

**Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Reinhardt

Humorale und zelluläre Immunität nach Pertussis-
Auffrischimpfung im Jugendalter

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von
Anna Graf
aus Berlin

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Johannes Liese

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Josef Eberle
Prof. Dr. Thomas Lang

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. Nikolaus Rieber

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2010

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in

1. medizinischen Fachzeitschriften:

Differences of humoral and cellular immune response to an acellular pertussis booster in adolescents with a whole cell or acellular primary vaccination.

Rieber N, Graf A, Belohradsky BH, Hartl D, Urschel S, Riffelmann M, Wirsing von König CH, Liese J. Vaccine. 2008 Dec 9; 26(52):6929-35.

2. Posterpräsentationen:

Humoral and cellular immunity before and after adolescent pertussis booster vaccination indicate high prevalence of subclinical pertussis contacts in Germany.

Nikolaus Rieber, Anna Graf, Dominik Hartl, Simon Urschel, Bernd H. Belohradsky, Carl-Heinz Wirsing von König, Johannes G. Liese. ESPID 2008 (13.05.2008 - 16.05.2008); 26th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases.

Humorale und zelluläre Immunität vor und nach Auffrischimpfung gegen Pertussis im Jugendalter deuten auf eine hohe Prävalenz von subklinischen Pertussiskontakten in Deutschland.

Nikolaus Rieber, Anna Graf, Dominik Hartl, Simon Urschel, Bernd H. Belohradsky, Carl-Heinz Wirsing von König, Johannes G. Liese. DGPI 2008 (05.06.2008 - 07.06.2008); 16. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie.

Für meine Familie und meinen Freund

1. Einleitung	1
1.1. Pertussis allgemein	1
1.1.1. Epidemiologie	1
1.1.2. Erreger und Virulenzfaktoren	3
1.1.3. Pathogenese	5
1.1.4. Krankheit / Klinik	6
1.1.5. Komplikationen	8
1.1.6. Therapie	8
1.2. Prävention	9
1.2.1. Impfeempfehlungen aktuell	9
1.2.2. Passive Immunisierung	10
1.3. Pertussis – Immunität nach Infektion und Erkrankung	10
1.3.1. Serologische Immunität	10
1.3.2. Zelluläre Immunität	12
1.4. Pertussis – Immunantwort nach aktiver Impfung	14
1.4.1. Immunität und Reaktogenität nach Impfung mit Ganzkeim-Impfstoff	14
1.4.2. Immunität und Reaktogenität nach Impfung mit azellulärem Impfstoff	16
1.4.3. Th1- und Th2- vermittelte Immunantwort und zugehörige Zytokinproduktion	19
1.4.4. Serologische Korrelation zur Wirksamkeit	20
2. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	22
3. Material- und Methodenteil	23
3.1. Studiendesign	23
3.1.1. Studienart	23
3.2. Probanden	23
3.2.1. Gruppeneinteilung	23
3.2.2. Einschlusskriterien	24
3.2.3. Ausschlusskriterien	25
3.3. Impfstoffe	26
3.3.1. Darreichungsform und Zusammensetzung des Impfstoffes	27
3.4. Ablauf der Studienbesuche	28
3.4.1. Aufklärung und Einverständniserklärung	28
3.4.2. Dokumentation des Impfstatus und Blutentnahme	28
3.4.3. Sicherheitsvorkehrungen	28

3.5.	Labormethoden	28
3.5.1.	Serologie	29
3.5.2.	Präparation der peripheren mononukleären Zellen des Blutes	30
3.5.3.	Serumgewinnung	30
3.5.4.	Lymphozytenzellkulturen.....	31
3.5.5.	Lymphozytenproliferation nach Antigenstimulation	32
3.5.6.	Zytokin-Bestimmungen im Kulturüberstand	32
3.5.7.	Durchflusszytometrische Analyse	33
3.5.8.	Datenanalyse / Statistik.....	34
4.	Ergebnisse	36
4.1.	Serologie vor und nach Impfung	36
4.1.1.	Zusammenfassung.....	36
4.1.2.	Serologische Antwort auf Pertussistoxin (PT)	37
4.1.3.	Serologische Antwort auf filamentöses Hämagglutinin (FHA)	39
4.1.4.	Serologische Antwort auf Pertactin (PRN)	41
4.2.	Zellvermittelte Immunität / cell mediated immunity (CMI) vor und nach Impfung.....	43 43
4.2.1.	Lymphozytenproliferation in-vitro nach Antigenstimulation mit PT	43
4.2.1.2.	Vergleich des SI der drei Impfgruppen.....	44
4.2.2.	Lymphozytenproliferation in-vitro nach Antigenstimulation mit FHA....	44
4.2.2.1.	Stimulationsindex (SI) innerhalb der einzelnen Gruppen vor	44
	und nach Impfung	44
4.2.2.2.	Vergleich des SI der drei Impfgruppen.....	46
4.2.3.	Lymphozytenproliferation in-vitro nach Antigenstimulation mit PRN ...	46
4.2.3.1.	Stimulationsindex (SI) innerhalb der einzelnen Gruppen vor	46
	und nach Impfung	46
4.2.3.2.	Vergleich des SI der drei Impfgruppen.....	47
4.2.4.	Lymphozytenproliferation in-vitro nach Antigenstimulation mit FIM.....	48
4.2.4.1.	Stimulationsindex (SI) innerhalb der einzelnen Gruppen vor	48
	und nach Impfung	48
4.2.4.2.	Vergleich des SI der drei Impfgruppen.....	49
4.3.	Zytokinproduktion in PT-stimulierten Lymphozytenkulturen nach..... Impfung.....	49 49
4.4.	Immunophänotypisierung peripherer Lymphozyten und Untersuchung	52

der Expression von Aktivierungsmarkern nach Stimulation mit.....	52
Pertussisantigenen vor und nach Impfung	52
5. Diskussion	56
5.1. Pertussis-spezifische humorale Immunität bei Adoleszenten mit.....	56
unterschiedlicher Grundimmunisierung vor und nach azellulärer Pertussis-.....	56
Auffrischimpfung	56
5.2. Lymphozytenproliferation nach Stimulation mit Pertussis-spezifischen.....	65
Antigenen bei Adoleszenten mit unterschiedlicher Grundimmunisierung vor.....	65
nach azellulärer Pertussis-Auffrischimpfung	65
5.3. Zytokine und Th1- bzw. Th2-vermittelte Immunität.....	71
5.3.1. Verfahren zur Bestimmung von Zytokinen	71
5.3.2. Th1-betonte Immunantwort nach azellulärer Auffrischimpfung bei.....	72
Probanden mit Ganzkeim- und azellulärer Grundimmunisierung	72
5.4. Anstieg von CD69+ aktivierten CD8+ T-Zellen nach azellulärer	76
Auffrischimpfung	76
6. Zusammenfassung.....	79
7. Literaturverzeichnis	82
Abkürzungsverzeichnis	91
Danksagung	93

1. Einleitung

1.1. Pertussis allgemein

1.1.1. Epidemiologie

Das Bakterium *Bordetella pertussis* ist der Erreger des Keuchhustens. Pertussis ist eine endemische Erkrankung, die alle zwei bis fünf Jahre epidemisch auftritt (eine Periodik, die sich trotz weit verbreiteter Immunisierung hält) und in den Entwicklungsländern zu einer hohen Morbidität und Mortalität vor allem bei Säuglingen und Kleinkindern führt (Cherry et al. 2005).

Weltweit kommt es zu 20-40 Millionen Pertussis-Erkrankungen pro Jahr, der größte Anteil davon trifft die Entwicklungsländer mit 90%. Man geht von bis zu 400.000 Pertussis-bedingten Todesfällen pro Jahr aus, die meisten betreffen Säuglinge in den ersten sechs Lebensmonaten (Tan et al. 2005).

In den 1940ern wurde der Pertussis-Ganzkeimimpfstoff eingeführt und jahrelang weltweit eingesetzt. Die hohe Reaktogenität des Ganzkeimimpfstoffes und die Diskussion um nicht kausal belegte Zusammenhänge zwischen der Ganzkeim-Pertussisimpfung und seltensten, schweren neurologischen Ereignissen, wie Enzephalopathien, führten in vielen Ländern zu Bedenken bei Eltern und Pädiatern und zu sinkenden Durchimpfungsraten (Griffith 1989). Daraufhin folgte die Entwicklung von weniger reaktogenen azellulären Impfstoffen in den siebziger Jahren, diese wurden ab 1994 auch in Deutschland zugelassen.

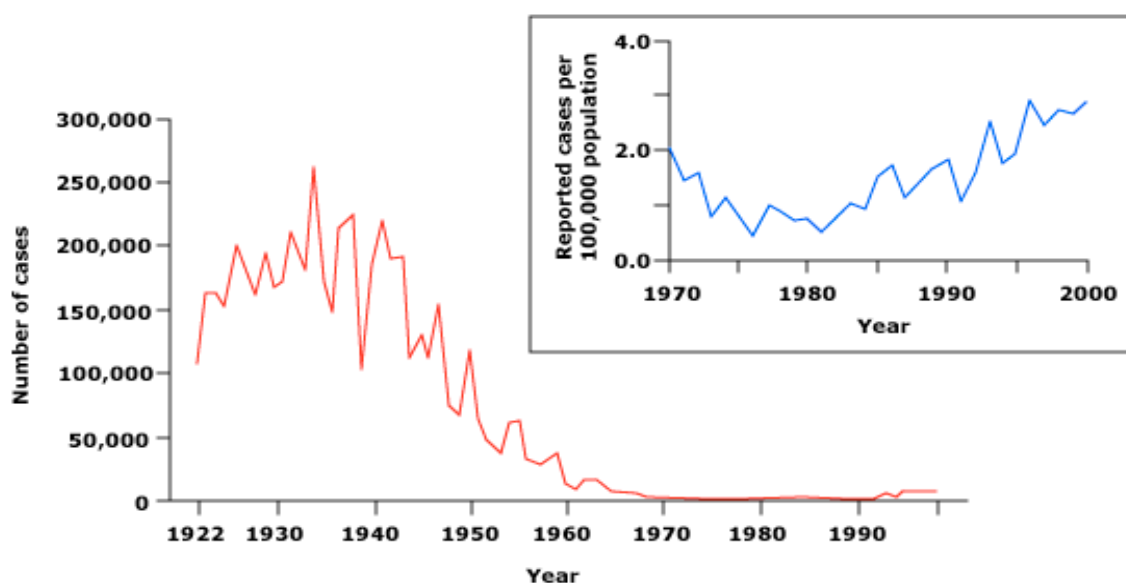


Abb. 1: In den vereinigten Staaten zwischen 1922-2000 gemeldete Pertussis-Fälle (Centers for Disease Control and Prevention).

Die Situation in Deutschland ist durch unterschiedliche Entwicklungen in den alten und neuen Bundesländern gekennzeichnet. Aktuelle Aussagen zur Pertussis-Inzidenz können hauptsächlich in Bezug auf die neuen Bundesländer getroffen werden, da nur in diesen eine Meldepflicht besteht. Der Wegfall der Impfpflicht in den alten Bundesländern zwischen 1974 bis 1991 führte zu einem Anstieg der Pertussis-Inzidenz mit bis zu 160-180 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner, seit der Wiedereinführung der Impfpflicht 1991 und dem Einsatz von azellulärem Impfstoff ab 1994 stieg die Durchimpfungsrate jedoch wieder deutlich an. Zwischen 1998 und 2006 stieg die Pertussis-Impfquote bei Schulanfängern von 57,7% auf 91,4%.

Die in der ehemaligen DDR 1964 eingeführte Pflichtimpfung für Säuglinge und Kleinkinder führte zu hohen Durchimpfungsraten. In den neuen Bundesländern sanken diese Anfang 1990 auf unter 75% ab. Obwohl ab 1995 wieder ein Anstieg der Durchimpfungsrate verzeichnet wurde (Pertussis-Impfquote bei Schulanfängern 2006: 95,5%), kam es bis 2006 zu einem kontinuierlichen Anstieg der Pertussis-Inzidenz auf 34,7 Erkrankungen/100.000 Einwohnern (4598 Fälle 2006) mit einer deutlichen Verschiebung der Erkrankung in das Jugend- und Erwachsenenalter (Robert-Koch-Institut 2007).

Diese Tendenz ist seit den achtziger Jahren in vielen Ländern mit langjährigen hohen Durchimpfungsraten festzustellen. Auch wenn es Unterschiede in den Entwicklungen je nach Impfprogrammen und deren Umsetzung sowie den vorhandenen Surveillance-Systemen gibt, steigt die Inzidenz vor allem bei älteren Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen generell an (Celentano et al. 2005; Edwards 2005; Tan et al. 2005). Ursächlich werden unterschiedliche Hypothesen diskutiert, unter anderem die nachlassende Immunität nach natürlicher Infektion und Impfung und geringere natürliche Auffrischung der Immunität durch nachlassenden Kontakt zu dem Erreger *B. pertussis* (Tan et al. 2005). Eine wichtige Rolle spielen sicherlich auch die erhöhte Aufmerksamkeit gegenüber Pertussis-Infektionen und verbesserte diagnostische Methoden, wie zum Beispiel der Nachweis von Pertussis-Nukleinsäure mittels PCR.

Bei Jugendlichen und Erwachsenen kommt es häufig zu milden und asymptomatischen Infektionen, die oft nicht als Pertussis-Erkrankungen erkannt werden (Black 1997). Infizierte symptomatische Jugendliche und Erwachsene können jedoch als Erregerreservoir dienen und als Überträger vor allem

ungeschützte Säuglinge gefährden. Deshalb ist es wichtig, den Impfschutz gegen Pertussis auch auf potentielle Überträger auszuweiten. Seit dem Jahr 2004 empfiehlt die STIKO eine Impfung ausdrücklich auch für Personen im häuslichen Umfeld von Säuglingen, die über keinen adäquaten Immunschutz gegen Pertussis verfügen (Kokonstrategie).

In der Zeitspanne zwischen 1998 und 2002 wurden in Deutschland 10,1 Pertussis-Fälle pro 100.000 Einwohner gemeldet (Celentano et al. 2005). Die Verschiebung der Erkrankung ins Jugend- und Erwachsenenalter wird deutlich in Daten aus den neuen Bundesländern, in denen 1980 noch etwa 50% der Erkrankungen im ersten Lebensjahr und weniger als 5% bei den ≥ 15 -Jährigen auftraten. In der Zeitspanne zwischen 2000 bis 2004 betrafen nur noch 1,2% der Erkrankungen Kinder im ersten Lebensjahr, 71% der Erkrankten waren ≥ 15 Jahre alt (Robert-Koch-Institut 2005).

1.1.2. Erreger und Virulenzfaktoren

Bordetella pertussis ist ein gram-negatives, aerobes, bekapseltes Stäbchenbakterium, das 1906 von Jules Bordet und Octave Gengou isoliert und als Erreger des Keuchhustens identifiziert wurde. Die ersten Beschreibungen des Krankheitsbildes finden sich 1578 durch Guillaume de Baillou, die Bezeichnung Pertussis erhielt die Krankheit 1679 von Sydenham aufgrund des charakteristischen anfallsartigen Hustens.

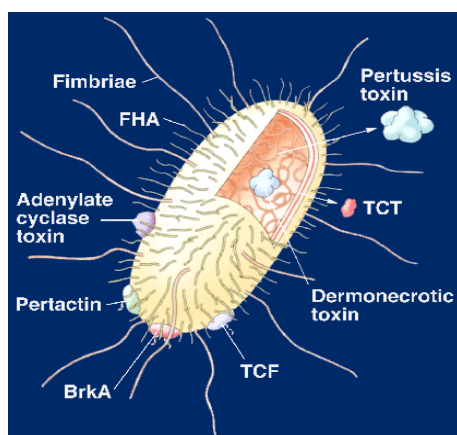


Abb. 2: *B. pertussis* mit den wichtigsten Virulenzfaktoren.

Eng verwandte Organismen von *B. pertussis* sind *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica*, die zu einer mildereren Verlaufsform der Erkrankung bzw. zu einer Infektion bei Haustieren führen können. *B. parapertussis* unterscheidet sich von *B.*

pertussis vor allem dadurch, dass es das kodierende Gen für Pertussistoxin nicht exprimiert.

B. pertussis enthält Virulenzfaktoren und produziert Toxine, die unter anderem für die Anhaftung des Organismus an das zilientragende Epithel des Respirationstraktes, für die lokalen und für die systemischen Reaktionen verantwortlich sind.

Außerdem tragen diese Faktoren zur Persistenz und Verbreitung des Erregers bei und modulieren die Immunantwort des Wirtes (Mills 2001).

Das Pertussistoxin (PT) ist das bedeutendste Exotoxin des Bakteriums und besitzt eine für bakterielle Exotoxine klassische Aufteilung in eine A-B Klasse. Die aus fünf Untereinheiten bestehende B-Oligomer-Bindungsuntereinheit ist für die Bindung an zilienbesetztes Epithel des Respirationstraktes, an Lymphozyten und an Makrophagen verantwortlich. Der enzymatisch aktive A-Promoter katalysiert die ADP-Ribosylierung von G-Proteinen, die an der Signaltransduktion in eukaryonten Zellen beteiligt sind. Dies führt zu den Wirkungen des PT, unter anderem zur Induktion der Lymphozytose, Histaminsensibilisierung, Insulinsekretion mit folgender Hypoglykämie und der mitogenen Potenz. Zusätzlich werden dem PT selbst Adjuvanseigenschaften zugeschrieben, die eine selektive Immunantwort auslösen (Ryan et al. 1998). PT ist in gereinigter, inaktivierter Form fester Bestandteil aller azellulären Impfstoffe.

Weitere Virulenzfaktoren, die als Adhäsionsfaktoren der Anheftung an das zilienbesetzte Epithel des Respirationstraktes dienen, sind das filamentöse Hämagglutinin (FHA), Pertactin (PRN) und Fimbrien vom Typ 2/3 (FIM). Diese Antigene sind in azellulären Impfstoffen zusammen mit PT in unterschiedlichen Kombinationen und Konzentrationen enthalten.

FHA wird eine besondere Rolle in der Persistenz des Pathogens im Respirationstrakt zugesprochen. Es unterdrückt beziehungsweise verzögert die Ausbildung der schützenden zellvermittelten Immunität (Th1-Antwort) durch IL-10 abhängige IL-12-Suppression. FHA stimuliert die antiinflammatorische IL-10 Produktion durch Bindung an den CR3-Rezeptor von Makrophagen und dendritischen Zellen, wodurch die IL-12 Produktion inhibiert wird (McGuirk and Mills 2000; McGuirk et al. 2002), die für die Induktion von Th1-Zellen verantwortlich ist.

PRN ist ein 69-kDa Oberflächenprotein, das neben der Funktion der Adhäsion des Pathogens eine verstärkende Wirkung auf den suppressiven Effekt von FHA auf die IL-12 Produktion zeigt (McGuirk and Mills 2000). Mooi et al. konnten bei *B. pertussis*

Wildtyp-Infektionen die Existenz von genetischen Variationen des PRN nachweisen, die nicht in den in Holland verwendeten Ganzkeimimpfstoffen enthalten waren und möglicherweise die Erklärung für eine nachlassende Wirksamkeit dieser Impfstoffe sind (Mooi et al. 1998; Mooi et al. 2001).

Fimbrien haben eine besondere Bedeutung als Adhäsionsfaktoren. Ihnen kommt eine wichtige Rolle bei der Kolonisierung des Respirationstraktes zu, da sie zur Anheftung des Bakteriums an das respiratorische Flimmerepithel und an Monozyten beitragen und zusätzlich zur Persistenz des Erregers im Respirationstrakt führen. Es wird angenommen, dass die Untereinheit FimD zusätzlich die immunmodulatorischen und anti-inflammatorischen Effekte von FHA über Aktivierung einer CR3 Expression auf Monozyten unterstützt.

Das Adenylatzyklase-Endotoxin kann aufgrund eines hämolysierenden Enzyms in Zellen aufgenommen werden, dort katalysiert es die Produktion großer Mengen von zyklischem AMP, welches zu einer Inhibition phagozytärer Funktionen führt, die zellulären Signalwege stört und das Immunsystem des Wirtsorganismus schwächt (Mills 2001). Der intrazellulär erhöhte cAMP-Spiegel bei mit *B. pertussis* infizierten Monozyten ist mit einer erniedrigten Produktion von TNF- α und geringeren Ausschüttung von Superoxidanionen assoziiert, zusätzlich wird dem Adenylatzyklase-Endotoxin die Fähigkeit zugeschrieben, Apoptose bei mit *B. pertussis* infizierten Makrophagen auszulösen.

Das Trachea-Zytotoxin (TCT; tracheal cytotoxin), Teil eines Peptidoglykans der Zellwand, führt zu einer Paralyse und lokalen Zerstörung des respiratorischen Flimmerepithels. Weitere zytotoxische Effekte werden der TCT-vermittelten NO-Produktion und der Induktion von IL-1 zugeschrieben (Heiss et al. 1993; Heiss et al. 1994). TCT wirkt nicht immunogen und ist schwer aufzubereiten, weshalb es nicht als Antigen in den Impfstoffen verwendet werden kann (Hewlett 1997).

1.1.3. Pathogenese

Die Übertragung erfolgt über hoch kontagiöse Tröpfchen durch Luftübertragung und selten auch durch Schmierinfektionen, es kommt bei dem Wirtsorganismus zu einer Besiedlung des respiratorischen Flimmerepithels im Rachenraum. Individuen, die keine Immunität gegen *B. pertussis* erworben haben, sei es durch Impfung oder

Erkrankung, sind sehr empfänglich gegenüber der Infektion. Bei diesen naiven Individuen führt die Infektion meist, jedoch nicht zwangsläufig zu einer typischen symptomatischen Erkrankung (Hewlett 1997).

Die Virulenzfaktoren und Toxine von *B. pertussis* führen zu einer Adhäsion an das zilienbesetzte Epithel und teilweise zur intrazellulären Aufnahme der Erreger. Die verschiedenen Mechanismen der Schädigung des Wirtsorganismus und Umgehung der Abwehrmechanismen ergänzen sich so, dass es zu einer Vermehrung und Ausbreitung des Erregers entlang der Bronchiolen kommen kann. Histopathologische Untersuchungen des Lungengewebes von an Pertussis verstorbenen Säuglingen beschreiben nekrotisierende Bronchiolitiden, intraalveoläre Hämorrhagien, fibrinöse Ödeme und ausgeprägte Leukozytosen (Paddock et al. 2008).

Das PT kann in den Blutkreislauf übertreten, auf diese Weise lassen sich die systemischen Wirkungen erklären. Die Pathogenese der neurologischen Symptome wie Enzephalopathien und Krampfanfälle ist noch nicht vollständig bekannt. Ursächlich können indirekte Wirkungen des PT, wie die Hypoxie des Gehirns infolge des schweren anfallsartigen Hustens und durch den Druckanstieg entstehende petechiale zerebrale Blutungen, sowie metabolische Entgleisungen (Fauci 2005; Geddes and Talbert 2006; Edwards KM 2008) sein. Auch eine direkte Wirkung der Toxine und durch sie induzierter Zytokine auf das Gehirn ist möglich (Mills 2001). Die intravenöse Injektion von aktivem PT bei Erwachsenen hat in einer Studie von Griffith et al. jedoch keine Nebenwirkungen dieser Art hervorgerufen (Griffith 1989).

1.1.4. Krankheit / Klinik

Der typische Erkrankungsverlauf bei Infektion mit *B. pertussis* zeigt sich hauptsächlich bei Kindern und ist in drei Stadien eingeteilt, die nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich 7-14 Tagen auftreten:

Zu Beginn steht das ein- bis zweiwöchige Stadium catarrhale mit typischen Symptomen eines oberen Atemwegsinfektes (wie Husten, Schnupfen, subfebrilen Temperaturen und allgemeinem Krankheitsgefühl), aus dem sich dann das Stadium convulsivum mit den charakteristischen vor allem nachts auftretenden anfallsartigen Hustenanfällen mit juchzender Inspiration und evtl. posttussivem Erbrechen entwickelt. Dieses Stadium dauert durchschnittlich 4-6 Wochen und geht häufig mit

schwerer Atemnot bis zur Zyanose und bei Säuglingen mit lebensgefährlichen Apnoe-Phasen einher. Zwischen den Hustenattacken können die Patienten bis auf eine zunehmende Müdigkeit symptomfrei sein, im Blutbild ist häufig eine ausgeprägte Lymphozytose bei milder Leukozytose zu erkennen.

Die anfallsartigen schweren Hustenattacken klingen im Stadium decrementi langsam ab, dies kann sich über mehrere Monate hinziehen.

Bei Jugendlichen und Erwachsenen kommt es in bis zu 50% der Fälle zu typischen Pertussis-Infektionen mit paroxysmalen Hustenattacken, jedoch auch mildere oligo- bis asymptomatische Infektionen können auftreten, die sich vor allem in prolongiertem Husten manifestieren und häufig fehldiagnostiziert werden bzw. unerkannt bleiben (Cherry et al. 2005). Es kommt durch vorangegangene Pertussis-Infektionen bzw. Impfungen gegen Pertussis zu einer Modifikation des Krankheitsverlaufes. Nach einer vorangegangenen Erkrankung ist die Wahrscheinlichkeit höher bei erneuter Infektion an einer typischen Pertussis zu erkranken als nach erfolgter Immunisierung (Cherry et al. 2005).

Erkrankte Individuen sind vor allem im Stadium catarrhale und in den ersten zwei Wochen nach Beginn des Hustens ansteckend, nach Beginn einer Antibiotikatherapie geht man von einer noch ca. 5-tägigen Infektiosität aus.

Es existieren unterschiedliche Definitionen von Pertussis-Erkrankungen, die zur Diagnosestellung eingesetzt werden. Die WHO-Definition von 1991 erfasst vor allem die typischen Pertussis-Erkrankungen und beinhaltet die Kriterien paroxysmaler Husten >21 Tage und eine positive *B. pertussis*-Kultur bzw. signifikante Titeranstiege von PT-/FHA-IgA bzw. -IgG im ELISA. Atypische und subklinische Infektionen werden mit dieser Definition nicht erfasst. Eine neuere Definition der WHO (2000) unterscheidet klinische von laborbestätigten Diagnosen und erfasst somit ein breiteres Spektrum an Infektionen und Erkrankungen. Die klinische Diagnose ist definiert durch eine ärztlich diagnostizierte Erkrankung oder Husten > 2 Wochen plus mindestens einem der folgenden Punkte: anfallsartiger Husten, inspiratorisches Juchzen oder Erbrechen nach dem Hustenanfall. Laborbestätigte Fälle sind definiert durch die Isolation von *B. pertussis*, Nachweis von Pertussis-Nukleinsäure mittels PCR oder gepaarte positive Serologie.

1.1.5. Komplikationen

Die Komplikationen der Pertussis-Erkrankung sind häufig Pneumonien und Otitis media durch Sekundärinfektion mit Streptokokken und *Hämophilus influenzae*. Insbesondere bei Säuglingen kann es anstelle oder vor Auftreten des anfallsartigen Hustens zu lebensbedrohlichen Apnoen kommen. Durch gesteigerten intrathorakalen Druck während der Anfälle kann es zu Petechien im Kopfbereich, vor allem der Konjunktiven und außerdem zu abdominalen und inguinalen Hernien sowie seltener zum Pneumothorax kommen. Es kann durch verringerte Nahrungsaufnahme und gehäuftes Erbrechen besonders bei unterernährten Kindern zur Malnutrition kommen. Seltener, jedoch gefürchtete Komplikationen sind Pertussis-Enzephalopathien (siehe 1.1.3.) unterschiedlicher Ausprägung, die in einem Drittel der Fälle zu bleibenden neurologischen Schäden führen können und mit Krampfanfällen und Bewusstseinsstörungen einhergehen können.

1.1.6. Therapie

Es empfiehlt sich eine frühzeitige antibiotische Therapie mit Makroliden, die zu einer Eradikation der infizierenden Bakterien im Nasopharynx führen. Der klinische Verlauf wird jedoch nur bei Behandlungsbeginn im frühen Stadium catarrhale beeinflusst, da die Symptome und der Langzeitverlauf vor allem durch die Toxine des Erregers verursacht werden.

Der Patient ist während des Stadium catarrhale und während der ersten drei Wochen der Hustenerkrankung infektiös. Eine Behandlung in diesen Stadien ist zur Unterbrechung der Infektionskette von Bedeutung und reduziert die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung auf andere durch Verkürzung der kontagiösen Phase. Das langjährig angewandte Erythromycin wurde durch neuere Makrolide wie Roxithromycin, Clarithromycin und Azithromycin ergänzt. Diese weisen eine bessere Pharmakokinetik auf, sind besser verträglich (weniger gastrointestinale NW) und zeigen eine vergleichbare Wirksamkeit (Langley et al. 2004). Es hat sich herausgestellt, dass eine 7-tägige Therapiedauer mit Makroliden offensichtlich genauso effektiv ist wie eine Therapiedauer von 14 Tagen (Halperin et al. 1997). Als

Alternative zu Makroliden kann bei seltener Resistenz des Erregers oder bei Makrolid-Nebenwirkungen Cotrimoxazol eingesetzt werden.

Chemoprophylaxe mit Antibiotika bei Haushaltsmitgliedern und engeren Kontaktpersonen der Erkrankten wird empfohlen, um Erkrankungen zu verhindern, mögliche Infektionsquellen und somit eventuelle Übertragungen auf besonders gefährdete Säuglinge einzudämmen und Kontakt-Personen mit erhöhtem Risiko zu schützen (Altunaiji et al. 2005).

Erkrankte Säuglinge sollten wegen des hohen Risikos der Komplikationen stationär aufgenommen, isoliert und aufgrund der möglichen Apnoen mit einem Atemmonitor überwacht werden.

1.2. Prävention

1.2.1. Impfeempfehlungen aktuell

Die Empfehlungen der STIKO (Ständige Impfkommission) am Robert Koch-Institut orientieren sich an den international anerkannten Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO). Es wird eine Grundimmunisierung von Säuglingen beginnend im Alter von 2 Monaten mittels eines Kombinationsimpfstoffes gegen Diphtherie, Tetanus, Pertussis, *Hämophilus influenzae* Typ b, Hepatitis B und Poliomyelitis empfohlen, die aus 3 Impfungen im Alter von 2, 3 und 4 Monaten sowie einer Impfung im Alter zwischen 11-14 Monaten besteht.

Eine Auffrischimpfung für Pertussis, Tetanus und Diphtherie (TdaP; Kombinationsimpfstoff mit Tetanus-, Diphtherie- und azellulärem Pertussisimpfstoff) ist für Jugendliche im Alter von 9-17 Jahren empfohlen, seit 2006 empfiehlt die STIKO außerdem eine weitere Auffrischung TdaP im Alter von 5-6 Jahren. Nach der Impfung im Alter von 5-6 Jahren sollte auf einen Impfabstand von mindestens 5 Jahren zur nächsten Dosis geachtet werden, um Lokalreaktionen zu vermindern.

In den neuesten Impfeempfehlungen der STIKO von 2009 wird erstmalig auch die Auffrischimpfung aller Erwachsenen empfohlen; diese sollen bei der nächsten fälligen Td-Impfung einmalig eine TdaP-Kombinationsimpfung erhalten.

Um Säuglinge besser zu schützen ist bei fehlender adäquater Immunität eine Indikationsimpfung bei Frauen mit Kinderwunsch präkonzeptionell und bei engen Haushaltsmitgliedern (Mutter, Vater, Geschwister und Großeltern) und Betreuern 4

Wochen vor Geburt des Kindes sinnvoll. Auch beruflich exponierte Personen, wie z. B. Personal in der Pädiatrie und der Kinderbetreuung, sollten über einen adäquaten Immunschutz verfügen und deshalb regelmäßig im Abstand von 10 Jahren mit Antigen-reduziertem azellulären Impfstoff geimpft werden.

1.2.2. Passive Immunisierung

Die Datenlage zur Effektivität passiver Immunisierung bei Erkrankung ist uneinheitlich. Eine transplazentäre Übertragung von mütterlichen FHA- und PRN-Antikörpern auf den Säugling ist nachgewiesen, diese Antikörpertiter bieten jedoch keinen sicheren Schutz vor Erkrankung (Isacson et al. 1995).

Die i.v.-Gabe von Immunglobulinen gegen PT in Studien am Mausmodell war mit einer Abnahme der Mortalität nach Provokation mit Erreger-haltigem Aerosol assoziiert (Bruss and Siber 1999). Ältere Studien mit Immunglobulingabe bei erkrankten Säuglingen konnten eine Verkürzung und Milderung des anfallsartigen Hustens belegen (Granstrom et al. 1991), wohingegen neuere Studien bei Säuglingen keine Besserung oder Milderung der Symptome durch Immunglobuline im Vergleich zu Placebo nachweisen konnten (Halperin et al. 2007).

1.3. Pertussis – Immunität nach Infektion und Erkrankung

1.3.1. Serologische Immunität

Die Entwicklung moderner diagnostischer Möglichkeiten, wie zum Beispiel der PCR, und die Erkenntnis, dass es nach durchgemachter Pertussis-Erkrankung auch zu weiteren weniger symptomatischen oder asymptomatischen Infektionen kommen kann, widerlegte die früher vertretene Meinung, eine stattgefundene Erkrankung mit Pertussis-Erregern führe zu einer lebenslangen Immunität. Heute geht man letztlich davon aus, dass in vielen Fällen die Immunität gegen *B. pertussis* nach der Erstinfektion durch wiederholte Exposition gegenüber dem Erreger auch ohne Erkrankung aufrechterhalten wird. Verschiedene Studien gehen von sehr unterschiedlicher Dauer der durch Infektion erworbenen Immunität aus, die Angaben reichen von 7-10 bis zu 20 Jahren (Wendelboe et al. 2005). Eine

Haushaltskontaktstudie von Wirsing von König et al. beschreibt, dass Erwachsene mit einer länger als 20 Jahre zurückliegenden Infektion erneut für eine Reinfektion empfänglich sind und ähnliche Symptome aufweisen, wie noch nie zuvor an Pertussis erkrankte Personen (Wirsing von König et al. 1995).

