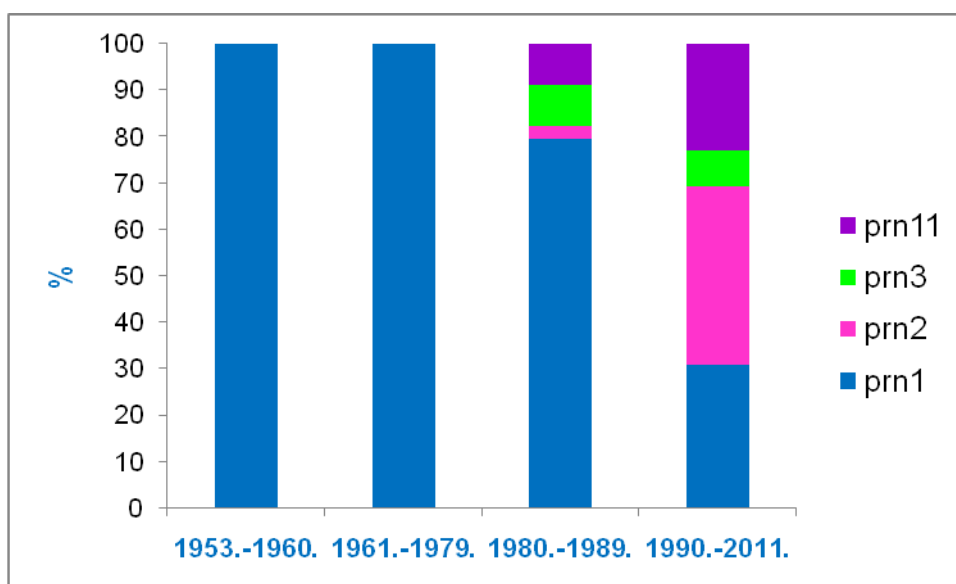
#### 4.1.4 Genotipizacija *prn* alela pertaktina

Genotipizacijom pertaktina je utvrđeno da tri vakcinalna soja imaju *prn1* genotip (2047/57, 1772/57 i 23/81), a da soj 8/84 poseduje *prn2* genotip (Tabela 8).

U prva dva ispitivana perioda, 1953.-1960. i 1960.-1979., svi klinički izolati su imali *prn1* genotip. Iako se *prn1* genotip pokazao kao najdominantniji među izolatima u Srbiji (Tabela 8), utvrđeno je da je posle 1980. godine došlo do pojave i drugih genotipova pertaktina (*prn2*, *prn3* i *prn11*), kao i da je genotip *prn2* preuzeo dominanciju u periodu 1990.-2011. Aleli *prn3* i *prn11* su prvi put detektovani kod sojeva izolovanih 1981. i 1984., a zatim su postali značajno učestaliji u periodu 1990.-2011. Alel *prn2* je pronađen kod samo jednog soja izolovanog 1984. godine (soj 8/84 koji je dodat u sastav vakcine 1985. godine), zatim kod dva od četiri izolata iz 2000. godine i kod poslednja tri izolovana soja *B. pertussis* u Srbiji, 2011. godine. Učestalost genotipa *prn1* u periodima 1953.-1960. i 1961.-1979. je bila visoko značajnija nego u periodima 1980.-1989. i 1990.-2011. ( $P < 0.001$  kod obe grupe) (Tabela 9). Učestalost *prn11* genotipa je



bila visoko značajno veća u periodima 1980.–1989. i 1990.–2011. nego u periodima 1953.–1960. i 1961.–1979. ( $P < 0.001$  kod obe grupe) (Grafikon 7)



Grafikon 7. Učestalost genotipova *prn* alela izolata *B. pertussis* u Srbiji

#### 4.1.5 Sumirana analiza serotipova i genotipova *B. pertussis* u različitim vremenskim periodima

U Tabeli 9 su prikazani rezultati genotipizacije *ptxA* subjednice i *prn* alela, kao i rezultati serotipizacije po periodima posmatranja. U prvom ispitivanom periodu (1953.-1960.) predominantni genotipi su bili *ptxA2* i *prn1*, dok je dominantni serotip bio Fim2,3. U drugom periodu (1961.-1979.), distribucija *ptx* genotipa je bila skoro ujednačena, ali i dalje je predominantni *prn* genotip bio *prn1* i dominantni serotip Fim2,3. U trećem periodu ispitivanja (1980.-1989.), dominaciju preuzima *ptxA1* genotip, dok *prn1* genotip i dalje ostaje dominantan. U pogledu serotipa, u trećem periodu potpuno nestaje serotip Fim2,3 i dominaciju preuzima serotip Fim2. U četvrtom periodu (1990.-2011.), distribucija *ptx* genotipa se ponovo izjednačava, sa malom dominacijom *ptxA1* genotipa. U pogledu *prn* genotipa, prisutna su sva četiri registrovana genotipa, sa manjom dominacijom *prn2* genotipa. U četvrtom periodu su prisutna i sva tri tipa serotipa, ali i dalje dominira serotip Fim2.

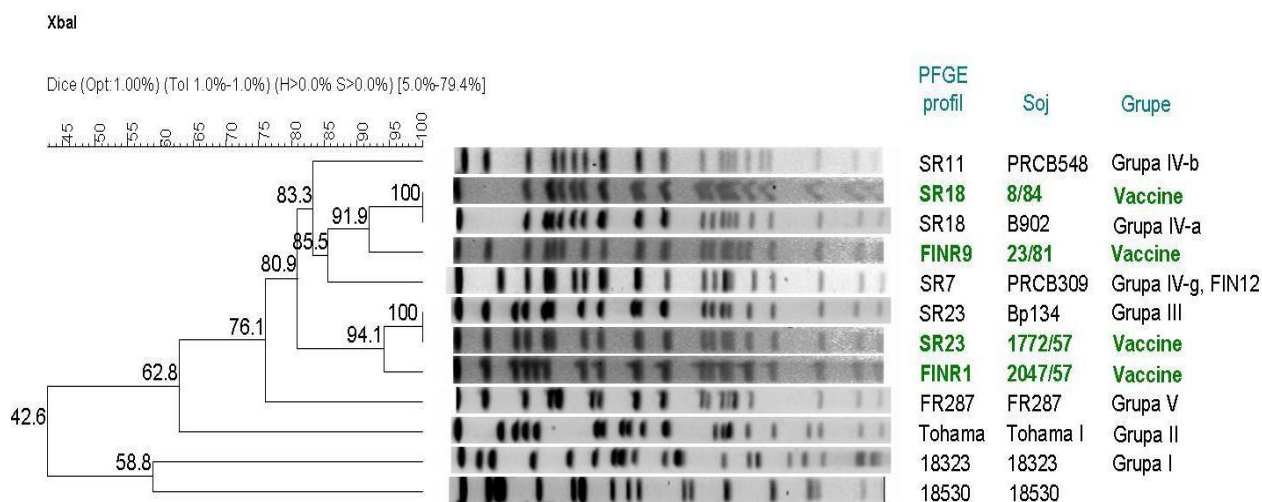
Posmatrajući ceo ispitivani period (1953.-2011.), najzastupljeniji su bili genotipovi *ptxA1* i *prn1*, kao i serotip Fim2.

Tabela 9. Serotipovi i genotipovi pertussis toksina i pertaktina kliničkih sojeva *B. pertussis* izolovanih u Srbiji u različitim vremenskim periodima.

Period izolacije	Br. izolata	<i>ptxA</i> (br.)		<i>prn</i> (br.)				serotip (br.)		
		<i>ptxA1</i>	<i>ptxA2</i>	<i>prn1</i>	<i>prn2</i>	<i>prn3</i>	<i>prn 11</i>	Fim2	Fim2,3	Fim3
1953.-1960.	21	0	21	21	0	0	0	8	13	0
1961.-1979.	9	4	5	9	0	0	0	0	6	3
1980.-1989.	34	31	3	27	1	3	3	22	0	12
1990.-2011.	13	10	3	4	5	1	3	7	3	3
<b>Ukupno</b>	<b>77</b>	<b>45</b>	<b>32</b>	<b>61</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>37</b>	<b>22</b>	<b>18</b>

#### 4.1.6 Analiza PFGE profila

Ispitivanjem je utvrđeno da četiri vakcinalna soja reprezentuju četiri različita PFGE profila (Slika 9).

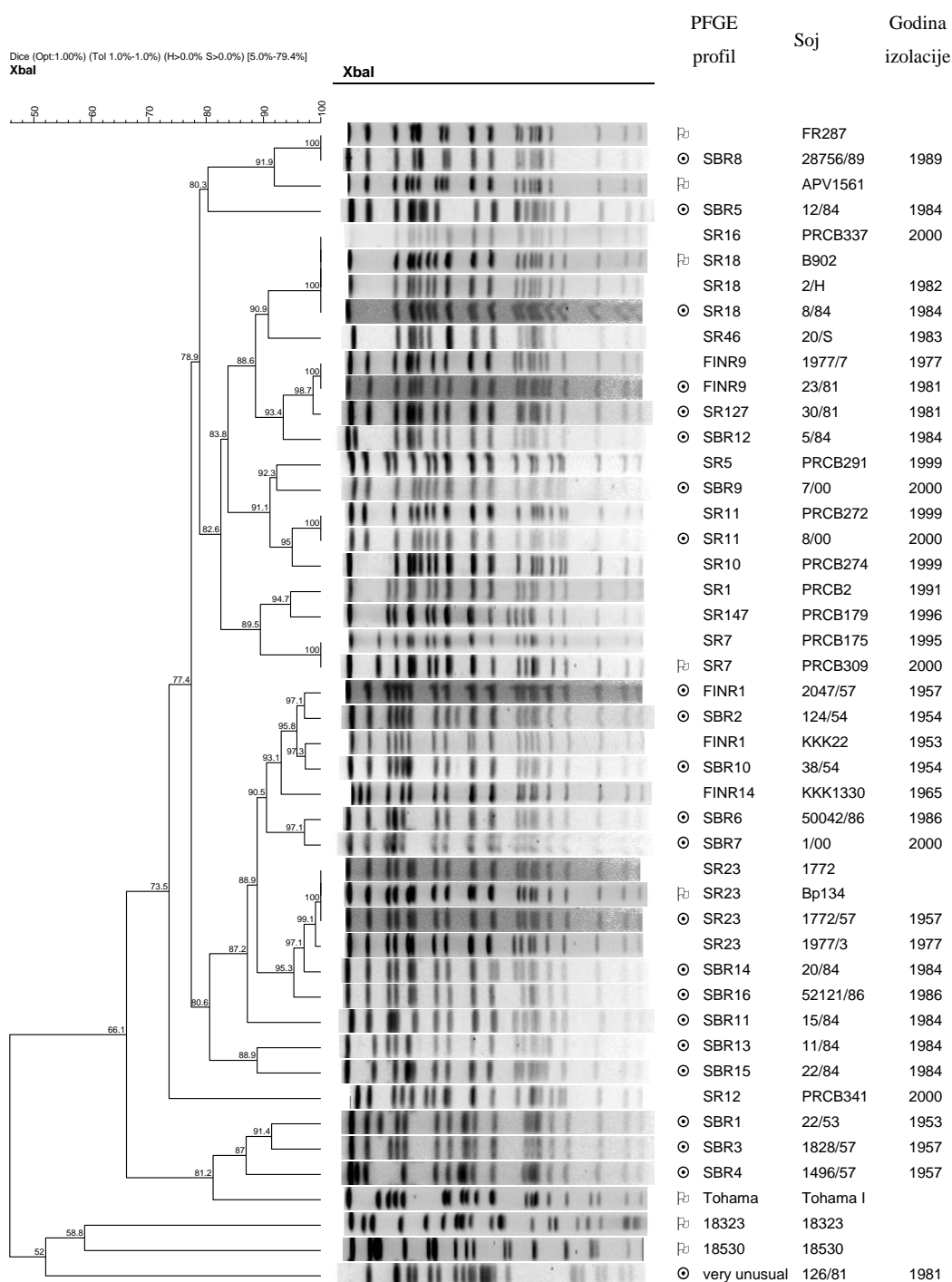


Slika 9. Analiza dendograma PFGE profila 4 vakcinalna soja 2047/57, 1772/57, 8/84 i 23/81 i srodnost sa grupama izolovanih sojeva. Korišćen je metod klastera kao aritmetički klastering (UPGMA) tipa dendograma sa Dice-ovim koeficijentom sličnosti, 1% optimizacije i 1% tolerancije.

Među ispitivanim kliničkim izolatima *B. pertussis* identifikovana su 22 različita PFGE profila (Slika 10). Najveći broj izolata je razvrstan u pet najčešćih PFGE profila: 17 izolata je imalo BpSR23 profil, 8 izolata je imalo BpFINR1 profil, 5 izolata je imalo BpFINR9 profil, 4 izolata BpSBR6 profil i 3 izolata je imalo BpSBR5 profil. Od ukupnog broja ispitivanih izolata, 24 (43%) izolata je pokazalo jedinstvene profile koji do sada nisu pronađeni u ispitivanjima drugih autora. Ovi profili su označeni kao srpski profili i dobili su oznaku BpSBR.

Analizom su utvrđene promene PFGE profila tokom posmatranog perioda. Svi PFGE profili koji su identifikovani kod sojeva izolovanih u periodu pre uvođenja vakcinacije su tokom vremena nestali, osim profila BpSR23, koji je bio prisutan tokom čitavog perioda posmatranja. Utvrđeno je da je 53 (95%) soja razvrstano u dva klastera, koji pokazuju visoku sličnost, koja iznosi najmanje 78% povezanosti (Slika 10).

Posmatrajući genotip *prn* alela i PFGE profil, uočeno je da su od šest izolata sa *prn11* genotipom, četiri imala profil BpSBR6, jedan je imao profil BpSBR7, a jedan profil BpSBR14. Svih šest izolata je posle analize, svrstano u jedan klaster. Od četiri izolata sa *prn3* genotipom, dva izolata su imala profil BpSBR8, jedan izolat profil BpSBR12 i jedan izolat profil BpSR127. I oni su takođe svrstani u jedan klaster. Dva izolata kod kojih je detektovan *prn2* genotip su imala profile BpSBR9 i BpSR11 i svrstana su u jedan klaster (Slika 10).



Slika 10. Analiza dendograma 22 PFGE profila ispitivanih sojeva *B. pertussis*

Korišćen je metod klastera kao aritmetički klastering (UPGMA) tipa dendograma sa Dice-ovim koeficijentom sličnosti, 1% optimizacije i 1% tolerancije. Simbol  $\text{FR}$  označava internacionalne referentne sojeve a simbol  $\odot$  sojeve izolovane u Srbiji. Kod više izolata koji imaju jedinstven PFGE profil prikazan je samo prvi iz grupe

## **4.2 Ispitivanje primene „WAVE“ sistema u proizvodnji vaccine protiv velikog kašlja**

### **4.2.1 Uporedna kultivacija *B. pertussis* 1772/57 u Roux bocama i „WAVE“ bioreaktoru**

Tokom kultivacije u *Roux* bocama i u „WAVE“ bioreaktoru, rast soja 1772/57 je bio uporediv (Grafikon 6). U „WAVE“ bioreaktoru, udeo rastvorenog kiseonika je održavan na 40% zasićenosti vazduha tokom prvih 46 h, a zatim je koncentracija opala na 30%. Protok gasova je održavan na 0,1L/min, a kiseonik je dodavan u cilju održavanja saturacije na više od 30%, sve dok se nije dostigla gustina kulture od  $OD_{570}=0,7$ .

#### **4.2.1.1 Čistoća kulture**

Zasejani uzorci kultura soja 1772/57, kultivisani paralelno u *Roux* bocama i u „WAVE“ bioreaktoru su posle inkubacije pokazali odsustvo kontaminacije.

#### **4.2.1.2 Mikroskopski pregled**

Mikroskopski pregled preparata uzoraka kultura soja 1772/57, kultivisanih paralelno u *Roux* bocama i u „WAVE“ bioreaktoru je pokazao prisustvo Gram negativnih, sitnih kokobacila u svim uzorcima.