Zum besseren Verständnis von Pertussis ist die Unterscheidung zwischen einer Pertussisinfektion (charakterisiert durch den Nachweis mittels Kultur, Serologie oder PCR, oligo- bis asymptomatisch) und einer Pertussis-Erkrankung (zusätzlich Symptome wie Husten usw.) nötig (Liese 2005).

Die Pertussis-Erkrankungen führen zu einer Bildung von IgG-Antikörpern gegen PT (Ausiello et al. 2000). Bezüglich der Datenlage zu Induktion von Antikörpern gegen PT bei asymptomatischen Infektionen bestehen unterschiedliche Auffassungen. Es existieren einerseits Arbeiten, in denen postuliert wird, dass subklinische Infektionen nicht zu einer Bildung von Antikörpern gegen PT führen (Isacson et al. 1993; Ausiello et al. 1999). Ergebnisse anderer Arbeiten hingegen sprechen für eine Induktion von PT-Antikörpern durch subklinische Infektionen. Des Weiteren wird vermutet, dass die Induktion von PT-Antikörpern zusätzlich von der Schwere der Infektion abhängig ist (Thomas et al. 1989; Long et al. 1990; Storsaeter et al. 1992). Außerdem kommt es bei der Erkrankung sehr häufig auch zu einem Anstieg der Antikörper gegen die anderen Antigene FHA, PRN und FIM (Isacson et al. 1993; Mink et al. 1994). Die Seropositivität in Bezug auf PT wird als ein mögliches Merkmal diskutiert, aufgrund dessen eine Unterscheidung zwischen Kindern mit durchgemachter Pertussis-Erkrankung und Kindern mit subklinischer Infektion möglich ist (Ausiello et al. 2000).

Im Falle einer subklinischen Infektion wird davon ausgegangen, dass es zu einem Anstieg der Antikörper gegen die Antigene, die maßgeblich an der Anhaftung der Erreger am Organismus beteiligt sind, kommt. Dazu gehören PRN und FHA (Isacson et al. 1995; Ausiello et al. 2000). Isacson et al. berichteten über einen Anstieg der Pertussis-Antikörper gegen PRN und FHA in den ersten drei Lebensjahren von Kindern ohne Symptome einer Infektion, die mit einem Impfstoff geimpft wurden, der nur PT enthielt. Dabei müssen neben einer subklinischen Infektion mit *B. pertussis* auch andere Ursachen in Betracht gezogen werden, unter anderem Infektionen mit *B. parapertussis* und verschiedenen Hämophilus-Spezies. Diese besitzen dem FHA- und PRN-ähnliche Antigene, die zur Bildung kreuzreagierender Antikörper führen können. Die nachgewiesenen Antikörpertiter waren bei subklinischer Infektion jedoch niedriger als nach einer Pertussis-Erkrankung.

Die Bildung und der Nachweis von IgA-Antikörpern sprechen für eine Infektion mit dem Pertussis-Erreger, während die reine intramuskuläre Impfung kaum Bildung von IgA-Antikörpern induziert (Long et al. 1990; Cherry et al. 1995). Dies ist unter anderem auch wichtig für die serologische Diagnose einer Pertussis-Erkrankung und differentialdiagnostische Überlegungen. IgA-Antikörpern wird eine schützende Rolle in der Verhinderung der Anhaftung der Erreger im zilienbesetzten Epithel des Respirationstraktes bzw. in der Beseitigung der Erreger zugesprochen, sie werden bei Infektion in der Mukosa des Nasopharynx sezerniert (Mills 2001).

Die Aufgabe der durch Kontakt mit dem Erreger induzierten Antikörper besteht vor allem in der Toxin-Neutralisation, der Antigen-Opsonisierung und der Verhinderung der Anheftung des Bakteriums an zilienbesetztes Epithel im Respirationstrakt.

1.3.2. Zelluläre Immunität

Immunität gegenüber Pertussis lässt sich nicht allein durch protektive Antikörper erklären, eine wichtige Rolle wird auch der zellvermittelten Immunität zugesprochen. So weisen zum Beispiel Säuglinge nur einen inkompletten Nestschutz gegenüber Pertussis auf, auch wenn bei vorhandener Immunität der Mutter diaplazentar übertragene maternale Antikörper in ihrem Blut nachweisbar sind (Van Savage et al. 1990; Healy et al. 2004). Ein Erklärungsansatz hierfür könnte möglicherweise die fehlende zelluläre Immunität bei Säuglingen sein. Auch die in einer Studie gemessenen, innerhalb von 2 Monaten rapide absinkenden Antikörpertiter bei den Säuglingen können ursächlich für die hohe Empfänglichkeit der Säuglinge gegenüber Pertussis-Infektionen sein (Healy et al. 2004).

Bevor 1969 C. Cheers und ihre Kollegen entdeckten, dass *B. pertussis* eine intrazelluläre Phase hat, ging man davon aus, dass *B. pertussis* ausschließlich ein extrazellulärer Erreger sei (Cheers and Gray 1969). In einer Studie mit HIV-positiven Kindern wurden aus BAL-Material (bronchoalveoläre Lavage) pulmonale Makrophagen isoliert, bei denen in einigen intrazelluläre Pertussis-Erreger nachgewiesen werden konnten (Bromberg et al. 1991). Die Entdeckung, dass *B. pertussis* auch in Säugetierzellen wie Makrophagen, polymorphkernigen Leukozyten und Epithelzellen des Respirationstraktes eindringen und dort persistieren kann (Saukkonen et al. 1992; Steed et al. 1992), hat eine Neubewertung des

Mechanismus der protektiven Immunität gegenüber Pertussis mit sich gebracht. In Tierversuchen mit *B. pertussis* konnte gezeigt werden, dass ein Schutz vor Pertussis-Erkrankung durch T-Zellen auch in der Abwesenheit nachweisbarer Antikörpertiter gegeben ist. Der Transfer CD4⁺ T-Zellen immuner Mäuse auf nicht-immune oder immunsupprimierte Mäuse führte nach intrabronchialer Exposition gegenüber Pertussis-Erregern nachweisbar zum Schutz vor Erkrankung, trotz fehlender Antikörper gegenüber Pertussis. Weitere Hinweise für die unverzichtbare Rolle von T-Zellen in der erworbenen Immunität gegen *B. pertussis* finden sich auch in der Beobachtung, dass Mäuse ohne Thymus nicht in der Lage sind, eine Pertussis-Infektion des Respirationstraktes zu bekämpfen, die Übertragung von T-Zellen immuner Mäuse ihnen jedoch Schutz verleiht (Mills et al. 1993). Zellvermittelte Immunität scheint äußerst wichtig in der Bekämpfung einer Primärinfektion und im Schutz vor darauf folgenden Infektionen zu sein. In frühen Studien zur zellvermittelten Immunität konnte eine Antigen-spezifische Proliferation von T-Zellen gegen eine Vielzahl von *B. pertussis*-Antigenen bei geimpften sowie zuvor erkrankten Probanden gezeigt werden (Di Tommaso et al. 1991; Peppoloni et al. 1991).

Dabei sind nicht nur T-Helferzellen von Bedeutung, auch zytotoxischen T-Zellen wird eine wichtige Position in der Eliminierung intrazellulär persistierender Erreger zugesprochen (Hewlett 1997). Nach bzw. während natürlicher Infektion oder Erkrankung mit *B. pertussis* bei Kindern kommt es zu einer vorwiegenden Typ 1 Zytokin-Antwort mit Sekretion von Interferon- γ und IL-2 und Aktivierung von CD4⁺ Th1-Zellen (Peppoloni et al. 1991; Ryan et al. 1997). In der Studie von Ryan et al. 1997 konnten auch bei einigen ungeimpften, „naiven“ Kindern *B. pertussis*-spezifische T-Zellproliferationen nachgewiesen werden. Dies spricht möglicherweise für subklinische Infektionen mit Pertussis bei diesen Kindern, bei denen eine natürliche Exposition somit zur Ausbildung einer Grundimmunität und wiederholte Exposition sogar zur Entwicklung einer Langzeit-Immunität beigetragen haben könnte.

Während eines Pertussis-Ausbruchs an einer Schule wurde eine prospektive Studie von Minh et al. 1999 durchgeführt, diese ergab, dass eine hohe in-vitro Proliferation von T-Zellen nach Stimulation mit PT, FHA oder PRN negativ mit klinischer Erkrankung korrelierte (Tran Minh et al. 1999). Die Messung der Antikörpertiter zeigte keine Assoziation zwischen Titerhöhe und klinischem Verlauf. Auch diese

Beobachtungen deuten auf einen schützenden Effekt der zellvermittelten Immunität gegen Infektion und symptomatische Erkrankung hin.

1.4. Pertussis – Immunantwort nach aktiver Impfung

1.4.1. Immunität und Reaktogenität nach Impfung mit Ganzkeim-Impfstoff

Die Isolierung und Kultivierung von *B. pertussis* durch Jules Bordet und Octave Gengou in Brüssel ermöglichte 1906 die Entwicklung des ersten Ganzkeim-Impfstoffes mit inaktivierten Bordetellen gegen Keuchhusten. Durch zunehmendes Wissen und bessere Produktionsmethoden entstanden in den vierziger Jahren standardisierte Ganzkeim-Impfstoffe, die in ihrer Qualität mit den heutigen Ganzkeim-Impfstoffen zu vergleichen sind. In dieser Zeit wurde auch der Kendrick-Test zur Prüfung der Effizienz und Immunogenität von Ganzkeim-Impfstoffen entwickelt. Für diesen Test wurden 14-17 Tage zuvor intraperitoneal immunisierten Mäusen letale Dosen von lebenden Erregern ($n=100.000$) intrazerebral verabreicht. Die Bestimmung der Wirksamkeit der Impfstoffe erfolgte durch den Vergleich der Überlebensrate in den zwei Impfgruppen nach 14 Tagen. Die protektive Potenz der so bei Mäusen getesteten Ganzkeimimpfstoffe korrelierte gut mit der in Studien getesteten Wirksamkeit der Impfstoffe bei Menschen (Mills 2001).

Nach Impfung mit Ganzkeimimpfstoffen kommt es wie nach natürlicher Infektion hauptsächlich zu einer Aktivierung von Th1-Zellen und einer Sekretion von Typ-1 Zytokinen, vor allem Interferon- γ und IL-2 (Ausiello et al. 1997; Ryan et al. 1998). Die Impfung mit Ganzkeimimpfstoffen führt im Bereich der humoralen Immunantwort zu einer vorwiegenden Bildung von IgG-Antikörpern gegen PT, FHA, PRN und FIM (Mink et al. 1994). Die durch Inaktivierung ganzer Bakterien hergestellten Ganzkeimimpfstoffe enthalten aus verfahrenstechnischen Gründen eine Anzahl an nicht eindeutig charakterisierbaren Bestandteilen, deren Einfluss auf Immunogenität und Nebenwirkungen schwer absehbar ist. Ganzkeim-Impfstoffe sind häufiger mit Nebenwirkungen wie lokalen Reaktionen an der Einstichstelle mit Rötung, Schwellung und Schmerzen sowie systemischen Reaktionen wie Fieber, Benommenheit und grippeähnlicher Symptomatik assoziiert als azelluläre Impfstoffe (Pichichero et al. 1997). Als seltener vorkommende Nebenwirkungen wurden Fieberkrämpfe, anhaltendes schrilles Schreien und hypotone-hyporesponsive

Episoden beschrieben. Die seit den siebziger Jahren weit verbreiteten Befürchtungen, die Ganzkeim-Impfungen seien in seltenen Fällen kausal mit Enzephalopathien und SIDS verknüpft, konnten nicht bewiesen werden (Griffith 1989; Miller et al. 1989; Miller et al. 1993; Pediatrics 1996).

In Studien zur Wirksamkeit und Immunogenität von Ganzkeimimpfstoffen zeigt sich eine sehr unterschiedliche Effektivität der verschiedenen Impfstoffe. Dabei muss berücksichtigt werden, dass den unterschiedlichen Studien verschiedene Fall-Definitionen zur Beurteilung der Impfstoff-Wirksamkeit zugrunde gelegt werden. Ein von Connaught Laboratories in den USA hergestellter Impfstoff ergab eine sehr niedrige Wirksamkeit von 48% nach drei Impfungen in einer schwedischen Studie (Gustafsson et al. 1996) und von nur 36% in einer italienischen Studie (Greco et al. 1996). In beiden Studien wurde nach den Kriterien der WHO die primäre Falldefinition als das Auftreten von anfallsartigem Husten an mindestens 21 aufeinander folgenden Tagen plus Kultur-bestätigter Pertussis-Infektion oder serologischem Nachweis eines $\geq 100\%$ Anstieges von IgG- bzw. IgA-Antikörpern gegen PT oder Kontakt mit einem Kultur-bestätigten infizierten Haushaltsmitglied mit mindestens 21 Tagen anfallsartigem Husten definiert. Die Impfstoff-Wirksamkeit wurde mit folgender Formel berechnet: $1 - R$, wobei R das Verhältnis der Inzidenz von Pertussis bei den Empfängern des Ganzkeimimpfstoffes und der Inzidenz von Pertussis bei den Kontrollen darstellt. Bessere Ergebnisse erzielte unter anderem ein deutscher, von den Behringwerken hergestellter DTP-Impfstoff. In einer Mainzer Studie erreichte dieser Impfstoff eine Wirksamkeit von 98% (Schmitt et al. 1996), derselbe Impfstoff führte zu einer 97% Wirksamkeit in einer Studie in München (Liese et al. 1997). In beiden Studien erreichte der Ganzkeimimpfstoff eine höhere Wirksamkeit als der azelluläre Vergleichsimpfstoff. Die Wirksamkeit des Impfstoffes bezieht sich in beiden Studien auf die Fähigkeit zur Verhinderung einer typischen Keuchhustenerkrankung mit anfallsartigem Husten ≥ 21 Tage und mit positiver *B. pertussis* Kultur. Insgesamt bieten die Ganzkeimimpfstoffe einen guten Schutz vor Erkrankung, werden jedoch aufgrund der niedrigeren Reaktogenität der azellulären Impfstoffe in Industrienationen kaum noch eingesetzt. In den Entwicklungsländern werden weltweit jedoch weiterhin meist Ganzkeimimpfstoffe eingesetzt.

1.4.2. Immunität und Reaktogenität nach Impfung mit azellulärem Impfstoff

Die Entwicklung azellulärer Impfstoffe wurde vor allem von den öffentlichen Bedenken im Bezug auf die Reaktogenität der Ganzkeimimpfstoffe vorangetrieben. Zunehmende Kenntnisse der Biologie des Erregers und der Erkrankung und neue Techniken in der Gewinnung immunogener Antigene in größerer Menge und Reinheit ermöglichten die Entwicklung und Testung einer Vielzahl an neuen azellulären Impfstoffen. Diese Entwicklung fand zunächst vor allem in Japan statt, wo die erste Generation azellulärer Impfstoffe seit 1975 entwickelt wurde. Obwohl nicht bewiesen werden konnte, dass die der Impfung mit dem Ganzkeimimpfstoff zugeschriebenen schweren Reaktionen wie Enzephalopathie und SIDS (sudden infant death syndrome) kausal mit der Impfung zusammenhängen, wird in industrialisierten Ländern aufgrund seiner geringeren Reaktogenität und somit deutlich besseren Verträglichkeit vorwiegend der azelluläre Impfstoff eingesetzt.

Zur Verwendung kam in allen bisherigen Impfstoffen chemisch inaktiviertes Pertussistoxoid oder gentechnisch synthetisiertes Pertussistoxoid, wobei Toxoid ein Ausdruck für ein nicht-toxisches Analogon des Pertussistoxins ist (im Weiteren wird PT als Synonym für Pertussistoxin und Pertussistoxoid verwendet). Die ersten azellulären Impfstoffe enthielten vornehmlich FHA und kleinere Mengen an inaktiviertem PT (Takeda Impfstoffe). Bald folgten weitere Impfstoffe, die zusätzlich zu höheren Dosen PT auch PRN und FIM enthielten.

Die Ergebnisse einiger Studien deuten darauf hin, dass azelluläre Impfstoffe, die mehrere Pertussis-Antigene enthalten, möglicherweise effizienter sind als solche, die nur PT oder PT und FHA enthalten (Cherry et al. 1998; Storsaeter et al. 1998). So wird von einigen Autoren die Meinung vertreten, dass die zusätzliche Verwendung von PRN und FIM eine größere Wirksamkeit aufweist als der alleinige Einsatz von PT und FHA (Gustafsson et al. 1996). Unabhängig von diesen Feststellungen konnte gezeigt werden, dass auch ausschließlich PT-enthaltende Impfstoffe Immunität verleihen können und klinischen Schutz bieten (Trollfors et al. 1995). Außerdem konnte in einer anderen Studie nachgewiesen werden, dass der 1995 als erster in Deutschland zugelassene azelluläre Biken-Impfstoff, der die Antigene PT und FHA enthält, mit einer Wirksamkeit von 96% einen guten Schutz vor typischer Pertussis-Erkrankung mit anfallsartigem Husten ≥ 21 Tage bietet (Liese et al. 1997). Eine Langzeitwirksamkeit konnte für eine Dauer bis 6 Jahre nach Impfung nachgewiesen

werden (Liese et al., Vortrag ICAAC 2003). In der Diskussion um Unterschiede in der Wirksamkeit azellulärer Impfstoffe im Schutz vor Infektion und symptomatischer Erkrankung ist zu bedenken, dass der individuelle Schutz vor typischer symptomatischer Pertussis-Erkrankung weitaus bedeutender für die Gesundheit der Geimpften ist als der Schutz vor Infektion oder einer Erkrankung mit milder Symptomatik. Auf der anderen Seite wäre ein Schutz gegen oligosymptomatische Infektionen wünschenswert, um die Übertragung von *B. pertussis* möglichst weiter einzuschränken. Es konnte gezeigt werden, dass auch Ein-Komponenten azelluläre Pertussis-Impfstoffe durch eine verminderte Zirkulation von *B. pertussis* zur Herdenimmunität beitragen (Liese et al. 2001; Taranger et al. 2001).

Impfung mit azellulären Impfstoffen führt im Gegensatz zur Impfung mit Ganzkeimimpfstoffen zu einer Induktion von T-Zellen mit einem Überwiegen des Th2-Zytokin-Profiles (Ausiello et al. 1997; Ryan et al. 1998; Esposito et al. 2001), vor allem mit IL-5-, IFN- γ - und in einigen Fällen auch IL-2-Sekretion. In einer Langzeit-Studie von Ausiello et al. konnte eine Änderung dieses Profils hin zu einem gemischten Th1/Th2-Profil 3-4 Jahre nach azellulärer Impfung gefunden werden, welche möglicherweise mit subklinischen Infektionen mit *B. pertussis* zusammenhängt (Ausiello et al. 1997; Ausiello et al. 1999).

Bei 4-jährigen Kindern mit azellulärer Grundimmunisierung wurde die zellvermittelte Immunität (CMI) nach spezifischer Antigenstimulation untersucht und mit der CMI derselben Kinder im Alter von 7 Monaten verglichen. Keines der Kinder erkrankte innerhalb dieses Zeitraumes klinisch an Pertussis. Bei 75% der vierjährigen Kinder konnte eine positive CMI (Stimulationsindex ≥ 4) auf mindestens eines der Pertussisantigene nachgewiesen werden. Bei 20% (PT) bzw. 37% (FHA) der im Alter von 7 Monaten noch CMI-positiven Kinder kam es zu einem Verlust der CMI-Positivität. Andererseits konnte eine Konversion zur CMI-Positivität bei 36% (FHA) bzw. 69% (PRN) der ursprünglich CMI-negativen Kinder beobachtet werden. Bei 60-80% der Konvertierten kam es zur Erhöhung oder zur Aufrechterhaltung bestehender Antikörpertiter gegen FHA bzw. PRN. Die Frequenz der Seropositivität gegenüber FHA und PRN war deutlich höher bei den konvertierten im Vergleich zu den nicht-konvertierten Kindern. Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse wäre, dass die durch Impfung verursachte CMI bis zum vierten Lebensjahr nachlässt, jedoch doch subklinische Infektionen mit *B. pertussis* natürlich aufgefrischt bzw. erworben werden kann (Ausiello et al. 1999).

Die Antikörperproduktion nach Immunisierung mit azellulären Impfstoffen ist abhängig von den im Impfstoff enthaltenen Antigenen und zum Teil von deren Konzentration. Zepp et al. beobachteten in dem Zeitraum zwischen Grundimmunisierung mit azellulärem Impfstoff und Auffrischimpfung nachlassende Antikörpertiter und kontinuierlich hohe zellvermittelte Immunität (Zepp et al. 1996). Die Studie untersucht die Antigen-spezifische Lymphozytenproliferation von Säuglingen, die einen azellulären Impfstoff zur Grundimmunisierung und Auffrischimpfung im Alter von 15-24 Monaten erhielten. Es kommt zu einer progressiven Zunahme der spezifischen T-Zellantworten auf PT, FHA und PRN im Verlauf der Impfungen, die zellvermittelte Immunantwort bleibt im Gegensatz zu sinkenden Antikörpertitern über den Zeitraum zwischen Grundimmunisierung und Auffrischimpfung stabil. Im Gegensatz zu der von Ryan et al. 1998 erwähnten vorwiegenden Induktion der Th2-Zytokine durch azelluläre Impfung (Ryan et al. 1998), weisen Zepp et al. eine bevorzugte Induktion von Th1-Zytokinen wie INF- γ und IL-2 nach, IL-10 konnte nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. Dabei ist zu beachten, dass IL-10 nicht ausschließlich als Th2-typisches Zytokin zu sehen ist, da es auch von anderen Zellen produziert werden kann (siehe Diskussion, Abschnitt 5.3.).

Erhalten Kinder mit azellulärer Grundimmunisierung eine Auffrischimpfung mit azellulärem Impfstoff, dann ist eine signifikant verstärkte Th2-Antwort nachzuweisen (Ryan et al. 2000). Diese Th2-Aktivierung wird für die in mehreren Studien beobachteten zunehmenden lokalen Reaktionen wie Rötung und Schwellung nach Gabe von azellulären Impfstoffen bei Auffrischimpfung mitverantwortlich gemacht (Ryan et al. 2000; Rowe et al. 2005). Bei Kindern, deren Grundimmunisierung mit Ganzkeimimpfstoff erfolgte, führt eine azelluläre Auffrischimpfung zu einer heterogenen Th1/Th2-Zytokinproduktion mit einem vorwiegenden Trend zur Th1-Antwort (Ryan et al. 1998; Reynolds et al. 2006). Die Nebenwirkungen nach Impfung mit azellulärem Impfstoff entsprechen denen nach Ganzkeimimpfung, sind jedoch milder ausgeprägt und treten wesentlich seltener auf. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen Rötung, Schwellung, Schmerzen und Fieber. Diese treten nach Ganzkeim-Impfung in ca. 50% der Fälle auf. Im Mittel kommt es bei den azellulären Impfstoffen, die in der multizentrischen azellulären Pertussis-Studie (MAPT) getestet wurden, bei 20-35% zu Fieber, Rötung und Schwellung und bei weniger als 10% zu Schmerzen (Decker and Edwards 2000).

Obwohl viele der zugelassenen azellulären Impfstoffe in ihrer Immunogenität, Reaktogenität und Effektivität Unterschiede aufweisen, sind sie effektiv und führen meist zu einer höheren Antikörperproduktion gegen die enthaltenen Antigene als Ganzkeimimpfstoffe (Pichichero et al. 1997; Decker and Edwards 2000). In einer Studie von Edwards et al. wurden 13 azelluläre Pertussis-Impfstoffe, die unterschiedlich viele Antigene enthielten, untersucht. Dabei produzierte jeder Impfstoff signifikante Anstiege der Antikörper gegen die jeweils enthaltenen Antigene. Eine Korrelation zwischen der Konzentration der Antigene im Impfstoff und der Höhe der Antikörperproduktion konnte für FIM nachgewiesen werden, im Gegensatz dazu scheint die Konzentration von PT sich nicht in der Höhe der Antikörpertiter widerzuspiegeln. Wichtiger für die Immunogenität von PT scheint die Art der Inaktivierung zu sein. Es zeigt sich bei rekombinantem PT eine bessere Immunogenität als bei chemisch mit Formaldehyd oder Glutaraldehyd detoxifiziertem PT (Edwards et al. 1995).

1.4.3. Th1- und Th2- vermittelte Immunantwort und zugehörige Zytokinproduktion

Es existieren eine Reihe von Arbeiten, die sich mit der Zytokinproduktion nach spezifischer Stimulation mit Pertussisantigenen beschäftigt haben. Dabei wurde vor allem untersucht, ob durch die Stimulation vorwiegend Zytokine der zellulären Th1-vermittelten oder der humoralen Th2-vermittelten Immunantwort produziert werden. Es herrscht Übereinstimmung darüber, dass Zytokine vom Th1-Typ, vor allem IFN- γ , starke Induktoren der Makrophagen-Aktivität sind und somit die Bekämpfung einiger intrazellulärer Mikroorganismen erleichtern, gleichzeitig jedoch auch B-Zellen zum Isotopenswitch und zur Sekretion von IgG2a Antikörpern anregen, welche zur Opsonisierung extrazellulärer Bakterien führen. Im Gegensatz dazu fördern Th2-Zytokine die B-Zell-Reifung und führen somit zur Bildung von Toxin-neutralisierenden Antikörperklassen. Aufgrund der intrazellulären Persistenz scheint für einen optimalen Schutz vor Infektion ein Zusammenspiel beider Varianten der T-zellulären Immunantwort notwendig (Mills et al. 1993; Ausiello et al. 1997).

Daten aus verschiedenen tierexperimentellen Studien an Mausmodellen liefern ähnliche Ergebnisse. Durch die Infektion mit *B. pertussis* und durch Vakzination mit

Ganzkeimpfstoffen entsteht eine deutliche Th1-Immunantwort, wohingegen sich nach Impfung mit azellulären Impfstoffen ein überwiegendes Th2-Zytokinmuster nachweisen lässt (Mills et al. 1993; Redhead et al. 1993; Barnard et al. 1996). Außerdem zeigte sich in der Studie von Redhead et al., dass nach respiratorischer Exposition mit *B. pertussis* konvaleszente und mit Ganzkeimpfstoff geimpfte Mäuse die bakterielle Infektion signifikant schneller eliminieren konnten als die Mäuse, die mit azellulärem Impfstoff geimpft wurden (Redhead et al. 1993). Untersuchungen bei Menschen ergeben ein inhomogeneres Reaktionsmuster in der Immunantwort als die Mausversuche. Bei Menschen kommt es nach Infektion und Impfung mit Ganzkeimpfstoff zu einem Überwiegen der zellulären Th1-vermittelten Immunantwort, die auch bei subklinischen Infektionen aktiviert wird (Peppoloni et al. 1991; Ryan et al. 1997; Esposito et al. 2001). Im Bezug auf die nach azellulärer Impfung eingeschlagene Immunantwort existieren unterschiedliche Ergebnisse und Ansichten (siehe Abschnitt 5.3.2.), tendenziell kommt es jedoch zu einer bevorzugten Aktivierung der Th2-vermittelten Immunantwort als direkte Reaktion auf die Impfung (Ausiello et al. 1997; He et al. 1998; Ryan et al. 1998).

1.4.4. Serologische Korrelation zur Wirksamkeit

Üblicherweise werden serologische Korrelate zum Schutz vor Erkrankung in Studien ermittelt, in denen das Erreichen eines bestimmten Immunitätslevels bzw. Antikörpertiters nach Impfung mit der Prävention der Krankheit korreliert wird (Edwards KM 2008).

In vielen Studien wurde versucht, spezifische Antikörpertiter festzulegen, die einen Schutz vor Pertussis bieten. In einigen Studien konnten Korrelationen zwischen Antikörpertitern gegen Pertussis-Antigene und Schutz vor Erkrankung festgestellt werden, ein sicher protektiver Titer konnte allerdings nicht ermittelt werden (Cherry et al. 1998; Storsaeter et al. 1998; Taranger et al. 2000). Eine Kombination von Antikörpern gegen verschiedene Pertussis-Antigene scheint dabei jedoch wichtiger zu sein als Antikörpertiter gegen einzelne Antigene für sich allein genommen. Der vor Erkrankung schützende Mechanismus ist multifaktoriell und wird durch ein komplexes Zusammenspiel humoraler und zellulärer Immunität erreicht, die alleinige

Bestimmung von schützenden Antikörpertitern wird der wichtigen Rolle der zellulären Immunität nicht gerecht.

Eine Studie von Storsaeter et al. postuliert, dass vor allem hohe Antikörpertiter gegen die Agglutinogene PRN und FIM 2/3 mit Schutz vor Erkrankung nach Exposition assoziiert sind und PT-Antikörpertiter zwar Schutz vor typischer Erkrankung, jedoch nicht vor Infektion und mildem Erkrankungsverlauf bieten. FHA-Antikörpertiter konnten nicht mit Schutz in Zusammenhang gebracht werden (Storsaeter et al. 1998). Ähnliche Ergebnisse liefert die longitudinale prospektive Studie von Cherry et al., in der eine Signifikanz für die Antikörpertiter von PRN und PT im Bezug auf Schutz vor klinischer Erkrankung gezeigt werden konnte. Cherry kam zu dem Schluss, dass ein PRN-Antikörpertiter von <7 EU/ml bedeutet, mit einer kalkulierten Wahrscheinlichkeit von 67% an Pertussis zu erkranken, unabhängig von der Höhe des PT-Antikörpertiters. Bei einem PRN-Antikörpertiter ≥ 7 EU/ml und einem PT-Antikörpertiter von <66 EU/ml beträgt die vorausberechnete Wahrscheinlichkeit nur noch 31% und bei einem PT-Antikörpertiter ≥ 66 EU/ml ist die Wahrscheinlichkeit gleich Null an Pertussis zu erkranken. Bei gleichzeitigem Vorhandensein von Antikörpern gegen mehrere Antigene (PT, PRN und FIM), steuert die Anwesenheit von FHA-Antikörpern nicht zu stärkerem Schutz bei (Cherry et al. 1998).

Im Gegensatz dazu konnte einem Impfstoff, der nur PT und FHA (Biken DTaP) enthielt, gute Wirksamkeit gegen typische Keuchhustenerkrankung nachgewiesen werden (siehe auch Abschnitt 1.3.2., (Liese et al. 1997; Tindberg et al. 1999).

Taranger et al. untersuchten in einer prospektiven Studie die Beziehung von PT-IgG-Antikörpertitern nach Impfung und dem Schutz vor Pertussis. Die Studie zeigte, dass Kinder, die an Pertussis erkrankten, signifikant niedrigere PT-IgG-Titer nach Impfung hatten als Kinder, die nicht erkrankten (Taranger et al. 2000).

Diese Beobachtungen können jedoch nicht verallgemeinert werden, sondern nur im Bezug auf die getesteten Impfstoffe Informationen für die hier untersuchten Populationen liefern.

2. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der Pertussis-spezifischen Langzeitimmunität sowie der spezifischen Immunantwort auf die azelluläre Auffrischimpfung bei 10- bis 14-jährigen Jugendlichen.

Gibt es Unterschiede in der humoralen und zellulären Langzeitimmunität und in der Immunantwort auf die azelluläre Auffrischimpfung zwischen den Jugendlichen? Lassen sich individuelle Antikörpertiter mit individuellen CMI-Ergebnissen korrelieren? Gibt es Hinweise auf eine mögliche Vorstimulation durch frühere subklinische Infektionen oder Erkrankungen?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde die Pertussis-spezifische Immunität 10- bis 14-jähriger Jugendlicher, die zuvor 5 Dosen Biken DTaP (zuletzt im Alter von 4-6 Jahren) erhalten haben und gleichaltrigen Jugendlichen, die entweder 4 Dosen DTaP (zuletzt im Alter von 18-24 Monaten) oder 4 Dosen DTwP (zuletzt im Alter von 18-24 Monaten) erhalten haben, untersucht.

Die Untersuchungen sollen einen Beitrag zum besseren Verständnis der Immunogenität von Ganzkeim- und azellulären Pertussis-Impfstoffen leisten. Auch werden Hinweise erwartet, ob von Seiten der Immunantwort die Zeitpunkte der neuerdings empfohlenen azellulären Pertussis-Impfung im Vorschulalter und der Auffrischimpfung im Jugendalter sinnvoll erscheinen. Zusätzlich stellt sich die Frage, wann bei einem Individuum von einem sicheren Impfschutz ausgegangen werden kann und welche immunologischen Parameter zur Beurteilung der Immunität hilfreich sind.

3. Material- und Methodenteil

3.1. Studiendesign

3.1.1. Studienart

Es handelte sich um eine offene, multizentrische Studie, die als Substudie im Rahmen einer klinischen Studie der Phase IV zur Sicherheit der Pertussisimpfung bei Jugendlichen durchgeführt wurde. Durchführung der Studie (Rekrutierung der Studienzentren, Entwicklung des Prüfplanes, Monitoring, Laboruntersuchungen und Auswertung) wurde durch Drittmittel der Firma Sanofi-Pasteur Inc., Swiftwater, PA, USA unterstützt.

Aufnahme der Probanden, Impfung und Blutentnahme erfolgte in den Arztpraxen niedergelassener Kinderärzte in Deutschland und in der pädiatrischen Ambulanz des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Universität München, Deutschland.

Serologische Untersuchungen erfolgten in dem Institut für Hygiene und Labormedizin, Helios Klinikum Krefeld, Deutschland (Leitung: Prof. W. von König, nationales Pertussis-Referenzzentrum).

Alle Untersuchungen der zellulären Immunität und die Bestimmung der Zytokine erfolgten im Immunologischen Labor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der LMU München, Deutschland (Leitung: Prof. Dr. B. H. Belohradsky; siehe Abschnitt 3.4.).

3.2. Probanden

3.2.1. Gruppeneinteilung

Es wurden drei Gruppen von Probanden in die Studie aufgenommen:

Gruppe A/5aP: 37 Kinder im Alter von 10-14 Jahren, die im Rahmen von zwei früheren Studien (Liese et al. 1997; Liese et al. 2001) bereits 5 Dosen eines azellulären Pertussis-Impfstoffes (5aP) zusammen mit Diphtherie- und Tetanus-Impfstoff erhalten haben (Biken DTaP: Dosis 1-3 im Alter von 2,4 und 6 Monaten, Dosis 4 im Alter von 18-24 Monaten, Dosis 5 im Alter von 4-6 Jahren). Probanden der Gruppe A/5aP waren gleichzeitig Teilnehmer der Hauptstudie zur „Reaktogenität einer Auffrischimpfung mit azellulärem Pertussisimpfstoff bei Jugendlichen, die in der

Vorgeschichte entweder 5 Dosen des BIKENSchen azellulären Pertussis-Impfstoffs im Kombination mit Diphtherie- und Tetanus-Toxoid (Tripedia®) erhalten haben oder 3 Dosen Ganzkeimimpfstoff zur Grundimmunisierung plus mindestens einer Pertussis-Auffrischimpfung“ (Liese 2007) und waren dort der Gruppe 1 zugehörig.

Gruppe B/4aP: 23 Kinder im Alter von 10-14 Jahren, die zuvor 4 Dosen an azellulärem Pertussis-Impfstoff (4aP) zusammen mit Diphtherie- und Tetanus-Impfstoff (Biken DTaP, zuletzt im Alter von 18-24 Monaten) erhalten haben. Probanden der Gruppe B/4aP konnten nicht an der Reaktogenitätsstudie (s. o.) teilnehmen.

Gruppe C/4wcP: 18 Kinder im Alter von 10-14 Jahren, die zuvor 4 Dosen Ganzkeim-Pertussisimpfstoff (4wcP) zuletzt im Alter von 18-24 Monaten) und bisher noch keinen azellulären Pertussisimpfstoff erhalten haben. Probanden der Gruppe C/4wcP waren gleichzeitig Teilnehmer der Reaktogenitätsstudie (s. o.) und waren dort der Gruppe 2 zugehörig.

Für alle Probanden war zum Studienzeitpunkt von der STIKO eine Auffrischimpfung für Pertussis (azellulärer Impfstoff), Diphtherie und Tetanus empfohlen.

3.2.2. Einschlusskriterien

1. Jugendliche, die gemäß den Empfehlungen der STIKO für eine Auffrischimpfung mit einem azellulären Pertussis-Impfstoff (REPEVAX® oder COVAXIS®) im Alter von 9-17 Jahren für eine Impfung mit in Frage kamen.
2. Die Einwilligungs- und Zustimmungserklärung wurden vor Durchführung der ersten Studienmaßnahme unterschrieben und datiert.
3. Die Erhebung der medizinischen Vorgeschichte und die körperliche Untersuchung unter Berücksichtigung des anamnestischen Befundes wiesen den Jugendlichen als gesund aus.
4. Der Proband beabsichtigte, während der gesamten Dauer der Prüfung im Studiengebiet zu bleiben.
5. Der Studienteilnehmer und ein Elternteil/Sorgeberechtigter konnten lesen und schreiben und die Studienunterlagen verstehen; alle waren geistig dazu in der

Lage, ihre Einwilligung und Zustimmung zu erklären.

6. Bei einer weiblichen Studienteilnehmerin: keine bekannte oder vermutete Schwangerschaft zum Zeitpunkt des Einschlusses und keine geplante Schwangerschaft während der Teilnahme an der klinischen Prüfung.
7. Zugehörigkeit zu Gruppe A, B oder C (siehe Definition unter 2.1.2.)
8. Orale Körpertemperatur < 38,0°C.

3.2.3. Ausschlusskriterien

1. Bei einer weiblichen Studienteilnehmerin: Schwangerschaft oder Stillen eines Kindes.
2. Bekannte oder vermutete kongenitale oder erworbene Erkrankungen des Immunsystems (Erkrankungen mit Verdacht auf eine immunologische Komponente wie z.B. Autoimmunerkrankungen [z.B. rheumatoide Arthritis oder entzündliche Darmerkrankungen] wurden nicht ausgeschlossen, es sein denn, sie erfüllten die Ausschlusskriterien 3 oder 5).
3. Malignom, Hyposensibilisierungs- oder immunsuppressive Therapie (Teilnehmer, die topische oder inhalative Steroide erhielten, konnten in die Studie eingeschlossen werden; dies galt auch für Studienteilnehmer, die kurzfristig, d.h. ≤ 7 Tage orale Steroide erhielten, solange innerhalb der letzten zwei Wochen vor der Impfung keine Behandlung erfolgte).
4. Erhalt eines Pertussis-, Diphtherie- oder Tetanusimpfstoffes in den letzten 5 Jahren.
5. Jede instabile schwere chronische Grunderkrankung einschließlich eines Malignoms, einer kardiopulmonalen Erkrankung oder einer renalen, endokrinologischen, hämatologischen oder hepatischen Funktionsstörung.
6. Bekannte Beeinträchtigung neurologischer Funktionen, ein akutes Krampfleiden oder Einnahme medikamentöser Therapie zur Prophylaxe von Krampfanfällen.
7. Eine ärztlich diagnostizierte oder laborbestätigte Pertussis-Erkrankung innerhalb der letzten 10 Jahre.
8. Erhalt von Blutprodukten oder Immunglobuline innerhalb der letzten drei Monate.
9. Bekannte oder vermutete Allergie gegen einen der Impfstoffe oder eine der Impfstoffkomponenten, die in der Studie eingesetzt wurden.

10. Tägliche Anwendung nicht-steroidaler anti-inflammatorischer Arzneimittel.
11. Erhalt eines Impfstoffs oder Prüfimpfstoffs innerhalb von 30 Tagen vor dem Studieneinschluss oder geplanter Erhalt eines anderen Impfstoffs innerhalb von 28 Tagen nach Erhalt des Studienimpfstoffs.
12. Drogenabhängigkeit (z.B. Alkoholismus oder intravenöser Drogenkonsum, nicht aber Nikotin oder Koffein) nach Einschätzung des Prüfarztes.
13. Bekannte oder vermutete akute Atemwegsinfektion zum Zeitpunkt der Impfung mit akuten Symptomen und Anzeichen wie z.B. Nasenfluss, frischer Husten, Pharyngitis, Atemprobleme (z.B. pfeifendes Atmen, Kurzatmigkeit).
14. Jede Erkrankung, die nach Einschätzung des Prüfarztes ein Gesundheitsrisiko für den Studienteilnehmer darstellte oder die Erreichung des Studienziels in Frage stellte.
15. Vorgeschichte einer anaphylaktischen Sofortreaktion, einer Enzephalopathie innerhalb von 7 Tagen oder von Krampfanfällen innerhalb von 3 Tagen nach Erhalt eines Diphtherie-, Tetanus- oder Pertussis-Impfstoffs.
16. Geplante Teilnahme an einer anderen klinischen Prüfung im Verlauf der vorliegenden Studie (Ausnahme: Teilnahme an klinischer Prüfung zur Reaktogenität nach Pertussisimpfung (Liese 2007)).
17. Thrombozytopenie oder eine andere Koagulationsstörung, die eine Kontraindikation für eine intramuskuläre Injektion wären.

3.3. Impfstoffe

Die Probanden wurden für diese Studie nicht randomisiert. Teilnehmer der Gruppen A/5aP und C/4wcP erhielten den Impfstoff TdaP-IPV (REPEVAX®) oder TdaP (COVAXIS®, ggf. plus IPV Merieux®) gemäß der Randomisierung im Rahmen der Reaktogenitätsstudie (Liese 2007). Teilnehmer der Gruppe B/4aP konnten nach Wahl REPEVAX®, COVAXIS® oder COVAXIS® plus IPV Merieux® erhalten.

Alle verwendeten Impfstoffe sind in Deutschland durch das Paul-Ehrlich Institut zugelassen und wurden von der Firma Sanofi Pasteur MSD GmbH, Leimen, Deutschland, hergestellt und zur Verfügung gestellt.

3.3.1. Darreichungsform und Zusammensetzung des Impfstoffes

Der TdaP-Impfstoff (COVAXIS®, Sanofi Pasteur, Deutschland) und der TdaP-IPV-Impfstoff (REPEVAX®, Sanofi Pasteur, Deutschland) wurden in flüssigen 0,5 ml-Dosen verabreicht. Die aktiven Bestandteile waren in jedem aufgeführten Impfstoff in gleicher Menge und Konzentration enthalten:

2,5 µg Pertussis-Toxoid (PT)

5 µg filamentöses Hämagglutinin (FHA)

5 µg Fimbrien Typ 2 / 3 (FIM)

3 µg Pertactin (PRN)

2 Lf Diphtherie-Toxoid (d)

5 Lf Tetanus-Toxoid (T)

Jede Dosis enthielt auch 1,5 mg Aluminiumphosphat, 0,6% 2-Phenoxyethanol, < 0,1 mg Formaldehyd, < 50 ng Glutaraldehyd und bis zu 0,5 ml Wasser zur Injektion.

Zusätzlich zu den genannten Komponenten erhielt der TdaP-IPV-Impfstoff (REPEVAX®, Sanofi Pasteur, Deutschland) einen inaktivierten Poliomyelitis-Impfstoff (aus Verozellen):

Poliovirus-Typ 1: 40 D-Einheiten

Poliovirus-Typ 2: 8 D-Einheiten

Poliovirus-Typ 3: 32 D-Einheiten

<0,01 % Tween 80

Jede Dosis konnte auch Rückstandspuren von Streptomycin, Neomycin und Polymyxin B enthalten.

Jede 0,5 ml-Dosis IPV Merieux™ enthielt:

Poliovirus-Typ 1: 40 D-Einheiten

Poliovirus-Typ 2: 8 D-Einheiten

Poliovirus-Typ 3: 32 D-Einheiten

Jede Dosis enthielt auch <0,02% Formaldehyd und <1,0% 2-Phenoxyethanol. Es konnten auch Rückstandspuren von Streptomycin, Neomycin und Polymyxin B enthalten sein. Die Impfstoffe wurden intramuskulär (i.m.) verabreicht, IPV Merieux® konnte auch subkutan (s.c.) verabreicht werden.

3.4. Ablauf der Studienbesuche

3.4.1. Aufklärung und Einverständniserklärung

Nach eingehender Aufklärung des Probanden und eines oder beider Erziehungsberechtigten/r wurde zunächst von einem oder beiden Erziehungsberechtigten und dem aufklärendem Arzt die Einverständniserklärung und vom Probanden die Zustimmungserklärung zur Teilnahme an dieser Studie unterzeichnet.

3.4.2. Dokumentation des Impfstatus und Blutentnahme

Der Polio-, Tetanus-, Diphtherie- und Pertussis-Impfstatus eines jeden Studienteilnehmers wurde auf einem Dokumentationsbogen erfasst. Im Anschluss wurden dem Jugendlichen direkt vor der Impfung und 1 Monat danach (28-36 Tage) jeweils 10 ml heparinisiertes Blut (20 IU Heparin pro ml) und weitere 3 ml Vollblut zur Gewinnung von Serum entnommen.

Das Blut wurde mit einem Kurierservice ungekühlt verschickt und innerhalb von 24 h nach Entnahme im Labor weiterverarbeitet.

3.4.3. Sicherheitsvorkehrungen

Die Probanden mussten nach der erhaltenen Impfung für 15 Minuten unter ärztlicher Kontrolle bleiben und es musste eine entsprechende Ausrüstung zur Versorgung eines akuten allergischen Notfalls bzw. anaphylaktischen Schocks vorhanden sein.

3.5. Labormethoden

Alle beschriebenen Arbeitsschritte mit Ausnahme der Serologie wurden im Immunologischen Labor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der LMU München, Deutschland, durchgeführt (Leitung: Prof. Dr. B. H. Belohradsky). Für die Serologie (siehe Abschnitt 3.5.1.) wurde das Institut für Hygiene und Labormedizin, Helios

Klinikum Krefeld, Deutschland beauftragt (Leitung: Prof. W. von König, nationales Pertussis-Referenzzentrum).

3.5.1. Serologie

Die Messung der serologischen Antikörper der Probanden erfolgte in dem Institut für Hygiene und Labormedizin, Helios Klinikum Krefeld, Deutschland (Leitung: Prof. W. von König, nationales Pertussis-Referenzzentrum).

Mittels standardisiertem ELISA-Verfahren wurden die IgG-Antikörper gegen PT, PRN und FHA wie früher beschrieben (Wirsing von König et al. 1999), gemessen. Für die Analysen wurden Antigene der Firma GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rixensart, Belgien, verwendet. Standardisierte ELISA für Fimbrien (FIM) 2 / 3 waren zu diesem Zeitpunkt nicht erhältlich.

Im Überblick ist dies ein "Sandwich-ELISA", bei dem die Festphase (Mikrotiterplatten) mit dem Antigen beschichtet ist. Sind Antikörper in der zu untersuchenden Probe vorhanden, binden sie an PT, FHA bzw. PRN. Nicht gebundene Serumbestandteile werden ausgewaschen. Anschließend wird ein zweiter Detektions-Antikörper gegen menschliches IgG zugegeben, der mit den an PT, FHA oder PRN gebundenen Antikörpern reagiert. Nicht gebundener Zweitantikörper wird erneut ausgewaschen. Die Aktivität des an den Zweitantikörper gebundenen Enzyms wird durch Zugabe von Substrat gemessen. Nach Beenden der Enzymreaktion durch eine pH-Änderung wird die Extinktion bei der entsprechenden Wellenlänge photometrisch gemessen und der Gehalt an spezifischen Antikörpern im Vergleich zu einem Referenzpräparat (Serum #3 des CBER/FDA) in ELISA-Einheiten pro ml Serum errechnet (EU/ml). Die Berechnung der Standardkurve erfolgte über eine 4-Parameter-Logistik Referenzlinienmethode („softmax“ Evaluationssoftware, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Die Nachweisgrenze (minimal level of detection; MLD) für alle Antigene lag bei 5 EU/ml. Seropositivität der Probanden ist durch Werte ≥ 5 EU/ml definiert. Seren, die eine berechnete Konzentration von weniger als 5 EU/ml aufwiesen, wurden als negativ bewertet und auf die Hälfte der Nachweisgrenze (d.h. auf 2,5 EU/ml) gesetzt.

3.5.2. Präparation der peripheren mononukleären Zellen des Blutes

Aus dem frischen heparinisierten Blut wurden die peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) innerhalb von 24 h durch Dichtezentrifugation mittels Ficoll-Gradienten präpariert. Die Verarbeitung erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einem „Airflow“.

Je Probe wurden drei sterile Glasröhrchen (8ml, Fa.Nunc, Nr.146183, Roskilde, Dänemark) mit 3 ml Ficollischer Lösung (Lymphozyte Separation Medium, Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland) gefüllt. Jeweils ca. 3 ml von dem mit 1-2 ml RPMI 1640 Medium (Biochrom AG, Cat. No. FG 1215) verdünnten heparinisierten Blut wurden vorsichtig auf die Ficoll-Lösung geschichtet. Durch Zentrifugation mit 2000 U/min über 20 min wurden die PBMC aufgrund der Dichteunterschiede vom restlichen Blut getrennt.

Die auf diese Weise separierten PBMC wurden mit Hilfe von sterilen Pasteurpipetten aus den Röhrchen abgesaugt und mit RPMI 1640 Medium zweimal gewaschen (1.Zentrifugation bei 2000 U für 10 min, 2. Zentrifugation bei 1500 U für 10 min) und so vom Plasma und der restlichen Ficoll-Lösung befreit. Für die Zellzählung wurde Trypanblau-Lösung 0,5% (40mg Trypanblau in 8 ml 0,9% NaCl) verwendet, wodurch tote von lebenden Zellen unterschieden werden können. Die Zellauszählung erfolgte in Neubauer-Zählkammern bei 40-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop. Die Lymphozytenkonzentrationen der verschiedenen Proben wurden mit Nährmedium auf $1,5 \times 10^6$ /ml lebende Zellen eingestellt. Das Nährmedium war R5H (bestehend aus RPMI 1640 Medium (Fa. Biochrom, Nr.F1215)+5 % inaktiviertem Humanserum (Inaktivierung bei 56°C für 30 min) +1% Antibiotika (Penicillin, Fa. Biochrom, Nr.A2212). Bei der Zellzählung konnte eine Vitalität von mehr als 80% der Zellen in allen Proben gesichert werden.

3.5.3. Serumgewinnung

Zur Gewinnung von Serum wurden den Probanden direkt vor und 28-36 Tage nach Impfung 3 ml Vollblut in ein Serum- Gel- Röhrchen abgenommen (S-Monovette®, Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland). Das Vollblut wurde am Tag der Abnahme mit einem Kurier per Raumtemperatur verschickt und innerhalb von 24

Stunden weiterverarbeitet, d.h. abesert und bei -20°C bis zur Versendung in das Institut für Hygiene und Labormedizin (Helios Klinikum Krefeld, Deutschland) eingefroren.

3.5.4. Lymphozytenzellkulturen

In Rundboden-Gewebekulturplatten („96-well-Platten“, Cellstar, No.650180, LOT 06090168, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) wurden pro well 100 µl Lymphozytensuspension mit Nährmedium (R5H: RPMI-1640 plus 1% Antibiotika), entsprechend 150.000 Zellen pro well ausplattiert. Der Rundboden der Platten ermöglichte eine möglichst große Nähe zwischen den Subpopulationen der eingesetzten Lymphozyten und Monozyten und damit eine gute Interaktionsfähigkeit zwischen antigenpräsentierenden Zellen und spezifischen T-Zellen. Die spezifischen, auch in den Impfstoffen enthaltenen Pertussisantigene PT (2 µg/ml, inaktiviert durch Erhitzung auf 80°C für 20 min), FHA (10 µg/ml), PRN (10 µg/ml) und FIM (10 µg/ml) wurden auf einer Platte für durchflusszytometrische Analysen und einer Platte für spezifische Lymphozytenproliferation ausplattiert. Wie auch in anderen Studien beschrieben (Zepp et al. 1996, Esposito et al. 2001), haben wir inaktiviertes PT für die in vitro Stimulation benutzt, da bekannt ist, dass natives PT mitogen auf Lymphozyten wirkt. Damit kann man die unspezifische Stimulation aufgrund des nativen Toxins ausschließen, die sonst die spezifischen Reaktionen auf das Antigen überdeckt hätte. Außerdem wurden zwei Positiv- und zwei Negativ-Kontrollen angesetzt. Eine Positiv-Kontrolle erfolgte durch die Zugabe des Mitogens Phytohämagglutinin (PHA, Fa. Oxoid, London, England, Nr. HW/30852801, 2mg, Stammlösung 1 mg/ml), welches über eine Kreuzvernetzung von Lymphozytenrezeptoren zu einer unspezifischen Lymphozytenstimulation führt. Diese Positiv-Kontrolle wurde zusammen mit einer Negativ-Kontrolle (ausschließlich Nährmedium R5H) für 48 h inkubiert. Die andere Positiv-Kontrolle erfolgte mit Diphtherie- und Tetanus-Toxoid (Fa. Behring, Marburg, D, aus der Produktion Impfstoffe Dr. Blackkolb: T-Toxoid Nr.4800 Lf/ml, 19,5g Eiw./l, D-Toxoid Nr.3400 Lf/ml 13,7g Eiw./l). Diese Positivkontrolle wurde zusammen mit der zweiten Negativkontrolle für sechs Tage inkubiert. Die Platte für durchflusszytometrische Analysen wurde für 48 h inkubiert, da dies in eigenen Vorversuchen als optimaler

Zeitpunkt ermittelt wurde. Alle Ansätze wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Platten wurden im Brutschrank (Heraeus, Kendro Laboratory Products) bei 37°C und 96% relativer Luftfeuchte in 5% CO² angereicherter Atmosphäre für die vorgegebenen Zeiträume inkubiert.

3.5.5. Lymphozytenproliferation nach Antigenstimulation

Nach einer Inkubationszeit der Antigen-stimulierten Kulturplatte von 6 Tagen wurden die stimulierten Lymphozyten mit 1,5 µCi ³H-Thymidin (Amersham, UK) versetzt und vermischt. Nach erneuten 16 h Inkubationszeit bei 37°C wurden die radioaktiv markierten Zellen mittels eines Zell-Harvesters (Fa. Skatron, Schweden) auf einem Filterpapier (Fa. Skatron, Nr.11731) aufgefangen und gewaschen. Dort trockneten sie und die Filterpapiere wurden in Szintillations-Röhrchen gegeben, in denen sie mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint,11 eco, Fa.Carl Roth GmbH, Fürth/D, Nr.9500.2) versetzt und mit einem β-Counter (Beckmann, Germany) ausgezählt wurden. Dieser Szintillationszähler misst die Radioaktivität aufgrund des Tritium-Einbaus in die neusynthetisierte DNA in cpm (counts per minute) und gibt somit Auskunft über die Lymphozytenproliferation der jeweiligen Probe.

Die Lymphozytenproliferation lässt sich mit Hilfe des Stimulationsindex beschreiben. Der Stimulationsindex berechnet sich aus dem Quotienten des ³H-Thymidin-Einbaus in Antigen-stimuliertem Lymphozytenansatz und nicht stimuliertem Ansatz. Er ist ein Maß dafür, um welchen Faktor die spezifische Stimulation mit einem Antigen die Proliferation der Lymphozyten erhöht.

3.5.6. Zytokin-Bestimmungen im Kulturüberstand

Um Pertussis-Toxoid induzierte Zytokin-Produktion zu messen wurden aus den Überständen der Lymphozytenkulturen für die FACS-Analyse nach 48 h Inkubationszeit jeweils 90 µl Überstand vorsichtig abpipettiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren. Für die Untersuchungen wurde der „Human Th1/Th2 cytometric bead array-Kit“ (BD Biosciences, San Jose, CA USA)

nach Herstellerangaben verwendet. Hiermit konnten in einem Versuchsdurchlauf 6 verschiedene Th1 (IL-2, TNF- α und INF- γ)- bzw. Th2 (IL-4, IL-5 und IL-10)-typische Zytokine gemessen werden. Dieses Verfahren funktioniert nach dem Prinzip eines Sandwich-Assay, bei dem der Capture-Antikörper jedoch nicht an eine Mikrotiterplatte, sondern an ein Polymerkügelchen (Bead) gekoppelt ist, in dem sich Fluoreszenzmoleküle befinden, die zu einer eindeutigen Identifikation in durchflusszytometrischen Analysen führen. Die in einem zweiten Schritt eingesetzten mit Phycoerythrin (PE)-beladenen spezifischen Detektionsantikörper binden an den Komplex aus Capture-Bead und Zytokin, die Analyse erfolgt am Durchflusszytometer. Anhand einer Standardkurve können quantitative Angaben zu den Zytokinen generiert werden. Die Analyse erfolgte mittels eines eigens hierfür entwickelten Computerprogramms, der BD CBA Software (BD CBA Biosciences).

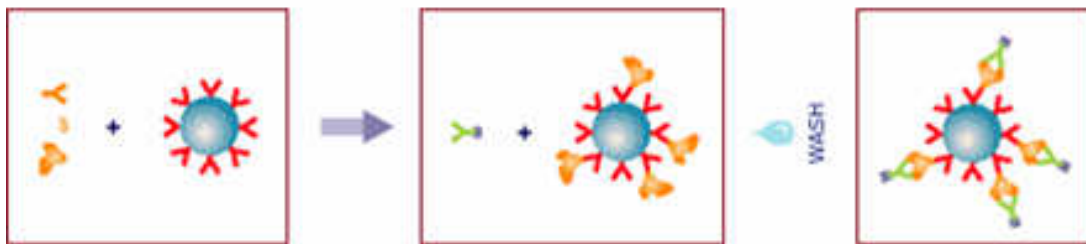


Abb.1: „Sandwich Assay“ Technik für die CBA Immunoassays; die zu bestimmenden Zytokine werden von Antikörpern gebunden, die an Kugeln haften. Zugabe von farblich markierten Detektionsantikörpern gegen diese Zytokine führt zur Bildung eines markierten Zytokin-Antikörperkomplexes. Die Zytokinquantität kann mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen gemessen werden. BD Biosciences, San Jose, CA USA.

3.5.7. Durchflusszytometrische Analyse

Die Immunophänotypisierung der peripheren Lymphozyten und Untersuchung der Expression von Aktivationsmarkern nach Antigenstimulation wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse durchgeführt. Es wurden monoklonale, mit fluoreszierenden Farbstoffen markierte Antikörper (PE-Cy5 anti-human CD 4, APC anti-human CD 8, PE anti-human CD 25, FITC anti-human CD 69; alle von BD Pharmingen™) gegen Oberflächenmarker der Lymphozyten eingesetzt. Die Lymphozyten wurden in Zellkulturen (wie im Abschnitt 2.4.3. beschrieben) angesetzt. Nach 48 h wurden sie in FACS-Röhrchen (5 ml Rundbodenröhrchen, BD Falcon)

gefüllt und mit je 3 µl aller Antikörper pro Probe für 30 min im Dunkeln inkubiert, sodass die Antikörper an die Lymphozyten binden konnten. Danach erfolgte ein Waschschrift mit 2,5 ml PBS (phosphate buffered saline, Dulbecco 1*, LE, Biochrom AG) und eine Zentrifugation bei 2000 U über 10min. Die Überstände wurden dekantiert und die Lymphozytensuspension mit 200 µl PBS aufgefüllt. Die Analyse erfolgte im FACSCalibur (Becton Dickinson, NJ/USA), die Daten wurden während der Analyse gespeichert.

Für jede Probe wurden 10.000 Zellen im anhand von FSC und SSC generierten Lymphozyten-Fenster analysiert. Die Geräteeinstellung für 4 Farben-Analyse für Lymphozyten wurde vorher optimiert. Um die unspezifische Hintergrundbindung zu bestimmen wurden Maus- IgG1- Isotypkontrollen mitgeführt.

3.5.8. Datenanalyse / Statistik

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe von Microsoft-Excel™, SPSS, REPORT Version 6.6, TESTIMATE Version 6.4. (IDV Gauting, Germany), GraphPad Prism Version 4.01 für Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) und für die Zytokinbestimmung mit der BD CBA Software (BD Biosciences, San Jose, CA USA) ausgewertet.

Zum Vergleich der vor und nach Auffrischimpfung ermittelten Werte zur humoralen und zellvermittelten Immunität innerhalb der Gruppen wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben verwendet, für den Zwischengruppenvergleich der Wilcoxon-Mann-Whitney-U Test für unverbundene Stichproben. Folgende Gruppenpaare wurden im Zwischengruppenvergleich gegeneinander getestet: A/5aP versus B/4aP, A/5aP versus C/4wcP und B/4aP versus C/4wcP. Korrelationsanalysen wurden mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten von Spearman durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde jeweils ein P-Wert < 0,05 gefordert.

Zur Interpretation der Gruppenunterschiede wie auch zur Veranschaulichung wurde das Mann-Whitney-Überlegenheitsmaß (MW), das dazugehörige Relevanzmaß und sein zweiseitiges 95%-iges Konfidenzintervall graphisch dargestellt.

Das MW-Maß (0.0 bis 1.0) gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass ein zufällig ausgewählter Proband der Testgruppe einen jeweils besseren Wert hat als ein

zufällig ausgewählter Proband der Referenzgruppe. Die allgemein anerkannten Grenzwerte sind:

0.36 mittlere Unterlegenheit (definierte Grenze für Nicht-Unterlegenheit)

0.44 kleine Unterlegenheit

0.50 Gleichheit

0.56 kleine Überlegenheit

0.64 mittlere (relevante) Überlegenheit

0.71 große Überlegenheit

Die Nullhypothese geht von keiner Änderung der Laborparameter im Innergruppenvergleich bzw. von keinem Unterschied der Vor- und Nachwerte im Zwischengruppenvergleich aus.

Die graphischen Darstellungen beinhalten Boxplots, Streudiagramme und reverse kumulative Verteilungskurven (reverse cumulative curves, siehe Abschnitt 4.1.) zur besseren Darstellung der Antikörper- Verläufe und Tabellen.

Die graphische Darbietung der serologischen Daten mittels reversen kumulativen Verteilungskurven erleichtert die gesamte Darstellung der erhobenen Daten, ermöglicht eine schnelle visuelle Beurteilung wichtiger Details der Verteilung und vereinfacht den Vergleich von Verteilungen (Reed et al. 1995). Dabei repräsentiert die horizontale Achse die Antikörperlevel in logarithmischer Darstellung, die vertikale Achse reicht von 0% bis 100% und repräsentiert den prozentualen Anteil an Probanden, die mindestens den jeweiligen Antikörperlevel besitzen. Die Graphik wird durch das Auftragen des prozentualen Anteils an Probanden auf die vertikale Achse erstellt, die eine gleiche oder höhere Antikörperkonzentration haben als das jeweilig angezeigte Level auf der horizontalen Achse.

4. Ergebnisse

4.1. Serologie vor und nach Impfung

4.1.1. Zusammenfassung

Es wurden die IgG-Titer auf die Pertussisantigene PT, FHA, PRN bei allen 78 Probanden untersucht. Bei einem Probanden aus Gruppe A/5aP konnte der Vorwert aufgrund eines technischen Problems in der Verarbeitung nicht bestimmt werden. Alle anderen Proben konnten technisch einwandfrei analysiert werden.

Der prozentuale Anteil der Probanden mit 2-fachem Titeranstieg nach der Impfung ist in allen drei Gruppen vergleichbar angestiegen, es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. So ist nach Impfung in Gruppe A/5aP ein 2-facher Titeranstieg von IgG gegenüber PT bei $n=28/36$ (77,8%), in Gruppe C/4wcP bei $n=14/18$ (77,8%) und in Gruppe B/4aP bei $n=19/23$ (82,6%) zu sehen. Dieser 2-fache Titeranstieg ist noch ausgeprägter gegenüber FHA bei $n=33/36$ (91,7%) in Gruppe A, $n=23/23$ (100%) in Gruppe B und $n=16/18$ (88,9%) in Gruppe C, sowie gegenüber und PRN (100% in Gruppe A [$n=36/36$] und B [$n=23/23$], 94,4% in Gruppe C [$n=17/18$]; s. Tabelle 1).

In allen 3 Gruppen konnte für alle 3 Antigene (PT, FHA, PRN) ein signifikanter Titeranstieg nach Impfung ermittelt werden. Signifikante Gruppenunterschiede bestehen zu Gunsten von Gruppe C im Vergleich mit Gruppe A und B im Nachwert bei der serologischen Antwort auf PT, sowie zu Gunsten von Gruppe A im Vergleich mit Gruppe C im Vorwert bei der serologischen Antwort auf FHA.

Für Gruppe A, die zuvor 5 Dosen azellulären Impfstoffes erhalten hatte, waren die Antikörpertiter gegen PT und FHA nach der Gabe der 5. Dosis azellulären Impfstoffes im Alter von 4-6 Jahren bekannt (siehe Abschnitt 4.1.2. bzw. 4.1.3.).

Antikörper	Gruppe	GMT vor Impfung (EU/ml) (95% CI)	GMT nach Impfung (EU/ml) (95% CI)	Seropositivität vor Impfung % (95% CI)	Seropositivität nach Impfung % (95% CI)	2-facher Titer- anstieg % (95% CI)
Anti-PT						
IgG	A/5aP	4.2 (3.2-5.5)	16.4 (11.4-23.6)*	36.1 (20.8-53.8)	86.5 (71.2-95.5)	77,8 (60.9-89.9)
	B/4aP	3.9 (2.8-5.3)	17.1 (9.7-30.1)*	30.4 (13.2-52.9)	82.6 (61.2-95.1)	82,6 (61.2-95.1)
	C/4wcP	9.7 (4.2-22.5)	50.3 (26.1-97.0)*	55.6 (30.8-78.5)	94.4 (72.7-99.9)	77,8 (52.4-93.6)
Anti-FHA						
IgG	A/5aP	25.2 (16.8-37.8)*	161.0 (122.3-211.8)	94.4 (81.3-99.3)	100 (90.5-100)	91,7 (77.5-98.3)
	B/4aP	15.0 (9.4-23.9)	127.0 (89.1-181.2)	82.6 (61.2-95.1)	100 (85.2-100)	100 (85.2-100)
	C/4wcP	10.7 (5.2-21.9)*	137.6 (98.9-191.3)	61.1(35.8-82.7)	100 (81.5-100)	88,9 (65.3-98.6)
Anti-PRN						
IgG	A/5aP	18.8 (12.5-28.2)	600.7 (449.6-802.6)	88.9 (73.9-96.9)	100 (90.5-100)	100 (90.3-100)
	B/4aP	13.3 (6.3-28.0)	407.3 (260.6-636.7)	56.5 (34.5-76.8)	100 (85.2-100)	100 (85.2-100)
	C/4wcP	14.0 (6.3-30.9)	639.0 (370.0-1103.3)	72.2 (46.5-90.3)	100 (81.5-100)	94,4 (72.7-99.9)

Tabelle 1: Antikörpertiter der drei Gruppen vor und nach Impfung.

Antikörpertiter vor und nach Impfung sind in EU/ml angegeben. Die minimale Nachweisgrenze (minimal level of detection; MLD) lag bei 5 EU/ml. Antikörpertiter unterhalb dieser Grenze wurden auf einen Wert von 2,5 EU/ml gesetzt. Seropositivität ist durch Werte ≥ 5 EU/ml definiert.

A/5aP Gruppe (aP = azellulärer Pertussisimpfstoff): Diese Gruppe erhielt zuvor insgesamt 5 Dosen azellulären Impfstoffes, zuletzt im Alter von 4-6 Jahren. **B/4aP Gruppe** (aP = azellulärer Pertussisimpfstoff): Diese Gruppe erhielt zuvor insgesamt 4 Dosen azellulären Impfstoffes, zuletzt im Alter von 18-24 Monaten. **C/4wcP Gruppe** (wcP = whole cell bzw. Ganzkeim-Pertussisimpfstoff): Diese Gruppe erhielt zuvor insgesamt 4 Dosen Ganzkeimimpfstoff, zuletzt im Alter von 18-24 Monaten (A/5aP Gruppe:n=36; B/4aP Gruppe:n=23; C/4wcP Gruppe:n=18).

* statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-U Test; siehe Text)

4.1.2. Serologische Antwort auf Pertussistoxin (PT)

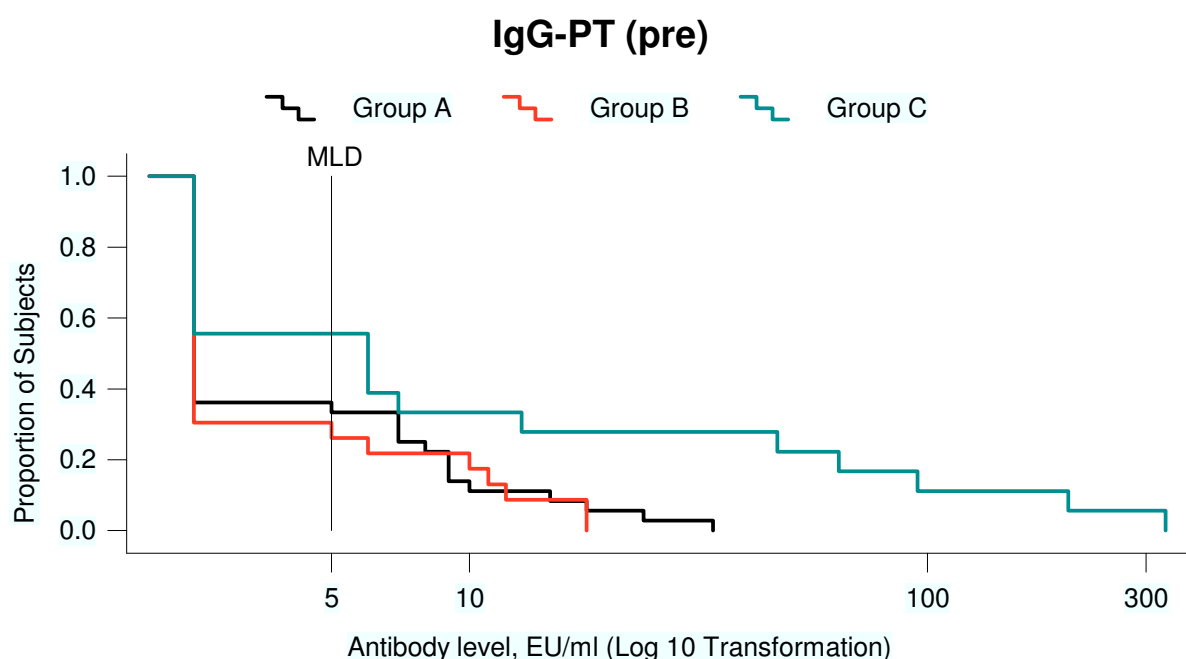
Ein mindestens zweifacher Titeranstieg gegenüber dem Ausgangswert konnte für n=28/36 (78%) in Gruppe A/5aP, n=19/23 (83%) in Gruppe B/4aP und n=14/18 (78%) in Gruppe C/wcP ermittelt werden.

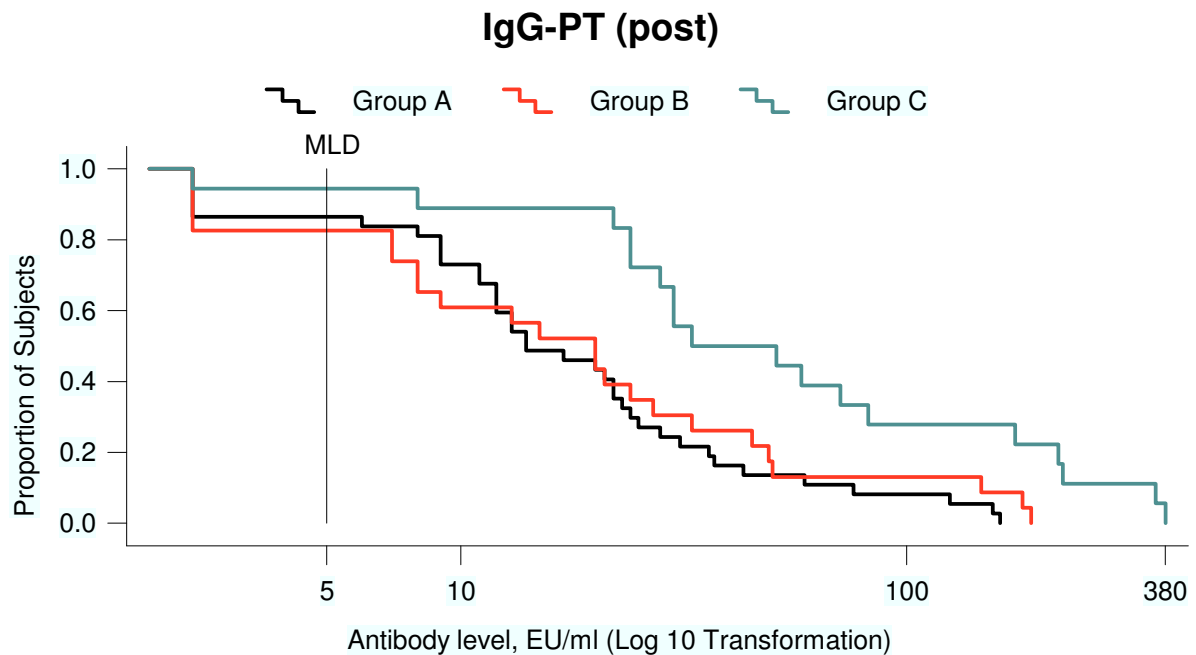
Der *Geometric Mean Titre* (GMT) vor Impfung lag bei 4,2 EU/ml, 3,9 EU/ml bzw. 9,7 EU/ml (Gruppe A, B, C). Der GMT nach Impfung lag bei 16,4 EU/ml, 17,1 EU/ml bzw. 50,3 EU/ml (Gruppe A, B, C).

Dabei war der GMT vor Impfung in Gruppe A (4,22 EU/ml) im Vergleich zum Wert aus der Vorgängerstudie nach Impfung mit einer fünften Dosis Biken DTaP im Alter von 4-6 Jahren (123,1 EU/ml) deutlich abgesunken. In dieser Vorgängerstudie von Liese et al. wurde die Sicherheit und Immunogenität der Gabe einer 5. Dosis des azellulären Biken-Impfstoffes in Kombination mit Diphtherie- und Tetanus-Toxoid im Alter von 4-6 Jahren untersucht (Liese et al. 2001).

Nur 13 von insgesamt 36 Probanden (36%) aus Gruppe A hatten vor Impfung einen nachweisbaren Titer (> 5 EU/ml). Im Vergleich mit den anderen beiden Gruppen zeigt sich in Gruppe C beim Vorwert eine nicht signifikante Tendenz zu höheren Werten (MWU-Maß = 0,62 bzgl. Gruppe A bzw. 0,65 bzgl. Gruppe B). Diese Tendenz wird auch durch die reversen kumulativen Verteilungskurven gestützt (Abb. 1 und 2). Zwischen Gruppe A und B konnten keine Unterschiede im Vorwert ermittelt werden.

Nach Impfung sind bei allen Gruppen signifikante Titeranstiege zu verzeichnen ($p < 0,0001$). Nach der Impfung erreichen die Probanden der Gruppe C signifikant höhere Werte als Gruppe A und B ($p = 0,001$; MWU = 0,77 bzw. $p = 0,006$; MWU = 0,75). Zwischen Gruppe A und B ist wiederum kein Unterschied festzustellen.





Abbildungen 1 und 2: Reverse kumulative Verteilungskurven von IgG-Antikörpern gegen PT vor und nach Impfung.

Die horizontale Achse repräsentiert die Antikörpertiter in logarithmischer Darstellung. Auf der vertikalen Achse wird der prozentuale Anteil der Probanden repräsentiert, der mindestens den jeweiligen Level der Antikörpertiter besitzt, die Achse reicht von 0% bis 100%.

Die minimale Nachweisgrenze (MLD, minimal level of detection) liegt bei 5 EU/ml. Antikörperlevel unter der Nachweisgrenze bekamen einen arbiträren Wert von der Hälfte der Nachweisgrenze (2,5 EU/ml) zugeordnet. (A/5aP Gruppe:n=36; B/4aP Gruppe:n=23; C/4wcP Gruppe:n=18).

4.1.3. Serologische Antwort auf filamentöses Hämagglutinin (FHA)

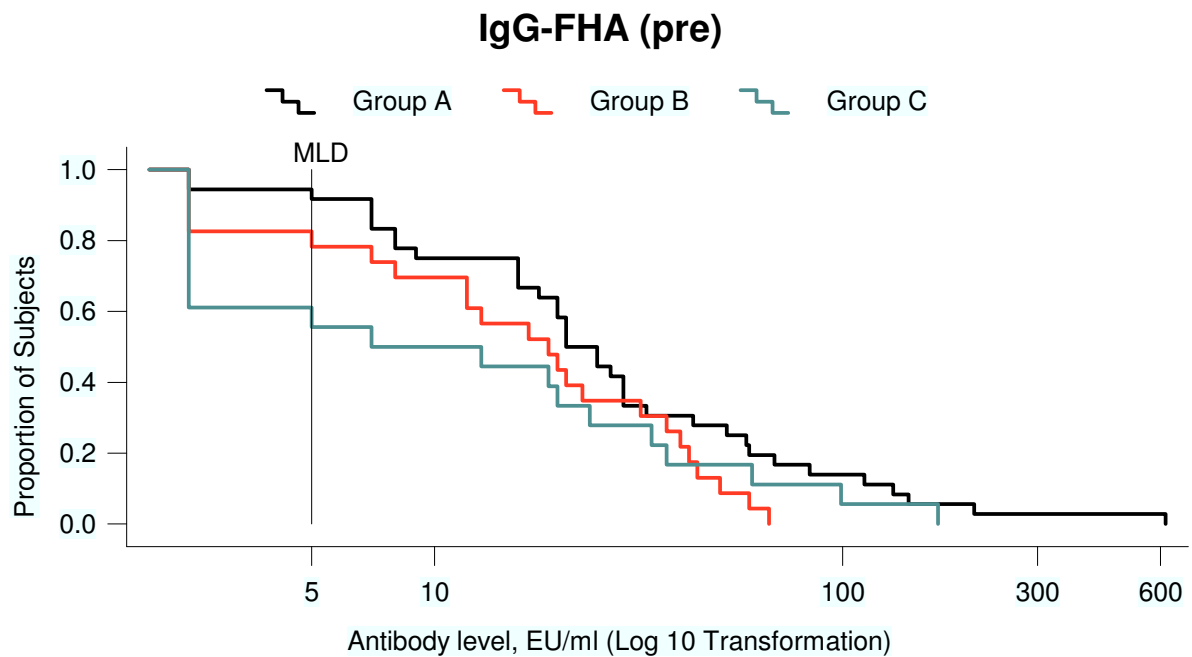
Ein mindestens zweifacher Titeranstieg konnte für n=33/36 (92%) in Gruppe A/5aP, n=23/23 (100%) in Gruppe B/4aP und n=16/18 (89%) in Gruppe C/4wcP ermittelt werden.

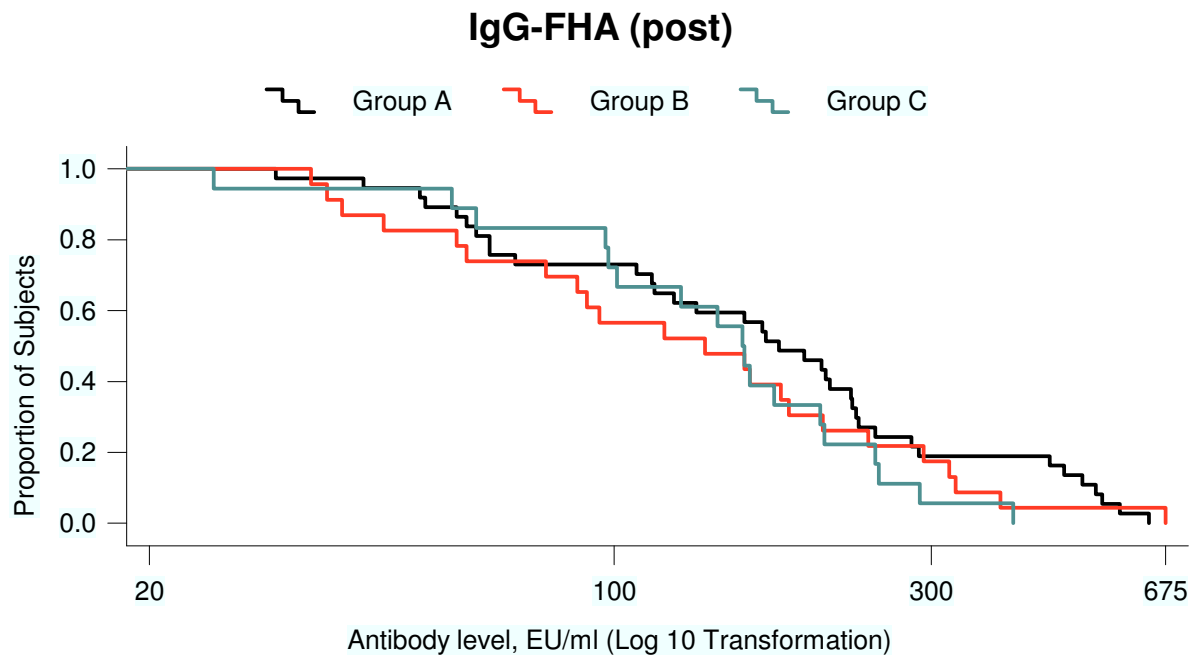
Der GMT vor Impfung lag bei 25,2 EU/ml, 15,0 EU/ml bzw. 10,7 EU/ml (Gruppe A, B, C). Der GMT nach Impfung lag bei 161,0 EU/ml, 127,0 EU/ml bzw. 136,6 EU/ml (Gruppe A, B, C).

Die Titer vor Impfung waren in Gruppe A im Vergleich zum Wert aus der Vorstudie (Liese et al. 2001) nach Impfung abgesunken, hielten sich aber bei 34 von 36 Probanden (94%) oberhalb der Nachweisgrenze (GMT der Vorstudie: 241,1 EU/ml; GMT in unserer Studie: 25,2 EU/ml). Nach Impfung wurde bei unserer Studie ein

niedrigerer GMT (161,0 EU/ml) erreicht als nach der Impfung im Rahmen der Vorstudie (241,1 EU/ml).

Beim Vorwert zeigen sich für Gruppe A im Vergleich mit Gruppe C signifikant höhere Werte ($p = 0,039$; MWU = 0,33), im Vergleich mit Gruppe B eine Tendenz zu höheren Werten (MWU = 0,4). Zwischen den Gruppen B und C können keine Unterschiede im Vorwert ermittelt werden. Nach Impfung sind bei allen Gruppen signifikante Titeranstiege ($p < 0,0001$) zu verzeichnen. Nach Impfung sind keine Unterschiede zwischen den Gruppen vorhanden.





Abbildungen 3 und 4: Reverse kumulative Verteilungskurven von IgG-Antikörpern gegen FHA vor und nach Impfung.

Die minimale Nachweisgrenze (MLD, minimal level of detection) liegt bei 5 EU/ml. Antikörperlevel unter der Nachweisgrenze bekamen einen arbiträren Wert von der Hälfte der Nachweisgrenze (2,5 EU/ml) zugeordnet. (A/5aP Gruppe:n=36; B/4aP Gruppe:n=23; C/4wcP Gruppe:n=18).

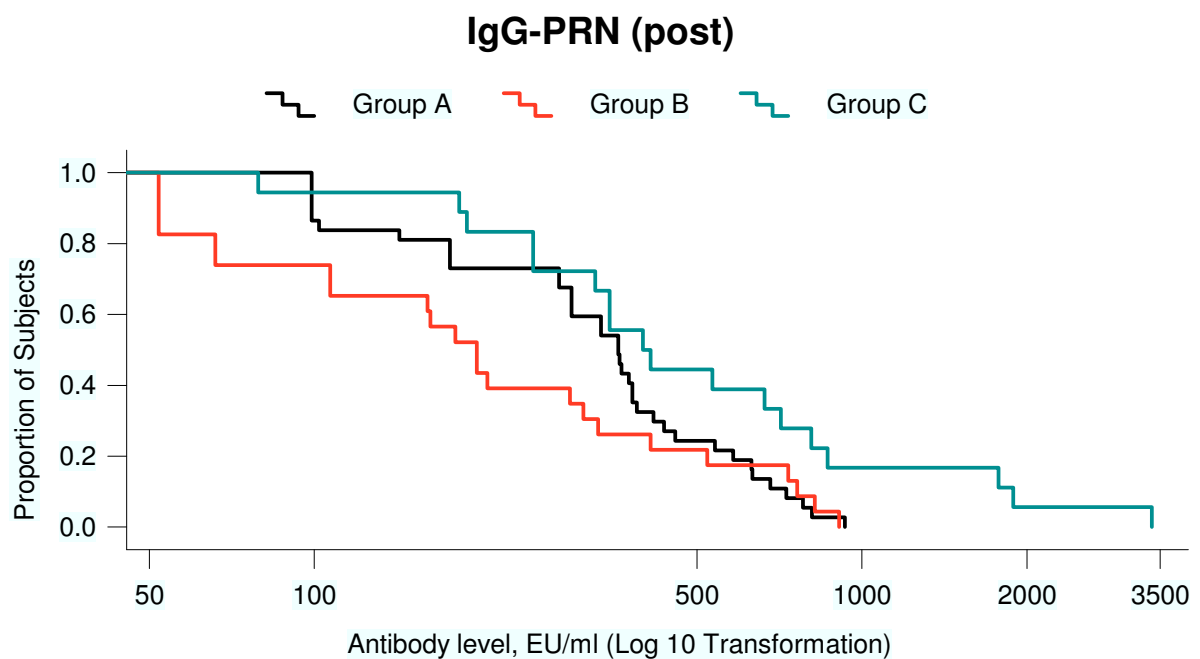
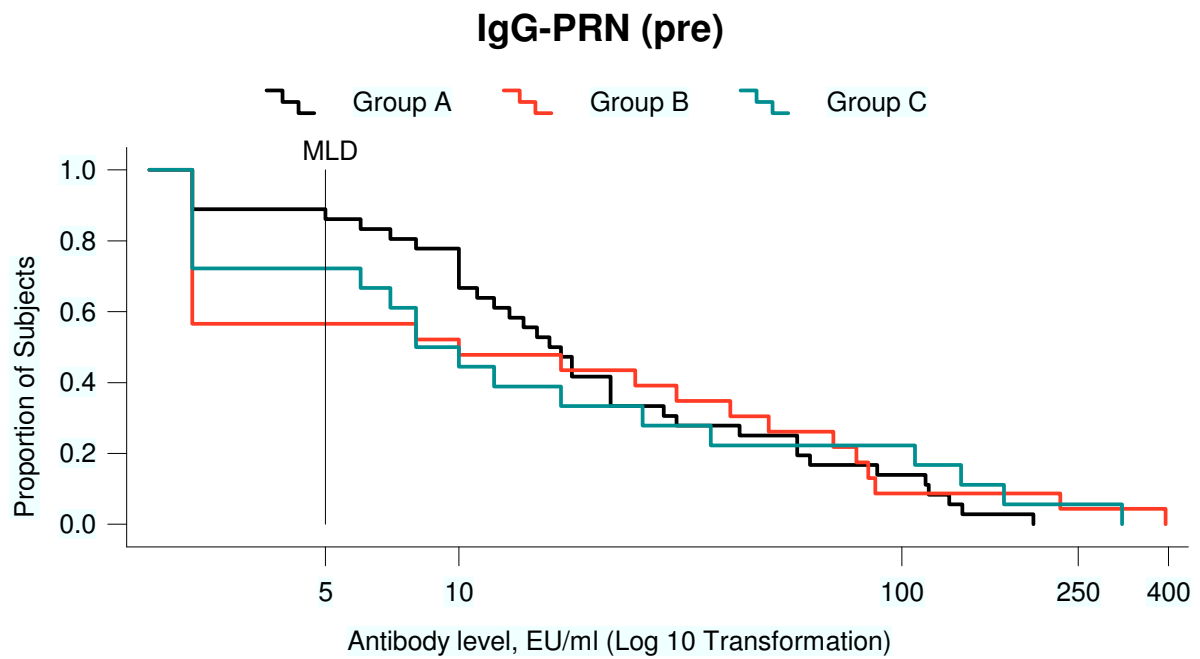
4.1.4. Serologische Antwort auf Pertactin (PRN)

Ein mindestens zweifacher Titeranstieg konnte für n=36/36 (100%) in Gruppe A/5aP, n=23/23 (100%) in Gruppe B/4aP und n=17/18 (94%) in Gruppe C/4wcP ermittelt werden.

Der GMT vor Impfung lag bei 18,8 EU/ml, 13,3 EU/ml bzw. 14,0 EU/ml (Gruppe A, B, C). Der GMT nach Impfung lag bei 600,7 EU/ml, 407,3 EU/ml bzw. 639,0 EU/ml (Gruppe A, B, C).

Für Pertactin existieren keine Vorwerte für Gruppe A aus der Vorgängerstudie (Liese et al. 2001), da der Biken DTaP-Impfstoff keine bzw. nur minimale Mengen PRN enthält.

Vor der Impfung waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar. Nach der Impfung sind bei allen Gruppen signifikante Titeranstiege zu verzeichnen. Es zeigt sich nach der Impfung eine Tendenz zu höheren Werten bei Gruppe A und C gegenüber Gruppe B (MWU = 0,40 bzw. 0,60). Zwischen Gruppe A und C konnte kein Unterschied in den Nachwerten ermittelt werden.



Abbildungen 5 und 6: Reverse kumulative Verteilungskurven von IgG-Antikörpern gegen PRN vor und nach Impfung.

Die minimale Nachweisgrenze (MLD, minimal level of detection) liegt bei 5 EU/ml. Antikörperlevel unter der Nachweisgrenze bekamen einen arbiträren Wert von der Hälfte der Nachweisgrenze (2,5 EU/ml) zugeordnet. (A/5aP Gruppe:n=36; B/4aP Gruppe:n=23; C/4wcP Gruppe:n=18).

4.2. Zellvermittelte Immunität / cell mediated immunity (CMI) vor und nach Impfung

4.2.1. Lymphozytenproliferation in-vitro nach Antigenstimulation mit PT

4.2.1.1. Stimulationsindex (SI) innerhalb der einzelnen Gruppen vor und nach Impfung

Der Stimulationsindex lässt sich für jeden einzelnen Probanden aus dem Quotienten des ^3H -Thymidin-Einbaus im Antigen-stimulierten Lymphozyten-Ansatz und nicht-stimulierten Ansatz berechnen. Er ist ein Maß dafür, um welchen Faktor die spezifische Stimulation mit dem jeweiligen Antigen die Proliferation der Lymphozyten erhöht. Es wird allgemein anerkannt, dass ab einem Stimulationsindex ≥ 4 eine positive zellvermittelte Immunität (CMI) auf das geprüfte Antigen vorliegt.

Vor der Impfung waren in Gruppe A/5aP nach Stimulation mit PT $n=14/37$ Probanden (37,8%) CMI-positiv, nach der Impfung waren es $n=23/37$ (62,2%).

In Gruppe B/4aP waren vor Impfung $n=9/21$ Probanden (42,9%) CMI-positiv, nach der Impfung waren es $n=17/21$ (81%), dies ist ein signifikanter Anstieg (Wilcoxon-Test, $p=0,022$). In Gruppe C/4wcP zeigte sich ein Anstieg von $n=9/17$ Probanden (52,9%) vor Impfung auf $n=13/17$ (76,5%) nach Impfung.

Im Median reagieren all drei Gruppen auf Antigenstimulation mit PT mit einem Anstieg des SI, wobei dieser bei Gruppe A am stärksten und bei Gruppe B am zweitstärksten ausfällt (Abb.1). In Gruppe A ist der Anstieg signifikant (Wilcoxon-Test, $p=0,047$).

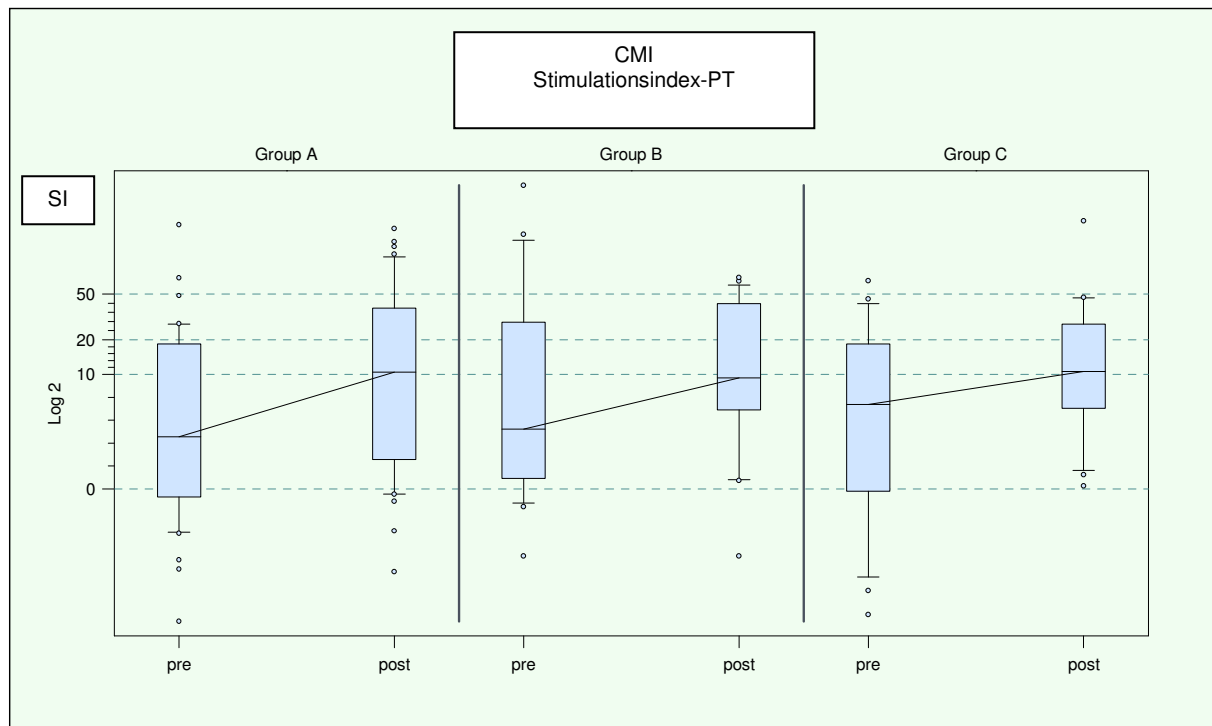


Abb.1: Boxplot-Darstellung der Stimulationsindices (SI) von Pertussistoxin (PT) vor (pre) und 28-36 Tage nach (post) Impfung.

Die SI sind auf der Y-Achse im Zweier-Logarithmus dargestellt. (A/5aP Gruppe:n=37; B/4aP Gruppe:n=21; C/4wcP Gruppe:n=17).

4.2.1.2. Vergleich des SI der drei Impfgruppen

Es zeigen sich weder vor noch nach der Impfung signifikante Unterschiede im Stimulationsindex bezüglich PT zwischen den drei Gruppen A/5aP, B/4aP und C/wcP (Mann-Whitney-U-Test). Auch hinsichtlich des Vorhandenseins eines positiven Stimulationsindex (≥ 4) bestehen zwischen den drei Gruppen weder vor noch nach Impfung signifikante Unterschiede. Positive Stimulationsindices gegenüber PT bestanden bei 43% der Probanden bereits vor Impfung.

4.2.2. Lymphozytenproliferation in-vitro nach Antigenstimulation mit FHA

4.2.2.1. Stimulationsindex (SI) innerhalb der einzelnen Gruppen vor und nach Impfung

Vergleicht man die Ausgangswerte der SI nach Antigenstimulation mit FHA mit denen nach PT-Stimulation, sieht man im Allgemeinen höhere Werte vor Impfung bei den Stimulationen mit FHA (Abb.1 und Abb.2).

Gruppe A/5aP hat auf Stimulation mit FHA hin vor Impfung 29/37 (78,4%) CMI-positive Probanden ($SI \geq 4$), nach Impfung steigt der Anteil der CMI-Positiven auf 32/37 (86,5%). Gruppe B/4aP zeigt einen signifikanten Anstieg von 13/21 (61,9%) auf 20/21 (95,2%), (Wilcoxon-Test, $p=0,039$). In Gruppe C/4wcP sind 11/17 (64,7%) der Probanden vor Impfung CMI-positiv, danach sind es 16/17 (94,1%). Nur in Gruppe B zeigt sich ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$), wobei nach Impfung auch ein sehr hoher Anteil der Probanden aus Gruppe C eine positive CMI erlangt haben.

Nach Antigenstimulation mit FHA ist in allen Gruppen im Median ein Anstieg der SI nach Impfung zu sehen, der bei Gruppe A und C Signifikanz erreicht (Wilcoxon-Test, $p=0,004$ bzw. $p=0,009$).

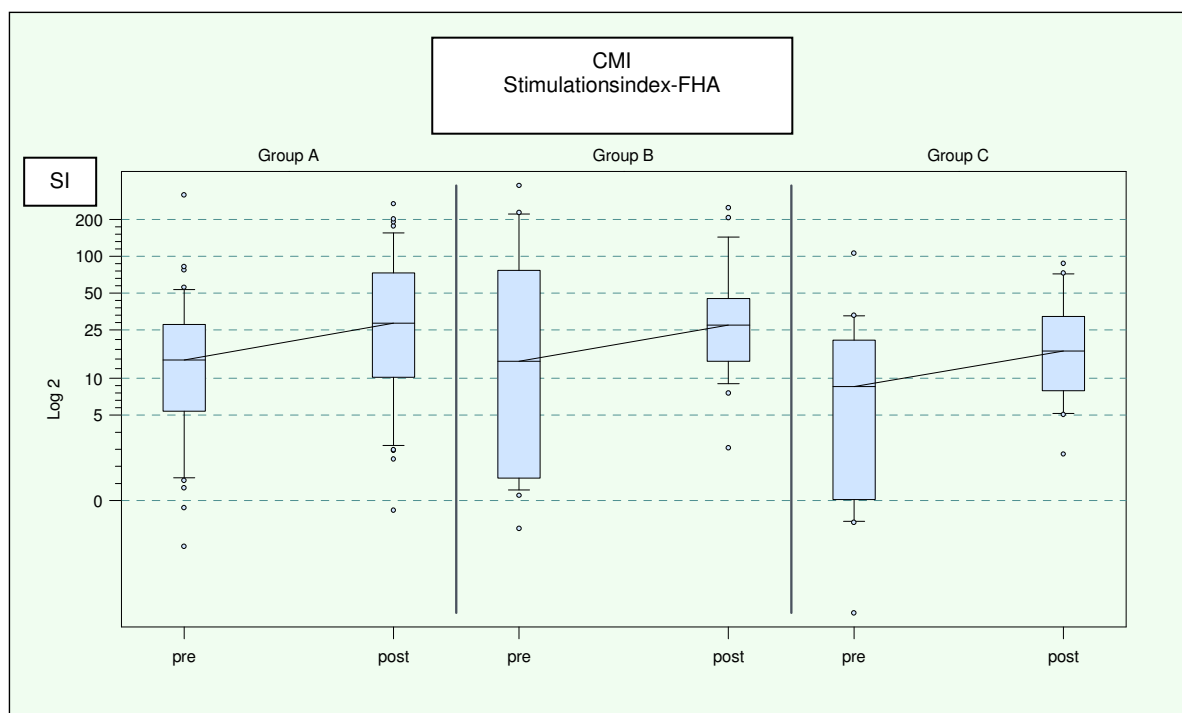


Abb.2: Boxplot-Darstellung der Stimulationsindices (SI) für filamentöses Hämagglutinin (FHA) vor (pre) und 28-36 Tage nach (post) Impfung.

Die SI sind auf der Y-Achse im Zweier-Logarithmus dargestellt. (A/5aP Gruppe:n=37; B/4aP Gruppe:n=21; C/4wcP Gruppe:n=17).

4.2.2.2. Vergleich des SI der drei Impfgruppen

Es zeigen sich weder vor noch nach der Impfung signifikante Unterschiede im Stimulationsindex bezüglich FHA zwischen den drei Gruppen A, B und C (Mann-Whitney-U-Test). Auch hinsichtlich des Vorhandenseins eines positiven Stimulationsindex (≥ 4) bestehen zwischen den drei Gruppen weder vor noch nach Impfung signifikante Unterschiede. Positive Stimulationsindices gegenüber FHA bestanden bei 71% der Probanden bereits vor Impfung.

4.2.3. Lymphozytenproliferation in-vitro nach Antigenstimulation mit PRN

4.2.3.1. Stimulationsindex (SI) innerhalb der einzelnen Gruppen vor und nach Impfung

Gruppe A/5aP hat vor der Impfung mit 13/37 (35,1%) den niedrigsten Anteil an Probanden mit positiver CMI nach Stimulation mit PRN aufzuweisen. Nach Impfung steigt der Wert auf 25/37 (67,6%), dies ist ein signifikanter Anstieg (Wilcoxon-Test, $p=0,008$). In Gruppe B/4aP ist ein geringer Anstieg von 13/21 (61,9%) CMI-positiven Probanden vor Impfung auf 15/21 (71,4%) nach Impfung sichtbar, Gruppe C/4wcP weist einen Anstieg von 9/17 (52,9%) auf 14/17 (82,6%) auf, dies ist jedoch ohne Signifikanz.