#### **4.2.1.3 Određivanje aglutinogena**

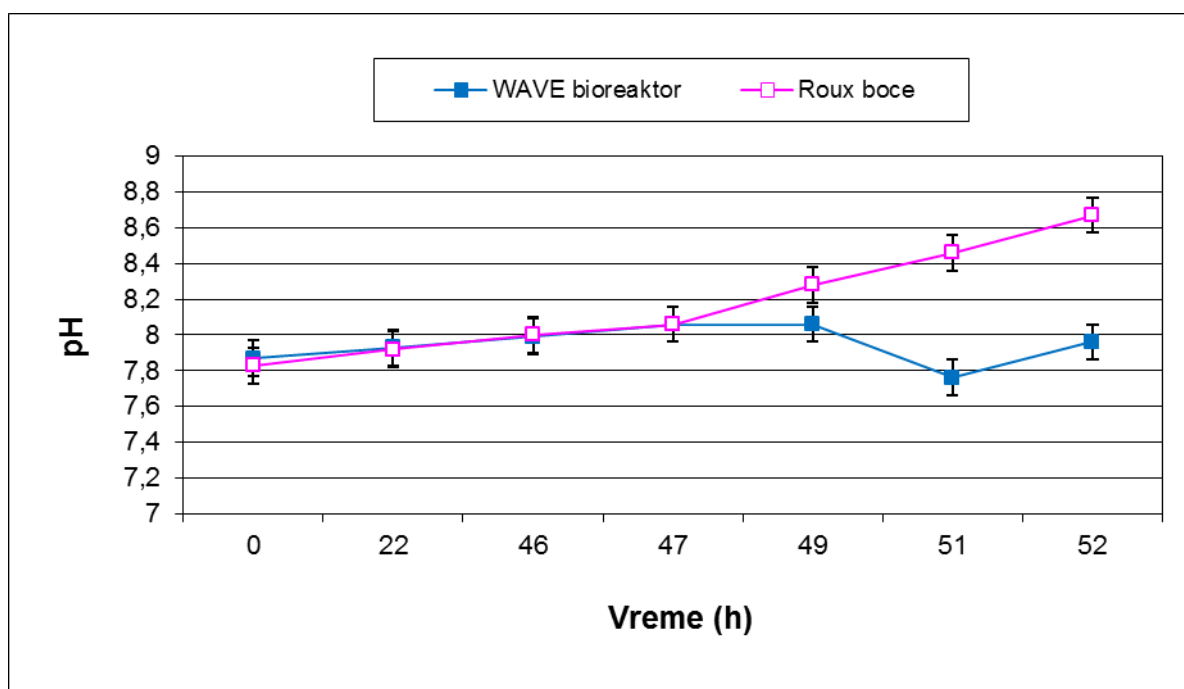
Rezultati dobijeni određivanjem tipova aglutinogena aglutinacijom na pločici sa specifičnim antiserumiima su pokazali da su u svim uzorcima prisutni fimbrijalni aglutinogeni AGG1, AGG2, AGG3 i PoliAGG, što odgovara karakteristikama soja 1772/57 (Tabela 10).

Tabela 10: Tipovi fimbrijalnih aglutinogena prisutnih kod kultura soja 1772/57, kultivisanih paralelno u *Roux* bocama (R) i u „WAVE“ bioreaktoru (W)

SOJ	Metod kultivacije	AGG1	AGG2	AGG3	AGG14	PoliAGG	AGGif	PBS
1772/57	R	+	+	+	-	+	-	-
	W	+	+	+	-	+	-	-

#### 4.2.1.4 Poređenje pH vrednosti

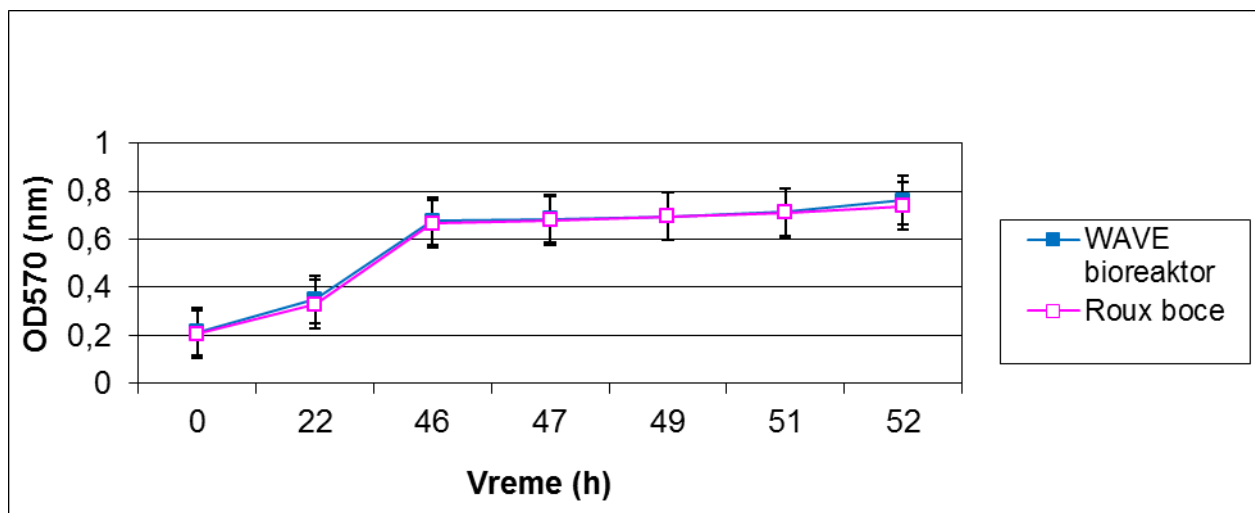
Merenjem je utvrđeno da je pH vrednost kultura u *Roux* bocama i u „WAVE“ bioreaktoru rasla paralelno do 46. časa kultivacije. Posle 46. časa kultivacije došlo je do daljeg rasta pH vrednosti u *Roux* bocama, dok se pH vrednost u „WAVE“ bioreaktoru održavala relativno konstantnom. Poređenjem pH vrednosti u funkciji vremena, nije utvrđena statistički značajna razlika u rastu pH vrednosti tokom kultivacije ( $P=0,0104$ , T-test) (Grafikon 8).



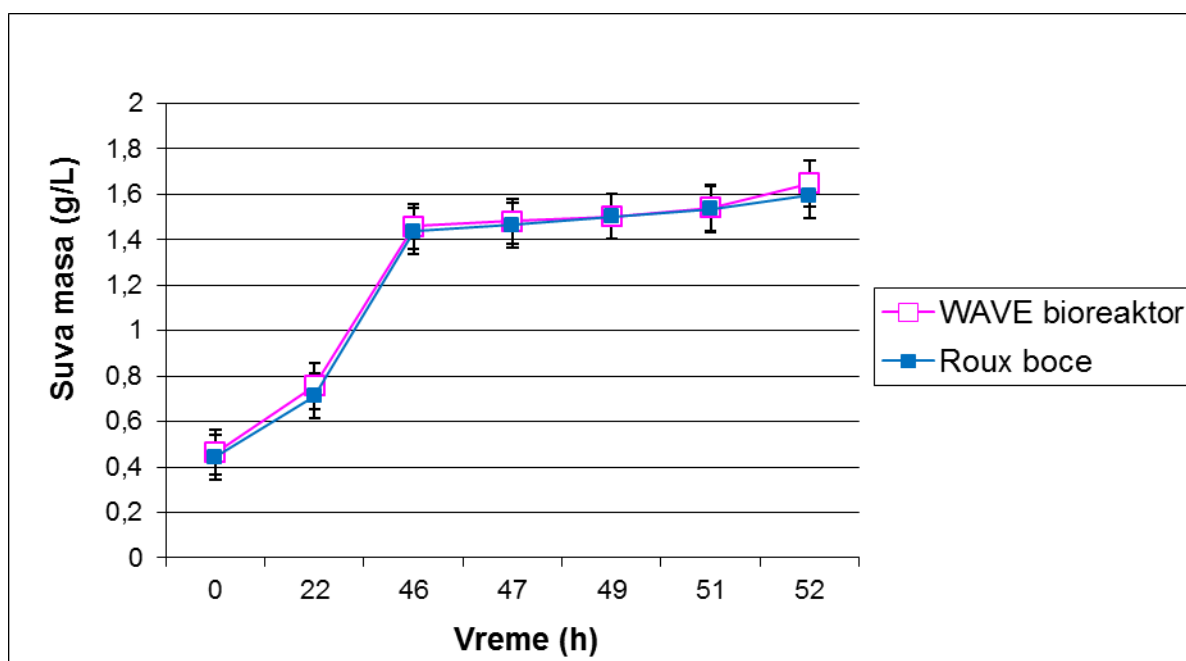
Grafikon 8. Poređenje pH vrednosti kultura kultivisanih u WAVE bioreaktoru i u Roux bocama u funkciji vremena. Sva merenja su rađena u duplikatu, dva puta su ponavljana i kao standardna greška su korišćene dve standardne devijacije. Nije utvrđena statistički značajna razlika u pH vrednosti kultura iz dva kultivaciona sistema, tokom kultivacije ( $P=0,0104$ , T-test).

#### 4.2.1.5 Poređenje biomase

Poređenjem rezultata gustine (OD570nm) (Grafikon 9) i suve mase bakterija (Grafikon 10) u Roux bocama i u „WAVE“ bioreaktoru, u funkciji vremena, utvrđeno je da nema statistički značajne razlike u porastu biomase između dve metode kultivacije (P=0,975, T-test).



Grafikon 9. Poređenje gustina kultura (OD570) kultivisanih u WAVE bioreaktoru i u Roux bocama, tokom kultivacije. Sva merenja su rađena u duplikatu, dva puta su ponavljana i kao standardna greška su korišćene dve standardne devijacije. Nije utvrđena statistički značajna razlika u biomasi merenoj optičkom gustinom kultura iz dva kultivaciona sistema (P=0,975, T-test).



Grafikon 10. Poređenje porasta suve mase bakterija kultura kultivisanih u WAVE bioreaktoru i u Roux bocama. Sva merenja su rađena u duplikatu, dva puta su ponavljana i kao standardna greška su korišćene dve standardne devijacije

#### 4.2.2 Inaktivacija, koncentrovanje i prečišćavanje kultura *B. pertussis* 1772/57 kultivisanih u Roux bocama i u „WAVE“ bioreaktoru

Posle izvršene inaktivacije sa tiomersalom, radi daljeg koncentrovanja i prečišćavanja, bakterijske suspenzije *B. pertussis* su podeljene u grupe i podgrupe prema Tabeli 8. Uzorci bakterijskih suspenzija su podeljeni prema Tabeli 11.

Tabela 11. Uzorci bakterijskih suspenzija R1, R2, W1 i W2. Svaki pojedinačni uzorak je uzet tri puta

Bakterijska suspenzija	Uzorci		
	Pre koncentrovanja i prečišćavanja	U toku koncentrovanja i prečišćavanja	Posle koncentrovanja i prečišćavanja
R1	R1a	R1b	R1c
R2	R2a	R2b	R2c
W1	W1a	W1b	W1c
W2	W2a	W2b	W2c

##### 4.2.2.1 Sterilnost

Zasejani uzorci bakterijskih suspenzija R1, R2, W1 i W2 su posle inkubacije pokazali odsustvo bakterijske kontaminacije.

##### 4.2.2.2 Mikroskopski pregled

Mikroskopski pregled preparata uzoraka bakterijskih suspenzija R1, R2, W1 i W2 je pokazao prisustvo Gram negativnih, sitnih kokobacila u svim uzorcima.

##### 4.2.2.3 Određivanje aglutinogena

Rezultati dobijeni određivanjem tipova aglutinogena aglutinacijom na pločici sa specifičnim antiserumima su pokazali da su u svim uzorcima (R1, R2, W1 i W2) prisutni fimbrijalni aglutinogeni AGG1, AGG2, AGG3 i PoliAGG, što odgovara karakteristikama soja 1772/57 (Tabela 12).



Tabela 12: Tipovi fimbrijalnih aglutinogena prisutnih bakterijskih suspenzija R1, R2, W1 i W2

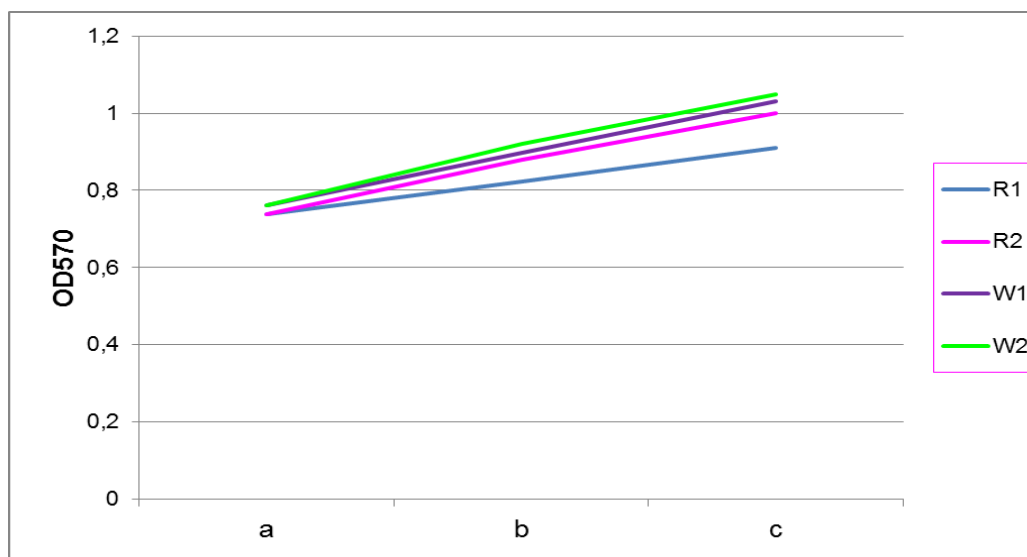
Bakterijska suspenzija	AGG1	AGG2	AGG3	AGG14	PoliAGG	AGGif	PBS
<b>R1</b>	+	+	+	-	+	-	-
<b>R2</b>	+	+	+	-	+	-	-
<b>W1</b>	+	+	+	-	+	-	-
<b>W2</b>	+	+	+	-	+	-	-

#### 4.2.2.4 Porast biomase tokom koncentrovanja

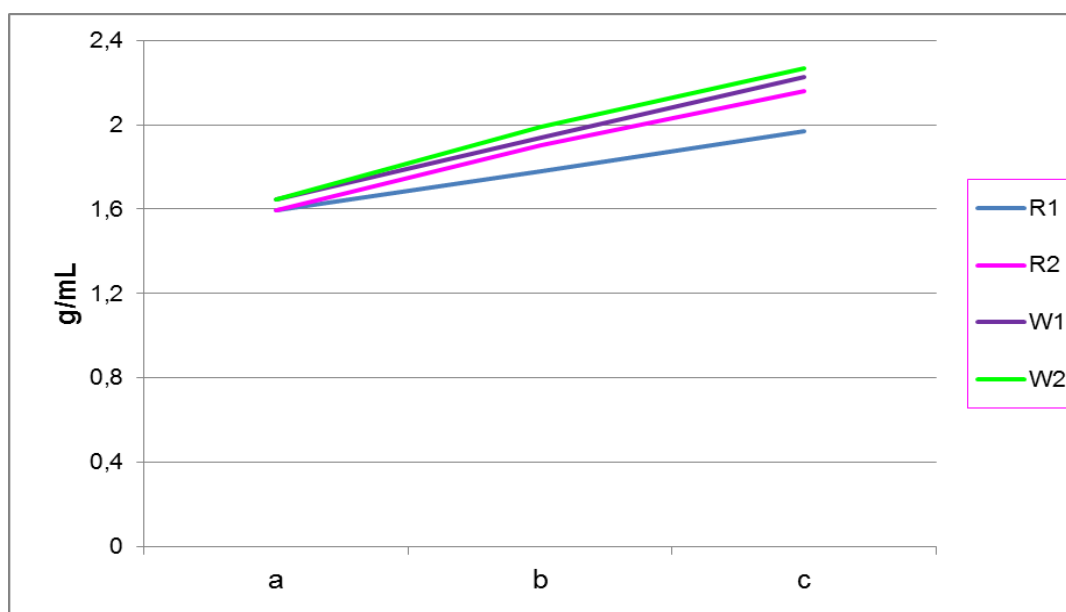
Poređenje rezultata biomase pre, u toku i posle koncentrovanja i prečišćavanja je pokazalo da nema statistički visoko značajne razlike između bakterijskih suspenzija R1 i R2 ( $P=0,62$ ), R2 i W1 ( $P=0,84$ ), R2 i W2 ( $P=0,75$ ) i W1 i W2 ( $P=0,9$ ), kao i da nema statistički značajne razlike između R1 i W1 ( $P=0,47$ ) i R1 i W2 ( $P=0,42$ ). U Tabeli 13 i na Grafikonu 9 su prikazani rezultati biomase prilikom primene dva različita metoda koncentrovanja i prečišćavanja.

Tabela 13. Gustina i suva masa bakterija bakterijskih suspenzija tokom koncentrovanja i prečišćavanja

Uzorak bakterijske suspenzije	<b>a</b>		<b>b</b>		<b>C</b>	
	OD570nm	g/L	OD570nm	g/L	OD570nm	g/L
<b>R1</b>	0,7375	1,59418	0,82375	1,780618	0,91	1,967056
<b>R2</b>	0,7375	1,59418	0,88	1,902208	1,00	2,1616
<b>W1</b>	0,7625	1,64822	0,89625	1,937334	1,03	2,226448
<b>W2</b>	0,7625	1,64822	0,92	1,988672	1,05	2,26968



Grafikon 11. Prikaz gustina bakterijskih suspenzija (OD570) tokom koncentrovanja i prečišćavanja. Svi uzorci su uzeti tri puta, sva merenja su dva puta ponavljana a kao rezultat je prikazana aritmetička sredina. (a -pre, b - u toku, c - posle koncentrovanja i prečišćavanja)



Grafikon 12. Prikaz suve mase bakterija tokom koncentrovanja i prečišćavanja. Svi uzorci su uzeti tri puta, sva merenja su dva puta ponavljana a kao rezultat je prikazana aritmetička sredina. (a - pre, b - u toku, c - posle koncentrovanja i prečišćavanja)

#### 4.2.2.5 Test aktivnosti (potence)

Rezultati testa aktivnosti inaktivisanih, koncentrovanih i prečišćenih bakterijskih suspenzija su pokazali da potence svih finalnih uzoraka (R1c, R2c, W1c i W2c) odgovaraju zahtevu, tj. da minimalno iznose 4IU/0,5mL (Tabela 13).

#### 4.2.2.6 Test specifične toksičnosti (MWGT)

Rezultati MWGT testa inaktivisanih, koncentrovanih i prečišćenih bakterijskih suspenzija su pokazali da specifična toksičnost svih finalnih uzoraka (R1c, R2c, W1c i W2c) odgovara zahtevu da minimalno iznosi 60% (Tabela 13). Nije utvrđena statistički značajna razlika u potenci i specifičnoj toksičnosti suspenzija dobijenih pomoću dva načina kultivisanja i koncentrovanih i prečišćenih centrifugiranjem i mikrofiltracijom (P=0,945).

Tabela 13. Potenca i specifična toksičnost inaktivisanih, prečišćenih i koncentrovanih bakterijskih suspenzija *B. pertussis* 1772/57 kultivisanih, koncentrovanih i prečišćenih na različite načine

Uzorak	Potenca (IU/0,5mL)	MWGT (%)
R1c	4,90	65,30
R2c	4,93	66,30
W1c	5,03	71,03
W2c	5,86	72,24

# **5. DISKUSIJA**

Vakcinacija celoćelijskim pertusis vakcinama je uvedena kao mera prevencije protiv velikog kašlja 40.-ih i 60.-ih godina XX veka i uspešno je redukovala morbiditet i mortalitet od ovog oboljenja u svetu (He et al., 2008). U upotrebi su bile različite vakcine raznih proizvođača sa velikim varijacijama u vakcinalnim sojevima. Najveći broj vakcinalnih sojeva u sastavu i celoćelijskih i acelularnih vakcina su izolati *B. pertussis* iz perioda pre i neposredno posle uvođenja vakcinacije. Iz tog razloga je u mnogim zemljama, tokom godina sprovođenja vakcinacije došlo do prirodne selekcije cirkulišućih, kliničkih sojeva *B. pertussis* koji su različiti od vakcinalnih sojeva koji su u upotrebi (Elomaa et al., 2005; Cassiday et al., 2000; Mooi et al., 1999, Kallonen et al., 2011). Istraživanja Elomaa i saradnika (2005) kao i Mooi i saradnika (1999) su utvrdila da je u Finskoj došlo do promene genotipova pertaktina i pertusis toksina kod cirkulišućih sojeva *B. pertussis* neposredno pre nastanka ponovnog povećanja broja obolelih. Cassiday i saradnici (2000) su pokazali da je i u SAD došlo do promene genotipova pertaktina i pertusis toksina, gde su novi tipovi zamenili stare koji su dominirali u doba pre uvođenja vakcinacije. Kallonen i saradnici (2011) su analizom izolata iz Poljske, Finske i Velike Britanije utvrdili da je u populaciji *B. pertussis* došlo do progresivnog gubitka gena kao posledica primenjene vakcinacije. U Srbiji, celoćelijska pertusis vakcina se koristi od 1957. godine i proizvodi se u Institutu za virusologiju, vakcine i serume Torlak, Beograd. Za razliku od vakcina drugih proizvođača, ova vakcina sadrži četiri različita soja, od kojih su dva soja klinički izolati iz 1957. godine, a druga dva soja su izolovana 1984. i 1985. godine. Ovakva kompozicija vakcine se koristi od 1985. godine, kada su dva novoizolovana soja dodata u sastav. Ova jedinstvena formulacija pertusis vakcine koja se koristi u Srbiji je omogućila da se ispita mogući efekat uključivanja cirkulišućih sojeva u sastav vakcine na trend *B. pertussis* populacije koja cirkuliše.

Povećan broj obolelih (eng. *resurgence*) od velikog kašlja je registrovan u mnogim zemljama sa dugom tradicijom vakcinacije (Cellentano et al., 2005; Halperin et al., 2007; McIntyre et al., 2002; Mooi et al., 2001, Kallonen et al., 2011). Analizom parametara epidemiološkog nadzora velikog kašlja u 16 evropskih zemalja, Cellentano i saradnici (2005) su utvrdili da je veliki kašalj slabo kontrolisano oboljenje u Evropi sa

porastom incidencije od 115% u grupi starijih od 14 godina starosti. Halperin i saradnici (2007) su utvrdili porast broja obolelih od pertusisa u Kanadi od 1989. godine, sa pojavom epidemija u razmacima od po četiri godine. Epidemiološki podaci u Australiji (McIntyre et al., 2002) ukazuju da je veliki kašalj značajan zdravstveni problem u ovoj zemlji, sa najvećom incidencijom u grupi nekompletno vakcinisanih odojčadi mlađih od 4 meseca i u grupi odraslih starijih od 20 godina. Takođe, zapažen je i povećan broj obolelih osoba starijih od 60 godina, koji mogu biti značajan izvor infekcije za najmlađu starosnu grupu. U Holandiji je i pored visokog obuhvata vakcinacije, registrovan povećan broj obolelih od pertusisa počev od 1996. godine (Mooi et al., 2001). U SAD, od 1990. godine incidencija obolevanja od velikog kašlja je postepeno rasla da bi 2011. godine iznosila 13,4/100 000 stanovnika. Najskorija epidemija pertusisa u SAD se dogodila u periodu od januara do juna 2012. godine u Vašingtonu sa 2 520 registrovanih slučajeva, a najveći broj obolelih je bio među odojčadima mlađim od 1 godine i među decom od 10-14 godina (Gabutti et al., 2012; CDC, 2012). U evropskim zemljama je, prema izveštajima ECDC i Mreže za nadzor vakcinama preventabilnih bolesti (eng. *Surveillance Network for vaccine preventable diseases EUVAC-NET*) prosečna incidencija obolevanja u periodu posle 2003. godine iznosi 4,1/100 000 stanovnika. Najveća stopa obolevanja je registrovana u Norveškoj, Švedskoj i Finskoj, gde je prosečna incidencija iznosila 35/100 000. Praćenjem epidemioloških parametara u zemljama Centralne i Istočne Evrope i Turske uočeno je drastično smanjenje incidencije, gde je pre uvođenja vakcinacije ona iznosila 180–651/100 000, da bi posle 1995. godine konstantno bila manja od 3/100 000. Specifično povećanje incidencije u određenim starosnim grupama je zapaženo kod uzrasta od 5 do 14 godina starosti u nekim zemljama Evrope, kao što su Poljska, Estonija i Češka, uz održavanje incidencije obolevanja odojčadi mlađih od 1 godine na niskom nivou, tj, na manje od 1/100 000 (Gabutti et al., 2012).

Podaci iz navedenih studija se razlikuju od epidemioloških podataka o velikom kašlju u Republici Srbije, gde je incidencija ovog oboljenja značajno niža. Prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović-Batut“, incidencija obolevanja od velikog kašlja u Srbiji je neposredno posle uvođenja vakcinacije, 1965. godine iznosila 51,43/100 000 stanovnika. Vremenom je, uz povećanje obuhvata vakcinacije, incidencija bila u opadanju sa povremenim pojavama većeg broja obolelih u pojedinim

godinama. Incidencija obolevanja od velikog kašlja u Srbiji je 2011. godine iznosila 0,34/100 000 stanovnika, što je izuzetno niska vrednost u poređenju sa drugim zemljama koje takođe održavaju visok obuhvat imunizacije.

Pored toga, incidencija velikog kašlja u Srbiji je u stalnom opadanju (WHO, 2012; Dakic et al., 2010). Poznato je da u vakcinisanim populacijama, simptomi velikog kašlja mogu biti blagi i u tim slučajevima pacijent najčešće ne traži medicinsku pomoć. Iz tog razloga, ne može se isključiti mogućnost da je realna incidencija velikog kašlja u Srbiji potcenjena. U Srbiji se, poslednjih 20 godina dijagnoza velikog kašlja najčešće postavlja na osnovu kliničke slike, a ređe pomoću seroloških analiza i metoda izolacije *B. pertussis*. Veliki kašalj je zarazno oboljenje koje se obavezno prijavljuje, prema Članu 2. Zakona o zdravstvenoj zaštiti stanovništva od zaraznih bolesti, a prijavljivanje prema Članu 14. vrše zdravstvene ustanove, druga pravna lica koja mogu obavljati zdravstvenu delatnost za svoje zaposlene u skladu sa zakonom, drugi oblici obavljanja zdravstvene delatnosti i zdravstveni radnici, u skladu sa ovim zakonom. Na osnovu odluke Ministra zdravlja Republike Srbije, a na osnovu člana 82. Zakona o zdravstvenoj zaštiti (Službeni glasnik RS broj 107/05) i člana 23. Zakona o državnoj upravi (Službeni glasnik RS broj 79/05 i 101/07) doneto je Rešenje o referentnim laboratorijama za kontrolu zaraznih bolesti br. 022-04-28/2008-07 od 20. 03. 2008. godine) prema kome je ustanovljena Referentna laboratorija za prikupljanje i slanje materijala sumnjivog na *B. pertussis* u Institutu za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović-Batut". Iz tog razloga, u Srbiji ne postoji Referentna laboratorija za kultivaciju i identifikaciju *B. pertussis*. Kultivaciju i identifikaciju *B. pertussis* vrši laboratorija Instituta za virusologiju, vakcine i serume – Torlak, kao i serološku analizu seruma na prisustvo antitela na antigene *B. pertussis*, metodom mikroaglutinacije. Loša obaveštenost službi za primarnu, sekundarnu i tercijarnu zdravstvenu zaštitu o mogućnostima dijagnostike velikog kašlja u Srbiji doprinosi malom broju uzoraka koji se šalju u laboratorije koje mogu da pruže ove usluge. Relativna kompleksnost uzimanja uzorka materijala za kultivaciju i nepoznavanje tehnika uzimanja nazofaringealnog brisa su još jedan od razloga za mali broj izvršenih kultivacija cirkulišućih izolata u Srbiji. S druge strane, postoji mogućnost da je niska incidencija oboljenja direktna posledica specifične kompozicije vakcine koja se koristi. King i saradnici (2001.) su prvi dokazali da varijacije pertaktina utiču na efikasnost vakcine u mišjem modelu. Takođe je dokazano

da je adekvatan stepen eliminacije bakterija utvrđen kod miševa imunizovanih a zatim inficiranih sa istim tipom vakcinalnog soja (Bottero, 2007.) i da vakcina pripremljena od aktuelnih izolata daje najveći stepen zaštite u poređenju sa vakcinama koje sadrže tzv „stare“ izolate kao što je soj Tohama I (Pereira, 2005.).

Analiza epidemioloških podataka u našoj studiji upućuje na to da se tokom vremena pojavljuje sve veći broj obolelih među vakcinisanom populacijom u Srbiji, ali da još uvek primarno obolevaju nevakcinisani. Ovi podaci nisu u saglasnosti sa podacima iz drugih zemalja sa visokim obuhvatom vakcinacije, u kojima poslednjih godina najveći broj obolelih ima uredan vakcinalni status (CDC, 2012; Moraga-Llop et al., 2013; Baxter et al., 2013). Prema izveštajima Centra za kontrolu bolesti u Atlanti, SAD (2012), Moraga-Llop i saradnika (2013) i Baxter i saradnika (2013) najveći broj obolelih u SAD i u Španiji je među adolescentnom populacijom (11-14 godina) koja je uredno vakcinisana u najranijem detinjstvu. Srednja vrednost uzrasta pacijenata od kojih su izolovani ispitivani sojevi u Srbiji se kretala od 5,1 godinu u prevakcinalnom periodu do 7,3 godina u poslednjem ispitivanom periodu, što je značajno niže u odnosu na prosek godina obolelih u drugim posmatranim zemljama koji je značajno viši i sve više pripada adolescentnom dobu (Baptista et al., 2007; Fisman et al., 2011; Vincent et al., 2011). Razlog ove razlike može biti u dužini trajanja zaštite koju pružaju različite vakcine ili nedostatak prepoznavanja i evidentiranja velikog kašlja kod adolescenata i odraslih. Takođe, podaci o distribuciji polova među pacijentima od kojih su izolovani ispitivani sojevi u Srbiji pokazuju da je u periodu pre uvođenja vakcinacije veći broj pacijenata bio ženskog pola, zatim da se distribucija polova izjednačila tokom 80.-ih godina XX veka, a da danas u značajno većem broju obolevaju osobe muškog pola. Ovakav trend distribucije polova se pokazao specifičnim jer nije zabeležen u objavljenim podacima drugih zemalja gde je uglavnom jednak odnos muškog i ženskog pola među obolelima (Choe et al., 2012; HPA, 2012; Skowronski et al., 2002). Razlog ovakve distribucije polova je nepoznat.

Prema tipu fimbrija koje *B. pertussis* sadrži, do sada su identifikovana i u literaturi opisana tri serotipa: Fim2, Fim3 i Fim2,3 (Eldering et al, 1957). Vakcinalni sojevi *B. pertussis* koji se koriste za pravljenje vakcine u našoj zemlji pripadaju serotipu Fim2,3



(1772/57 i 2047/57), zatim serotipu Fim2 (8/84) i serotipu Fim3 (23/81). U našoj studiji, u prevakcinalnom periodu predominantan serotip je bio Fim2,3. Pored njega među kliničkim izolatima iz tog perioda detektovano je i prisustvo Fim2 serotipa. Uvođenjem vakcine 1957. godine i postepenim povećanjem obuhvata vakcinacije, došlo je do visoko značajnog smanjenja učestalosti serotipa Fim2,3. Tako je učestalost serotipa Fim2,3 u trećem i četvrtom periodu bila vrlo niska u poređenju sa prvim i drugim periodom. Iako je tokom čitavog ispitivanog vremena došlo do povećanja učestalosti Fim3 serotipa, Fim2 je ostao najdominantniji serotip u našoj studiji. Nekoliko studija je pokazalo da je Fim2 serotip najzastupljeniji kod sojeva izolovanih u periodu pre uvođenja vakcinacije (Hallander et al., 2005; Preston et al., 1992). Posle uvođenja vakcinacije celocelijskom vakcinom koja je sadržavala i serotip Fim2 i serotip Fim3, došlo je do izmene predominantnog serotipa, pa je najzasupljeniji postao serotip Fim3 (Hallander et al., 2007; Preston et al., 1992). Hallander i saradnici (2007) su utvrdili da je u Švedskoj, u periodu uvođenja acelularne pertusis vakcine (1997.-2004.) došlo do promene serotipa cirkulišućih sojeva i da je serotip Fim3 postao dominantan. Preston i saradnici su analizirali dve velike epidemije pertusisa u Velikoj Britaniji tokom 1977.-1979. i 1981.-1983. koje su nastale kao posledica smanjenog obuhvata vakcinacijom sredinom 70-ih godina XX veka. Tokom obe epidemije dominantni serotip je bio Fim3, dok su sojevi sa serotipovima Fim2 i Fim2,3 u značajno većem broju izolovani kod nevakcinisane dece. Ovi rezultati su ukazivali da su celocelijske pertusis vakcine koje su se tada primenjivale u Velikoj Britaniji, iako efikasne protiv svih serotipova *B. pertussis*, ipak bile značajno efikasnije protiv serotipova Fim2 i Fim2,3 nego protiv serotipa Fim3 (Preston et al., 1992). Pored toga, iako se vakcinacija celocelijskom vakcinom koja sadrži sva tri serotipa (Fim2, Fim3 i Fim2,3) u Srbiji sprovodi od 1957. godine, skoro polovina izolovanih kliničkih sojeva u celokupnom posmatranom periodu (1957.-2011.) je imala serotip Fim2, što se razlikuje od navedenih rezultata drugih autora. Uzrok ovakve distribucije serotipova nije poznat.