Im Median reagieren Gruppe A und C auf Antigenstimulation mit Pertactin (PRN) mit einem signifikanten Anstieg der SI nach Impfung (Wilcoxon-Test, $p=0,001$ bzw. $p=0,007$). Auffällig sind die hohen Ausgangswerte nach Stimulation mit PRN vor der Impfung in Gruppe B. Nach Impfung kommt es nicht zu einer Steigerung des SI-Medians in Gruppe B (Abb.3).

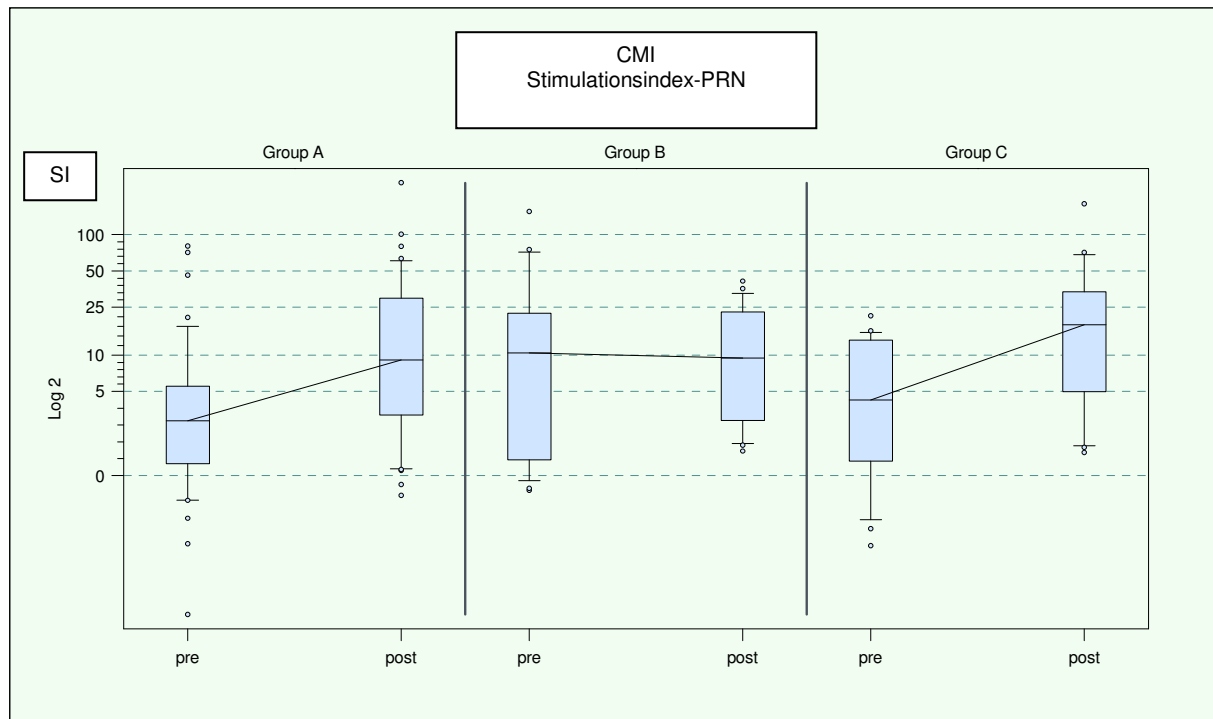


Abb.3: Boxplot-Darstellung der Stimulationsindices (SI) von Pertactin vor (pre) und 28-36 Tage nach (post) Impfung. (A/5aP Gruppe:n=37; B/4aP Gruppe:n=21; C/4wcP Gruppe:n=17).

4.2.3.2. Vergleich des SI der drei Impfgruppen

Vor der Impfung zeigen sich deutliche Unterschiede in der CMI auf Pertactin zwischen den Gruppen, wobei Gruppe B/4aP signifikant höhere Werte hat als Gruppe A/5aP (Wilcoxon-Mann-Whitney-U Test, $p=0,040$).

Nach der Impfung zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Stimulationsindex bezüglich PRN zwischen den drei Gruppen A/5aP, B/4aP und C/4wcP. Auch hinsichtlich des Vorhandenseins eines positiven Stimulationsindex (≥ 4) bestehen zwischen den Gruppen weder vor noch nach Impfung signifikante Unterschiede. Positive Stimulationsindices gegenüber PRN bestanden bei insgesamt 47% der Probanden bereits vor Impfung.

4.2.4. Lymphozytenproliferation in-vitro nach Antigenstimulation mit FIM

4.2.4.1. Stimulationsindex (SI) innerhalb der einzelnen Gruppen vor und nach Impfung

Alle Gruppen zeigen ähnliche Ausgangs- und Endwerte. In Gruppe A/5aP sind 22/37 (59,5%) Probanden mit positiver CMI vor Impfung, der Wert steigt nach Impfung auf 27/37 (73%). In Gruppe B/4aP sind vor der Impfung 11/21 (52,4%) der Probanden CMI-positiv, nach der Impfung sind es 16/21 (76,2%). Bei Gruppe C/4wcP kommt es zu einem Anstieg der CMI-positiven Probanden von 9/17 (52,9%) auf 14/17 (82,4%), diese Anstiege sind jedoch nicht signifikant.

Im Median reagieren alle Gruppen auf Stimulation mit FIM mit einem Anstieg der SI nach Impfung, Gruppe C hat einen signifikanten Anstieg aufzuweisen (Wilcoxon-Test, $p=0,023$). Gruppe A zeigt einen gerade nicht mehr signifikanten Anstieg ($p=0,053$) (Abb.4).

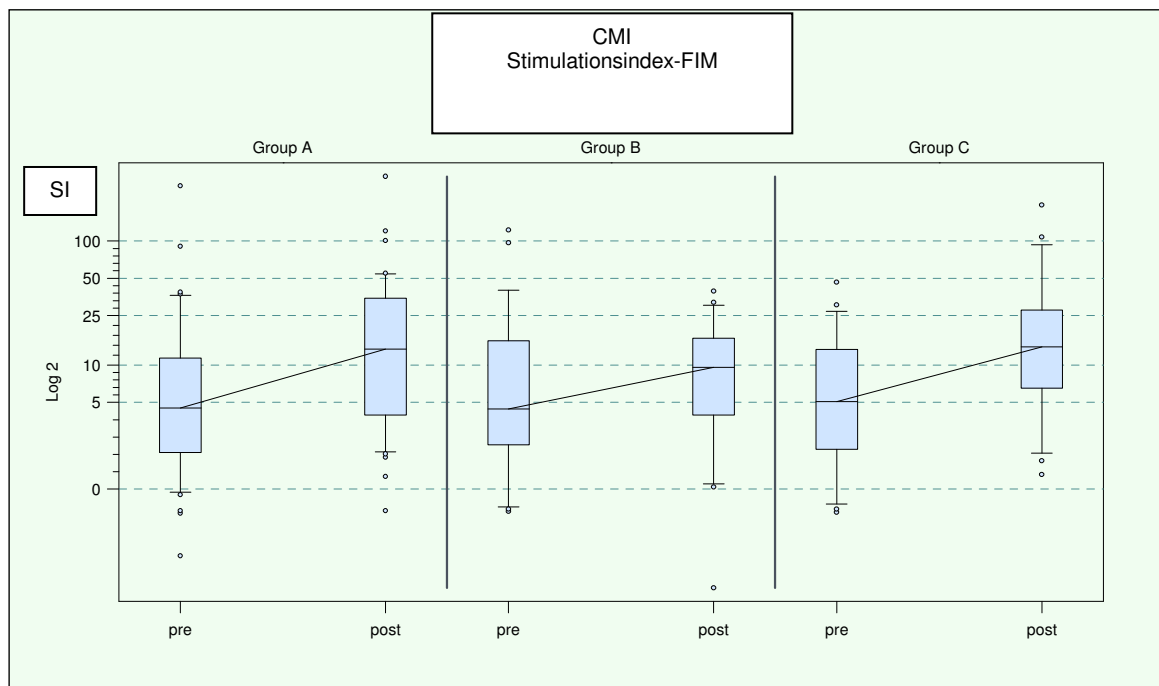


Abb.4:Boxplot-Darstellung der Stimulationsindices (SI) für Fimbrien (FIM 2/3) vor (pre) und 28-36 Tage nach (post) Impfung.

Die SI sind auf der Y-Achse im Zweier-Logarithmus dargestellt. (A/5aP Gruppe:n=37; B/4aP Gruppe:n=21; C/4wcP Gruppe:n=17).

4.2.4.2. Vergleich des SI der drei Impfgruppen

Es zeigen sich weder vor noch nach der Impfung signifikante Unterschiede im Stimulationsindex bezüglich FIM zwischen den drei Gruppen A, B und C (Mann-Whitney-U-Test). Auch hinsichtlich des Vorhandenseins eines positiven Stimulationsindex (≥ 4) bestehen zwischen den drei Gruppen weder vor noch nach Impfung signifikante Unterschiede. Positive Stimulationsindices gegenüber FIM bestanden bei 56% der Probanden bereits vor Impfung.

4.3. Zytokinproduktion in PT-stimulierten Lymphozytenkulturen nach Impfung

In den mit PT stimulierten und als Kontrolle nicht stimulierten Kulturen für die durchflusszytometrischen Analysen wurden Zytokine der Th-1-Antwort (IL-2, TNF- α , INF- γ) und der Th-2-Antwort (IL-4, IL-5, IL-10) aus den Überständen bestimmt.

Die Zytokin-Bestimmungen wurden nur in den Proben nach Impfung durchgeführt.

Für die statistische Auswertung konnten nur INF- γ Werte in die Berechnung einfließen, da nur diese konstant über dem Detektionslevel von 20 pg/ml lagen und sich die anderen Zytokine größtenteils darunter befanden.

Ein Streudiagramm der individuellen INF- γ Werte nach Impfung zeigt Abb. 1. In allen Gruppen (A/5aP, B/4aP und C/4wcP) zeigen sich in den mit PT stimulierten Ansätzen signifikant höhere INF- γ Werte als in den nicht stimulierten Kontroll-Ansätzen (Wilcoxon-Test; Gruppe A: $p < 0,001$; Gruppe B: $p = 0,0078$; Gruppe C: $p = 0,0156$).

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen bezüglich der INF- γ Sekretion nach PT-Stimulation (Mann-Whitney-U Test).

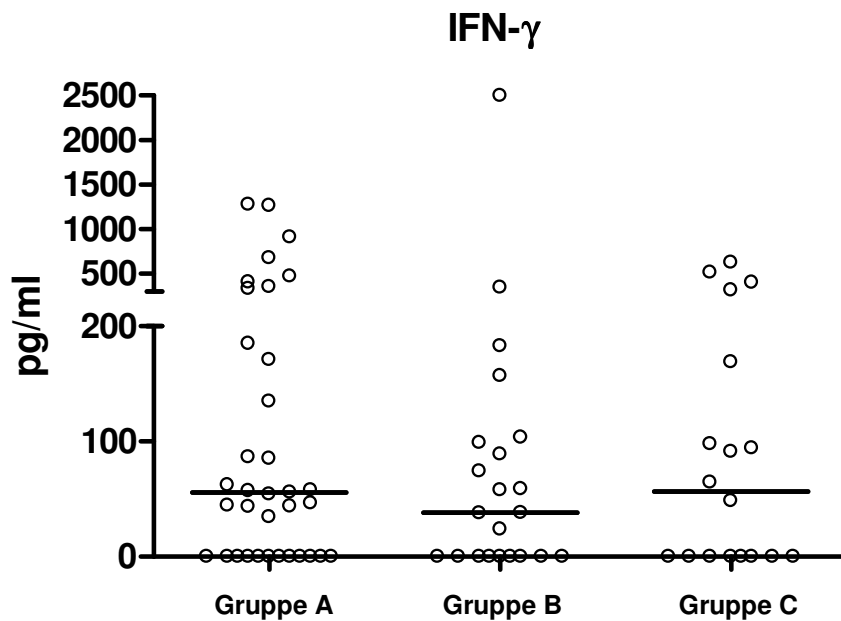


Abb.1: Streudiagramm der IFN- γ Sekretion nach Stimulation mit PT.

Die Zytokin-Sekretion nach Impfung wurde in Kulturüberständen nach 48-stündiger Stimulation mit PT gemessen. Zur besseren Darstellung von Ausreißern wurde die y-Achse zweigeteilt.

Die horizontalen Linien stehen für den Median.

Im Vergleich dazu kommt es nur bei einem geringeren Anteil der Probanden zu messbar hohen TNF- α Werten nach Impfung und Stimulation mit PT (Abb. 2).

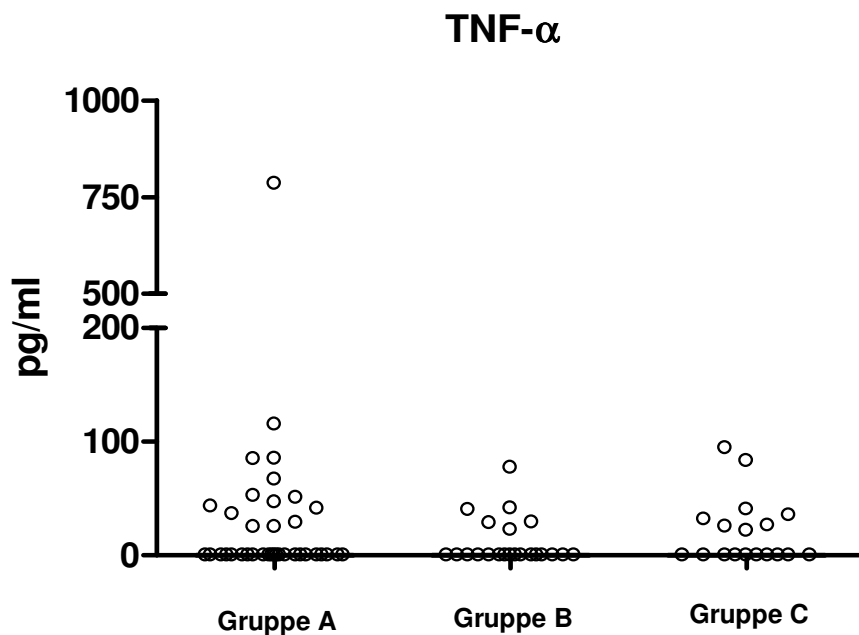


Abb. 2: Streudiagramm der TNF- α Sekretion nach Stimulation mit PT.

Die Zytokin-Sekretion wurde in Kulturüberständen nach Auffrischimpfung und 48-stündiger Stimulation mit PT gemessen.

Bei 8 der 78 Probanden sind messbar hohe IL-5 Werte aufgetreten, die verstärkte Th-2 Antworten andeuten können. Diese sind mehrfach mit starken Lokalreaktionen beziehungsweise Nebenwirkungen, wie zum Beispiel der Schwellung des gesamten Armes, assoziiert worden (Rowe et al. 2005). Für 6 der 8 Probanden liegen Informationen zur Reaktogenität der Impfung vor (simultane Teilnahme an der Reaktogenitätsstudie). Einer der 6 Probanden (16,6%) zeigte eine starke Schwellung und Rötung (siehe Tabelle 1), bei den anderen 5 Probanden (83,3%) wurde dies jedoch nicht beobachtet. Somit zeigt sich kein Zusammenhang zwischen erhöhter lokaler Reaktogenität und IL-5-Nachweis bei unseren Probanden.

Es konnte auch keine außergewöhnlich starke Reaktogenität (Fieber, Schmerz, Rötung, Schwellung) bei diesen Probanden im Vergleich mit der Gesamtstudienpopulation erkannt werden, dies wurde jedoch aufgrund der geringen Anzahl an Probanden mit messbar erhöhten IL-5 Werten und Impfreaktionen nicht statistisch getestet.

Probandennummer	Fieber	Schmerzen	Schwellung (cm)	Erythem (cm)
254	0	2	8,0	10,0
306	0	2	0	0
307	0	1	0	0
617	0	0	0	0
707	0	0	0	0
1416	0	0	0	0

Tabelle 1: Reaktogenität der Impfung bei 6 Probanden mit messbar hoher IL-5 Sekretion nach PT-Stimulation.

Alle 6 Probanden gehörten zur Gruppe A und nahmen gleichzeitig an der parallel laufenden Reaktogenitätsstudie einer 6. azellulären Pertussis-Auffrischimpfung teil.

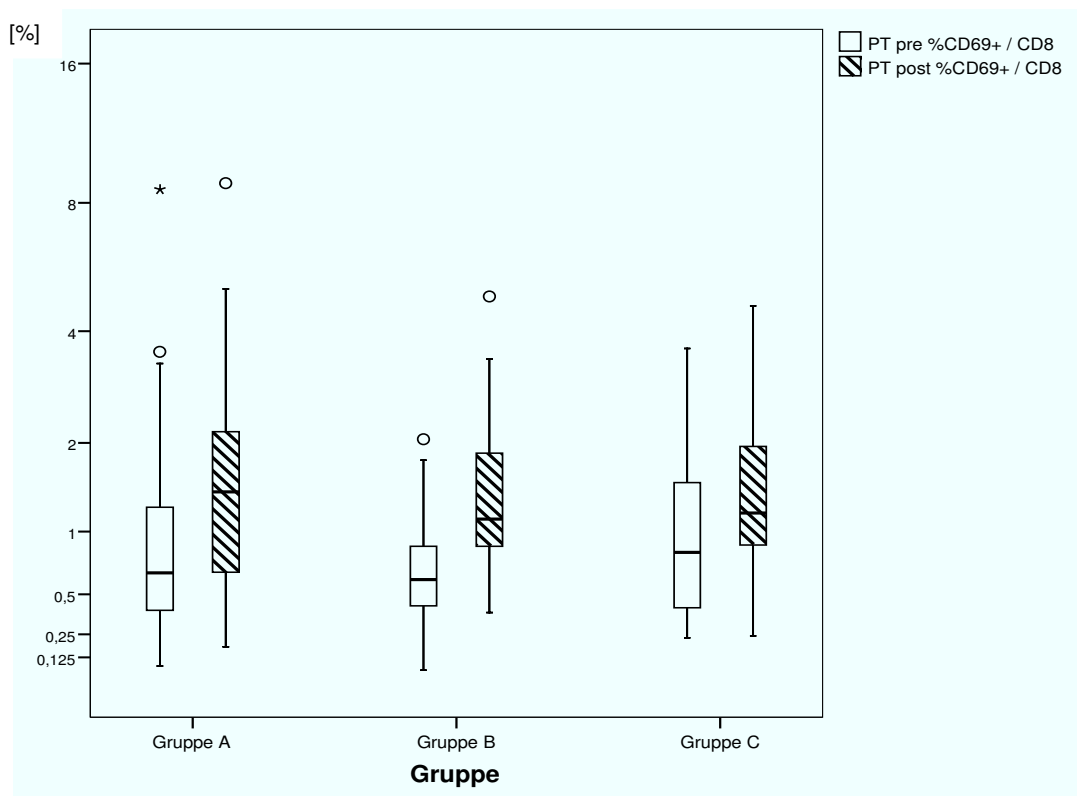
Definitionen: Fieber = orale Temperatur $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$; Schmerz: 1 = nicht beeinträchtigend, 2 = beeinträchtigend bei alltäglichen Aktivitäten, 3 = starke Beeinträchtigung bzw. Hinderung an der Durchführung alltäglicher Aktivitäten; Schwellung = Schwellung der Injektionsstelle bzw. deren Umgebung; Erythem = Rötung der Injektionsstelle und Umgebung.

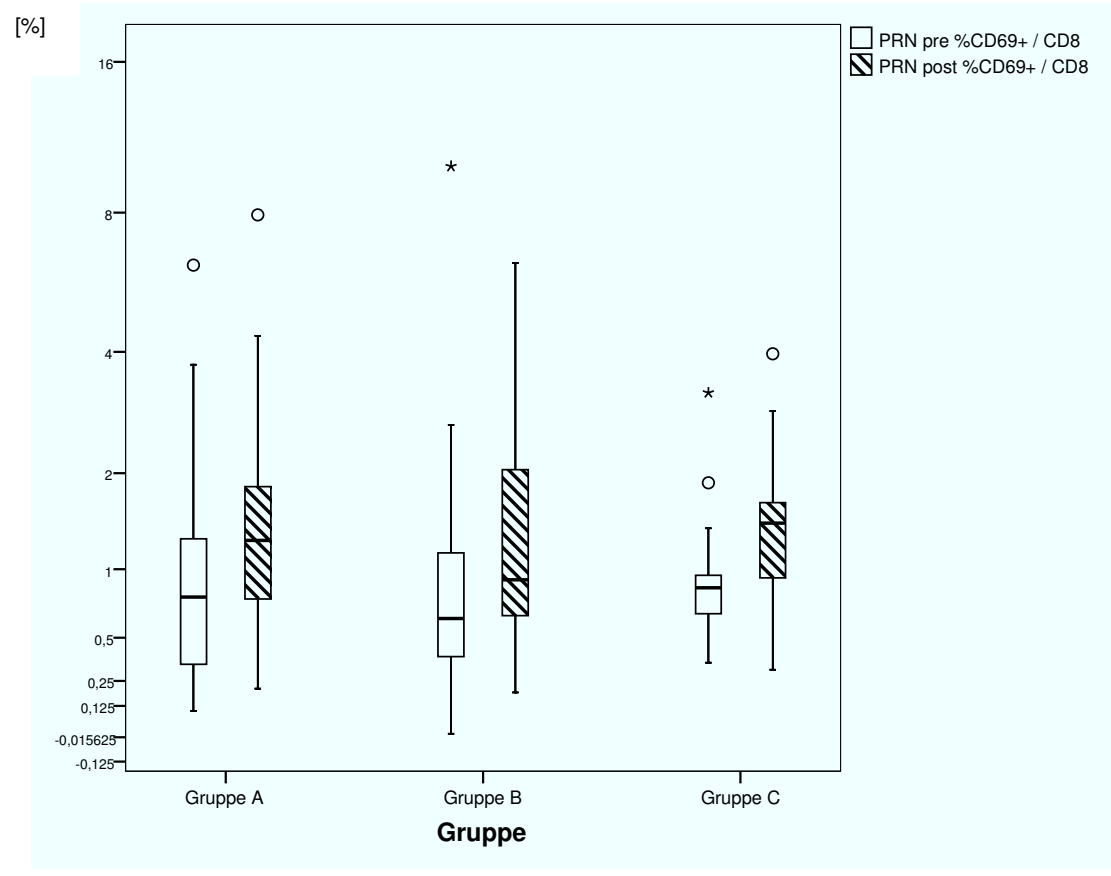
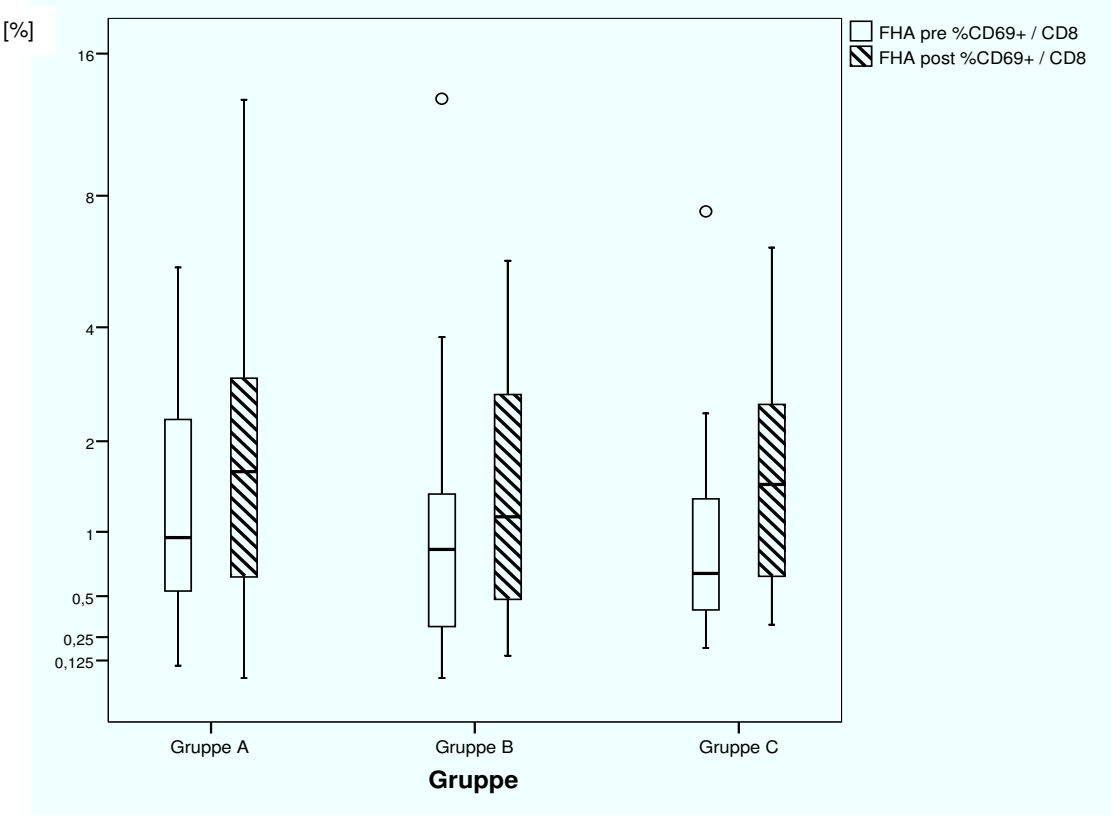
4.4. Immunphänotypisierung peripherer Lymphozyten und Untersuchung der Expression von Aktivierungsmarkern nach Stimulation mit Pertussisantigenen vor und nach Impfung

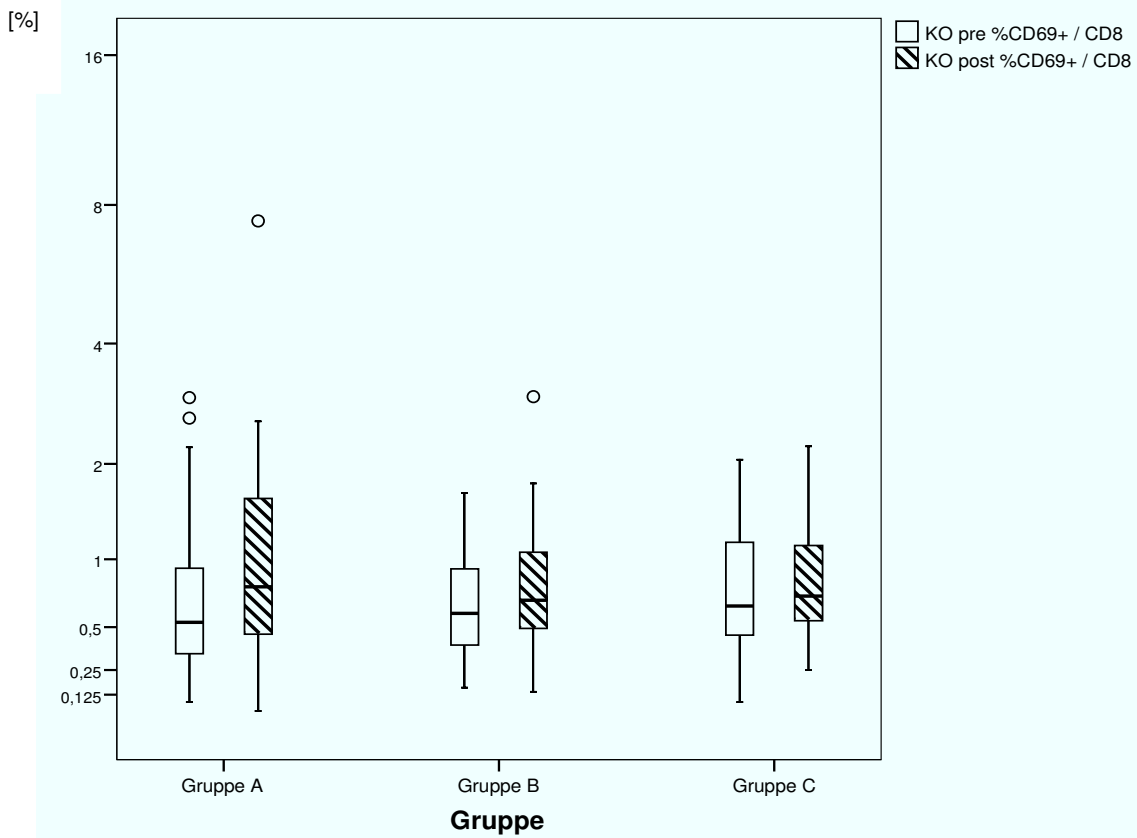
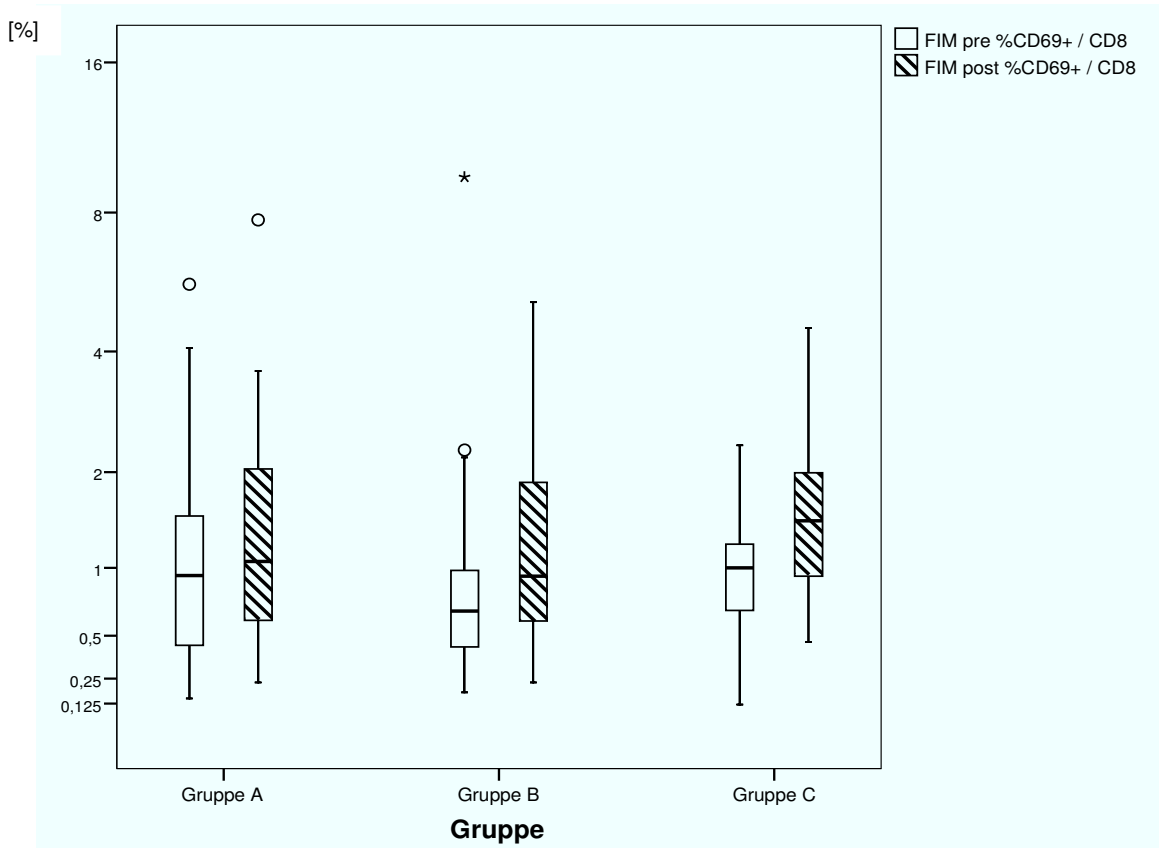
Die durchflusszytometrischen Analysen zur Immunphänotypisierung peripherer Lymphozyten und zur Expression von Aktivierungsmarkern wurden mit Antikörpern gegen CD 4, CD 8, CD 25 und CD 69 in Antigen-stimulierten und unstimulierten Kontrollen vor und nach Impfung durchgeführt.

Es konnten keine Unterschiede in der Expression der Aktivierungsmarker CD 25 und CD 69 auf CD 4+ T-Lymphozyten in stimulierten Kontrollen vor und nach Impfung gezeigt werden. Nach Impfung konnte in stimulierten Kulturen keine Änderung in der Anzahl der CD 8+ / CD 25+ Lymphozyten festgestellt werden, es ist jedoch ein deutlicher Anstieg von CD 8+ / CD 69+ Zellen in jeder einzelnen Gruppe zu beobachten gewesen (Abb. 1-6). Dieser Anstieg der CD 8+ / CD 69+ Zellen nach Stimulation war signifikant für alle vier getesteten Pertussis-Antigenen (PT ($p < 0,001$), FHA ($p = 0,021$), PRN ($p = 0,003$) und FIM ($p = 0,005$); Wilcoxon-Test). In unstimulierten Kontrollen trat dieser Effekt nicht ein.

Der Anstieg der CD 8+ / CD 69+ Lymphozyten nach Impfung tritt in allen drei Impfguppen auf, ohne sichtbare Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 6; kein statistischer Zwischengruppenvergleich).







Abbildungen 1-5: Anstieg der CD8+/CD69+ Lymphozyten nach Impfung, Gruppen einzeln dargestellt.

Die obere Begrenzung der Box steht für das 75ste Perzentil, die untere für das 25ste Perzentil. Der waagerechte Strich in der Box kennzeichnet den Median der SI. Die vertikalen Ausläufer über und

unter der Box markieren den größten und kleinsten Wert, der nicht als extremer Wert oder Ausreißer klassifiziert wird (Ausreißer: Werte, deren Abstand vom 25sten bzw. 75sten Perzentil zw. dem 1,5- und 3-fachen der Boxhöhe liegen. Extreme Werte: Abstand extremer Werte von dem 25sten o. 75sten Perzentil mehr als das 3-fache der Boxhöhe). Die y-Achse ist im Zweier-Logarithmus dargestellt.