Do sada je u svetu identifikovano 13 genotipova *prn* alela (Mooi, 2010). Polimorfizam pertaktina je vezan za region 1 koji se nalazi neposredno uz RDG segment koji učestvuje u adheziji (Leininger et al., 1991). U mnogim zemljama, najčešći genotipovi vakcinalnih sojeva su *prn1* ili *prn7*, koji predstavljaju genotipove sojeva prevakcinalne ere (He et al., 2008). Međutim, posle uvođenja masovne vakcinacije, došlo je izmene trenda sojeva u populaciji, tako da su "nevakcinalni tipovi" sojeva sa dominantnim

*prn2* genotipom najzastupljeniji među modernim izolatima (Advani et al., 2004; Elomaa et al., 2005; Cassidy et al., 2000; Mooi et al., 1998; Weber et al., 2001; Njamkepo et al., 2008; Kallonen et al., 2011 ). U nekoliko studija je utvrđeno da sojevi sa *prn2* genotipom najčešće izazivaju povećan broj obolevanja i epidemije velikog kašlja u zemljama sa visokim obuhvatom imunizacije (He et al., 2003; Hallander et al., 2007, Njamkepo et al., 2008; Kallonen et al., 2011). Rezultati Elomaa i saradnika (2005.) ukazuju da je pre uvođenja vakcinacije najučestaliji genotip pertaktina u Finskoj bio *prn1* koji se takođe nalazio u sastavu Finske celocelijske vakcine. Posle višegodišnjeg sprovođenja vakcinacije, došlo je do promene genotipa pertaktina cirkulišućih sojeva, pa od 1982. godine predominantni postaju sojevi sa genotipom *prn2*. Svi sojevi izolovani u Finskoj posle 1999. godine imaju *prn2* genotip (Elomaa et al., 2005). Slične rezultate su objavili i Cassidy i saradnici (2000), koji su utvrdili da su se u SAD sojevi sa genotipom *prn2* pojavili 70.-ih godina XX veka, a da su postali predominantni 80.-ih godina, kada su činili 70% svih izolata *B. pertussis* u SAD (2000). U Holandiji je u studiji Mooi i saradnika (1998) potvrđeno prisustvo cirkulišućih sojeva *B. pertussis* sa *prn2* genotipom od 1981. godine, sa predominacijom posle 1990. godine, kada je 90% izolata imalo *prn2* genotip. Analizom polimorfizma cirkulišućih izolata *B. pertussis* u Francuskoj, Weber i saradnici (2001) su takođe utvrdili predominaciju sojeva sa *prn2* genotipom posle 1990. godine. Njamkepo i saradnici (2008) su izvršili uporednu analizu cirkulišućih izolata *B. pertussis* u periodu 1991.-1995. u Francuskoj, zemlji sa visokim obuhvatom vakcinacije i Senegal, zemlji gde je obuhvat vakcinacije izrazito nizak. Utvrdili su da postoji značajna razlika u genotipovima pertaktina sojeva *B. pertussis*, pa je dominantni genotip sojeva izolovanih u Francuskoj bio genotip *prn2*, a u Senegal genotip *prn1* koji odgovara genotipu sojeva iz prevakcinalne ere u Francuskoj. Slične rezultate su objavili Kallonen i saradnici (2011), koji su pokazali da vrsta i sastav vakcine utiču na pojavu i vreme pojavljivanja novih genotipova pertaktina u populaciji sojeva *B. pertussis*. Rezultati He i saradnika (2003) ukazuju da specifičan imunski odgovor koji indukuju sojevi sa *prn2* genotipom ne stimuliše stvaranje antitela na konformacione epitope kao vakcinalni sojevi sa genotipovima *prn1* i *prn3*. Ova pojava može da objasni karakteristike *B. pertussis* sojeva koji imaju *prn2* genotip da imaju veliku učestalost pojavljivanja i veću sposobnost da izazovu povećan broj obolevanja i njihov epidemijski karakter. (He et al., 2003).

U našem ispitivanju je utvrđeno da jedan od sojeva *B. pertussis* dodatih 1985. godine u sastav vakcine, soj 8/84, sadrži *prn2* alel. S druge strane, u Srbiji je, među cirkulišućim sojevima, učestalost *prn2* genotipa vrlo niska i pojavljivanje u populaciji je kasnije nego u drugim zemljama (Advani et al., 2004; Elomaa et al., 2005; Cassiday et al., 2000; Mooi et al., 1998; Weber et al., 2001; Kallonen et al., 2011 ). U zavisnosti od perioda kada je uvedena vakcinacija i od aktivnosti korišćene vakcine, u najvećem broju zemalja, izolati sa *prn2* genotipom su prvi put registrovani 70.-ih i 80.-ih godina XX veka (Advani et al., 2004; Elomaa et al., 2005; Cassiday et al., 2000; Mooi et al., 1998; Weber et al., 2001; Hallander et al., 2005 ). U Srbiji, prvi soj sa *prn2* genotipom (soj 8/84) je izolovan 1984, i od 1985. godine se nalazi u sastavu vakcine. Posle toga, svi izolovani sojevi su imali *prn1* ili *prn11* genotip sve do 2000. godine kada su dva od četiri izolata sadržavala *prn2* alel. Niska učestalost sojeva sa *prn2* genotipom i njihovo relativno kasno pojavljivanje u Srbiji mogu biti posledica uvođenja soja 8/84 sa *prn2* genotipom u sastav vakcine 1985. godine. Takođe, ispitivanjem je utvrđeno postojanje četiri različita genotipa (*prn1*, *prn2*, *prn3* i *prn11*) među izolatima u Srbiji. Aleli *prn1*, *prn2* i *prn3* su veoma česti kod izolata u mnogim drugim zemljama (Elomaa et al., 2005; Cassiday et al., 2000; Mooi et al., 1998; Weber et al., 2001; Poynten et al., 2004; Njamkepo et al., 2008). Međutim, alel *prn11* je izuzetno redak i do sada je detektovan samo u ispitivanju sprovedenom u Australiji, gde je 1982. godine izolovano 5 sojeva sa *prn11* genotipom, u istoj regiji (Poynten et al., 2004). U našem ispitivanju, utvrđeno je da čak 6 sojeva izolovanih u periodu od 1984. do 2000. ima *prn11* genotip. Od tih 6 sojeva, 4 soja imaju isti serotip i *ptxA* genotip. Razlika između *prn1* i *prn11* alela se ogleda u samo jednoj ponavljajućoj sekvenci u regionu 1: *prn1* ima pet, a *prn11* ima šest ponavljajućih sekvenci. Rezultati koji govore da najveći broj izolata iz perioda od 1984. do 2000. ima *prn1* ili *prn11* alel upućuju na to da sojevi prevalentni u prevakcinalnoj eri i dalje cirkulišu u Srbiji. Iako vakcina koja se koristi u Srbiji ne sadrži vakcinalni soj sa *prn3* genotipom, učestalost *prn3* alela među cirkulišućim sojevima u Srbiji je niža nego u drugim zemljama (Elomaa et al., 2005; Mooi et al., 1998; Poynten et al., 2004; Njamkepo et al., 2008 ). Tačan razlog ove pojave nije do sada utvrđen. Poznato je da pored sastava vakcine i drugi faktori, kao što su imunitet, gustina i dinamika kretanja stanovništva mogu doprineti prirodnoj selekciji cirkulišućih sojeva.

Do sada je u svetu registrovano 8 tipova *ptxA* alela (Mooi, 2010). U većini zemalja, aleli *ptxA2* i/ili *ptxA3* su prisutni kod većine vakcinalnih sojeva i predominantni su kod izolata iz prevakcinalne ere (Elomaa et al., 2005; Cassiday et al., 2000; Weber et al., 2001; Kallonen et al., 2011). Međutim, vremenom, posle uvođenja vakcinacije, došlo je do izmene predominantnog genotipa među cirkulišućim sojevima, pa je „nevakcinalni“ genotip *ptxA1* zamenio „vakcinalne“ genotipove sojeva u populaciji. Elomaa i saradnici (2005) su utvrdili da je Finska celocelijska vakcina sadržavala soj *B. pertussis* 18530 koji je imao *ptxA3* genotip, a da su izolati iz perioda 1953.-1965. kao i soj *B. pertussis* 1772, koji je dodat u sastav vakcine 1976. godine, predstavljali *ptxA2* genotip. Svi ostali sojevi izolovani u Finskoj su imali *ptxA1* genotip. U SAD, takođe je došlo do sličnih promena u *ptxA* genotipu cirkulišućih sojeva *B. pertussis*, pa je genotip *ptxA2* bio dominantan do 1970. godine, kada ga je zamenio genotip *ptxA1* koji je dominantan u savremenim izolatima (Cassiday et al., 2000). Proporcija učestalosti *ptxA2* genotipa se po sličnom principu menjala i u Velikoj Britaniji, gde je zabeleženo da je oko 50% izolata iz 40.-ih godina XX veka imalo *ptxA2* genotip a da je 90.-ih godina XX veka procenat učestalosti *ptxA2* genotipa pao na 0%. Pošto sojevi sa ostalim genotipovima (*ptxA3*-*ptxA8*) nisu izolovani u Velikoj Britaniji, posle 90.-ih godina XX veka, svi izolati su imali *ptxA1* genotip (Fry et al., 2002). U našem ispitivanju, rezultati genotipizacije *ptxA* alela vakcinalnih sojeva i cirkulišućih rezultata u Srbiji su delimično u saglasnosti sa rezultatima drugih autora. Uočena je promena (eng. *shift*) iz *ptxA2* u *ptxA1* genotip kod izolata sa kraja 60.-ih godina XX veka i predominacija *ptxA1* genotipa u periodu od 1980. do 1989. godine, kao i u drugim zemljama. Međutim, interesantno je da je došlo do ponovnog pojavljivanja cirkulišućih sojeva sa *ptxA2* alelom posle dodavanja dva nova soja sa *ptxA1* genotipom u sastav vakcine, 1985. godine. Utvrđena visoka učestalost sojeva sa *ptxA2* genotipom u periodu od 1990. do 2011. godine nije u saglasnosti sa učestalosti ovog genotipa u drugim zemljama (Elomaa et al., 2005; Cassiday et al., 2000; Weber et al., 2001). Učestalost *ptxA2* genotipa je izuzetno niska u savremenim izolatima *B. pertussis* u drugim zemljama i u najvećem broju ispitivanih populacija sa visokim obuhvatom vakcinacije iznosi 0% (Elomaa et al., 2005; Cassiday et al., 2000; Weber et al., 2001). Razlog ove pojave nije u potpunosti razjašnjen, ali jedna od pretpostavki je da je to posledica primene vakcine koja u svom sastavu sadrži dva vakcinalna soja (2047/57 i 1772/57) koja imaju *ptxA2* genotip i dva vakcinalna soja (23/81 i 8/8) koja imaju *ptxA1* genotip.

Analiza PFGE profila je metod koji omogućava identifikaciju i praćenje sojeva *B. pertussis* u različitim vremenskim periodima i u različitim zemljama. U našoj studiji, PFGE analizom sojeva *B. pertussis* u Srbiji je utvrđeno da se učestalost PFGE profila menjala tokom vremena. Među ispitivanim sojevima, 30% izolata je imalo profil BpSR23 i on je perzistirao tokom celokupnog perioda posmatranja. Ovaj PFGE profil je takođe bio prisutan u Finskoj i Švedskoj tokom 70.-ih godina XX veka, ali se u tim zemljama kasnije izgubio iz populacije (Elomaa et al., 2005; Hallander et al., 2005). U Finskoj, najučestaliji PFGE profil je BpSR147 (Elomaa et al., 2005). Hallander i saradnici (2007) su analizirali PFGE profile izolata *B. pertussis* iz 8 zemalja Evropske Unije i utvrdili da je PFGE profil BpSR11 (sa serotipom Fim3 i genotipom *prn2*) najučestaliji u Francuskoj, Nemačkoj, Holandiji, Švedskoj i Velikoj Britaniji. Sojevi sa profilom BpSR11 su prvi put izolovani 1997. godine u Udevali, u Švedskoj i tokom nekoliko narednih godina su se proširili po Švedskoj i postali predominantni u populaciji većeg dela Evrope. U studiji sprovedenoj u Švedskoj je utvrđeno da su sojevi sa profilom BpSR11 učestaliji kod pacijenata kojima je bila potrebna produžena hospitalizacija (Advani et al., 2007). U Danskoj, najučestaliji profil je bio BpSR12, dok su se PFGE profili u Poljskoj razlikovali od drugih, pa su najučestaliji bili jedinstveni profili BpPLR1 i BpPLR2, koji su do tada izolovani samo u toj zemlji. Među četiri soja izolovana u Srbiji tokom 2000. godine, samo jedan soj je imao profil BpSR11, koji je najzastupljeniji među sojevima u evropskim zemljama (Hallander et al., 2007). U našem ispitivanju, 43% ispitivanih sojeva u Srbiji je pokazalo jedinstvene profile koji do sada nisu pronađeni kod sojeva u drugim zemljama (BpSBR 1-16). To ukazuje na specifičnost populacije cirkulišućih sojeva *B. pertussis* u Srbiji, što je u saglasnosti sa rezultatima Mosiej i saradnika (2004) koji su pokazali da su i u Poljskoj, zemlji sa takođe specifičnom formulacijom vakcine protiv velikog kašlja, jedinstveni PFGE profili najučestaliji.

„WAVE“ bioreaktori se već nekoliko godina koriste za kultivaciju ćelijskih kultura sisara, insekata i biljaka (Weber et al. 2002, Chen et al. 2004, Genzel et al. 2006). Weber i saradnici (2002) su uspostavili sistem za proizvodnju rekombinantnih proteina Baculovirusa u kulturi Sf-9 ćelija insekata, a Chen (2004) i saradnici korišćenjem AAV

vektora u „WAVE“ bioreaktoru. Takođe, objavljena je i uspešna kultivacija influenza virusa na MDCK ćelijama u „WAVE“ bioreaktoru, sa zadovoljavajućim prinosima infektivnog titra (Genzel et al., 2006).

Do sada je u literaturi objavljeno samo nekoliko pokušaja kultivacije aerobnih mikroorganizama u pokretnim bioreaktorima. Opisana je kultivacija *Saccharomyces cerevisiae* u modifikovanom „WAVE“ bioreaktoru, gde je prinos biomase bio dva puta veći od prinosa u konvencionalnim bocama (Lohr et al. 2010). Drugi izveštaj je prikazao kultivaciju *Corynebacterium diphtheriae* u pripremi inokuluma za proizvodnju toksoida difterije primenom bioreaktora za jednokratnu upotrebu tipa *CultiBag RM system*. Pokazano je da bioreaktor za jednokratnu upotrebu može efikasno zameniti čelični fermentor za kultivaciju *C. diphtheriae*, uz zadovoljavajući prinos suve mase bakterija i da se na ovaj način mogu smanjiti troškovi čišćenja i sterilizacije uz bolju kontrolu kontaminacije proizvoda (Ullah et al. 2008). Takođe su objavljeni i rezultati primene „WAVE“ bioreaktora za kultivaciju *Escherichia coli* (Glazyrina et al. 2010, Mahajan et al. 2010). Glazyrina i saradnici (2010) su utvrdili da su bioreaktori sa kontrolisanim mešanjem kulture dobra alternativa standardnim metodama kultivacije bakterija u cilju proizvodnje rekombinantnih proteina. Kultivacijom *E. coli* u *BIOSTAT® Cultibag RM* sistemu sa sensorima za jednokratnu upotrebu i unapređenim sistemom kontrole parametara dostignuta je bolja gustina bakterijske kulture nego u standardnim bocama za kultivaciju i u standardnom čeličnom fermentoru (Glazyrina et al. 2010). Mahajan i saradnici (2010) su pokazali da je pripremu inokuluma *E. coli* za proizvodnju rekombinantnih proteina moguće izvršiti kultivacijom u „WAVE“ bioreaktoru uz adekvatnu kontrolu oksigenacije. Takođe, utvrdili su da kultivacija u „WAVE“ bioreaktoru iziskuje manje kapitalne investicije i operacione troškove nego kultivacija u standardnom čeličnom fermentoru.