Ein signifikanter Anstieg der CD8+/CD69+ Lymphozyten konnte nach Stimulation mit PT, FHA, PRN und FIM gezeigt werden, jedoch nicht in unstimulierten Kontrollgruppen (Gruppe A: n=37, Gruppe B: n=21, Gruppe C: n=17).

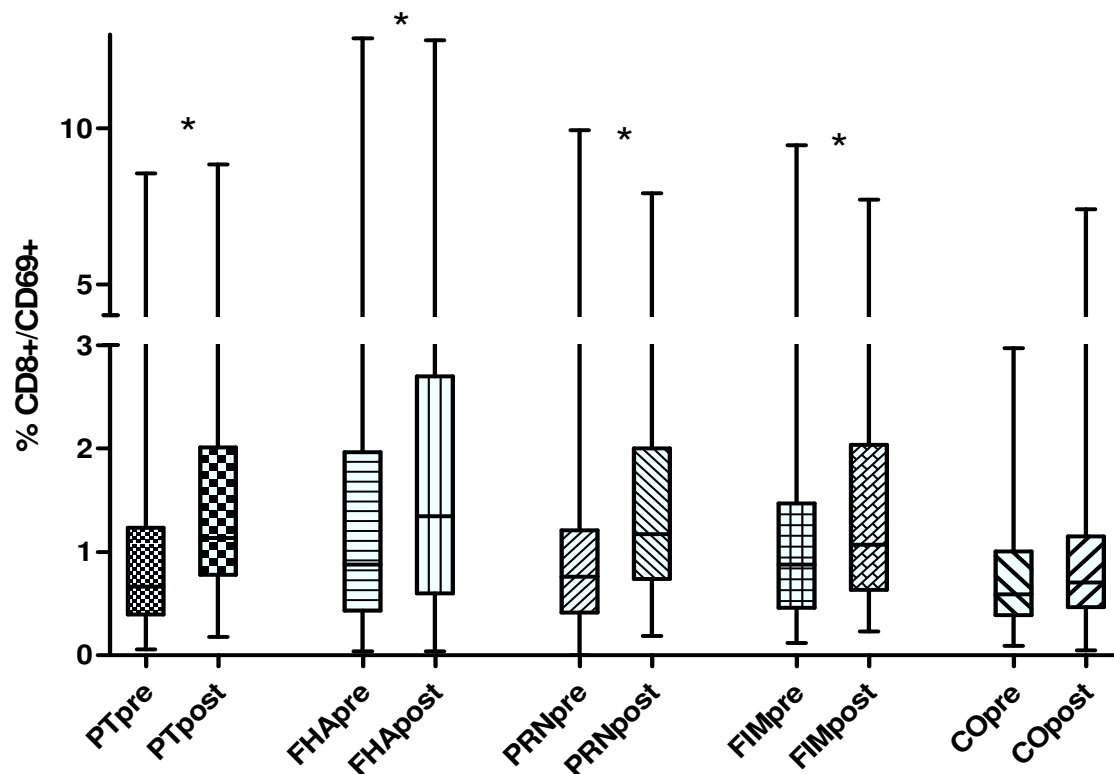


Abbildung 6: Anstieg der CD8+/CD69+ Lymphozyten nach Impfung, Gruppen zusammengefasst.

Oberflächenmarker auf T-Lymphozyten wurden nach 48-stündiger Stimulation mit *B. pertussis* Antigenen (PT, FHA, PRN, FIM) oder ohne Antigenstimulation (Kontrollen) gemessen. Durchflusszytometrische Analysen wurden vor (pre) und nach (post) der azellulären Auffrischimpfung durchgeführt. Es wird der prozentuale Anteil CD8+/CD69+ Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl dargestellt. Zur besseren Darstellung von Ausreißern wurde die y-Achse zweigeteilt. Die obere Begrenzung der Box steht für das 75ste Perzentil, die untere für das 25ste Perzentil. Der waagerechte Strich in der Box kennzeichnet den Median der SI, die vertikalen Ausläufer markieren die 10te (unten) bzw. 90ste Perzentile (oben).

* Signifikanter Anstieg nach Impfung (Wilcoxon-Test).

5. Diskussion

Das vorrangige Ziel dieser Doktorarbeit und der zugrunde liegenden Studie ist die Untersuchung der Pertussis-spezifischen Immunität bei drei Gruppen von 10- bis 14-jährigen Jugendlichen mit unterschiedlicher Grundimmunisierung (mit Ganzkeim- bzw. azellulärem Impfstoff), die mit einem azellulären Pertussis-Impfstoff eine Auffrischimpfung erhalten haben.

Die Immunität in der Gruppe der Adoleszenten, welche im Alter von 4 bis 6 Jahren eine zusätzliche 5. Dosis eines azellulären Pertussis-Impfstoffs erhalten haben (die seit März 2006 in Deutschland offiziell empfohlen wird), soll mit der Pertussis-spezifischen Immunität von gleichaltrigen Adoleszenten, die diese zusätzliche Auffrischimpfung nicht erhalten haben, verglichen werden. Des Weiteren sollen eventuell vorhandene Unterschiede in der Immunantwort Jugendlicher, deren Grundimmunisierung entweder mit azellulärem oder mit Ganzkeimimpfstoff stattfand, herausgearbeitet werden. Diese Untersuchungen sollen dazu beitragen, den Zeitpunkt der Auffrischimpfungen und die notwendige Anzahl der Impfungen besser beurteilen zu können.

5.1. Pertussis-spezifische humorale Immunität bei Adoleszenten mit unterschiedlicher Grundimmunisierung vor und nach azellulärer Pertussis-Auffrischimpfung

In allen drei Impfgruppen konnten nach Impfung signifikante Titeranstiege bei fast allen Teilnehmern gegen die getesteten Antigene (PT, FHA und PRN) im Vergleich zu den Werten vor Impfung erreicht werden. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen im 2-fachen Titeranstieg nach Impfung, die Seropositivität (Werte ≥ 5 EU/ml) nach Impfung gegenüber PRN und FHA betrug 100%, gegenüber PT 88%.

In der Vorgängerstudie wurde die Sicherheit und Immunogenität der Gabe einer fünften Dosis des azellulären Biken-Impfstoffes untersucht (Liese et al. 2001). Im Vergleich zum GMT (geometric mean titre) der Antikörpertiter aus der Vorgängerstudie nach der 5. Dosis azellulären Impfstoffes zeigte sich über einen Zeitraum von 6-8 Jahren eine deutliche Abnahme der Antikörpertiter. So lag der GMT

der Antikörpertiter gegen PT in der Vorgängerstudie nach Impfung bei 123,1 EU/ml. In unserer aktuellen Studie überstiegen die Antikörpertiter gegen PT vor Impfung nur noch bei 36% der Probanden in Gruppe A die Nachweisgrenze und der GMT lag bei 4,2 EU/ml. Auch nach der 6. Dosis erreichte der GMT nur 16,4 EU/ml, dieser Wert ist deutlich niedriger als der nach der 5. Dosis gemessene Wert. Gegen FHA wurde in unserer Studie nach Impfung ein niedrigerer GMT (161,0 EU/ml) erreicht als nach der Impfung im Rahmen der Vorgängerstudie (241,1 EU/ml). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Untersuchungen der beiden Studien nicht in demselben Labor stattfanden und nicht dieselben Antigene verwendet wurden, sodass ein direkter Vergleich nicht möglich ist. Es ist eher unwahrscheinlich, dass die niedrigeren Titer im Vergleich zur Vorstudie durch den reduzierten Antigengehalt des in der aktuellen Studie verwendeten 5-Komponenten-Impfstoffes verursacht werden. Dieser enthält zwar im Gegensatz zu dem zuvor verwendeten Biken-Impfstoff Tripedia® (jeweils 23,4 µg PT und FHA) nur 2,5 µg PT, jeweils 5 µg FHA und FIM und 3 µg PRN, führte jedoch in vorangehenden Studien zur Induktion deutlich höherer Antikörpertiter (Halperin et al. 2000; Pichichero et al. 2005; Pichichero et al. 2006).

In einer von Tindberg et al. durchgeführten Kohorten-Nachuntersuchung wurde die Dauer der Antikörperantwort und die Immunität 10- bis 12-jähriger Kinder mit unterschiedlicher Grundimmunisierung (zwei bzw. drei Dosen des azellulären Biken-Impfstoffes, der auch in unserer Studie verwendet wurde oder drei Dosen eines Ganzkeimimpfstoffes) und azellulärer Auffrischimpfung im Alter von 17 bis 24 Monaten untersucht. Es zeigten sich signifikant niedrigere Konzentrationen von Antikörpertitern gegen PT in den Proben, die im Alter von 11 Jahren abgenommen wurden im Vergleich zu den zwei Jahre nach der letzten Auffrischimpfung gemessenen Antikörpertitern im Alter von 4 Jahren. Der Vergleich der Gabe von zwei bzw. drei Dosen azellulären Impfstoffes zur Grundimmunisierung gefolgt von einer azellulären Auffrischimpfung ergab keine Unterschiede in den Antikörpertitern. Ebenso konnte kein Unterschied in den Antikörpertitern gegen PT zwischen Kindern, die eine Grundimmunisierung mit Ganzkeimimpfstoff, gefolgt von einer azellulären Auffrischimpfung, und Kindern, die ihre Grundimmunisierung und Auffrischimpfung mit azellulärem Impfstoff erhielten, festgestellt werden (Tindberg et al. 1999). Diese Ergebnisse deuten auf eine qualitativ und quantitativ vergleichbare Antikörperantwort der Gruppen mit unterschiedlicher Grundimmunisierung hin und sind qualitativ

vergleichbar mit unseren Ergebnissen bezüglich PRN und FHA in allen drei Gruppen. Eine Ausnahme bilden hierbei die Antikörpertiter gegen PT in Gruppe C (Grundimmunisierung mit Ganzkeimimpfstoff), die in unserer Studie nach Impfung signifikant höher sind als in den beiden Gruppen mit azellulärer Grundimmunisierung. Der in unserer Studie gemessene GMT gegenüber PT in Gruppe C vor Impfung ist mit 9 EU/ml allerdings auch quantitativ vergleichbar mit den Werten aus der Studie von Tindberg et al., in der der GMT in der Gruppe von 11-jährigen Jugendlichen, die zur Grundimmunisierung Ganzkeimimpfstoff erhielten, ebenfalls 9 EU/ml beträgt. In der Studie von Tindberg et al. wurden bei 77% der Jugendlichen messbare Antikörpertiter (≥ 4 EU/ml) gegen PT nachgewiesen, in unserer Studie hatten nur 36% (Gruppe A), 30% (Gruppe B) bzw. 56% (Gruppe C) der Probanden einen nachweisbaren Titer (≥ 5 EU/ml) gegen PT vor der Impfung.

Die in unserer Studie gemessenen Antikörpertiter gegen die Antigene PT, FHA und PRN liegen im Vergleich zu Studien anderer Arbeitsgruppen fast ausschließlich im Bezug auf PT in eher niedrigen Bereichen. Nach der vierten Dosis eines azellulären Impfstoffes in einer Studie von Zepp et al. liegen alle Antikörpertiter in höheren Bereichen als in unserer Studie nach der sechsten Dosis (Zepp et al. 1996). Diesen Ergebnissen können unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen. So können die Messungen in verschiedenen Laboren den direkten Vergleich erschweren bis unmöglich machen, da eine gewisse Variabilität in den Untersuchungen unter anderem durch voneinander abweichende Referenzen schwer zu vermeiden ist. Eine weitere Schwierigkeit des Vergleichs von Ergebnissen unterschiedlicher Studien liegt in der Verwendung verschiedener Impfstoffe in den Studien.

In einer Übersichtsstudie von Edwards et al., in der 13 azelluläre Impfstoffe verglichen wurden, zeigte sich, dass die Immunogenität der azellulären Impfstoffe vor allem in Bezug auf PT nicht nur von der im Impfstoff enthaltenen PT-Antigenkonzentration abhängig ist, sondern auch von anderen Faktoren wie der Antigenprozessierung und der Art der Inaktivierung von PT (Edwards et al. 1995; Greco et al. 1996). Rekombinant inaktiviertes PT hat demnach eine bessere Immunogenität als chemisch inaktiviertes PT, wobei der in unserer Studie zur Grundimmunisierung verwendete, mit Formalin inaktivierte, azelluläre Biken-Impfstoff in der Studie von Edwards et al. eine hohe Antikörperproduktion gegenüber PT induzierte. Eine ältere Studie von Edwards et al. berichtet über den Unterschied in

der Immunogenität von zwei verschiedenen Ganzkeimimpfstoffen (Lederle und Connaught), die sich deutlich in ihrer Fähigkeit zur Induktion von Antikörpern gegen PT unterscheiden (Edwards et al. 1991).

Auffallend ist der zuvor erwähnte signifikante Gruppenunterschied nach Impfung bei der serologischen Antwort auf PT, der zu Gunsten der Gruppe, die ihre Grundimmunisierung mit Ganzkeimimpfstoff plus einer azelluläre Auffrischimpfung erhielt, im Vergleich zu den zwei anderen Gruppen, die zuvor 4 bzw. 5 Dosen eines azellulären Pertussis-Impfstoffes erhielten, auftritt. Die im Zwischengruppenvergleich mit Ausnahme der Antikörpertiter gegen Pertussistoxin relativ ähnlichen Antikörperantworten der drei unterschiedlichen Impfgruppen, die auch schon in einer Studie von Tindberg et al. 1999 beschrieben wurden, lassen sich am besten durch die Hypothese der natürlichen Boosterung („Stille Feiung“) erklären. Als „Stille Feiung“ bezeichnet man die Immunantwort des Körpers im Rahmen einer symptomlosen beziehungsweise inapparenten Infektion mit einem Krankheitserreger. Der zugrunde liegende Mechanismus ist durch die adaptive Immunantwort mit Bildung von Gedächtniszellen bzw. eines immunologischen Gedächtnisses erklärbar, das im Falle eines erneuten Kontaktes mit dem Erreger eine schnelle und spezifische Aktivierung von antigenspezifischen T-Effektorzellen und Antikörper-bildenden B-Zellen ermöglicht. Es wird angenommen, dass diese „stummen Auseinandersetzungen“ des Wirtes durch wiederholte Exposition mit dem Erreger, die vor allem bei endemischer Zirkulation des Erregers stattfinden, zu einer Verstärkung der bestehenden beziehungsweise zur Neubildung und Aufrechterhaltung einer schützenden Immunität ohne Erkrankung führen können (siehe Abbildung 1).

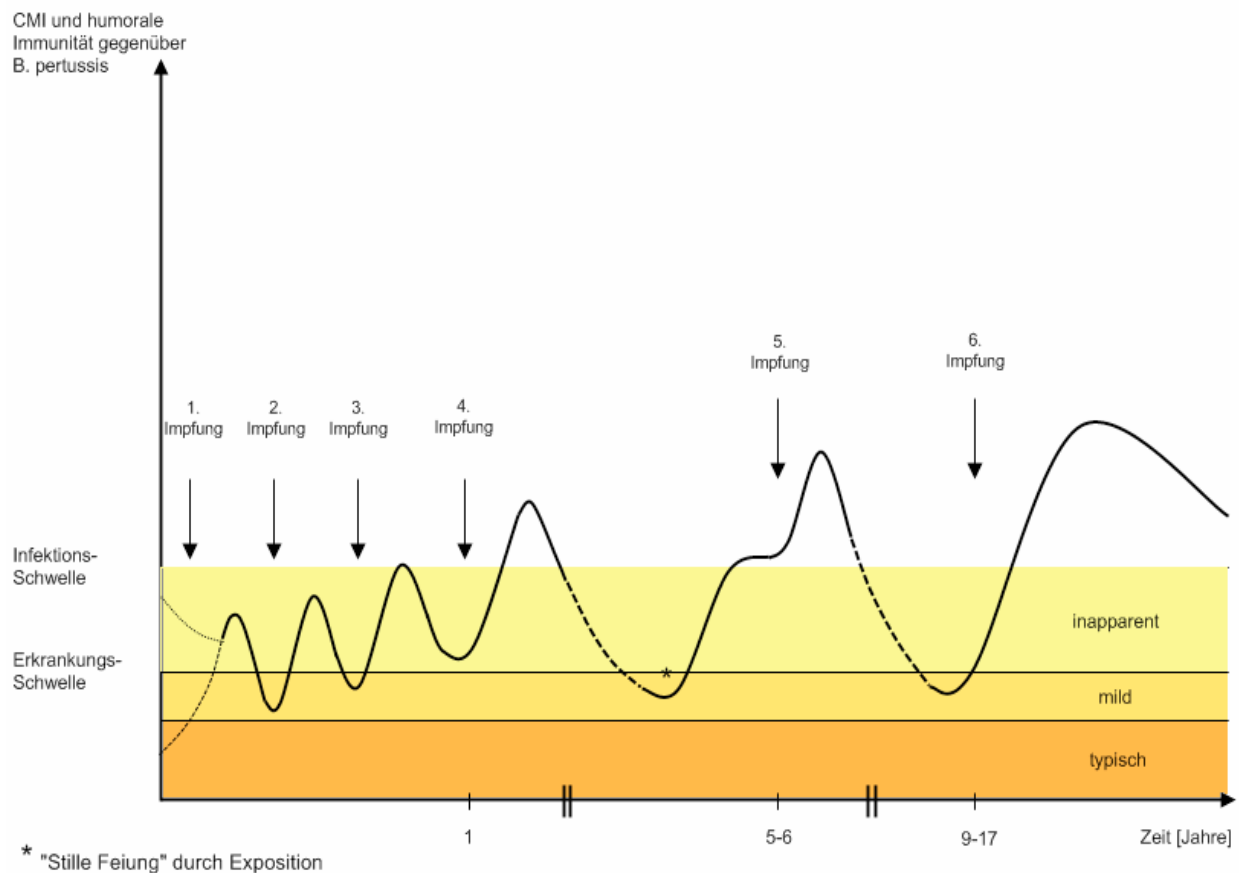


Abb. 1: Schema der Immunität durch Impfung und durch „Stille Feiung“ bei Exposition gegenüber *B. pertussis*.

Zu dieser Hypothese passt auch, dass vor der Auffrischimpfung in den serologischen Analysen die Antikörpertiter gegen PRN und FIM nach Antigenstimulation deutlich höher sind als gegen PT, obwohl sie gar nicht (FIM) oder nur in Restspuren (PRN) in dem ursprünglich zur Grundimmunisierung verwendeten azellulären Biken-Impfstoff enthalten sind (Biken DTaP).

Diese durch Exposition und subklinische Infektionen hervorgerufene Stimulierung des spezifischen Immunsystems gegenüber den Antigenen des Erregers führt vor allem zu einem Anstieg der Antikörper gegen die Adhäsionsantigene FHA und PRN (Isacson et al. 1995; Ausiello et al. 2000). So berichteten Isacson et al. eine Seropositivität von 80%-100% gegenüber FHA und PRN bei Kindern, die mit einem nur PT als Antigen enthaltenden Impfstoff geimpft wurden. Antikörper gegen FHA und PRN können jedoch in begrenztem Maße auch durch Infektionen mit *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica*, sowie durch Infektionen mit kreuzreagierenden Antigenen anderer Organismen, wie zum Beispiel *Haemophilus influenzae* oder

Mycoplasma pneumoniae, entstehen (Isacson et al. 1995; Storsaeter et al. 1998; Vincent et al. 2000).

Ein Anstieg der Antikörper gegen PT ist im Allgemeinen nach klinischer Erkrankung (Ausiello et al. 2000; Hodder et al. 2000) und nach Impfung mit Ganzkeim- und azellulärem Impfstoff zu beobachten. Die Datenlage zu Induktion von Antikörpern gegen PT bei asymptomatischen Infektionen ist uneinheitlich. Es existieren einerseits Arbeiten, die davon ausgehen, dass subklinische Infektionen nicht zu einer Bildung von Antikörpern gegen PT führen (Isacson et al. 1993; Ausiello et al. 1999). Ergebnisse anderer Arbeiten hingegen sprechen für eine Induktion von PT-Antikörpern durch subklinische Infektionen. In diesen Arbeiten wird die Vermutung geäußert, dass die Bildung von PT-Antikörpern außerdem abhängig von der Schwere der Infektion ist (Thomas et al. 1989; Long et al. 1990; Storsaeter et al. 1992). Das Pertussistoxin ist spezifisch für *B. pertussis*.

Die schon zuvor erwähnte signifikant höhere Antikörperantwort gegenüber PT nach Impfung in der Gruppe, bei der die Grundimmunisierung mit Ganzkeimimpfstoff durchgeführt wurde, war überraschend.

Eine in diesem Zusammenhang interessante Arbeit von Pichichero et al., die die Immunogenität und Sicherheit der Gabe einer fünften Dosis von sechs verschiedenen azellulären Impfstoffen und eines Ganzkeimimpfstoffes bei 4- bis 6-jährigen Kindern mit unterschiedlicher Grundimmunisierung vergleicht, liefert Ergebnisse, die sich mit unseren Ergebnissen decken (Pichichero et al. 2000). Dabei zeigt sich, dass es bei Verwendung von Ganzkeimimpfstoff in der Vorgeschichte nach der 5. Impfdosis in fast allen Fällen zu höheren Antikörpertitern gegen PT kommt als bei alleiniger Verwendung azellulären Impfstoffes in der Vorgeschichte.

Eine später folgende Studie von Pichichero et al. befasste sich mit der Gabe einer 6. Dosis zweier unterschiedlicher Tdap-Impfstoff bei 10- bis 18-jährigen Jugendlichen mit unterschiedlicher Grundimmunisierung (Pichichero et al. 2006). Auch in dieser Studie zeichnete sich ein Unterschied zwischen den Probanden, die zur Grundimmunisierung und Auffrischimpfungen nur azellulären Impfstoff erhielten und denen, die mit Ganzkeim- und azellulärem Impfstoff geimpft wurden, ab. In fast allen Gruppen, die mindestens 3 bis 5 Dosen eines Ganzkeimimpfstoffes erhielten, waren sowohl vor als auch nach der 6. Impfdosis die Antikörpertiter gegen PT höher als in den ausschließlich mit azellulärem Impfstoff geimpften Gruppen.

Dem gegenüber stehen jedoch die Ergebnisse anderer Studien, die keine stärkere Induktion der Antikörperantwort gegen PT durch Ganzkeimimpfstoffe im Vergleich zur Verwendung von azellulären Impfstoffen nachweisen konnten (Tindberg et al. 1999; Guiso et al. 2007). In der Studie von Tindberg et al. konnte sowohl 2 als auch 9 Jahre nach Auffrischimpfung mit azellulärem Impfstoff im Alter von 18-24 Monaten kein Unterschied in der Höhe der Antikörperantwort gegenüber PT zwischen Probanden, die entweder Ganzkeim- oder azellulären Pertussisimpfstoff zur Grundimmunisierung erhielten, nachgewiesen werden. Guiso et al. untersuchten die humorale und zelluläre Immunität von Probanden, die für ihre Grundimmunisierung und Auffrischimpfung entweder Ganzkeim- oder azellulären Impfstoff erhielten. Die einen Monat nach der Auffrischimpfung im Alter von 16-18 Monaten gemessenen Antikörpertiter gegenüber PT lagen nach Impfung mit azellulärem Impfstoff mit 130,8 EU/ml deutlich höher als nach Impfung mit Ganzkeimimpfstoff (21 EU/ml). Jeweils 3 und 6 Jahre danach konnte kein Unterschied in den Antikörpertitern gegenüber PT zwischen den Empfängern von azellulärem bzw. Ganzkeimimpfstoff mehr festgestellt werden. Der GMT der Antikörper gegenüber PT betrug 3 Jahre nach Auffrischimpfung mit azellulärem Impfstoff 5,9 EU/ml und nach Ganzkeimimpfstoff 6,6 EU/ml. Auch 6 Jahre nach der Auffrischimpfung zeigten die Antikörpertiter gegenüber PT ähnliche Werte von 5,8 EU/ml (azellulärer Impfstoff) und 5,6 EU/ml (Ganzkeimimpfstoff).

Unterschiedliche Überlegungen zur Erklärung unserer Ergebnisse sind möglich. Wenn man davon ausgeht, dass klinische Infektionen einen Anstieg von PT hervorrufen, könnte man eventuell den Rückschluss ziehen, der Ganzkeimimpfstoff wäre in seiner Wirksamkeit weniger effizient gewesen als der azelluläre Impfstoff und es sei somit in Gruppe C vermehrt zu klinischen Erkrankungen gekommen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass vorangegangene klinische Pertussis-Erkrankungen ein Ausschlusskriterium der Studie waren. Zusätzlich stehen dieser Hypothese Studien gegenüber, die den Ganzkeimimpfstoff mit 96%-98% schützender Effektivität als hochwirksam bewerten und die eingesetzten Ganzkeimimpfstoffe letztlich sogar als wirksamer einstufen als die verwendeten geprüften azellulären Impfstoffe (Schmitt et al. 1996; Liese et al. 1997).

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der hohen PT-Antikörpertiter in der Gruppe, die eine Grundimmunisierung mit dem Ganzkeimimpfstoff erhielt, könnte

möglicherweise eine frühzeitige Bahnung des Immunsystems durch die Grundimmunisierung mit Ganzkeimimpfstoff in Richtung einer stärkeren Aktivierung von B-Gedächtniszellen sein, die nach Entwicklung zu Plasmazellen für die gezielte Antikörperproduktion zuständig sind. Da wir keine Unterschiede im 2-fachen Titeranstieg und in der CMI gegenüber PT bei den Jugendlichen mit unterschiedlicher Grundimmunisierung gesehen haben, kann der Unterschied in den Antikörpertitern gegenüber PT nach Impfung nicht durch eine Anergie einiger Probanden aus den Gruppen mit azellulärer Grundimmunisierung gegenüber PT erklärt werden.

B-Gedächtniszellen reagieren nach ihrer Entstehung auf einen erneuten Antigenkontakt mit einer schnellen Transformation zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen. Nicht alle Mechanismen, die der Entwicklung und Aufrechterhaltung von B-Gedächtniszellen zugrunde liegen, sind vollständig bekannt. Unter anderem wird die Proliferation und Differenzierung zu B-Gedächtniszellen von Lipopolysacchariden (LPS) und anderen Toll-like-Rezeptor-Liganden der bakteriellen Zellwand, so genannten PAMPs (pathogen associated molecular patterns), auch in Abwesenheit von spezifischen Antigenen getriggert (Bernasconi et al. 2002; Calame 2006; Radbruch et al. 2006). Viele Impfstoff-Rezepturen nutzen komplexe Kombinationen aus Antigenen gekoppelt an Adjuvantien, die häufig multiple TLR-Signale enthalten. Als Adjuvantien werden unter anderem auch abgetötete *Bordetellen* und Aluminiumhydroxid eingesetzt. Diese Komplexe aus TLR-Agonisten und löslichen Antigenen können selektiv die Expansion von Antigen-spezifischen B-Gedächtniszellen und Plasmazellen induzieren. Dabei spielen wahrscheinlich die Quantität und auch die Kombinationen verschiedener TLR-Liganden eine entscheidende Rolle in der Induktion von Antikörper-sezernierenden Plasmazellen (Raman et al. 2007).

Untersuchungen scheinen sinnvoll, die stimulierenden Bestandteile der Ganzkeimimpfstoffe zu identifizieren und eventuell in isolierter Form den azellulären Impfstoffen als Adjuvans hinzuzufügen, um somit eine bessere Langzeitimmunität der azellulären Impfstoffe zu erreichen, ohne die begleitenden unerwünschten Nebenwirkungen der Ganzkeimimpfstoffe in Kauf nehmen zu müssen.

In einer Studie am Mausmodell von Mahon et al. konnte mittels ELISPOT Technik nachgewiesen werden, dass 44 Wochen nach intraperitonealer Impfung sowohl mit

azellulärem wie auch mit Ganzkeim-Impfstoff eine Induktion von B-Gedächtniszellen stattgefunden hatte. Dabei führte der azelluläre Impfstoff zu einer stärkeren Induktion von B-Gedächtniszellen im peripheren Blut, der Ganzkeimimpfstoff jedoch zu einer höheren Induktion von B-Gedächtniszellen in den Milzzellen. Die respiratorische Provokation mit PT-Aerosol bei Mäusen mit nicht mehr nachweisbaren Antikörpertitern führte innerhalb von 7 Tagen zu einer erneuten deutlichen Antikörperantwort, die ab dem 10. Tag nach Provokation bei den mit unterschiedlichen Impfstoffen immunisierten Mäusen vergleichbare Werte erreichte (Mahon et al. 2000). Im Rahmen unserer Studie wurde kein Nachweis von B-Gedächtniszellen durchgeführt, dies wäre jedoch eine interessante Fragestellung für Folgestudien.

Die Untersuchungen zur Reaktogenität im Rahmen dieser Studie, die Bestandteil einer weiteren Dissertation sind, liefern zusätzlich interessante Daten. Es zeigt sich bezüglich der Rate lokaler Reaktionen eine deutlich niedrigere Reaktogenität in der Gruppe Jugendlicher, die die sechste azelluläre Impfstoffdosis erhält (76,1%), gegenüber der Gruppe, die die fünfte Impfstoffdosis erhält (89,7%). Schmerzen und Rötung traten nach der 6. Dosis seltener auf (72,6% vs. 89,7%; 16,2% vs. 27,8%). Schwellungen hingegen traten nach der 5. Dosis nur bei 17,5% auf, nach der 6. Dosis bei 20,5% (Liese 2007). Diese Ergebnisse werden durch eine Studie von Zepp et al. unterstützt, in der die Sicherheit der Gabe eines Antigen-reduzierten azellulären Pertussis-Impfstoffes als zusätzlichen 6. Dosis im Alter von 9-13 Jahren untersucht wird (Zepp et al. 2006). In der erwähnten Studie zeigte sich, dass die Jugendlichen nach der 6. Dosis des Impfstoffes mehr Schmerzen angaben als nach der 5. Dosis (6. Dosis: 62,2%; 5. Dosis: 55,2%). Im Vergleich zur 5. Dosis des azellulären Pertussis-Impfstoffes kam es jedoch nach der 6. Dosis zu weniger Rötung (47,7% vs. 55,2%) und Schwellung (38,9% vs. 52,6%).

Dies steht im Gegensatz zu früheren Studien (meist 5. Dosis), in denen von einem Anstieg der lokalen Reaktionen mit steigender Anzahl an azellulären Impfungen bei gleichzeitiger leichter Abnahme der systemischen Reaktionen berichtet wird (Pichichero et al. 2000; Rennels et al. 2000; Liese et al. 2001). Liese et al. konnten in der Vorgängerstudie einen Zusammenhang zwischen hohen Vorwerten der Antikörpertiter gegen Tetanustoxoid, Diphtherietoxoid und PT und dem gehäuftem Auftreten von größeren Lokalreaktionen nachweisen (Liese et al. 2001). Die lokalen

Reaktionen wären daher am ehesten mit einer Arthus-Reaktion erklärbar. Diese entsteht durch Injektion von Antigenen in die Haut und Bildung von Immunkomplexen mit zirkulierenden IgG-Antikörpern, die ins Gewebe diffundieren. Diese Immunkomplexe führen zu lokalen Entzündungsreaktionen mit erhöhter Gefäßpermeabilität.

Des Weiteren stellt sich die Frage, in wieweit die Höhe der gemessenen *B. pertussis*-spezifischen zirkulierenden Antikörper mit der Wirksamkeit gegen *B. pertussis* Infektionen korreliert. Dies ist nach wie vor umstritten. Letztlich ist auch die zelluläre Immunantwort für die schützende Immunität mitverantwortlich (siehe Einleitung).

In vielen Studien wird von einem raschen Absinken der Antikörpertiter innerhalb der ersten 1-2 Jahre nach Impfung berichtet (Giuliano et al. 1998; Ausiello et al. 1999; Wendelboe et al. 2005). Dabei scheint die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses durch Induktion von T- und B-Gedächtniszellen für den Schutz vor Erkrankung eine wichtigere Rolle zu spielen als die Anzahl zirkulierender Antikörper zum Zeitpunkt der Exposition mit dem Erreger (Mahon et al. 2000). Niedrige Antikörpertiter passen auch zu dem in unserer Studie auftretenden Zytokinmuster, das auf eine Th1-vermittelte Immunität hinweist (Barnard et al. 1996).

5.2. Lymphozytenproliferation nach Stimulation mit Pertussis-spezifischen Antigenen bei Adoleszenten mit unterschiedlicher Grundimmunisierung vor und nach azellulärer Pertussis-Auffrischimpfung

Der nach Impfung gemessene Anstieg der Lymphozytenproliferation infolge einer Stimulation mit den vier in dieser Studie verwendeten Antigenen PT, FHA, PRN und FIM ist in allen drei Gruppen vergleichbar. Es lässt sich in jeder Gruppe bezüglich der Stimulation mit jedem einzelnen verwendeten Antigen eine gleichförmige Zunahme der Probanden mit positiver zellvermittelter Immunität nachweisen ($SI \geq 4$; s. S. 42, Abschnitt 4.2.1.1.). Auch ein Anstieg des Medians der Stimulationsindices nach Impfung lässt sich in fast allen Gruppen feststellen. Auffallend sind die im Vergleich zu den restlichen Antigenen bei der Stimulation mit FHA schon vor der Impfung deutlich höheren Werte der SI in allen drei Gruppen. Des Weiteren besteht in der Gruppe B, die zuvor 4 Dosen azellulären Impfstoffes erhielt, vor der Impfung

ein im Vergleich zu den anderen Gruppen erhöhter Stimulationsindex der Lymphozyten nach Stimulation mit PRN. Nach der Impfung kommt es in dieser Gruppe nicht zu einem Anstieg des Medians der SI, ein leichter Anstieg des Anteils an Probanden mit positiver CMI nach Impfung ist jedoch erkennbar.