Proizvodnja vakcine protiv velikog kašlja u *Roux* bocama zahteva intenzivan manuelni rad i veliki broj obučenog osoblja. Takođe, veliki broj manipulacija sa otvaranjem *Roux* boca povećava mogućnost nastanka kontaminacije u odnosu na zatvorene bioreaktore. To povećava broj kontrolnih testova koji se moraju vršiti za svaku pojedinačnu *Roux* bocu i time uvećavaju troškove proizvodnje. Kultivacija *B. pertussis* u zatvorenom

bioreaktoru za jednokratnu upotrebu redukuje broj manipulacija i kontrolnih testova, a poboljšava sigurnost proizvoda u odnosu na kultivaciju u *Roux* bocama, a s druge strane umanjuje troškove proizvodnje u odnosu na čelične bioreaktore jer ne zahteva čišćenje i sterilizaciju suda, kao ni validaciju ovih metoda (Mahajan et al., 2010).

U našoj studiji, prema dobijenim rezultatima, upotreba „*WAVE*“ bioreaktora se pokazala svrsishodnom za kultivaciju *B. pertussis* tokom proizvodnje vakcine protiv velikog kašlja. Praćenjem pH vrednosti tokom kultivacije je utvrđeno da se u „*WAVE*“ bioreaktoru može bolje kontrolisati porast pH vrednosti nego u *Roux* bocama, mogućnostima kontrolisane oksigenacije kulture i eventualnim dodavanjem kiselih dodataka. U toku kultivacije u „*WAVE*“ bioreaktoru je postignut rast *B. pertussis* sa prinosom biomase sličnim prinosu pri kultivaciji u *Roux* bocama. Kao što se i očekivalo, postignuta je ciljana gustina kulture uz kontrolisano dodavanje kiseonika. Međutim, ostvareni prinos biomase u „*WAVE*“ bioreaktoru nije bio značajno veći od prinosa biomase u *Roux* bocama, jer nije vršena optimizacija procesa već su uslovi kultivacije u bioreaktoru bili podešeni da samo imitiraju uslove kultivacije u *Roux* bocama. Daljim istraživanjem je potrebno izvršiti optimizaciju procesa kultivacije u „*WAVE*“ bioreaktoru sa podešavanjem svih parametara (pH vrednosti, zasićenosti kiseonikom i brzine i ugla kretanja) u cilju postizanja još većeg prinosa biomase uz očuvanje drugih karakteristika bakterije.

U našem ispitivanju, poređenjem rezultata kontrolnih testova prilikom primene dva različita metoda koncentrovanja i prečišćavanja utvrđeno je da nema značajne razlike u kvalitetu dobijenih inaktivisanih bakterijskih suspenzija *B. pertussis*. Rezultati svih testova kvaliteta su pokazali da sve dobijene inaktivisane, koncentrovane i prečišćene bakterijske suspenzije *B. pertussis* ispunjavaju sve zadate zahteve u pogledu sterilnosti, potence i specifične toksičnosti, tj. da bi sve mogle biti upotrebljene za izradu vakcine protiv velikog kašlja.

S druge strane, fleksibilnost rada primenom metode mikrofiltracije, mogućnost da se kultura višestruko koncentruje i prečisti do željene gustine, kao i uniformnost i konzistentnost suspenzije, koja se nalazi u jednom sudu umesto u više boca za centrifugiranje, daje prednost metodu mikrofiltracije u odnosu na centrifugiranje, što je

u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Kumar et al., 2009; Roush et al., 2008; Aunins et al., 2000). Kumar i saradnici (2009.) su utvrdili da centrifugiranje kulture *B. pertussis* može uzrokovati disrupciju ćelija zbog povećane stope smicanja ćelija (eng. *shear-rate* ) kao i do slepljivanja bakterijskih ćelija. S druge strane, prilikom mikrofiltracije, stalna recirkulacija i mogućnost kontrole pritiska i stope smicanja tokom celog procesa, omogućava da proizvod bude manje izložen negativnim uticajima. Pored toga, prednosti metoda mikrofiltracije u odnosu na centrifugiranje doprinosi i postojanje aseptičnih konekcija i zatvorenog sistema kojim se kreće retentat, što onemogućava nastanak kontaminacije proizvoda i u skladu je sa smernicama DPP.



# **6. ZAKLJUČCI**

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj studiji, izvedeni su sledeći zaključci:

- Za razliku od drugih zemalja sa visokim obuhvatom vakcinacije, u Srbiji još uvek najveći broj obolelih od velikog kašlja pripada nevakcinisanoj populaciji stanovništva, prosečne starosti od 6,1 godine sa tendencijom povećanja distribucije muškog pola u odnosu na ženski.
- Serotipizacijom vakcinalnih sojeva je potvrđeno da oni reprezentuju sva tri serotipa (Fim2, Fim3 i Fim2,3). Posle uvođenja vakcinacije u Srbiji, došlo je do visoko značajnog smanjenja učestalosti serotipa Fim2,3 među kliničkim izolatima, koji je prethodno bio najdominantniji serotip. Analiziranjem celog perioda ispitivanja, utvrđeno je da je Fim2 serotip najučestaliji kod izolovanih kliničkih sojeva *B. pertussis* u Srbiji.
- Genotipizacijom pertaktina je utvrđeno da tri vakcinalna soja (2047/57, 1772/57 i 23/81) imaju *prn1* genotip, a da soj 8/84 poseduje *prn2* genotip. Pokazano je da su kod kliničkih izolata *B. pertussis* u Srbiji prisutna četiri tipa *prn* alela (*prn1*, *prn2*, *prn3* i *prn11*). Međutim, u Srbiji je, među cirkulišućim sojevima, učestalost *prn2* genotipa vrlo niska i pojavljivanje u populaciji je kasnije u poređenju sa drugim zemljama. Dominantni *prn* genotipovi u Srbiji su *prn1*, podjednako učestali genotip i u drugim zemljama, i *prn11*, koji je izuzetno redak genotip.
- Genotipizacijom *ptxA* subjediničice pertusis toksina je utvrđeno da vakcinalni sojevi 2047/57 i 1772/57 imaju *ptxA2* genotip, dok sojevi 23/81 i 8/84 pokazuju *ptxA1* genotip. Uočena je promena iz *ptxA2* u *ptxA1* genotip kod kliničkih izolata sa kraja 60.-ih godina XX veka i predominacija *ptxA1* genotipa u periodu od 1980. do 1989. godine. Posle dodavanja dva nova soja sa *ptxA1* genotipom u sastav vakcine 1985. godine, došlo je do ponovnog pojavljivanja cirkulišućih sojeva sa *ptxA2* alelom. Utvrđena visoka učestalost cirkulišućih sojeva sa *ptxA2* genotipom u periodu od 1990. do 2011. godine nije u saglasnosti sa učestalosti ovog genotipa u drugim zemljama
- Analiza PFGE profila izolovanih sojeva ukazuje na specifičnost populacije cirkulišućih sojeva *B. pertussis* u Srbiji. Tokom celokupnog perioda posmatranja prisutan je profil BpSR23 sa učestalošću od 30% koji je bio prisutan u Finskoj i

Švedskoj tokom 70.-ih godina XX veka, ali se u tim zemljama kasnije izgubio iz populacije. Najzastupljeniji profil među sojevima u evropskim zemljama, BpSR11, izolovan je u Srbiji tokom 2000. godine kod samo jednog soja. S druge strane, 43% ispitivanih sojeva u Srbiji je pokazalo jedinstvene BpSBR profile koji do sada nisu pronađeni kod sojeva u drugim zemljama.

- Populacija cirkulišućih izolata *B. pertussis* u Srbiji se fenotipski i genotipski razlikuje u odnosu na populacije ove bakterije u drugim zemljama sa visokim obuhvatom vakcinacije, a razlog tome može biti specifična kompozicija vakcine protiv velikog kašlja koja se koristi u Srbiji, prema kojoj su povremeno u sastav vakcine uključivani sojevi koji cirkulišu u populaciji.
- Upotreba „WAVE<sup>sc</sup>“ bioreaktora se pokazala svrsishodnom za kultivaciju *B. pertussis* tokom proizvodnje vakcine protiv velikog kašlja. Kulture dobijene ovim metodom kultivacije su ispunjavale sve kriterijume kontrolnih testova uz tendenciju porasta dobijene biomase u slučaju dalje optimizacije uslova kultivacije.
- Prednosti kultivacije *B. pertussis* u „WAVE<sup>sc</sup>“ bioreaktoru su mogućnost kontrole i prilagođavanja uslova kultivacije, redukcija broja manipulacija i kontrolnih testova, poboljšanje sigurnosti proizvoda, a sa druge strane smanjenje troškove proizvodnje u odnosu na čelične bioreaktore jer ne zahteva čišćenje i sterilizaciju suda, kao ni validaciju ovih metoda.
- Sve dobijene inaktivisane, koncentrovane i prečišćene bakterijske suspenzije *B. pertussis*, dobijene koncentrovanjem i prečišćavanjem kultura metodama mikrofiltracije i centrifugiranja, ispunjavaju sve zadate zahteve u pogledu sterilnosti, potence i specifične toksičnosti, pa bi mogle biti upotrebljene za izradu vakcine protiv velikog kašlja.
- Prednost metoda mikrofiltracije u odnosu na centrifugiranje se ogleda u fleksibilnosti rada sa metodom mikrofiltracije, mogućnosti da se kultura višestruko koncentruje i prečisti do željene gustine, uniformnosti i konzistentnosti suspenzije koja se nalazi u jednom sudu, postojanju aseptičnih

konekcija i zatvorenog sistema prilikom mikrofiltracije, koji onemogućava nastanak kontaminacije proizvoda i u skladu je sa smernicama DPP.

## **7. SKRAĆENICE**

**Spisak skraćenica korišćenih u tekstu:**

ACT - adenilat ciklaza toksin

ADP - adenozin difosfat

aP - acelularna pertusis vakcina

BG- Bordet-Gengou podloga

bp – parovi baza

Bp/BP - *Bordetella pertussis*

BrkA - Bordetella otpornost na ubijanje

BvgAS - Bordetella aktivator gena virulencije

CD – klaster diferencijacije

CDC – Centar za kontrolu i prevenciju bolesti

cfu – jedinica formiranja kolonija

CHO – ćelije jajnika kineskog hrčka

CRD – domen za prepoznavanje ugljenih hidrata

CW – Cohen-Wheeler podloga

DI – indeks različitosti

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DNT - dermonekrotišući toksin

DPP- dobra proizvođačka praksa

DTP - difterija, tetanus, pertusis

ECDC – Evropski centar za kontrolu i prevenciju bolesti

ELISA – imunoadsorpcioni enzimski test

FHA - filamentozni hemaglutinin

FIM - fimbrije

Hib - *Haemophilus influenzae* tip b

HPD - histidin fosfotransferski domen

IFN - interferon

Ig - imunoglobulin

IL - interleukin

IPV - inaktivisani virus poliomijelitisa

IS - inserciona sekvenca

IU - internacionalna jedinica

kDa - kilodalton

LPS - lipopolisaharid  
MAP - mitogen-aktivirani protein  
MLST – tipizacija multilokus sekvenci  
MLVA – broj varijabilnih ponavljajućih parova  
MWGT – mišji test dobijanja na težini  
NAD - nikotinamid adenin dinukleotid  
PBS – fosfatni puferisani fiziološki rastvor  
PCR – reakcija lančanog umnožavanja  
PFGE – elektroforeza u pulsirajućem polju  
PRN - pertaktin  
PT - pertusis toksin  
RFLP – polimorfizam restrikcionih fragmenata  
RisAS – aktivator redukcije intracelularnog preživljavanja  
RNK – ribonukleinska kiselina  
RTX – ponavljanja u toksinu  
SNP - analiza polimorfizma pojedinačnih polinukleotida  
TCF - trahealni faktor kolonizacije  
TCT - trahealni citotoksin  
TNF - tumor faktor nekroze  
TPS – dvopartnerska sekrecija  
WHO – Svetska zdravstvena organizacija  
wP – celočelijska pertusis vakcina

# **8. LITERATURA**



- Abramson T, Kedem H and Relman D A. Proinflammatory and proapoptotic activities associated with *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *Infect Immun* 2001;69:4:2650-2658.
- Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines. Placebo-controlled trial of two acellular pertussis vaccines in Sweden--protective efficacy and adverse events. *Lancet* 1988;1:8592:955-960.
- Advani A, Donnelly D, Hallander H. Reference system for characterization of *Bordetella pertussis* pulsed-field gel electrophoresis profiles. *J Clin Microbiol* 2004;42: 2890-2897.
- Advani A, Gustafsson L, Ahren C, et al. Appearance of Fim3 and ptxP3-*Bordetella pertussis* strains, in two regions of Sweden with different vaccination programs. *Vaccine* 2011;29:18:3438-3442.
- Advani A, Gustafsson L, Carlsson rm, et al. Clinical outcome of pertussis in Sweden: association with pulsed-field gel electrophoresis profiles and serotype. *APMIS* 2007;115:736-742.
- Advani A, Van der Heide HG, Hallander HO, et al. Analysis of Swedish *Bordetella pertussis* isolates with three typing methods: characterization of an epidemic lineage. *J Microbiol Methods* 2009;78:3:297-301.
- Altunaiji S, Kukuruzovic R, Curtis N, et al. Antibiotics for whooping cough (pertussis). *Cochrane Database Syst Rev* 2007;3: CD004404.
- Anderson R, and May RM. Directly transmitted infections diseases: control by vaccination. *Science* 1982;215:4536:1053-1060.
- Antila M, He Q, de Jong C, et al. *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis. *J Med Microbiol* 2006;55:8:1043-1051.
- Arico B and Rappuoli R. *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. *J Bacteriol* 1987;169:6:2847-2853.

Aunins JG, Lee AL, Volkin DB. Vaccine Production. The Biomedical Engineering Handbook: Second Edition. Ed. Joseph D. Bronzino Boca Raton: CRC Press LLC, 2000.

Ayme G, Caroff M, Chaby R, et al. Biological activities of fragments derived from *Bordetella pertussis* endotoxin: isolation of a nontoxic, Shwartzman-negative lipid A possessing high adjuvant properties. *Infect Immun* 1980;27:3: 739-745.

Baker JP, Katz. Childhood vaccine development: an overview. *SL Pediatr Res*. 2004 Feb;55:2:347-356.

Baptista PN, Magalhaes VS, Rodrigues, LC. Children with pertussis inform the investigation of other pertussis cases among contacts. *BMC paediatrics* 2007;7:21-24.

Barnard A, Mahon BP, Watkins J, Redhead K and Mills KH. Th1/Th2 cell dichotomy in acquired immunity to *Bordetella pertussis*: variables in the in vivo priming and in vitro cytokine detection techniques affect the classification of T-cell subsets as Th1, Th2 or Th0. *Immunology* 1996;87:372–380.

Barnes M G and Weiss AA. BrkA protein of *Bordetella pertussis* inhibits the classical pathway of complement after C1 deposition. *Infect Immun* 2001;69:5: 3067-3072.

Bass J W, Klenk E L, Kotheimer JB, et al. Antimicrobial treatment of pertussis. *J Pediatr* 1969;75:5: 768-781.

Baxter R, Bartlett J, Rowhani-Rahbar A, Fireman B, Klein NP. Effectiveness of pertussis vaccines for adolescents and adults: case-control study. *BMJ* 2013;347:f4249.

Bellalou J, Sakamoto H, Ladant D, et al. Deletions affecting hemolytic and toxin activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Infect Immun* 1990;58:10: 3242-3247.

Bernsen RMD, de Jongste JC, van der Wouden JC. Lower risk of atopic disorders in whole cell pertussis-vaccinated children. *Eur Respir J* 2003;22:962–964.

Bisgard K M, Pascual FB, Ehresmann KR, et al. Infant pertussis: who was the source? *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:11: 985-9.

Black R E, Cousens S, Johnson HL, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet* 2010;375:9730:1969-87

Bloemen PG, Van den Tweel MC, Henricks PA, et al. Stimulation of both human bronchial epithelium and neutrophils is needed for maximal interactive adhesion. *Am J Physiol* 1996;270:1Pt1:80-87.

Bokhari H, Said F, Syed MA, et al. Molecular typing of *Bordetella parapertussis* isolates circulating in Pakistan." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2011: n/a-n/a.

Bokoch GM and Gilman AG. Inhibition of receptor-mediated release of arachidonic acid by pertussis toxin." *Cell* 1984;39;2 Pt1:301-308.