Bemerkenswert ist die hohe Rate an positiver CMI und auch Serologie gegenüber PRN und FIM schon vor der Auffrischimpfung, da diese beiden Antigene nicht in dem zuvor verwendeten azellulären Biken-DTaP Impfstoff enthalten waren. Ein Vorhandensein spezifischer Lymphozytenproliferation nach Stimulation mit zuvor nicht im Impfstoff enthaltenen Antigenen kann auf eine frühere Exposition gegenüber dem Erreger hinweisen, die zu subklinischen oder atypischen Infektionen geführt hat, die nicht als Pertussis wahrgenommen wurden. Eine erfolgte Keuchhustenerkrankung war ein definiertes Ausschlusskriterium der Studie. Wie zuvor in dem Abschnitt zur Serologie beschrieben sollte auch berücksichtigt werden, dass Antigene von *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica*, wie auch von *H. influenzae* und *M. pneumoniae*, die den Antigenen von *B. pertussis* ähneln, zu einer Induktion von kreuzreagierenden Antikörpern gegen PRN, FHA und FIM und möglicherweise auch zu Antigen-vermittelter Lymphozytenproliferation führen können (Abschnitt 5.1., S. 60).

Die Hypothese, dass subklinische Infektionen auch zu einer Induktion der Lymphozytenproliferation führen können, wird von einer Studie von Ausiello et al. unterstützt (Ausiello et al. 1999). Untersucht wurde die CMI gegenüber den *B. pertussis*-spezifischen Antigenen PT, FHA und PRN von 4-jährigen Kindern, deren Grundimmunisierung mit azellulären Impfstoffen erfolgte, die keine Auffrischimpfung erhielten und die bis zum Untersuchungszeitpunkt nicht an Pertussis erkrankt waren. Zusätzlich lagen Daten zur zellvermittelten Immunität dieser Kinder einen Monat nach der Grundimmunisierung im Alter von 7 Monaten vor. Es konnte bei 56% (PT), 70% (PRN) bzw. 36% (FHA) der im Alter von 7 Monaten CMI-negativen Probanden eine Konversion zur CMI-Positivität ($SI \geq 4$) bis zum Alter von 4 Jahren nachgewiesen werden. Bei den CMI-Konvertierten zeigte sich eine ungefähr dreimal höhere Rate an Seropositivität (definiert als ein mind. vierfach höherer AK-Wert im ELISA als die festgesetzte Nachweisgrenze des jeweiligen Antigens) gegenüber PRN und FHA als bei den CMI-Negativen, jedoch nicht gegenüber PT. Eine mögliche Erklärung hierfür wären subklinische Infektionen, die zum Erwerb bzw. zur natürlichen Auffrischung der CMI geführt haben könnten (Ausiello et al. 1999). Da es in der erwähnten Studie

wie auch in einer weiteren Studie (Esposito et al. 2001) bei einem nicht unerheblichen Teil der Probanden (20-38%) zu einem Verlust der CMI-Positivität im Zeitraum zwischen Grundimmunisierung und dem vierten Lebensjahr kam, lässt sich folgern, dass die durch Impfung induzierte CMI bei vielen Kindern nach Grundimmunisierung nachlässt. Langanhaltender Schutz gegenüber klinischer Pertussis-Infektion wäre somit weniger durch die Persistenz der durch Impfung induzierten Immunität sondern eher durch einen Neuerwerb bzw. eine Auffrischung bestehender Immunität durch Exposition gegenüber dem Erreger erklärbar. Betrachtet man unsere Ergebnisse vor dem Hintergrund dieser Hypothese, ließe sich die relativ homogene zelluläre Immunität der drei verschiedenen Gruppen unserer Studie damit erklären. Die wiederholte Exposition gegenüber dem Erreger *B. pertussis* könnte somit zu einer gleichförmigen Immunantwort unabhängig von den sich zwischen den Gruppen unterscheidenden vorangegangenen Impfungen geführt haben.

Der Vergleich unserer Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer Studien erfolgt für die Gruppen A und B, die eine azelluläre Grundimmunisierung erhielten und für Gruppe C, die eine Grundimmunisierung mit Ganzkeimpfostoff erhielt, getrennt.

Der Anteil an Probanden mit positiver CMI ($SI \geq 4$) nach Antigenstimulation liegt in einer Studie von Ausiello et al. bei 4-Jährigen ca. 3½ Jahre nach Grundimmunisierung mit azellulärem Impfstoff bei 83% gegenüber PT, 78% gegenüber FHA und 70% gegenüber PRN (Ausiello et al. 2000). In unserer Studie liegt der Anteil positiver CMI-Antworten vor der Auffrischimpfung in Gruppe A bei 38% (PT), 78% (FHA) bzw. 35% (PRN) und in Gruppe B bei 43% (PT), 62% (FHA) bzw. 62% (PRN) und ist somit vor allem gegenüber PT deutlich niedriger. Auch quantitativ ist die Lymphozytenproliferation nach Stimulation mit PT und PRN bei Ausiello et al. höher als in unserer Studie. Die hohen CMI-Werte nach Stimulation mit spezifischen Pertussis-Antigenen in der Studie von Ausiello et al. könnten möglicherweise durch Expositionen gegenüber dem *B. pertussis* Erreger zustande gekommen sein. In Italien war *B. pertussis* zum Studienzeitpunkt endemisch verbreitet. Damit war die Wahrscheinlichkeit rezidivierender Expositionen gegenüber dem Erreger und somit inapparenten oder subklinischen Infektionen groß (Ausiello et al. 2000). Jedoch ist auch in Deutschland von einer endemischen Zirkulation der Pertussis-Erreger auszugehen (s. Abschnitt 1.1.1.). Ein Vergleich der Ergebnisse der beiden Studien sollte nur mit Vorsicht erfolgen, da unterschiedliche Studiendesigns,

Altersgruppen und Abstände zur letzten Impfung vorliegen. In der Studie von Ausiello et al. wurden z. B. die Immunität von 4- bis 6-jährigen Kinder untersucht, bei denen der durchschnittliche Abstand zur letzten Impfung $3\frac{1}{2}$ Jahre betrug. In unserer Studie wurden 10- bis 13-jährige Jugendliche untersucht, der durchschnittliche Abstand zur letzten Impfung betrug in der Gruppe A 7 Jahre und für Gruppe B und C 10 Jahre.

Eine Studie von Knuf et al. weist hohe Raten an Seropositivität gegenüber PT (37%) und FHA (92%) in einer Gruppe von ungeimpften deutschen Jugendlichen ohne stattgefundene Pertussis-Erkrankung nach, die die Annahme der hohen Rate an subklinischen Infektionen innerhalb der deutschen Studienpopulation unterstützen (Knuf et al. 2006).

Eine von Tran Minh et al. durchgeführte Studie bei 10- bis 13-jährigen Jugendlichen untersucht die Immunogenität einer Antigen-reduzierten azellulären Auffrischimpfung nach Grundimmunisierung (3 Dosen) und einer Auffrischimpfung (im Alter von 24 Monaten) mit Ganzkeimimpfstoff (Tran Minh et al. 1999). Sie zeigt eine etwas höhere Rate an positiver CMI gegen PT und PRN (100% bzw. 90%) im Vergleich zu der Rate an CMI-Positiven in Gruppe C einen Monat nach Auffrischimpfung in unserer Studie (PT: 77% und PRN: 82%). Der in der Studie von Minh et al. verwendete Auffrischimpfstoff enthielt jedoch im Vergleich zu unserem einen höheren Antigengehalt von PT (8 μ g PT statt 2,5 μ g PT) und 0,5 μ g weniger PRN. Auffallend in der Studie von Minh et al. ist der geringere Anteil CMI-Positiver vor Auffrischimpfung im Vergleich zu unseren Werten vor Impfung. Die Rate positiver CMI vor Auffrischimpfung beträgt bei Minh et al. 46% (PT), 35% (FHA) und 24% (PRN), wohingegen die Werte in unserer Studie bei 53%; 65% und 53% (PT; FHA und PRN) liegen. Erklärbar wäre dies durch eine höhere Exposition unserer Studienpopulation gegenüber *B. pertussis* und einer höheren Rate subklinischer Infektionen (s.o.).

In einer neueren Studie von Guiso et al. wurde die Dauer der humoralen und zellulären Immunantwort von Kindern, die ihre Grundimmunisierung (2-4 Monate) und Auffrischimpfung (16-18 Monate) mit entweder azellulärem oder Ganzkeimimpfstoff erhielten, untersucht (Guiso et al. 2007). Jeweils 3 und 6 Jahre nach der Auffrischimpfung wurde die CMI bestimmt. Die Probanden, die mit azellulärem Impfstoff (Infanrix®, 4 Dosen) immunisiert wurden, zeigten eine deutlich höhere Anzahl an positiver CMI ($SI \geq 3$) als die, die Ganzkeimimpfstoff erhielten. 3 Jahre nach

Auffrischimpfung betrug die Anzahl der Probanden mit positiver CMI gegenüber PT, FHA und PRN bei den Probanden mit azellulärer Impfung 75%, 68% bzw. 36%. Der prozentuale Anteil an Probanden mit positiver CMI, die mit Ganzkeimimpfstoff immunisiert wurden, betrug 14% (PT), 3% (FHA) und 17% (PRN). Nach 6 Jahren hatte die Anzahl der CMI-Positiven gegenüber FHA in der azellulären (33%) und Ganzkeimimpfstoff-Gruppe (0%) nachgelassen, war gegenüber PT und PRN jedoch etwas angestiegen (81% bzw. 38% in azellulärer Gruppe und 33% bzw. 31% in der Ganzkeimimpfstoff-Gruppe).

Vergleicht man die Ergebnisse unserer Gruppe, die 4 Dosen Ganzkeimimpfstoff erhielt, mit denen von Guiso et al. sowohl 3 als auch 6 Jahre nach der 4. Dosis eines Ganzkeimimpfstoffes, zeigen sich deutlich höhere Raten an positiver CMI ($SI \geq 4$) in unserer Studie (PT: 53%, FHA:65%, PRN: 53%). Dieser Unterschied ist umso erwähnenswerter, da der Abstand zur letzten Impfung in unserer Gruppe durchschnittlich 10 Jahre beträgt. Des Weiteren ist die Definition der positiven CMI-Antwort in unserer Studie ein $SI \geq 4$, in der Studie von Guiso et al. ist eine positive CMI-Antwort bei einem $SI \geq 3$ erreicht. Diese deutlich höhere Rate an positiven CMI-Antworten in unserer Studie bei den Probanden, die den Ganzkeimimpfstoff erhielten, ließe sich womöglich durch eine ausgeprägtere Exposition unserer Studienpopulation gegenüber *B. pertussis* Erregern mit einer stärkeren Stimulation der Immunität erklären. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass in den Studien unterschiedliche Ganzkeimimpfstoffe verwendet wurden. Möglicherweise sind die bei den Probanden von Guiso et al. verwendeten Ganzkeimimpfstoffe (DTPw-IPV/Hib; Pentacoq™ oder PentHIBest™, Sanofi Pasteur) weniger immunogen als der bei unseren Studienteilnehmer verwendete Ganzkeimimpfstoff (DPT-Impfstoff® der Behringwerke).

Die bei Guiso et al. untersuchten Probanden mit azellulärer Impfung erreichten deutliche höhere Raten an positiver CMI als die Probanden mit Ganzkeim-Impfung. Im Vergleich mit den Probanden unserer Studie, die mit azellulärem Impfstoff geimpft wurden, zeigten sich höhere Raten an positiver CMI gegenüber PT bei Guiso et al. (81%) als in unserer Studie (Gruppe A: 38%; Gruppe B: 43%). Der prozentuale Anteil an Probanden mit positiver CMI gegenüber FHA und PRN war tendenziell höher bei unseren Probanden. So betrug die Anzahl an CMI-positiven Probanden gegenüber FHA in unserer Studie 78% (Gruppe A) bzw. 62% (Gruppe B) und gegenüber PRN 35% bzw. 62%, wohingegen die Werte bei Guiso et al. bei 33% (FHA) und 38%

(PRN) lagen. Diese Unterschiede können wiederum auf eine Stimulation der CMI aufgrund subklinischer Infektionen und folgender stiller Feiung des Immunsystems basieren.

Die Grundimmunisierung mit Ganzkeimpfstoff im Vergleich zu azellulärer Grundimmunisierung ergibt in unserer Studie keine Unterschiede in der zellvermittelten Immunität nach azellulärer Auffrischimpfung. Die Verwendung von sowohl azellulärem Impfstoff als auch von Ganzkeimpfstoff führt zu einer deutlichen und vergleichbaren Induktion der CMI. Im Abschnitt zur Th1- bzw. Th2-vermittelten Immunität (s. Abschnitt 5.3.2.) wird auf die nach Verwendung unterschiedlicher Impfstoffe überwiegend eingeschlagene Richtung der Immunität genauer eingegangen. Im Allgemeinen induziert die Grundimmunisierung mit Ganzkeimpfstoff eine Immunantwort mit Th1-Präferenz (Peppoloni et al. 1991; Ryan et al. 1997; Esposito et al. 2001), im Gegensatz zu einer heterogenen Th1-/Th2-Antwort nach azellulärer Impfung (Mills et al. 1993; Redhead et al. 1993; Barnard et al. 1996; Ausiello et al. 1997; He et al. 1998; Ryan et al. 1998). Basierend auf diesen Überlegungen werden die Ganzkeimpfstoffe als stärkere Induktoren der zellvermittelten Immunität aufgefasst. Auch nach Studien mit Mäusen hätte man eine reduzierte CMI nach ausschließlicher Impfung mit azellulärem Impfstoff im Vergleich zu Ganzkeim-Impfung erwartet (Redhead et al. 1993). Dieser zu erwartende Unterschied könnte jedoch durch subklinische Infektionen maskiert worden sein, die zu einer vermehrten Induktion der CMI auch in der ausschließlich mit azellulärem Impfstoff geimpften Studienpopulation geführt haben könnten. Andererseits konnte in einer Studien zur Induktion der CMI jedoch auch den azellulären Impfstoffen eine potente Aktivierung der Lymphozytenproliferation nach Antigenstimulation nachgewiesen werden (Zepp et al. 1996).

Der zellvermittelten Immunität wird bei der Abwehr von Pertussis-Infektionen eine wichtige Rolle zugesprochen. Die immunologischen Mechanismen des Schutzes vor klinischer Infektion mit *B. pertussis* sind noch nicht vollständig geklärt. Es ist zwar bekannt, dass die CMI eine bedeutende Rolle im Schutz vor Pertussis spielt (s. Abschnitt 1.2.2.), jedoch ist es noch unklar, inwieweit Pertussis-spezifische CMI neben der Serologie als zweiter nützlicher Parameter zur Bestimmung der Immunantwort nach Impfung und zur Prädiktion des Schutzes gegen *B. pertussis* herangezogen werden kann. In unserer Studie konnten wir keinen Vorteil der zellulären Immunität gegenüber der Serologie als Langzeit-Parameter der Immunität

gegenüber Pertussis seit der letzten Impfung feststellen. Dies wurde auch in einigen anderen Studien beobachtet (Tran Minh et al. 1998; Esposito et al. 2001). Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die humorale und zelluläre Immunität in unserer Studie möglicherweise durch natürliche Exposition gegenüber *B. pertussis* beeinflusst wurde. Dadurch ist eventuell die Diskrepanz zu anderen Studien erklärbar, in denen eine längere Persistenz der CMI im Vergleich zur humoralen Immunität bei Kindern und Jugendlichen nach Impfung beschrieben wurde (Zepp et al. 1996; Edelman et al. 2004; Edelman et al. 2007). Eine Messung der ausschließlich durch Impfung induzierten Langzeitimmunität ist in unserer Studienpopulation somit nicht möglich.

Eine prospektive Studie von Tran Minh et al. untersucht die Bedeutung Pertussis-spezifischer CMI im Bezug auf Schutz vor klinischer Infektion bei 13-jährigen Kindern, die mehr als 10 Jahre zuvor mit Ganzkeimpfstoﬀ immunisiert wurden, während eines Pertussis-Ausbruchs an einer finnischen Schule. Dabei konnte eine Korrelation zwischen dem Infektionsverlauf und der CMI zum Expositionszeitpunkt festgestellt werden. Bei den Kindern, die im Verlauf der Beobachtung gesund blieben, konnte eine positive CMI gegen PT, FHA und/oder PRN nachgewiesen werden. Fehlende CMI führte zu einer größeren Wahrscheinlichkeit, an einer subklinischen oder klinischen Infektion zu erkranken (Tran Minh et al. 1999).

Es ist wahrscheinlich, dass es auch bei nachlassender messbarer zellvermittelter Immunität zu einer sofortigen kräftigen Stimulation derselben nach Infektion oder Auffrischimpfung aufgrund einer effektiven Vorbereitung einer Gedächtnisantwort auf relevante Pertussisantigene kommen kann (Zepp et al. 1996; Tran Minh et al. 1998).

Da Lymphozyten durch Zytokine induziert und reguliert werden, haben wir die Profile einiger wichtiger Zytokine untersucht, die von peripheren mononukleären Zellen durch in vitro Stimulation mit *B. pertussis* Antigenen ausgeschüttet werden.

5.3. Zytokine und Th1- bzw. Th2-vermittelte Immunität

5.3.1. Verfahren zur Bestimmung von Zytokinen

Zytokine können durch verschiedene Verfahren bestimmt werden. In dieser Studie wurde mit dem „Cytometric Bead Array“ System gearbeitet. Diese Methode ermittelt die quantitative Zytokinkonzentration, ermöglicht jedoch keine sichere Zuordnung der

sezernierten Zytokine zu den produzierenden Zellen. Der hochsensitive Nachweis von Zytokinen auf Ebene einzelner Zellen und die Zahl der zytokinproduzierenden Zellen innerhalb eines Ansatzes lässt sich mittels der Technik des „Enzyme linked Immunospot Assay“ (ELISPOT) bestimmen, dabei ist jedoch eine sichere Quantifizierung der ausgeschiedenen Menge an Zytokinen nicht möglich.

Weitere Möglichkeiten der Zytokinbestimmung sind ELISA-Verfahren, die Bestimmung der Expression der zu den Zytokinen gehörenden mRNA mit Hilfe der PCR oder die quantitative Bestimmung der fluoreszenzmarkierten intrazellulär vorhandenen Zytokine mittels Durchflusszytometrie (Janeway 2002).

Für mehrere Zytokine (u. a. für TNF- α und IFN- γ) wurden erhebliche Diskrepanzen zwischen der Expression von mRNA und der Produktion der Proteine an sich beschrieben (Favre et al. 1997). Da Zytokine die biologisch relevanten Effekte induzieren, ist die Bestimmung der aktiven Form und nicht nur der mRNA sinnvoll, daher erfolgte die Untersuchung mittels dem „Cytometric Bead Array“ System. Dieses bietet auch aus arbeitsökonomischer Sicht den Vorteil, in einem Versuchsdurchlauf 6 verschiedene Zytokine in den jeweiligen Proben messen zu können.

Es kann sein, dass nur einige wenige Zellen durch eine starke Zytokinausschüttung charakterisiert sind oder aber dass viele Zellen wenig Zytokine produzieren. Des Weiteren ist nicht bekannt, welche Zytokinkonzentrationen benötigt werden, um einen Effekt an den Zielzellen des bestimmten Zytokins herbeizuführen. Daher sind genaue Aussagen über die Effektorfunktion von Zytokinen allein anhand ihrer Konzentrationen schwierig zu treffen.

5.3.2. Th1-betonte Immunantwort nach azellulärer Auffrischimpfung bei Probanden mit Ganzkeim- und azellulärer Grundimmunisierung

Da beide Ebenen der T-zellulären Immunität für die Entwicklung eines Impfschutzes gegen *B. pertussis* relevant sind (s. Abschnitt 1.4.3.), ist die Untersuchung der vorwiegend eingeschlagenen Richtung der Immunantwort nach Impfung mit azellulärem bzw. Ganzkeimimpfstoff und natürlicher Infektion sowie subklinischer Infektion von großer Bedeutung. Sie hilft, die Komplexität der Immunität bezüglich *B. pertussis* Infektionen und die Mechanismen der Impfung besser zu verstehen.

Pathophysiologisch lässt sich die besondere Bedeutung der zellulären Immunität durch die Funktion von *B. pertussis* als partiell intrazellulärem Erreger ableiten. Zur Eliminierung intrazellulärer Erreger ist auch die Aktivierung der Th1-vermittelten zellulären Immunität notwendig (Mills et al. 1993; Redhead et al. 1993; Ryan et al. 1997).

Mehrere Arbeiten haben sich mit der Zytokinproduktion und der davon abhängigen Th1-/Th2-Präferenz der Immunantwort nach Infektion und nach Impfung mit den unterschiedlichen Impfstoffen beschäftigt. Mausversuche und Ergebnisse von Studien bei Menschen beschreiben zusammenfassend eine deutlich Th1-gerichtete Immunantwort nach Impfung mit Ganzkeimimpfstoffen und nach klinischen sowie subklinischen Infektionen (Peppoloni et al. 1991; Ryan et al. 1997; Esposito et al. 2001). Im Gegensatz dazu kommt es direkt nach der Impfung mit azellulärem Impfstoff zu einer vorwiegend Th2-vermittelten Immunantwort (Mills et al. 1993; Redhead et al. 1993; Barnard et al. 1996; Ausiello et al. 1997; He et al. 1998; Ryan et al. 1998).

Unsere Untersuchungen zeigen eine deutliche Tendenz zur Th1-vermittelten Immunantwort in allen drei Gruppen mit hohen IFN- γ - und TNF- α -Werten nach Stimulation mit *B. pertussis* Antigenen. Nur bei 8 Probanden konnten über dem Detektionslevel liegende IL-5 Werte gemessen werden, die für eine zusätzliche Beteiligung der Th2-vermittelten Immunantwort sprechen. Diese Ergebnisse passen zu der Hypothese einer vorher stattgefundenen Boosterung („stille Feiung“) des Immunsystems durch subklinische Infektionen. Aufgrund der unterschiedlichen Grundimmunisierungen der drei Gruppen hätte man deutlichere Unterschiede in der Zytokin-Antwort zwischen den mit Ganzkeimimpfstoff geimpften Kindern und denen, die mit azellulärem Impfstoff geimpft wurden, erwartet. Es wird angenommen, dass subklinische Infektionen zu einer Induktion beziehungsweise Verstärkung der Th1-Antwort führen und diese Exposition gegenüber dem Erreger somit zu einem Persistieren des Schutzes vor Erkrankung führt. Dadurch ließe sich erklären, warum es in den von uns untersuchten Gruppen mit azellulärer Grundimmunisierung zu einem vorwiegenden Auftreten der Th1-gerichteten Immunantwort kommt, obwohl azelluläre Impfstoffe vor allem als starke Induktoren der humoralen Th2-Zellantwort gelten.

Eine Studie von Ryan et al. bestätigt, dass Stimulation mit Pertussisantigenen bei nicht-geimpften akut an Keuchhusten erkrankten sowie rekonvaleszenten Kindern zu

einer bevorzugten Aktivierung des Th1-Zytokinmusters mit selektiv gesteigerter IFN- γ Produktion und niedriger bis nicht nachweisbarer IL-5 Produktion geführt hat. Bei 11 von 53 nicht-geimpften Kindern ohne klinische Pertussis-Infektion in der Anamnese kam es nach in-vitro Stimulation der Lymphozyten mit Pertussis-Antigenen zur Proliferation und/oder Sekretion von IFN- γ . Dies könnte Zeichen einer durchgemachten subklinischen Infektion sein und für eine bevorzugte Th1-Aktivierung sprechen (Ryan et al. 1997). Antikörpertiter gegen die Pertussis-Antigene wurden nicht bestimmt. Eine ein Jahr später durchgeführte Untersuchung derselben Arbeitsgruppe erbrachte zusätzliche Resultate, die im Einklang mit der Hypothese der durch subklinische Infektionen induzierten Th1-Immunantwort stehen. Dabei zeigte sich bei kurz zuvor mit azellulärem Impfstoff geimpften Kindern eine positive IL-5 Produktion, eine stärkere Th1-Antwort mit höheren IFN- γ Werten trat bei Kindern mit längeren Intervallen zur letzten azellulären Impfung auf. Möglicherweise ist ein Teil der Th1-Antworten, die nachgewiesen werden konnten, nicht in Folge der Impfung, sondern im Rahmen von subklinischen Infektionen aufgetreten (Ryan et al. 1998).

Eine weitere Arbeit, die zwei Gruppen mit azellulärer Impfung und eine Gruppe mit Ganzkeimimpfstoff bezüglich der Zytokin-mRNA-Bildung und der Zytokin-Sekretion im Überstand einen Monat nach Grundimmunisierung vergleicht, unterstützt zusätzlich die genannte Hypothese (Ausiello et al. 1997). Hier kommt es bei Ganzkeimimpfstoff-Empfängern zu einer Th1-vermittelten Immunantwort, IL-5 wird nur selten nachgewiesen. Zusätzlich zur Produktion von IFN- γ kommt es bei den beiden Gruppen mit azellulären Impfstoffen zu einer beständigen, Antigen-abhängigen Produktion der Typ 2 Zytokine IL-4 und IL-5. Dieses kurz nach Impfung beobachtete gemischte Th1/Th2-Profil ist 3-4 Jahre später in eine Th1-vermittelte Immunantwort übergegangen (Ausiello et al. 1999). Die deutlich existierenden Unterschiede in den Zytokinprofilen zwischen den Empfängern von Ganzkeim- und azellulärem Impfstoff, die nach Grundimmunisierung im durchschnittlichen Alter von 7 Monaten nachzuweisen waren, haben sich im Laufe der Zeit verloren. Auch diese Ergebnisse passen gut zu der Hypothese, dass die gesteigerte Th1 Antwort in den mit azellulärem Impfstoff geimpften Gruppen durch subklinische Infektionen zustande gekommen sein könnte.

Die in diesem Zusammenhang zuvor erwähnte Studie von Ryan et al. beobachtete eine Th1-vermittelte Immunantwort mit Sekretion von IFN- γ nach Impfung mit einem

potenten Ganzkeimpfostoff und beschrieb ein heterogenes Th1/Th2-Zytokinprofil nach azellulärer Impfung mit zusätzlichem Auftreten von IL-5 (Ryan et al. 1998). Im Gegensatz dazu beobachteten Zepp et al. eine bevorzugte Produktion von IFN- γ und IL-2 in Reaktion auf Stimulation mit Pertussisantigenen bei Kindern, die mit azellulärem Impfstoff immunisiert wurden. Allerdings wurden auch dort niedrige IL-10 Werte bei einigen Probanden nachgewiesen. Es zeigte sich jedoch eher eine Präferenz der Th1-vermittelten Immunantwort (Zepp et al. 1996). Zu berücksichtigen ist, ob die Auswahl von IL-10 als repräsentatives Typ-2-Zytokin in dieser Studie aussagekräftig ist, da IL-10 nicht von allen Th2-Zellen sezerniert wird und auch Monozyten es produzieren können. Spezifische Typ-2-Zytokine wie IL-4 und IL-5 wurden in der erwähnten Studie nicht untersucht. Die Studie von Zepp et al. wurde zwischen 1992 und 1995 in Deutschland durchgeführt. In diesem Zeitraum ist von einer hohen Zirkulation von *B. pertussis* in der Bevölkerung auszugehen (s. Abschnitt 1.1.1.). Eine Beeinflussung der Studienergebnisse in Richtung einer Th1-gewichteten Immunantwort durch Exposition gegenüber *B. pertussis* wäre somit denkbar.

He et al. verglichen die Zytokinproduktion bei Schulkindern und Erwachsenen nach Auffrischimpfung mit azellulärem Impfstoff und natürlicher Infektion. Dies geschah durch Untersuchung der Expression von mRNA der Th1- und Th2-Zytokine mittels RT-PCR und durch Bestimmung der Zytokinkonzentrationen im Überstand spezifisch stimulierter Kulturen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Muster der produzierten Zytokine, azelluläre Auffrischimpfung und natürliche Infektion induzierten die Expression von mRNA der Th1- und Th2-Typ Zytokine in ähnlicher Weise (He et al. 1998). Infolge spezifischer Antigen-Stimulation wurden bei den Immunisierten und Infizierten signifikant höhere Mengen an INF- γ , IL-4 und IL-5 als bei der Kontrollgruppe gesunder Ungeimpfter produziert. Diese Studie zeigte im Unterschied zu anderen Studien (Peppoloni et al. 1991; Ryan et al. 1997), die die Th1-/Th2-Präferenz des Immunsystems nach Infektion mit *B. pertussis* untersucht haben, eine nicht nur auf den Th1-Typ beschränkte Immunantwort nach Infektion.

Auch Esposito et al. verglichen die Langzeitimmunität gegenüber Pertussis fünf Jahre nach azellulärer Grundimmunisierung mit DTaP-HBV und natürlicher Infektion. Dafür untersuchten sie die Antikörperproduktion, Lymphozytenproliferation und Zytokin-Sekretion nach spezifischer Antigenstimulation. Die fünf Jahre nach Impfung vorhandene Immunität war der nach durchgemachter Infektion sehr ähnlich, in den serologischen Ergebnissen gab es bis auf eine häufigere und höhere

Antikörperantwort auf PRN bei geimpften Kindern keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Proliferationsaktivität nach *B. pertussis* Antigenstimulation war ebenfalls vergleichbar, auch dort war in der geimpften Gruppe eine stärkere Lymphozytenproliferation nach PRN-Stimulation zu verzeichnen. Es konnte nur noch bei einer Minderheit der Kinder eine Zytokinproduktion nachgewiesen werden, dabei bestätigte sich bei den Kindern mit natürlicher Infektion die bevorzugte Th1-Immunantwort und eine Th2-betonte Impfantwort nach azellulärer Impfung (Esposito et al. 2001).

Zusammenfassend zeigt sich in den erwähnten Studien eine unterschiedliche Präferenz der Immunantwort nach Impfung mit Ganzkeim- bzw. azellulärem Impfstoff, subklinischen und klinischen Infektionen. Wir beobachteten eine Th1-betonte Immunantwort auch in den Gruppen, die mit azellulärem Impfstoff eine Grundimmunisierung erhielten. Dies deckt sich mit den Ergebnissen verschiedener anderer Studien, die das Auftreten von subklinischen Infektionen für die vorwiegende Stimulation des Th1-Typs der Immunantwort in diesen Gruppen verantwortlich machen.

Im Gegensatz zu Mausversuchen und Untersuchungen an geklonten T-Zellen von Menschen muss jedoch bei humanen PBMCs von einer größeren Variabilität innerhalb der Zytokinmuster ausgegangen werden und von einer allzu strikten Trennung der Th1- von der Th2-Immunantwort Abstand genommen werden (Zepp et al. 1996). Da es praktisch immer neben der zellvermittelten Immunität auch zur Bildung von Antikörpern kommt, müssen beide Arme der Immunität zumindest zu einem bestimmten Ausmaß aktiviert werden. Dies schließt eine bevorzugte Aktivierung der Th1- bzw. Th2-gewichteten Immunität durch unterschiedliche Impfstoffe bzw. Erkrankungen jedoch nicht aus.

5.4. Anstieg von CD69+ aktivierten CD8+ T-Zellen nach azellulärer Auffrischimpfung

Um die durch azelluläre Auffrischimpfung bei unterschiedlicher Grundimmunisierung aktivierten T-Zell-Antworten und -Subpopulationen genauer zu definieren, untersuchten wir die Phänotypen der Lymphozyten sowie die Expression von Aktivierungsmarkern der Zelloberfläche nach Antigenstimulation der Lymphozyten.

Es zeigte sich dabei ein Anstieg der CD69+ aktivierten CD8+ T-Zellen nach Stimulation mit allen 4 Pertussis-Antigenen vier Wochen nach der azellulären Auffrischimpfung. CD69 wird als ein früher Aktivierungsmarker angesehen, der als ein Indiz für kürzlich stattgefundene Stimulation der Lymphozyten aufgefasst wird (Frey et al. 2003). Der Anstieg des Aktivierungsmarkers (CD69+) konnte überraschenderweise nicht für die CD4+ T-Zellen nachgewiesen werden. In verschiedenen Arbeiten wurde wiederholt die Wichtigkeit von CD4+ T-Zellen in der Immunantwort gegen Pertussis hervorgehoben (Mills et al. 1993; Petersen et al. 1993) und eine Stimulation und Proliferation dieser durch azelluläre und Ganzkeim-Impfungen nachgewiesen (Ryan et al. 1998).

So konnten Mills et al. in Tierversuchen zeigen, dass der Transfer CD4+ T-Zellen immuner Mäuse auf nicht-immune oder immunsupprimierte Mäuse nachweisbar zur Eliminierung des Erregers nach intrabronchialer Exposition gegenüber *B. pertussis* führte (siehe auch Abschnitt 1.2.2., S. 11). In dem gleichen Versuch konnte durch den Transfer von CD8+ T-Zellen keine Verringerung bzw. Eliminierung der intrapulmonalen Erregerzahlen erreicht werden.

Auch in einer Studie von Zepp et al. wurde hauptsächlich eine Aktivierung von CD4+ T-Zellen und eine Hochregulierung des Oberflächenmarkers CD45RO dieser Zellen registriert (Zepp et al. 1996). Dieser Oberflächenmarker wird den Aktivierungsmarkern zugerechnet, findet sich jedoch auch auf Subpopulationen CD4+ und CD8+ T-Gedächtniszellen. Es konnte zudem ein leichter prozentualer Anstieg der Menge der CD8+ Zellen mit CD45RO-Expression im Laufe der Grundimmunisierung und ersten Auffrischimpfung von durchschnittlich 1% auf 2% nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigen unsere Untersuchungen ausschließlich einen Anstieg der CD8+/CD69+ aktivierten T-Zellpopulation. Dieser lag in ähnlichen Dimensionen wie bei Zepp et al., durchschnittlich kam es zu einem Anstieg der prozentualen Menge an CD8+/CD69+ Zellen von unter 1% auf max. 1,4%. Da wir für unsere Studie nur die Aktivierungsmarker CD69 und CD25 untersucht haben, lassen sich unsere Ergebnisse jedoch nicht direkt mit denen von Zepp et al. vergleichen.