Borisova, O, Kombarova SY, Zakharova NS, et al. Antigenic divergence between *Bordetella pertussis* clinical isolates from Moscow, Russia, and vaccine strains. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:3: 234-238.

Bottero D, Gaillard ME, Fingermann M, Weltman G, Fernandez J, Sisti F, et al. Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms, and surfaceome analysis of vaccine and clinical *Bordetella pertussis* strains. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14: 1490–1498.

Boucher P E, Murakami K, Ishihama A, et al. Nature of DNA binding and RNA polymerase interaction of the *Bordetella pertussis* BvgA transcriptional activator at the *fha* promoter. *J Bacteriol* 1997;179:5: 1755-1763.

Bouchez V, Caro V, Levillain E, et al. Genomic content of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in areas of intensive children vaccination. *PLoS ONE* 2008;3:2437.

Brito G A, Souza MH, Melo-Filho AA, et al. Role of pertussis toxin A subunit in neutrophil migration and vascular permeability. *Infect Immun* 1997;65:3:1114-1118.

Byrne S and Slack AT. Analysis of *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin types from Queensland, Australia, 1999-2003. *BMC Infect Dis* 2006;6:53.

Carbonetti NH, Artamonova GV, Andreasen C, et al. Suppression of serum antibody responses by pertussis toxin after respiratory tract colonization by *Bordetella pertussis*

and identification of an immunodominant lipoprotein. *Infect Immun* 2004;72:6:3350-3358.

Carbonetti NH, Artamonova GV, Mays RM, et al. Pertussis toxin plays an early role in respiratory tract colonization by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 2003;71:11:6358-6366

Caro V, Bouchez V and Guiso N. Is the Sequenced *Bordetella pertussis* strain Tohama I representative of the species? *J Clin Microbiol* 2008;46:6: 2125-2128.

Caro V, Hot D, Guigon G, et al. Temporal analysis of French *Bordetella pertussis* isolates by comparative whole-genome hybridization. *Microbes Infect* 2006;8:8:2228-2235.

Caro V, Njamkepo E, Van Amersfoorth SC, et al. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Bordetella pertussis* populations in various European countries with different vaccine policies. *Microbes Infect* 2005;7:7-8: 976-982.

Caroff M, Chaby R, Karibian D, et al. Variations in the carbohydrate regions of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides: electrophoretic, serological, and structural features. *J Bacteriol* 1990;172:2: 1121-1128

Carter CRD, Dagg BM, Whitmore KM, Keeble JR, Asokanathan C, Xing D and Walkera B. The effect of pertussis whole cell and acellular vaccines on pulmonary immunology in an aerosol challenge model. *Cellular Immunology* 2004;227:51–58

Cassiday P, Sanden G, Heuvelman K, Mooi F, Bisgard KM, Popovic T. Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935–1999. *J Infect Dis* 2000;182:1402–1408.

CDC. CDC - Pertussis: Surveillance and Reporting. 2010a. Retrieved 17th June, 2011, from <http://www.cdc.gov/pertussis/survreporting>.

CDC. Pertussis epidemic-Washington. *MMWR*;2012;61:28:517-522.

CDC. Pertussis outbreak among adults at an oil refinery--Illinois, August-October 2002. *MMWR* 2003a;52:1:1-4.

CDC. Pertussis--United States, 1997-2000. *MMWR* 2002a;51:4:73-76.

Celentano LP, Massari M, Paramatti D, Salmaso S, Tozzi AE. Resurgence of pertussis in Europe. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:761–765.

Charles IG, Li JL, Roberts M, et al. Identification and characterization of a protective immunodominant B cell epitope of pertactin (P.69) from *Bordetella pertussis*. *Eur J Immunol* 1991;21:5:1147-1153.

Chen HF, Zhou SZ, Pierce GP, Colosi P: Adaptation of the WAVE bioreactor to baculoviral production of AAV vectors: Scale-up considerations. *Molecular Therapy* 2004;9:S160.

Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, et al. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine* 1998;16:20:1901-1906.

Cherry JD. Comparative efficacy of acellular pertussis vaccines: an analysis of recent trials. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:Suppl 4:S90-96.

Cherry JD. Historical review of pertussis and the classical vaccine. *J Infect Dis* 1996;174:Suppl 3:S259-263.

Choe YJ, Park YJ, Jung C, Bae GR, Lee DH. National pertussis surveillance in South Korea 1955–2011: epidemiological and clinical trends. *Int J Infect Dis* 2012;16:850–854.

Cloud J L, Hymas W and Carroll KC. Impact of nasopharyngeal swab types on detection of *Bordetella pertussis* by PCR and culture. *J Clin Microbiol* 2002;40;10: 3838-3840.

Cookson BT, Cho HL, Herwaldt LA, et al. Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1989a;57:7: 2223-2229.

Cookson BT, Tyler AN and Goldman WE. Primary structure of the peptidoglycan derived tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Biochemistry* 1989b;28:4:1744-1749.

Cotter PA and Miller JF. A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* bvgS gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg regulated antigens. *Mol Microbiol* 1997;24:4:671-685.

Cotter PA and Miller JF. BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect Immun* 1994;62:8:3381-3390.

Coutte L, Alonso S, Reveneau N, et al. Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen. *J Exp Med* 2003a;197:6:735-742.

Coutte L, Antoine R, Drobecq H, et al. Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J* 2001;20:18:5040-5048.

Coutte LE, Antoine WR, et al. Surface anchoring of bacterial subtilisin important for maturation function. *Mol Microbiol* 2003b;49:2:529-539.

Crespo I, Cardenosa N, Godoy P, et al. Epidemiology of pertussis in a country with high vaccination coverage. *Vaccine* 2011;29:25:4244-4248.

Dakic G, Kallonen T, Elomaa A, Pljesa T, Vignjevic-Krastavcevic M, He Q. *Bordetella pertussis* vaccine strains and circulating isolates in Serbia. *Vaccine* 2010;28:1188–1192.

de Greeff SC, Mooi FR., Westerhof A, Verbakel J M M, Peeters MF, Heuvelman CJ, et al.. Pertussis disease burden in the household: how to protect young infants. *Clin Infect Dis* 2010;50:1339–1345.

de Melker HE, Schellekens JF, Neppelenbroek SE, et al. Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of the Netherlands: observations on surveillance data. *Emerg Infect Dis* 2000;6:4:348-357.

De Serres G, Shadmani R, Duval B, et al. Morbidity of pertussis in adolescents and adults. *J Infect Dis* 2000;182:1:174-179.

Deora R, Bootsma HJ, Miller JF, et al. Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol Microbiol* 2001;40:3:669-683.

Dobrindt U and Hacker J. Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2001;4:5:550-557.

Edwards KM, Meade BD, Decker MD, et al. Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: overview and serologic response. *Pediatrics* 1995;96:3:548-557.

Eibl R, Kaiser S, Lombriser R, Eibl D. Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;86:41-49.

Eldering G. and Kendrick P. *Bacillus Para- Pertussis: A Species Resembling Both Bacillus Pertussis and Bacillus Bronchisepticus but Identical with Neither.*" *J Bacteriol* 1938;35:6:561-572.

Eldering G, Hornbeck C, Baker J. Serological study of *Bordetella pertussis* and related species. *J Bacteriol* 1957,74:2:133-136.

Elomaa A, Advani A, Donnelly D, Antila M, Mertsola J, Hallander H, et al. Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates in Finland, where the whole-cell pertussis vaccine has been used for 50 years. *J Clin Microbiol* 2005;43:3681–3687.

Emsley P, Charles IG, Fairweather NF, et al. Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature* 1996;381:6577:90-92.

Ennisa DP, Cassidy JP, Mahona BP. Whole-cell pertussis vaccine protects against *Bordetella pertussis* exacerbation of allergic asthma. *Immunology Letters* 2005;97:91–100.

EU Commission Decision. COMMISSION DECISION of 28/IV/2008. 2008. Retrieved 17th June, 2011, from [http://ec.europa.eu/health/ph\\_threats/com/docs/1589\\_2008\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_threats/com/docs/1589_2008_en.pdf).

European Center for Disease Prevention and Control. Guidance and protocol for the serological diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis*. [www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)

Farrell DJ, McKeon M, Daggard G, et al. Rapid-cycle PCR method to detect *Bordetella pertussis* that fulfills all consensus recommendations for use of PCR in diagnosis of pertussis." *J Clin Microbiol* 2000;38:12:4499-4502.

Fiett J, Letowska I, Gniadkowski M, et al. The new strategy for allele identification of the genes coding for pertussis toxin subunit S1 (ptx S1) and pertactin (prn) in *Bordetella pertussis*. *J Microbiol Methods* 2003;55:3:651-666.

Finger H and von Koenig CHW. *Bordetella*. *Medical Microbiology*. 4th edition. S. Baron. Galveston (TX), University of Texas Medical Branch at Galveston. 1996.

Fingermann M, Fernandez J, Sisti F, et al. Differences of circulating *Bordetella pertussis* population in Argentina from the strain used in vaccine production. *Vaccine* 2006;24:17:3513-3521.

Finn TM and Stevens LA. Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol Microbiol* 1995;16:4:625-634.

Fisman DN, Tang P, Hauck T, Richardson S, Drews SJ, Low DE and Jamieson F. Pertussis resurgence in Toronto, Canada: a population-based study including test-incidence feedback modelling. *BMC Public Health* 2011;11:694-704.

Fry N K, Neal S, Harrison TG, et al. Genotypic variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertactin and pertussis toxin in historical and recent clinical isolates in the United Kingdom." *Infect Immun* 2001;69:9:5520-5528.

Fry NK, Duncan J, Wagner K, et al. Role of PCR in the diagnosis of pertussis infection in infants: 5 years' experience of provision of a same-day realtime PCR service in England and Wales from 2002 to 2007. *J Med Microbiol* 2009;58:Pt 8:1023-1029.

Gabutti G and Rota MC. Pertussis: A review of disease epidemiology worldwide and in Italy. *Int J Environ Res Public Health* 2012;9:4626-4638.

Genzel Y, Olmer RM, Schaefer B, Reichl U. WAVE microcarrier cultivation of MDCK cells for influenza virus production in serum containing and serum-free medium. *Vaccine* 2006;24(35–36):6074–6087.

Geuijen CA, Willems RJ and Mooi FR. The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars. *Infect Immun* 1996;64:7:2657-2665.

Geuijen CA, Willems RJ, Bongaerts M, et al. Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. *Infect Immun* 1997;65:10:4222-4228.

Gilberg S, Njamkepo E, Du Chatelet IP, et al. Evidence of *Bordetella pertussis* infection in adults presenting with persistent cough in a french area with very high whole-cell vaccine coverage. *J Infect Dis* 2002;186:3:415-418.



Glaser P, Ladant D, Sezer O, et al. The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1988;2:1:19-30.

Glazyrina J, Materne EM, Dreher T, Storm D, Junne S, Adams T, Greller G, Neubauer P. High cell density cultivation and recombinant protein production with *Escherichia coli* in a rocking-motion-type bioreactor. *Microbial Cell Factories* 2010;9:42.

Goldman WE, Klapper DG and Baseman JB. Detection, isolation, and analysis of a released *Bordetella pertussis* product toxic to cultured tracheal cells. *Infect Immun* 1982;36:2:782-794.

Gross R, Carbonetti NH, Rossi R, et al. Functional analysis of the pertussis toxin promoter. *Res Microbiol* 1992;143:7:671-681.

Guedin S, Willery E, Tommassen J, et al. Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem* 2000;275:39:30202-30210.

Guiso N, Berbers G, Fry NK, et al. What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;30:3:307-312.

Gzyl A, Augustynowicz E, van Loo I, et al. Temporal nucleotide changes in pertactin and pertussis toxin genes in *Bordetella pertussis* strains isolated from clinical cases in Poland. *Vaccine* 2001;20:3-4:299-303.

Hallander H, Advani A, Riffelmann M, von Konig CH, Caro V, Guiso N, et al. *Bordetella pertussis* strains circulating in Europe in 1999 to 2004 as determined by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2007;45:257-262.

Hallander HO, Advani A, Donnelly D, Gustafsson L, Carlsson RM. Shifts of *Bordetella pertussis* variants in Sweden from 1970 to 2003, during three periods marked by different vaccination programs. *J Clin Microbiol* 2005;43:2856-2865.

Halperin SA and Marrie TJ. Pertussis encephalopathy in an adult: case report and review. *Rev Infect Dis* 1991;13:6:1043-1047

Halperin SA, Bortolussi R, Langley JM, et al. Seven days of erythromycin estolate is as effective as fourteen days for the treatment of *Bordetella pertussis* infections. *Pediatrics* 1997;100:1:65-71.

Halperin SA. The control of pertussis—2007 and beyond. *N Engl J Med* 2007;356:110–113.

Harvill ET, Preston A, Cotter PA, et al. Multiple roles for *Bordetella* lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. *Infect Immun* 2000;68:12:6720-6728.

Hazenbos WL, Geuijen CA, van den Berg BM, et al. *Bordetella pertussis* fimbriae bind to human monocytes via the minor fimbrial subunit FimD. *J Infect Dis* 1995;17:14:924-929.

He Q and Mertsola J. Factors contributing to pertussis resurgence. *Future Microbiol* 2008;3:329–339.

He Q, Mertsola J, Soini H, et al. Comparison of polymerase chain reaction with culture and enzyme immunoassay for diagnosis of pertussis. *J Clin Microbiol* 1993;31:3:642-645.

He Q, Makinen J, Berbers G, et al. *Bordetella pertussis* protein pertactin induces type specific antibodies: one possible explanation for the emergence of antigenic variants? *J Infect Dis* 2003;187:1200–1205.

Heikkinen E, Xing DK, Olander RM, Hytonen J, Viljanen MK, Mertsola J, et al. *Bordetella pertussis* isolates in Finland: serotype and fimbrial expression. *BMC Microbiol* 2008;8:162.

Hewlett EL, Gordon VM, McCaffery JD, et al. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Identification and purification of the holotoxin molecule. *J Biol Chem* 1989;264:32:19379-19384.

Higgs R, Higgins SC, Ross PJ, Mills KH. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunol* 2012;5:5:485-500.

Hoppe JE. State of art in antibacterial susceptibility of *Bordetella pertussis* and antibiotic treatment of pertussis. *Infection* 1998;26:4:242-246.

Horiguchi Y, Nakai T and Kume K. Effects of *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin on the structure and function of osteoblastic clone MC3T3-e1 cells. Infect Immun 1991;59:3:1112-1116.

Horiguchi Y, Sugimoto N and Matsuda M. Stimulation of DNA synthesis in osteoblast-like MC3T3-E1 cells by *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin. Infect Immun 1993;61:9:3611-3615.

Hozbor D, Mooi F, Flores D, et al. Pertussis epidemiology in Argentina: trends over 2004-2007. J Infect 2009;59:4:225-231.

HPA. Health Protection Report 2012;6:22.

HUSLAB. *Bordetella pertussis*, vasta-aineet. 2010. Retrieved 4th June, 2011, from <http://www.huslab.fi/ohjekirja/2471.html>

HUSLAB. *Bordetella pertussis*, viljely ja nukleiinihapon osoitus. 2011. Retrieved 18th June, 2011, from [http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt\\_show.exe?assay=9441&terms=bord](http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=9441&terms=bord).

Iida T and Okonogi T. Lientoxicity of *Bordetella pertussis* in mice. J Med Microbiol 1971;4:1:51-61.

Inatsuka CS., Xu Q, Vujkovic-Cvijin I, Wong S, Stibitz S, Miller JF and Cotter PA. Pertactin is required for *Bordetella* species to resist neutrophil-mediated clearance. Infect Immun 2010; 78:7:2901-2909.

Irie Y, Mattoo S and Yuk MH. The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. J Bacteriol 2004;186:17:5692-5698.

Ishibashi Y, Claus S and Relman DA. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18) J Exp Med 1994;180:4:1225-1233.

Ishibashi Y, Relman DA and Nishikawa A. Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and alpha5beta1 integrin. Microb Pathog 2001;30:5:279-288.

Jacob-Dubuisson F, Buisine C, Mielcarek N, et al. Amino-terminal maturation of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. Mol Microbiol 1996;19:1:65-78.

Jacob-Dubuisson F, El-Hamel C, Saint N, et al. Channel formation by FhaC, the outer membrane protein involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem* 1999;274:53:37731-37735.

Jacobs C, Joris B, Jamin M, et al. AmpD, essential for both beta-lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *Mol Microbiol* 1995;15:3:553-559.

Jenkins P and Clarke SW. Cough syncope: a complication of adult whooping cough. *Br J Dis Chest* 1981;75:3:311-313.

Jungnitz H, West NP, Walker MJ, et al. A second two-component regulatory system of *Bordetella bronchiseptica* required for bacterial resistance to oxidative stress, production of acid phosphatase, and in vivo persistence. *Infect Immun* 1998;66:10:4640-4650.

Kallonen T and He Q. *Bordetella pertussis* strain variation and evolution postvaccination. *Expert Rev Vaccines* 2009;8:7:863-875.

Kallonen T, Gröndahl-Yli-Hannuksela K, Elomaa A, Lutynska A, Fry NK, Mertsola J, et al. Differences in the genomic content of *Bordetella pertussis* isolates before and after introduction of pertussis vaccines in four European countries. *Infect Gen and Evol* 2011;11:2034–2042.

Kamachi K, Sota M, Tamai Y, et al. Plasmid pBP136 from *Bordetella pertussis* represents an ancestral form of IncP-1beta plasmids without accessory mobile elements. *Microbiology* 2006;152:12:3477-3484.

Kaslow, H. R. and D. L. Burns (1992). "Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation." *FASEB J* 6(9):2684-90.

Katada T and Ui M. Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:10:3129-3133.

Katada T, Tamura M and Ui M. The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein. *Arch Biochem Biophys* 1983;224:1:290-298.

Kendrick P and Eldering G. Cough plate examinations for *B. pertussis*. Am J Public Health Nations Health 1934;24:4:309-318

Kendrick PL, Eldering G, Dixon MK, Misner J. Mouse protection tests in the study of pertussis vaccine. Am J Public Health Nations Health 1947;37:7:803-810.

Khelef N, Zychlinsky A and Guiso N. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. Infect Immun 1993;61:10:4064-4071

King AJ, Berbers G, van Oirschot HF, Hoogerhout P, Knipping K, Mooi FR. Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity. Microbiology 2001;147:2885–2895.

Knapp S and Mekalanos JJ. Two trans-acting regulatory genes (*vir* and *mod*) control antigenic modulation in *Bordetella pertussis*. J Bacteriol 1988;170:11:5059-5066.

Knorr L, Fox JD, Tilley PA, et al. Evaluation of real-time PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. BMC Infect Dis 2006;6:62.

Kodama A, Kamachi K, Horiuchi Y, et al. Antigenic divergence suggested by correlation between antigenic variation and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Bordetella pertussis* isolates in Japan. J Clin Microbiol 2004;42:12:5453-5457.

Kretsinger K, Broder KR, Cortese MM, et al. Preventing tetanus, diphtheria, and pertussis among adults: use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccine recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and recommendation of ACIP, supported by the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC), for use of Tdap among health-care personnel. MMWR Recomm Rep 2006;55:RR-17:1-37.

KTL. Toimenpideohje torjuntatoimista hinkuuskäytäpausten yhteydessä. 2007. Retrieved 15th of June, 2011, from [http://www.ktl.fi/attachments/suomi/julkaisut/julkaisusarja\\_c/2007/2007c10.pdf](http://www.ktl.fi/attachments/suomi/julkaisut/julkaisusarja_c/2007/2007c10.pdf).

Kumar R, Kapre SV, Pattnaik P, Banerjee S, Mahadevan MS. Tangential flow filtration for the recovery of acellular pertussis vaccine components. BioPharm International 2009;Oct 1.

Kurniawan, J, Maharjan RP, Chan WF, et al. *Bordetella pertussis* clones identified by multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *Emerg Infect Dis* 2010;16:2:297-300.

Lasfargues A, Caroff M and Chaby R. Structural features involved in the mitogenic activity of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides for spleen cells of C3H/HeJ mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993;7:2:119-129.

Lebbar S, Cavaillon JM, Caroff M, et al. Molecular requirement for interleukin 1 induction by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes: involvement of the heptosyl-2-keto-3-deoxyoctulosonate region. *Eur J Immunol* 1986;16:1:87-91

Leininger E, Ewanowich CA, Bhargava A, et al. Comparative roles of the Arg-Gly-Asp sequence present in the *Bordetella pertussis* adhesins pertactin and filamentous hemagglutinin. *Infect Immun* 1992;60:6:2380-2385.

Leininger E, Roberts M, Kenimer JG, Charles IG, Fairweather N, Novotny P, et al. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88,345–349.

Li J, Fairweather NF, Novotny P, et al. Cloning, nucleotide sequence and heterologous expression of the protective outer-membrane protein P.68 pertactin from *Bordetella bronchiseptica*. *J Gen Microbiol* 1992;138:Pt 8:1697-1705.

Lievano FA, Reynolds MA, Waring AL, et al. Issues associated with and recommendations for using PCR to detect outbreaks of pertussis. *J Clin Microbiol* 2002;40:8:2801-2805.

Lin YC, Yao SM, Yan JJ, et al. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* in Taiwan, 1993-2004: suggests one possible explanation for the outbreak of pertussis in 1997. *Microbes Infect* 2006;8:8:2082-2087.

Litt DJ, Neal SE and Fry NK. Changes in genetic diversity of the *Bordetella pertussis* population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type. *J Clin Microbiol* 2009;47:3:680-688.

Livey I, Duggleby CJ and Robinson A. Cloning and nucleotide sequence analysis of the serotype 2 fimbrial subunit gene of *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol* 1987;1:2:203-209.

Locht C and Keith JM. Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization. *Science* 1986;232:4755:1258-1264.

Loeffelholz MJ, Thompson CJ, Long KS, et al. Detection of *Bordetella holmesii* using *Bordetella pertussis* IS481 PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000;38:1:467.

Lohr V, Genzel Y, Behrendt I, Scharfenberg K, Reichl U. A new MDCK suspension line cultivated in a fully defined medium in stirred-tank and WAVE bioreactor. *Vaccine* 2010;28:6256–6264.

Lyons AB. Pertussis toxin pretreatment alters the in vivo cell division behaviour and survival of B lymphocytes after intravenous transfer. *Immunol Cell Biol* 1997;75:1:7-12.

Mahajan E, Matthews T, Hamilton R, Laird MW. Use of disposable reactors to generate inoculum cultures for *E. coli*. *Biotechnol Prog* 2010;26:4:1200-1203.

Mahon BP, Brady MT, and Mills KH.. Protection against *Bordetella pertussis* in mice in the absence of detectable circulating antibody: implications for long-term immunity in children. *J Infect Dis* 2000;181:2087–2091.

Marchitto KS, Smith SG, Locht C, et al. Nucleotide sequence homology to pertussis toxin gene in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *Infect Immun* 1987;55:3:497-501.

Martinez de Tejada G, Miller JF and Cotter PA. Comparative analysis of the virulence control systems of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol* 1996;22:5:895-908.

Mastrantonio P, Spigaglia P, van Oirschot H, et al. Antigenic variants in *Bordetella pertussis* strains isolated from vaccinated and unvaccinated children. *Microbiology* 1999;145:Pt 8:2069-2075.

Matsuzawa T, Fukui A, Kashimoto T, et al. *Bordetella dermonecrotic* toxin undergoes proteolytic processing to be translocated from a dynamin-related endosome into the cytoplasm in an acidification-independent manner. *J Biol Chem* 2004;279:4:2866-2872.

Mattoo S and Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:2:326-382.

Mattoo S, Miller JF and Cotter PA. Role of *Bordetella bronchiseptica* fimbriae in tracheal colonization and development of a humoral immune response. *Infect Immun* 2000;68:4:2024-2033.

McGuirk P and Mills KH. Direct anti-inflammatory effect of a bacterial virulence factor: IL-10-dependent suppression of IL-12 production by filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Eur J Immunol* 2000;30:2:415-422.

McGuirk P, Johnson PA, Ryan EJ, et al. Filamentous hemagglutinin and pertussis toxin from *Bordetella pertussis* modulate immune responses to unrelated antigens. *J Infect Dis* 2000;182:4:1286-1289.

McIntyre P, Gidding H, Gilmour R, Lawrence G, Hull B, Horby P, et al. Vaccine preventable diseases and vaccination coverage in Australia, 1999 to 2000. *Commun Dis Intell* 2002;i-xi:1-111.

Meade BD, Kind PD and Manclark CR. Lymphocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis* alters mononuclear phagocyte circulation and response to inflammation. *Infect Immun* 1984;46:3:733-739.

Menzio FD, Gantiez C and Loch C. Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin. *FEMS Microbiol Lett* 1991;62:1:59-64.

Merkel TJ and Stibitz S. Identification of a locus required for the regulation of bvg-repressed genes in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 1995;177:10:2727-2736.

Miller DL, Ross EM, Alderslade R, et al. Pertussis immunisation and serious acute neurological illness in children. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1981;282:6276:1595-1599.

Miller JF, Johnson SA, Black WJ, et al. Constitutive sensory transduction mutations in the *Bordetella pertussis* bvgS gene. *J Bacteriol* 1992;174:970-979.



Miller JF, Silverberg RJ, Saito TM, et al. An agglutinative reaction for hemophilus pertussis: II. Its relation to clinical immunity. *The Journal of Pediatrics* 1943;22:6:644-651.

Moerman L, Leventhal A, Slater PE, et al. The re-emergence of pertussis in Israel. *Isr Med Assoc J* 2006;8:5:308-311.

Mooi FR, Hallander H, Wirsing von Konig CH, Hoet B, Guiso N. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:174–181.

Mooi FR, He Q., van Oirschot H, et al. Variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertussis toxin and pertactin in vaccine strains and clinical isolates in Finland. *Infect Immun* 1999;67:3133-3134.

Mooi FR, Jansen WH, Brunings H, et al. Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. *Microb Pathog* 1992;12:2:127-135.

Mooi FR, van Loo IH, King AJ. Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: a cause for its reemergence? *Emerg Infect Dis* 2001;7:526–528.

Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, et al. *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis* 2009;15:8:1206-1213.

Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, van der Heide HG, Gaastra W, Willems RJ. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine driven evolution. *Infect Immun* 1998;66:670–675.

Mooi FR. *Bordetella pertussis* and vaccination: The persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol* 2010;10:36-49.

Mooi, FR, van der Heide HG, ter Avest AR, et al. Characterization of fimbrial subunits from *Bordetella* species. *Microb Pathog* 1987;2:6:473-484.

Moraga-Llop FA, Mendoza-Palomar N, Muntaner-Alonso A, Codina-Grau G, Fàbregas-Martori A, Campins-Martí M. Pertussis in fully vaccinated infants and children. Are

new vaccination strategies required? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013;29 (Epub ahead of print)

Morse SI and Morse JH. Isolation and properties of the leukocytosis- and lymphocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis*. *J Exp Med* 1976;143:6:1483-1502.

Morse SI and. Bray KK. The occurrence and properties of leukocytosis and lymphocytosis-stimulating material in the supernatant fluids of *Bordetella pertussis* cultures. *J Exp Med* 1969;129:3:523-550.

Morse SI. Lymphocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis*: isolation, characterization, and biological activity. *J Infect Dis* 1977;136 Suppl: S234-238.

Morse SI. Studies on the lymphocytosis induced in mice by *Bordetella pertussis*." *J Exp Med* 1965;121:49-68.

Mosiej E, Augustynowicz E, Zawadka M, et al. Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates circulating in Poland after 50 years of whole-cell pertussis vaccine use. *J Clin Microbiol* 2011;49:4:1452-1457.

Nakajima K, Dharmage SC, Carlin JB, Wharton CL, Jenkins M, Giles GG, Abramson MJ, Walters EH and Hopper JL. Is childhood immunisation associated with atopic disease from age 7 to 32 years? *Thorax* 2007;62:270-275.

Nicosia A, Perugini M, Franzini C, et al. Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: operon structure and gene duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:13:4631-4635.

Ntezayabo B, De Serres G and Duval B. Pertussis resurgence in Canada largely caused by a cohort effect. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:1:22-27.

Njamkepo E, Cantinelli T, Guigon G, Guiso N. Genomic analysis and comparison of *Bordetella pertussis* isolates circulating in low and high vaccine coverage areas. *Microbes Infect* 2008;10:1582–1586.

Olin P, Rasmussen F, Gustafsson L, et al. Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines

compared with whole-cell pertussis vaccine. Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines. Lancet 1997;350:9091:1569-1577.

Packard ER, Parton R, Coote JG, et al. Sequence variation and conservation in virulence related genes of *Bordetella pertussis* isolates from the UK. J Med Microbiol 2004;53:Pt 5:355-365.

Parfentjev IA and Goodline MA. Histamine shock in mice sensitized with *Hemophilus pertussis* vaccine. J Pharmacol Exp Ther 1948;92:4:411-413.

Parfentjev IA and Schleyer WL. The influence of histamine on the blood sugar level of normal and sensitized mice. Arch Biochem 1949;20:2: 341-346.

Parkhill J, Sebahia M, Preston A, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. Nat Genet 2003;35:1:32-40.

Peppler MS, Kuny S, Nevesinjac A, et al. Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates from Quebec and Alberta provinces of Canada from 1985 to 1994. J Clin Microbiol 2003;41:7:3344-3347.

Peppler MS. Two physically and serologically distinct lipopolysaccharide profiles in strains of *Bordetella pertussis* and their phenotype variants. Infect Immun 1984;43:1:224-232.

Pereira A, Pereira AS, Moreira-Filho CA, Bando SY, Tambourgi DV. Comparative analysis of a *Bordetella pertussis* patient isolated strain and classical strains used in the pertussis vaccine. Vaccine 2005;23:4353-4358.

Ph. Eur. 7th edition. Assay of pertussis vaccine, general chapter 2.7.7. Strasbourg, France: Council of Europe; 2010.

Pishko EJ, Betting DJ, Hutter CS, et al. *Bordetella pertussis* acquires resistance to complement-mediated killing in vivo. Infect Immun 2003;71:9:4936-4442.

Pljesa T, He Q, Dakic G, Vignjevic-Krastavcevic M, Miković N and Cirkovic I. Changes in genetic diversity of the *Bordetella pertussis* population in Serbia between 1953 and 2011. Arch Biol Sci 2013. Article in press.

Postels-Multani S, Schmitt HJ, Wirsing von Konig CH, et al. Symptoms and complications of pertussis in adults. *Infection* 1995;23:3:139-142.

Poynten M, McIntyre PB, Mooi FR, Heuvelman KJ, Gilbert GL. Temporal trends in circulating *Bordetella pertussis* strains in Australia. *Epidemiol Infect* 2004;132:185–193.

Prasad SM, Yin Y, Rodzinski E, et al. Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1993;61:7:2780-2785.

Preston NW, Carter EJ. Serotype specificity of vaccine-induced immunity to pertussis. *Commun Dis Rep CDR* 1992;Rev 2:R155–156.

Qin X, Galanakis E, Martin ET, et al. Multitarget PCR for diagnosis of pertussis and its clinical implications. *J Clin Microbiol* 2007;45(2):506-511.

Qin X, Turgeon DK, Ingersoll BP, et al. *Bordetella pertussis* PCR: simultaneous targeting of signature sequences. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;43:4:269-275.

Register KB and Sanden GN. Prevalence and sequence variants of IS481 in *Bordetella bronchiseptica*: implications for IS481-based detection of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 2006;44:12:4577-4583.

Reischl U, Lehn N, Sanden GN, et al. Realtime PCR assay targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and molecular basis for detecting *Bordetella holmesii*. *J Clin Microbiol* 2001;39:5:1963-1966.

Relman D, Tuomanen E, Falkow S, et al. Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell* 1990;61:7:1375-1382.

Relman DA, Domenighini M, Tuomanen E, et al. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8:2637-2641.

Rhodes CR, Gray MC, Watson JM, et al. Structural consequences of divalent metal binding by the adenyl cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Arch Biochem Biophys* 2001;395:2:169-176.

Riffelmann M, Thiel K, Schmetz J, et al. Performance of commercial enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol 2010;48:12:4459-4463.

Riffelmann M, Wirsing von Konig CH, Caro V, et al. Nucleic Acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella infections*. J Clin Microbiol 2005;43:10:4925-4929.

Rogel A, Schultz JE, Brownlie RM, et al. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: purification and characterization of the toxic form of the enzyme. EMBO J 1989;8:9:2755-2760.

Rose T, Sebo P, Bellalou J, et al. Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calciumbinding sites and calcium-induced conformational changes. J Biol Chem 1995;270:44:26370-26376.

Rosenthal RS, Nogami W, Cookson BT, et al. Major fragment of soluble peptidoglycan released from growing *Bordetella pertussis* is tracheal cytotoxin. Infect Immun 1987;55:9:2117-2120.