Bei vielen Infektionskrankheiten spielen sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zellen eine wichtige Rolle. Dabei wird die relative Verteilung und Aktivierung der T-Zell-Subtypen vor allem durch die Art und den Ort der Erreger-Replikation mitbestimmt. CD4+ Th1-Zellen stimulieren u. a. durch IL-2- und INF- γ -Sekretion die phagozytären Funktionen

von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Zusätzlich sind sie, wie auch zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten, in der Lage, mit intrazellulären Erregern wie z. B. Viren, Listerien und Mykobakterien infizierte Zellen abzutöten (Mills et al. 1993). Da *B. pertussis* auch eine intrazelluläre Phase aufweist und in dieser Form der humoralen Immunabwehr entgehen kann, scheint eine wichtige Rolle der CD8⁺ T-Lymphozyten in der Bekämpfung des Pertussis-Erregers möglich.

In vielen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Immunisierungen gegenüber verschiedenen Pathogenen nicht nur einen Effekt auf CD4⁺ B- und T-Zellen ausüben, sondern auch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen aktivieren können. Dies konnte z. B. bei Immunisierung gegenüber dem Varizella-Zoster-Virus (Frey et al. 2003), dem Hepatitis B Virus (Dikopoulos et al. 2003), dem Enzephalomyokarditis-auslösenden Virus (Neal and Splitter 1998) und dem lymphozytären Choriomeningitis-Virus (Zimmermann et al. 1999) nachgewiesen werden. Ein wichtiger Mechanismus scheint dabei die Generierung aktivierter CD8⁺ T-Zellen durch Antigen- bzw. Peptidkontakt zu sein. Diese Zellen reagieren auf erneuten Kontakt mit dem Fremdpeptid mit einer kurzfristigen Hochregulierung von Aktivierungsmarkern wie z. B. CD69 und der α -Kette des IL-2-Rezeptors. Sie können durch die vermehrte Induktion von Zytokinrezeptoren und von Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche somit schneller als naive CD8⁺ T-Zellen aktiviert werden. Nach in vitro Aktivierung mit Peptidantigenen kommt es durch CD8⁺ T-Gedächtniszellen zu einer Sekretion höherer Level von Zytokinen, wie z. B. INF- γ und IL-2, als durch naive CD8⁺ T-Zellen (Pihlgren et al. 1999). Außerdem liegt der Schwellenwert zur Aktivierung dieser CD8⁺ T-Zellen in vitro in Gegenwart von IL-2 bei 10- bis 50-fach niedrigeren Peptidkonzentrationen als der Schwellenwert der CD8⁺ T-Zellen naiver Mäuse (Pihlgren et al. 1996).

Diese Unterschiede zwischen naiven CD8⁺ T-Zellen und aktivierten CD8⁺ T-Gedächtniszellen könnten eine bedeutende Rolle in der zellulären Immunantwort nach Impfung, vor allem bei fakultativ intrazellulären Erregern wie *B. pertussis*, spielen. Aufgrund dieser Überlegungen ist ein Anstieg der CD8⁺/CD69⁺ T-Lymphozyten mit der Funktion als T-Gedächtniszellen zum Erhalt eines lang anhaltenden Schutzes nach Impfung vorstellbar.

6. Zusammenfassung

Seit 1940 werden weltweit Impfungen gegen Pertussis mit Ganzkeimimpfstoffen (wcP) durchgeführt. Die nachlassende Akzeptanz auf Seiten der Eltern und Pädiater aufgrund der relativ hohen lokalen und systemischen Reaktogenität der Ganzkeimimpfstoffe führte zur Entwicklung von besser verträglichen azellulären Pertussis-Impfstoffen (aP). Diese sind seit 1994 in Deutschland zugelassen und werden heutzutage vorwiegend in industrialisierten Ländern eingesetzt. Unabhängig davon wurde in Ländern mit traditionell hohen Durchimpfungsraten bei Säuglingen und Kleinkindern (z. B. USA, neue Bundesländer) seit Beginn der 90er Jahre eine deutliche Verschiebung der Erkrankungsinzidenz aus dem Säuglings- und Kindesalter in das Jugend- und Erwachsenenalter beobachtet. Neuere Impfeempfehlungen der STIKO beinhalten deshalb auch Auffrischimpfungen bei Jugendlichen und Erwachsenen mit Kontakt zu Neugeborenen, sowie seit diesem Jahr eine erste generelle Erwachsenenimpfung, um Pertussis-Erkrankungen vorzubeugen und um eine Übertragung auf besonders gefährdete ungeschützte Säuglinge einzudämmen.

Ziel der Arbeit war, Unterschiede in der Langzeit-Immunität gegen Pertussis und in der Immunantwort auf eine azelluläre Pertussis-Auffrischimpfung bei 78 Jugendlichen im Alter von 10 bis 14 Jahren zu erfassen, welche zuvor entweder 5 Dosen azellulären Pertussis-Impfstoff (letzte Dosis mit 4-6 Jahren), 4 Dosen azellulären Pertussis-Impfstoff (letzte Dosis mit 18-24 Monaten) oder 4 Dosen Ganzkeim-Pertussisimpfstoff (letzte Dosis mit 18-24 Monaten) erhalten hatten. Dazu wurde einerseits die Pertussis-spezifische humorale Immunität mittels IgG-Antikörpertitern gegen Pertussistoxin (PT), filamentöses Hämagglutinin (FHA), Pertactin (PRN) und Fimbrien (FIM) gemessen. Zum anderen wurde die zellvermittelte Immunität mittels Proliferation der T-Lymphozyten nach Antigen-Stimulation, Zytokinen im Kulturüberstand und T-Zell-Aktivierungsmarkern gemessen.

Die Untersuchungen vor der azellulären Pertussis-Auffrischimpfung zeigten eine noch vorhandene humorale und zelluläre Restimmunität in der Studienpopulation. IgG-Antikörper konnten in 39% (PT), 83% (FHA) bzw. 75% (PRN) der Seren nachgewiesen werden. Eine spezifische zelluläre Immunität ($SI \geq 4$) bestand bei 43% der Jugendlichen gegenüber PT, 71% gegenüber FHA, 47% gegenüber PRN und

56% gegenüber FIM, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die niedrigen PT-Antikörpertiter lassen die Frage nach dem Vorliegen eines ausreichenden Impfschutzes bei den Jugendlichen aufkommen und unterstreichen die Notwendigkeit von Pertussis-Auffrischimpfungen. Von besonderer Bedeutung ist das Vorhandensein einer spezifischen humoralen und zellulären Immunreaktion gegenüber Pertussis-Antigenen, die nicht in dem zuvor verwendeten azellulären Biken-Impfstoff enthalten waren (PRN und FIM). Diese Immunität ist möglicherweise durch wiederholte Expositionen und subklinische Infektion mit *B. pertussis* in dem Zeitraum zwischen Grundimmunisierung und Auffrischimpfung zu erklären. Da diese subklinischen Infektionen zur natürlichen „Boosterung“ des Immunsystems führen können, liefern sie einen Beitrag zur Pertussis-spezifischen Immunität. Es ist bisher nicht vollständig geklärt, inwieweit diese subklinischen Infektionen für die Langzeitimmunität gegen *B. pertussis* von Bedeutung sind.

Die azelluläre Pertussis-Auffrischimpfung führte in allen drei Gruppen zu einer sehr ähnlichen humoralen und zellulären Immunantwort. Es kam zu einem zwischen den Gruppen vergleichbaren 2-fachen Titeranstieg gegenüber den Pertussis-spezifischen Antigenen (Gruppe A / B / C; PT: 78% / 83% / 78%, FHA: 92% / 100% / 89% und PRN: 100% / 100% / 94%). Außerdem kam es zu einer signifikanten Zunahme der zellulären Immunität, es zeigten sich dabei keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Diese Ergebnisse unterstützen zusätzlich die Hypothese der subklinischen Infektionen durch *B. pertussis*, da man aufgrund der Literatur im Vergleich zur Ganzkeim-Pertussis-Impfung nach ausschließlich azellulärer Pertussis-Impfung eher eine reduzierte CMI erwartet hätte.

Interessanterweise zeigten sich signifikant höhere Werte in den PT-Antikörpertitern nach Auffrischimpfung in der Gruppe mit Ganzkeimimpfstoff-Grundimmunisierung im Vergleich zu den beiden Gruppen, die ausschließlich azelluläre Pertussis-Impfstoffe erhielten. Dieser Unterschied war unabhängig von der Anzahl der Dosen, also auch bei einer zusätzlichen 5. Dosis in der Gruppe, deren Grundimmunisierung mit azellulärem Pertussis-Impfstoff erfolgte, noch nachweisbar. Es wäre möglich, dass die signifikant höheren PT-Antikörpertiter durch eine bessere Induktion von spezifischen B-Gedächtniszellen durch den früher verwendeten Pertussis-Ganzkeim-Impfstoff hervorgerufen sein könnten. In diesem Zusammenhang wären weitere Untersuchungen, wie z. B. die Messung von Pertussis-spezifischen B-Gedächtniszellen nötig, auch eine Wiederholung der Studie in einer anderen

Population mit einer traditionell hohen Durchimpfungsrate und niedriger Zirkulation von *B. pertussis* erscheint sinnvoll. Möglicherweise deuten diese Ergebnisse auch eine bessere klinische Wirksamkeit der hier verwendeten Ganzkeim-Impfstoffe gegenüber den azellulären Pertussis-Impfstoffen an. Dies konnte durch einige klinische Wirksamkeits-Studien für Ganzkeim-Pertussisimpfstoffe nach Grundimmunisierung gezeigt werden (Liese et al. 1997; Edwards 2008).

Die beobachtete Verschiebung der Erkrankungsinzidenz ins Jugend- und Erwachsenenalter belegt die Wichtigkeit der Pertussis-Auffrischimpfung im Jugend- und Erwachsenenalter. Hierdurch kann einerseits die Morbidität bei Erwachsenen vermindert, andererseits auch die Übertragung auf ungeimpfte Säuglinge vermieden werden. Die Auffrischimpfung führt zu einer guten Induktion der humoralen und zellulären Immunität. Die niedrigen PT-Antikörpertiter in allen Gruppen vor Auffrischimpfung und die stärkere Induktion von PT-Antikörpern nach Auffrischimpfung bei Jugendlichen, deren Grundimmunisierung mit Ganzkeim-Pertussisimpfstoff erfolgte, weisen möglicherweise auf eine geringere Immunogenität der azellulären Pertussis-Impfstoffe im Vergleich zu den Ganzkeim-Pertussisimpfstoffen hin. Es bleibt jedoch unklar, ob dies mit einer verminderten Schutzrate korreliert. Zum einen ließen sich in unseren Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede in der zellvermittelten Immunität nachweisen, zum anderen gibt es bisher lediglich bei Säuglingen und Kleinkindern Daten, die eine geringgradig bessere Wirksamkeit der heute nicht mehr verfügbaren Pertussis-Ganzkeim-Impfstoffe suggerieren.

Ein weiterer Grund, Auffrischimpfungen in regelmäßigen Abständen gemäß den aktuellen Empfehlungen der STIKO einzusetzen, sind die in unserer Studie gefundenen Hinweise auf wahrscheinliche subklinische *B. pertussis* Infektionen, die zu einer Auffrischung bzw. Aufrechterhaltung der Pertussis-spezifischen Immunität führen. Bei steigender Durchimpfungsrate ist von einer verminderten Zirkulation und damit einer verminderten Exposition gegenüber *B. pertussis* auszugehen. Damit kommt es möglicherweise zu einer deutlichen Reduktion bzw. zum Wegfall von subklinischen Infektionen und Boosterungen im Sinne einer „Stillen Feiung“. Die konsequente Durchführung von Auffrischimpfungen bei Jugendlichen und Erwachsenen ist daher notwendig, um Pertussisinfektionen und ihre Morbidität und Mortalität weiterhin erfolgreich zu kontrollieren.

7. Literaturverzeichnis

- Altunaiji, S., R. Kukuruzovic, et al. (2005). "Antibiotics for whooping cough (pertussis)." Cochrane Database Syst Rev(1): CD004404.
- Ausiello, C. M., R. Lande, et al. (2000). "Cell-mediated immunity and antibody responses to Bordetella pertussis antigens in children with a history of pertussis infection and in recipients of an acellular pertussis vaccine." J Infect Dis **181**(6): 1989-95.
- Ausiello, C. M., R. Lande, et al. (1999). "Cell-mediated immune responses in four-year-old children after primary immunization with acellular pertussis vaccines." Infect Immun **67**(8): 4064-71.
- Ausiello, C. M., F. Urbani, et al. (1997). "Vaccine- and antigen-dependent type 1 and type 2 cytokine induction after primary vaccination of infants with whole-cell or acellular pertussis vaccines." Infect Immun **65**(6): 2168-74.
- Barnard, A., B. P. Mahon, et al. (1996). "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 **87**(3): 372-80.
- Bernasconi, N. L., E. Traggiai, et al. (2002). "Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells." Science **298**(5601): 2199-202.
- Black, S. (1997). "Epidemiology of pertussis." Pediatr Infect Dis J **16**(4 Suppl): S85-9.
- Bromberg, K., G. Tannis, et al. (1991). "Detection of Bordetella pertussis associated with the alveolar macrophages of children with human immunodeficiency virus infection." Infect Immun **59**(12): 4715-9.
- Bruss, J. B. and G. R. Siber (1999). "Protective effects of pertussis immunoglobulin (P-IGIV) in the aerosol challenge model." Clin Diagn Lab Immunol **6**(4): 464-70.
- Calame, K. (2006). "Transcription factors that regulate memory in humoral responses." Immunol Rev **211**: 269-79.
- Celentano, L. P., M. Massari, et al. (2005). "Resurgence of pertussis in Europe." Pediatr Infect Dis J **24**(9): 761-5.
- Cheers, C. and D. F. Gray (1969). "Macrophage behaviour during the complaisant phase of murine pertussis." Immunology **17**(6): 875-87.

- Cherry, J. D., T. Beer, et al. (1995). "Comparison of values of antibody to *Bordetella pertussis* antigens in young German and American men." Clin Infect Dis **20**(5): 1271-4.
- Cherry, J. D., J. Gornbein, et al. (1998). "A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses." Vaccine **16**(20): 1901-6.
- Cherry, J. D., E. Grimprel, et al. (2005). "Defining pertussis epidemiology: clinical, microbiologic and serologic perspectives." Pediatr Infect Dis J **24**(5 Suppl): S25-34.
- Decker, M. D. and K. M. Edwards (2000). "Acellular pertussis vaccines." Pediatr Clin North Am **47**(2): 309-35.
- Di Tommaso, A., M. Domenighini, et al. (1991). "Identification of subregions of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin that stimulate human T-cell responses." Infect Immun **59**(9): 3313-5.
- Dikopoulos, N., I. Jomantaite, et al. (2003). "Specific, functional effector/memory CD8+ T cells are found in the liver post-vaccination." J Hepatol **39**(6): 910-7.
- Edelman, K., Q. He, et al. (2007). "Immunity to pertussis 5 years after booster immunization during adolescence." Clin Infect Dis **44**(10): 1271-7.
- Edelman, K. J., Q. He, et al. (2004). "Pertussis-Specific Cell-Mediated and Humoral Immunity in Adolescents 3 Years after Booster Immunization with Acellular Pertussis Vaccine." Clinical Infectious Diseases **39**(2): 179-185.
- Edwards, K. M. (2005). "Overview of pertussis: focus on epidemiology, sources of infection, and long term protection after infant vaccination." Pediatr Infect Dis J **24**(6 Suppl): S104-8.
- Edwards, K. M., M. D. Decker, et al. (1991). "Differences in antibody response to whole-cell pertussis vaccines." Pediatrics **88**(5): 1019-23.
- Edwards, K. M., B. D. Meade, et al. (1995). "Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: overview and serologic response." Pediatrics **96**(3 Pt 2): 548-57.
- Edwards, K. M. D., Michael D.: (2008). Pertussis Vaccine. Vaccines. S. A. O. Plotkin, Walter A.; Offit, P. A. Philadelphia, Saunders: pp 471-528.
- Esposito, S., T. Agliardi, et al. (2001). "Long-term pertussis-specific immunity after primary vaccination with a combined diphtheria, tetanus, tricomponent acellular pertussis, and hepatitis B vaccine in comparison with that after natural infection." Infect Immun **69**(7): 4516-20.
- Fauci, A. S. B., E. ; Isselbacher, Kurt J. (2005). Harrisons Innere Medizin, Abw Wissenschaftsverlag.

- Favre, N., G. Bordmann, et al. (1997). "Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR." J Immunol Methods **204**(1): 57-66.
- Frey, C. R., M. A. Sharp, et al. (2003). "Identification of CD8+ T cell epitopes in the immediate early 62 protein (IE62) of varicella-zoster virus, and evaluation of frequency of CD8+ T cell response to IE62, by use of IE62 peptides after varicella vaccination." J Infect Dis **188**(1): 40-52.
- Geddes, J. F. and D. G. Talbert (2006). "Paroxysmal coughing, subdural and retinal bleeding: a computer modelling approach." Neuropathol Appl Neurobiol **32**(6): 625-34.
- Giuliano, M., P. Mastrantonio, et al. (1998). "Antibody responses and persistence in the two years after immunization with two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis." J Pediatr **132**(6): 983-8.
- Granstrom, M., A. M. Olander-Nielsen, et al. (1991). "Specific immunoglobulin for treatment of whooping cough." Lancet **338**(8777): 1230-3.
- Greco, D., S. Salmaso, et al. (1996). "A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group." N Engl J Med **334**(6): 341-8.
- Griffith, A. H. (1989). "Permanent brain damage and pertussis vaccination: is the end of the saga in sight?" Vaccine **7**(3): 199-210.
- Griffith, A. H. (1989). "Pertussis vaccines and permanent brain damage." Vaccine **7**(6): 489-90.
- Guiso, N., E. Njamkepo, et al. (2007). "Long-term humoral and cell-mediated immunity after acellular pertussis vaccination compares favourably with whole-cell vaccines 6 years after booster vaccination in the second year of life." Vaccine **25**(8): 1390-7.
- Gustafsson, L., H. O. Hallander, et al. (1996). "A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine." N Engl J Med **334**(6): 349-55.
- Halperin, S. A., R. Bortolussi, et al. (1997). "Seven days of erythromycin estolate is as effective as fourteen days for the treatment of Bordetella pertussis infections." Pediatrics **100**(1): 65-71.
- Halperin, S. A., B. Smith, et al. (2000). "An adult formulation of a five-component acellular pertussis vaccine combined with diphtheria and tetanus toxoids is safe and immunogenic in adolescents and adults." Vaccine **18**(14): 1312-9.

- Halperin, S. A., W. Vaudry, et al. (2007). "Is pertussis immune globulin efficacious for the treatment of hospitalized infants with pertussis? No answer yet." Pediatr Infect Dis J **26**(1): 79-81.
- He, Q., N. N. Tran Minh, et al. (1998). "Cytokine mRNA expression and proliferative responses induced by pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and pertactin of *Bordetella pertussis* in the peripheral blood mononuclear cells of infected and immunized schoolchildren and adults." Infect Immun **66**(8): 3796-801.
- Healy, C. M., F. M. Munoz, et al. (2004). "Prevalence of pertussis antibodies in maternal delivery, cord, and infant serum." J Infect Dis **190**(2): 335-40.
- Heiss, L. N., J. R. Lancaster, Jr., et al. (1994). "Epithelial autotoxicity of nitric oxide: role in the respiratory cytopathology of pertussis." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(1): 267-70.
- Heiss, L. N., S. A. Moser, et al. (1993). "Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis." Infect Immun **61**(8): 3123-8.
- Hewlett, E. L. (1997). "Pertussis: current concepts of pathogenesis and prevention." Pediatr Infect Dis J **16**(4 Suppl): S78-84.
- Hodder, S. L., J. D. Cherry, et al. (2000). "Antibody responses to *Bordetella pertussis* antigens and clinical correlations in elderly community residents." Clin Infect Dis **31**(1): 7-14.
- Isacson, J., B. Trollfors, et al. (1995). "Acquisition of IgG serum antibodies against two *Bordetella* antigens (filamentous hemagglutinin and pertactin) in children with no symptoms of pertussis." Pediatr Infect Dis J **14**(6): 517-21.
- Isacson, J., B. Trollfors, et al. (1993). "How common is whooping cough in a nonvaccinating country?" Pediatr Infect Dis J **12**(4): 284-8.
- Janeway (2002). Immunologie. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Knuf, M., F. Zepp, et al. (2006). "Immunogenicity of a single dose of reduced-antigen acellular pertussis vaccine in a non-vaccinated adolescent population." Vaccine **24**(12): 2043-8.
- Langley, J. M., S. A. Halperin, et al. (2004). "Azithromycin is as effective as and better tolerated than erythromycin estolate for the treatment of pertussis." Pediatrics **114**(1): e96-101.
- Liese, J. (2005). "Pertussis bei Jugendlichen und Erwachsenen." Monatsschrift Kinderheilkunde **153**: 845-853.

Liese, J. (2007). Clinical Trial Report TRI05, EUDRACT-number 2005-005765-17.

Liese, J. G., C. K. Meschievitz, et al. (1997). "Efficacy of a two-component acellular pertussis vaccine in infants." *Pediatr Infect Dis J* **16**(11): 1038-44.

Liese, J. G., S. Stojanov, et al. (2001). "Safety and immunogenicity of Biken acellular pertussis vaccine in combination with diphtheria and tetanus toxoid as a fifth dose at four to six years of age. Munich Vaccine Study Group." *Pediatr Infect Dis J* **20**(10): 981-8.

Long, S. S., H. W. Lischner, et al. (1990). "Serologic evidence of subclinical pertussis in immunized children." *Pediatr Infect Dis J* **9**(10): 700-5.

Mahon, B. P., M. T. Brady, et al. (2000). "Protection against *Bordetella pertussis* in mice in the absence of detectable circulating antibody: implications for long-term immunity in children." *J Infect Dis* **181**(6): 2087-91.

McGuirk, P., C. McCann, et al. (2002). "Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*." *J Exp Med* **195**(2): 221-31.

McGuirk, P. and K. H. Mills (2000). "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* **30**(2): 415-22.

Miller, D., N. Madge, et al. (1993). "Pertussis immunisation and serious acute neurological illnesses in children." *Bmj* **307**(6913): 1171-6.

Miller, D. C., M. J. Wadsworth, et al. (1989). "Pertussis vaccine and severe acute neurological illnesses. Response to a recent review by members of the NCES team." *Vaccine* **7**(6): 487-9.

Mills, K. H. (2001). "Immunity to *Bordetella pertussis*." *Microbes Infect* **3**(8): 655-77.

Mills, K. H., A. Barnard, et al. (1993). "Cell-mediated immunity to *Bordetella pertussis*: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model." *Infect Immun* **61**(2): 399-410.

Mink, C. M., C. H. O'Brien, et al. (1994). "Isotype and antigen specificity of pertussis agglutinins following whole-cell pertussis vaccination and infection with *Bordetella pertussis*." *Infect Immun* **62**(3): 1118-20.

Mooi, F. R., I. H. van Loo, et al. (2001). "Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: a cause for its reemergence?" *Emerg Infect Dis* **7**(3 Suppl): 526-8.

- Mooi, F. R., H. van Oirschot, et al. (1998). "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 **66**(2): 670-5.
- Neal, Z. C. and G. A. Splitter (1998). "Protection against lethal encephalomyocarditis virus infection in the absence of serum-neutralizing antibodies." J Virol **72**(10): 8052-60.
- Paddock, C. D., G. N. Sanden, et al. (2008). "Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants." Clin Infect Dis **47**(3): 328-38.
- Pediatrics (1996). "The relationship between pertussis vaccine and central nervous system sequelae: continuing assessment. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. No authors listed." Pediatrics **97**(2): 279-81.
- Peppoloni, S., L. Nencioni, et al. (1991). "Lymphokine secretion and cytotoxic activity of human CD4+ T-cell clones against *Bordetella pertussis*." Infect Immun **59**(10): 3768-73.
- Petersen, J. W., P. Andersen, et al. (1993). "Proliferative responses to purified and fractionated *Bordetella pertussis* antigens in mice immunized with whole-cell pertussis vaccine." Vaccine **11**(4): 463-72.
- Pichichero, M. E., J. R. Casey, et al. (2006). "Acellular pertussis vaccine boosters combined with diphtheria and tetanus toxoid boosters for adolescents: safety and immunogenicity assessment when preceded by different 5-dose DTaP/DTwP schedules." Clin Pediatr (Phila) **45**(7): 613-20.
- Pichichero, M. E., M. A. Deloria, et al. (1997). "A safety and immunogenicity comparison of 12 acellular pertussis vaccines and one whole-cell pertussis vaccine given as a fourth dose in 15- to 20-month-old children." Pediatrics **100**(5): 772-88.
- Pichichero, M. E., K. M. Edwards, et al. (2000). "Safety and immunogenicity of six acellular pertussis vaccines and one whole-cell pertussis vaccine given as a fifth dose in four- to six-year-old children." Pediatrics **105**(1): e11.
- Pichichero, M. E., M. B. Rennels, et al. (2005). "Combined tetanus, diphtheria, and 5-component pertussis vaccine for use in adolescents and adults." Jama **293**(24): 3003-11.
- Pihlgren, M., C. Arpin, et al. (1999). "Memory CD44(int) CD8 T cells show increased proliferative responses and IFN-gamma production following antigenic challenge in vitro." Int Immunol **11**(5): 699-706.

- Pihlgren, M., P. M. Dubois, et al. (1996). "Resting memory CD8+ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro." J Exp Med **184**(6): 2141-51.
- Radbruch, A., G. Muehlinghaus, et al. (2006). "Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell." Nat Rev Immunol **6**(10): 741-50.
- Raman, V. S., E. F. Lind, et al. (2007). "Strategies for selective priming of memory B cells." Immunol Lett **109**(2): 93-100.
- Redhead, K., J. Watkins, et al. (1993). "Effective immunization against Bordetella pertussis respiratory infection in mice is dependent on induction of cell-mediated immunity." Infect Immun **61**(8): 3190-8.
- Rennels, M. B., M. A. Deloria, et al. (2000). "Extensive swelling after booster doses of acellular pertussis-tetanus-diphtheria vaccines." Pediatrics **105**(1): e12.
- Reynolds, E., B. Walker, et al. (2006). "Laboratory investigation of immune responses to acellular pertussis vaccines when used for boosting adolescents after primary immunisation with whole cell pertussis vaccines: a comparison with data from clinical study." Vaccine **24**(16): 3248-57.
- Robert-Koch-Institut (2005). "Zum Auftreten von Pertussis in den neuen Bundesländern." Epidemiologisches Bulletin(23): 195-198.
- Robert-Koch-Institut (2007). "Keuchhusten-Erkrankungen in den neuen Bundesländern seit 2002." Epidemiologisches Bulletin(50): 475-481.
- Rowe, J., S. T. Yerkovich, et al. (2005). "Th2-associated local reactions to the acellular diphtheria-tetanus-pertussis vaccine in 4- to 6-year-old children." Infect Immun **73**(12): 8130-5.
- Ryan, E. J., L. Nilsson, et al. (2000). "Booster immunization of children with an acellular pertussis vaccine enhances Th2 cytokine production and serum IgE responses against pertussis toxin but not against common allergens." Clin Exp Immunol **121**(2): 193-200.
- Ryan, M., L. McCarthy, et al. (1998). "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 **10**(5): 651-62.
- Ryan, M., G. Murphy, et al. (1997). "Bordetella pertussis respiratory infection in children is associated with preferential activation of type 1 T helper cells." J Infect Dis **175**(5): 1246-50.
- Saukkonen, K., W. N. Burnette, et al. (1992). "Pertussis toxin has eukaryotic-like carbohydrate recognition domains." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(1): 118-22.

- Schmitt, H. J., C. H. von Konig, et al. (1996). "Efficacy of acellular pertussis vaccine in early childhood after household exposure." Jama **275**(1): 37-41.
- Steed, L. L., E. T. Akporiaye, et al. (1992). "Bordetella pertussis induces respiratory burst activity in human polymorphonuclear leukocytes." Infect Immun **60**(5): 2101-5.
- Storsaeter, J., W. C. Blackwelder, et al. (1992). "Pertussis antibodies, protection, and vaccine efficacy after household exposure." Am J Dis Child **146**(2): 167-72.
- Storsaeter, J., H. O. Hallander, et al. (1998). "Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to Bordetella pertussis." Vaccine **16**(20): 1907-16.
- Tan, T., E. Trindade, et al. (2005). "Epidemiology of pertussis." Pediatr Infect Dis J **24**(5 Suppl): S10-8.
- Taranger, J., B. Trollfors, et al. (2001). "Immunologic and epidemiologic experience of vaccination with a monocomponent pertussis toxoid vaccine." Pediatrics **108**(6): E115.
- Taranger, J., B. Trollfors, et al. (2000). "Correlation between pertussis toxin IgG antibodies in postvaccination sera and subsequent protection against pertussis." J Infect Dis **181**(3): 1010-3.
- Thomas, M. G., L. A. Ashworth, et al. (1989). "Serum IgG, IgA, and IgM responses to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and agglutinogens 2 and 3 after infection with Bordetella pertussis and immunization with whole-cell pertussis vaccine." J Infect Dis **160**(5): 838-45.
- Tindberg, Y., M. Blennow, et al. (1999). "A ten year follow-up after immunization with a two component acellular pertussis vaccine." Pediatr Infect Dis J **18**(4): 361-5.
- Tran Minh, N. N., K. Edelman, et al. (1998). "Antibody and cell-mediated immune responses to booster immunization with a new acellular pertussis vaccine in school children." Vaccine **16**(17): 1604-10.
- Tran Minh, N. N., Q. He, et al. (1999). "Cell-mediated immune responses to antigens of Bordetella pertussis and protection against pertussis in school children." Pediatr Infect Dis J **18**(4): 366-70.
- Trollfors, B., J. Taranger, et al. (1995). "A placebo-controlled trial of a pertussis-toxoid vaccine." N Engl J Med **333**(16): 1045-50.
- Van Savage, J., M. D. Decker, et al. (1990). "Natural history of pertussis antibody in the infant and effect on vaccine response." J Infect Dis **161**(3): 487-92.

- Vincent, J. M., J. D. Cherry, et al. (2000). "Prolonged afebrile nonproductive cough illnesses in American soldiers in Korea: a serological search for causation." Clin Infect Dis **30**(3): 534-9.
- Wendelboe, A. M., A. Van Rie, et al. (2005). "Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination." Pediatr Infect Dis J **24**(5 Suppl): S58-61.
- Wirsing von Konig, C. H., S. Postels-Multani, et al. (1995). "Pertussis in adults: frequency of transmission after household exposure." Lancet **346**(8986): 1326-9.
- Zepp, F., M. Knuf, et al. (2006). "Safety of reduced-antigen-content tetanus-diphtheria-acellular pertussis vaccine in adolescents as a sixth consecutive dose of acellular pertussis-containing vaccine." J Pediatr **149**(5): 603-610.
- Zepp, F., M. Knuf, et al. (1996). "Pertussis-specific cell-mediated immunity in infants after vaccination with a tricomponent acellular pertussis vaccine." Infect Immun **64**(10): 4078-84.
- Zimmermann, C., A. Prevost-Blondel, et al. (1999). "Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences." Eur J Immunol **29**(1): 284-90.

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
μCi	Microcurie
μg	Microgramm
A/5aP	Gruppe A, zuvor 5 Dosen azellulären Pertussis-Impfstoff erhalten
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-Diphosphat
AMP	Adenosin-Monophosphat
aP	azellulärer Pertussis-Impfstoff
B/4aP	Gruppe B, zuvor 4 Dosen azellulären Pertussis-Impfstoff erhalten
C/4wcP	Gruppe C, zuvor 4 Dosen Ganzkeim-Pertussisimpfstoff erhalten
cAMP	cyklisches AMP
Cat.	Katalog
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Center for Disease Control, USA
CI	Konfidenzintervall
CMI	cell mediated immunity
cpm	counts per minute
DTwcP	Tetanus-, Diphtherie- und Ganzkeim-Pertussis-Kombinationsimpfstoff
Eiw.	Eiweiß
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter (Durchflusszytometer)
FHA	Filamentöses Hämagglutinin
FIM	Fimbrien
Fim D	Fimbrien-Untereinheit D
GMT	Geometric mean titre
HBV	Hepatitis B Virus
Hib	Haemophilus influenzae Typ b
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
IPV	inaktivierte Poliovaccine
LPS	Lipopolysaccharid
MLD	minimal level of detection
mRNA	messenger RNA
MWU	Mann-Whitney-U
NaCl	Natriumchlorid / Kochsalz
NO	Stickstoffmonoxid
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBMC	Periphere mononukleäre Zellen des Blutes
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
pg	Picogramm
PHA	Phytohämagglutinin

PRN	Pertactin
PT	Pertussis-Toxin / -Toxoid
RKI	Robert-Koch-Institut
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SI	Stimulationsindex
SIDS	Sudden infant death syndrome
STIKO	Ständige Impfkommission
TCT	Tracheales Cytotoxin
TdaP	Tetanus-, Diphtherie- und azelluläre Pertussis-Kombinationsimpfstoff
TdaP-IPV	TdaP- und Poliomyelitis-Kombinationsimpfstoff
Th1	T-Helferzellen Typ 1
Th2	T-Helferzellen Typ 2
TLR	Toll-like-receptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α

Danksagung

Herzlichen Dank an

Herrn Professor Dr. med. J. Liese
für die Überlassung des Themas und konsequente, verlässliche und hilfsbereite
Unterstützung.

Herrn Dr. med. N. Rieber
für die gute Zusammenarbeit und freundliche, kompetente und hilfsbereite
Betreuung.

Die Mitarbeiter des immunologischen Labors im Dr. von Haunerschen Kinderspital.

Die Statistikerin Frau M. Ocak für die professionelle Hilfe bei der statistischen
Auswertung.

Meine Familie und meinen Freund, sowie meine Freundinnen für die Unterstützung,
Freundschaft und Liebe.