Ross PJ, Sutton CE, Higgins S, Allen AC, Walsh K, et al. Relative Contribution of Th1 and Th17 Cells in Adaptive Immunity to *Bordetella pertussis*: Towards the Rational Design of an Improved Acellular Pertussis Vaccine. PLoS Pathog 2013;9:4:e1003264.

Roush DJ, Lu Y. Advances in Primary Recovery: Centrifugation and Membrane Technology. Biotechnol. Prog. 2008;24:488-495.

Rowatt E. Some factors affecting the growth of *Bordetella pertussis*. J Gen Microbiol 1957;17:279-296.

Rowe J, Yerkovich ST, Richmond P, Suriyaarachchi D, Fisher E, Feddema L, Loh R, Sly PD and Holt1 P. Th2-associated local reactions to the acellular diphtheria-tetanus-pertussis vaccine in 4- to 6-year-old children. Infect Immun 2005;73:12:8130–8135

Ryan M, McCarthy L, Rappuoli R, et al. Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. Int Immunol 1998;10:5:651-662

Sato Y and Sato H. Development of acellular pertussis vaccines. *Biologicals* 1999;27:2:61-69.

Sato Y, Kimura M, Fukumi H. Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet*. 1984;1(8369):122-126.

Schaeffer LM, McCormack FX, Wu H, et al. *Bordetella pertussis* lipopolysaccharide resists the bactericidal effects of pulmonary surfactant protein A. *J Immunol* 2004;173:3:1959-1965.

Schouls LM, van der Heide HG, Vauterin L, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Dutch *Bordetella pertussis* strains reveals rapid genetic changes with clonal expansion during the late 1990s. *J Bacteriol* 2004;186:16:5496-5505.

Sinclair A. Disposable Bioreactors: the next generation. *Bio-Pharm Int*. 2008;21:4:21.

Singh M and Lingappan K. Whooping cough: the current scene. *Chest* 2006;130:5:1547-1553.

Skinner JA, Reissinger A, Shen H, et al. *Bordetella* type III secretion and adenylate cyclase toxin synergize to drive dendritic cells into a semimature state. *J Immunol* 2004;173:3:1934-1940.

Skowronski DM, De Serres G, MacDonald D, Wu W, Shaw C, Macnabb J, Champagne S, Patrick DM, and Halperin SA. The changing age and seasonal profile of pertussis in Canada. *J Infect Dis* 2002;185:1448–1453.

Spasojević V. Antigenska i biološka karakterizacija sojeva *B. pertussis* izolovanih u Beogradu. Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Doktorska disertacija, 1977.

Spokes PJ and RE Gilmour. NSW Annual Vaccine-Preventable Disease Report, 2009. *N S W Public Health Bull* 2011;21:9-10:197-209.

Stechenber B. *Bordetella pertussis*. The neurological manifestations of pediatric infectious diseases and immunodeficiency syndromes. L. L. Barton and N. R. Friedman, Humana Press 2008;215-218.

Stenson TH, Allen AG, Al-Meer JA, et al. *Bordetella pertussis* risA, but not risS, is required for maximal expression of Bvg-repressed genes. *Infect Immun* 2005;73(9):5995-6004.

Stibitz S and Yang MS. Genomic fluidity of *Bordetella pertussis* assessed by a new method for chromosomal mapping. *J Bacteriol* 1997;179:18:5820-5826.

Stibitz S and Yang MS. Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the vir locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 1991;173:14:4288-4296.

Stockbauer KE, Fuchslocher B, Miller JF, et al. Identification and characterization of BipA, a *Bordetella* Bvg-intermediate phase protein. *Mol Microbiol* 2001;39:1:65-78.

Storsaeter J and Olin P. Relative efficacy of two acellular pertussis vaccines during three years of passive surveillance. *Vaccine* 1992;10:3:142-144.

Storsaeter J, Hallander H, Farrington CP, et al. Secondary analyses of the efficacy of two acellular pertussis vaccines evaluated in a Swedish phase III trial. *Vaccine* 1990;8:5:457-461.

Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, et al. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 1998;16:20:1907-1916.

Sutherland JN, Chang C, Yoder SM, et al. Antibodies recognizing protective pertussis toxin epitopes are preferentially elicited by natural infection versus acellular immunization. *Clin Vaccine Immunol* 2011;18:6:954-962.

Tamura M, Nogimori K, Yajima M, et al. A role of the B-oligomer moiety of islet-activating protein, pertussis toxin, in development of the biological effects on intact cells. *J Biol Chem* 1983;258:11:6756-6761.

Tan TMD, Trindade EMDM and Skowronski DMDF. Epidemiology of pertussis. *Pediatric Infectious Disease Journal The Global Pertussis Initiative* 2005;24:5:Supplement:S10-S18.

Tanaka M, Vitek CR, Pascual FB, et al. Trends in pertussis among infants in the United States, 1980-1999. *JAMA* 2003;290:22:2968-2975.

Templeton K E, Scheltinga SA, van der Zee A, et al. Evaluation of real-time PCR for detection of and discrimination between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella holmesii* for clinical diagnosis. J Clin Microbiol 2003;41:9:4121-4126.

Thalen M, van der Ark A, van den IJssel J, van Straaten I, Jansen D, Beuvery C, Martens D, Tramper J. Improving the cellular pertussis vaccine: Increased potency and consistency. Vaccine 2008;26:653—663.

Tiwari T, Murphy TV and Moran J. Recommended antimicrobial agents for the treatment and postexposure prophylaxis of pertussis: 2005 CDC Guidelines. MMWR Recomm Rep 2005;54:RR-14:1-16.

Tosi MF, Stark JM, Smith CW, et al. Induction of ICAM-1 expression on human airway epithelial cells by inflammatory cytokines: effects on neutrophil-epithelial cell adhesion. Am J Respir Cell Mol Biol 1992;7:2:214-221.

Tuomanen E. and Weiss A. Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory-epithelial cells. J Infect Dis 1985;152:118-125.

Uhl MA and Miller JF. Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:3:1163-1167.

Uhl MA and Miller JF. Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay. J Biol Chem 1996a;271.52:33176-33180.

Uhl MA and Miller JF. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. EMBO J 1996b;15:5:1028-1036.

Ullah M, Burns T, Bhalla A, Beltz HW, Greller G, Adams T. Disposable bioreactors for cells and microbes productivities similar to those achieved with stirred tanks can be achieved with disposable bioreactors. Biopharm International 2008;44.

UTUlab. *Bordetella pertussis* vasta-aineet. 2008. Retrieved 18th June, 2011, from <http://www.med.utu.fi/tiedostot/ylab/pdf/BORDETELLA%20PERTUSSIS,%20VASTA-AINEET.pdf>



UTUlab. *Bordetella pertussis* vasta-aineet. 2008. Retrieved 18th June, 2011, from <http://www.med.utu.fi/tiedostot/ylab/pdf/BORDETELLA%20PERTUSSIS,%20VASTA-AINEET.pdf>.

UTUlab. *Bordetella pertussis*, viljely. 2009. Retrieved 18th June, 2011, from <http://www.med.utu.fi/tiedostot/ylab/pdf/BORDETELLA%20PERTUSSIS,%20VILJELY.pdf>

van der Zee A, Vernooij S, Peeters M, et al. Dynamics of the population structure of *Bordetella pertussis* as measured by IS1002-associated RFLP: comparison of pre- and post-vaccination strains and global distribution. *Microbiology* 1996;142:Pt 12:3479-3485.

van Gent M, van Loo IH, Heuvelman KJ, et al. Studies on Prn variation in the mouse model and comparison with epidemiological data. *PLoS One* 2011b;6:3:e18014.

van Loo IH, Heuvelman KJ, King AJ, et al. Multilocus sequence typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes. *J Clin Microbiol* 2002;40:6:1994-2001.

van Loo IH, van der Heide HG, Nagelkerke NJ, et al. Temporal trends in the population structure of *Bordetella pertussis* during 1949-1996 in a highly vaccinated population. *J Infect Dis* 1999;179:4:915-923.

Vandebriel RJ, Gremmer ER, van Hartskamp M, Dormans JAMA and Mooi FR. Effects of a diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine on immune responses in murine local lymph node and lung allergy models. *Clin Vacc Immunol* 2007;3:14:211–219

Vandebriel RJ, Hellwig SM, Vermeulen JP, et al. Association of *Bordetella pertussis* with host immune cells in the mouse lung. *Microb Pathog* 2003;35:1:19-29.

Vincent M, Rodeghiero C, Eylenbosch R, Mans Y, Swalus-Steenhouwer J, Pie'rard D, Huygen K and Vanhoof R. Pertussis serodiagnosis in Belgium from 1990 to 2009. *Clin Vacc Immunol*, 2011; Apr.:588–594

von König CH, Halperin S, Riffelmann M, et al. Pertussis of adults and infants. *Lancet Infect Dis* 2002;2:12:744-750.

Watanabe M, Takimoto H, Kumazawa Y, et al. Biological properties of lipopolysaccharides from *Bordetella* species. *J Gen Microbiol* 1990;136:3:489-493.

Wearing HJ and Rohani P. Estimating the duration of pertussis immunity using epidemiological signatures. *PLoS Pathog* 2009;5:10:e1000647.

Weber C, Boursaux-Eude C, Coralie G, Caro V, Guiso N. Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years. *J Clin Microbiol* 2001;39:4396–4403.

Weber W, Weber E, Geisse S, Memmert K. Optimisation of protein expression and establishment of the WAVE Bioreactor for Baculovirus/ insect cell culture. *Cytotechnology* 2002;38:77-85.

Weingart CL and Weiss AA. *Bordetella pertussis* virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils. *Infect Immun* 2000;68:3:1735-1739.

Weingart CL, Mobberley-Schuman PS, Hewlett EL, et al. Neutralizing antibodies to adenylate cyclase toxin promote phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect Immun* 2000;68:12:7152-7155.

Weiss AA and Goodwin MS. Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model. *Infect Immun* 1989;57:12:3757-3764.

Wendelboe AM, Njamkepo E, Bourillon A, et al. Transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:4:293-299.

WHO. Available at: <http://www.who.int/biologicals/vaccines/pertussis/en> (Accessed May 15 2013)

WHO. Laboratory Manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis/Bordetella parapertussis*. IVB/04.14

WHO. Manual for the production and control of vaccines, Pertussis vaccine, BLG/UNDP/77.3 Rev.1., 1977.

WHO. Pertussis vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2010a;85:40:385-400.

WHO. Pertussis vaccines--WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2005;80:4:31-9.

WHO. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Recommendations for whole-cell pertussis vaccine; Technical Report Series 2007;941, Annex 6.

WHO. WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system 2012 global summary. 2012. WHO/IVB/2012

WHO. WHO-recommended standards for surveillance of selected vaccine-preventable diseases. 2003. Retrieved 17th June, 2011, from [http://www.who.int/vaccinesdocuments/ DocsPDF06/843.pdf](http://www.who.int/vaccinesdocuments/DocsPDF06/843.pdf).

WHO. World Health Organisation: immunization, vaccination and biologicals. Vaccine preventable diseases Vaccines monitoring system Global Summary Reference Time Series: SERBIA. 2012. Available at: <http://www.who.int/immunization/monitoring/en/globalsummary/timeseries/tscoveragebycountry.cfm?C=SRB>.

WHO. WHO Expert Committee on Biological Standardization, 30<sup>th</sup> Report Technical Report Series 1979;636:61-65.

Willems R, Paul A, van der Heide HG, et al. Fimbrial phase variation in *Bordetella pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation. EMBO J 1990;9:9:2803-2809.

Willems RJ, Geuijen C, van der Heide HG, et al. Isolation of a putative fimbrial adhesin from *Bordetella pertussis* and the identification of its gene. Mol Microbiol 1993;9:3:623-634.

Williams CL and Cotter PA. Autoregulation is essential for precise temporal and steady-state regulation by the *Bordetella* BvgAS phosphorelay. J Bacteriol 2007;189:5:1974-1982.

Wilson R, Read R, Thomas M, et al. Effects of *Bordetella pertussis* infection on human respiratory epithelium in vivo and in vitro. Infect Immun 1991;59:1:337-345.

Wood N and McIntyre P. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. Paediatr Respir Rev 2008;9:3:201-211.

Xing D, Wirsing von Konig CH, Newland P, et al. Characterization of reference materials for human antiserum to pertussis antigens by an international collaborative study. Clin Vaccine Immunol 2009;16:3:303-311.

Yaari E, Yafe-Zimmerman Y, Schwartz SB, et al. Clinical manifestations of *Bordetella pertussis* infection in immunized children and young adults. *Chest* 1999;115:5:1254-1258.

Yhtyneet Medix laboratoriot. *Bordetella pertussis*, vasta-aineet. 2011. Retrieved 19th June, 2011, from <http://www.yml.fi/tuotevalikoima/55.html>.

Yih W K, Lett SM, des Vignes FN, et al. The increasing incidence of pertussis in Massachusetts adolescents and adults, 1989-1998. *J Infect Dis* 2000;182:5:1409-1416.

Zako o državnoj upravi. Službeni glasnik RS broj 79/05 i 101/07

Zakon o zaštiti stanovništva od zaraznih bolesti. Službeni glasnik RS broj 107/05

Zaretzky FR, Gray MC and Hewlett EL. Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of *Bordetella pertussis*: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction. *Mol Microbiol* 2002;45:6:1589-1598.

Zhang L, Prietsch SO, Axelsson I, et al. Acellular vaccines for preventing whooping cough in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;1:CD001478.

## **BIOGRAFIJA**

Mr. sci. med. dr. Tatjana Plješa, rođena Petrović, rođena je 10.01.1976. godine u Čačku. Upisala je studije medicine na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, školske 1995./1996. godine, a diplomirala je 29.06.2001. godine sa srednjom ocenom 9,17. U toku studija je bila stipendista Fonda za naučni razvoj Ministarstva za nauku Republike Srbije. Poslediplomske studije na predmetu Klinička i eksperimentalna bakteriologija Medicinskog fakulteta u Beogradu upisala je školske 2001./2002. godine i završila ih 26.01.2009. godine, odbranom magistarske teze pod nazivom "*Procena značaja primene različitih podloga za izolaciju Mycoplasmae hominis*". Specijalističke studije iz Mikrobiologije i parazitologije je upisala školske 2002./2003. godine i završila ih 29.12.2005. godine sa odličnom ocenom.

U toku studija, Mr. sci. med. dr. Tatjana Plješa je radila kao demonstrator na katedri za Mikrobiologiju i imunologiju na studijama na engleskom jeziku, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Obavezan lekarski staž je obavila kao stažista Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Radni odnos u Institutu za virusologiju, vakcine i serume Torlak, je zasnovala 2003. godine. Od 2003. radila je u Odseku za bakterijske vakcine kao saradnik, stručni saradnik, i šef Odseka za bakterijske vakcine, a zatim je od 2012. do 2013. godine radila kao Direktor proizvodnje Instituta Torlak. Paralelno radi kao Vođa tima za kombinovanje bakterijskih vakcina i kao Osoba odgovorna za sprovođenje kontinuirane medicinske edukacije u Institutu Torlak od 2008. godine i kao Odgovorna osoba za uspostavljanje WAVE bioreaktorske proizvodnje toksoida tetanusa, toksoida difterije i pertusis koncentrovane suspenzije, od 2011. godine. Pored toga, trenutno radi kao stručni saradnik u Odseku za anaerobe. Promovisana je u naučno zvanje Istraživač-saradnik 2010. godine.

Mr. sci. med. dr. Tatjana Plješa je autor više od 20 radova iz oblasti mikrobiologije i imunologije objavljenih u stručnim časopisima i u zbornicima domaćih i međunarodnih skupova. Kao predavač po pozivu iz oblasti vakcina učestvovala je u radu više međunarodnih konferencija. Gostujući urednik je specijalnog izdanja časopisa "*Immunome Research*" pod nazivom "*Pertussis Resurgence*".

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Татјана Пљеша

број индекса \_\_\_\_\_

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**"Упоредно испитивање вакциналних сојева и циркулишућих изолата**

**Bordetella pertussis у Републици Србији"**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 25.11.2013.

  
\_\_\_\_\_

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Татјана Пљеша

Број индекса \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада "Упоредно испитивање вакциналних сојева и циркулишућих  
изолата *Bordetella pertussis* у Републици Србији"

Ментор doc. dr. Ивана Ђирковић

Потписани/а Татјана Пљеша

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 25.11.2013.



Прилог 3.

### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

"Упоредно испитивање вакциналних сојева и циркулишућих изолата  
*Bordetella pertussis* у Републици Србији"

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 25.11.2013.

