

Boğmaca: Her zaman gündemde

Erkan Özcengiz

Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi, Aşı-Serum Üretim ve Araştırma Bölümü, 06100 Ankara

ÖZET

Boğmaca hastalığının önemli bir halk sağlığı problemi olarak tüm dünyada devam etmesi ve bağışıklama ile korunmanın toplumlar için tek yol olması, *Bordetella pertussis* bakterisi ve boğmaca aşılarının önemini artırmaktadır. Günümüzde ortaya çıkan boğmaca salgınlarında aşılı bireylerin ve bazı yaş gruplarının hastalığa yakalanma bakımından gösterdikleri değişimler incelenmeye değer bulunmaktadır. Dünyada bebek ölümlerinin başlıca nedenlerinden biri olan boğmacanın erişkinlerde de görülmesi, bakterinin toplumda sirkülasyonunu sürdürmesinde önemli bir etken olmaktadır. Günümüzde erişkinlerin hücresiz yeni aşı ile bağışıklanması ise dünya gündeminde ağırlıklı bir yer tutmaktadır. Bununla beraber yeni hücresiz boğmaca aşısı henüz çok az sayıda ülkede primer bağışıklamada kullanılmakta ve yüksek maliyeti nedeniyle fakir ve gelişmekte olan ülkelere girişi çok zor görülmektedir. Pek çok ülkede tam hücre aşısı ve çok az ülkede hücresiz aşının uygulamada bulunmasının yarattığı ikilem yanında, bu aşılarda da kendi içlerinde farklılıklara sahip olması bu alanda yapılacak çok fazla çalışmanın bulunduğunu göstermektedir. Bu raporda; günümüzdeki boğmaca salgınları, *B. pertussis*' in önemli virulans faktörleri, gösterdikleri genetik çeşitlilik, boğmaca aşıları ve aralarındaki karşılıklı etkileşimler tartışılmıştır.

SUMMARY

Pertussis: Always on the agenda

Regarding the fact that pertussis disease remains as a serious public health problem and vaccination is the only preventing route to combat this disease, *Bordetella pertussis* and pertussis vaccines have continued to receive worldwide interest. At present, the changes in the patterns of infection of vaccinated individuals as well as susceptible age groups are found to be worthy of detailed evaluation. Because pertussis is a major cause of both childhood illness and infant death and is also reported among adolescents and adults, it is clear that the pathogen keeps on circulating in populations. Currently, universal adolescent and adult vaccination with the new acellular pertussis vaccine has important impact on the world's agenda. However, this type of vaccination is in use for primary immunization in a very limited number of countries and it can hardly enter to poor and developing countries due to its high cost. In addition to this dilemma, the intrinsic variations among

such vaccines in use points to the need for further stuides in the field. In this report, the current pertussis outbreaks, the virulance factors of B. pertussis, the genetic variation that the organism displays and pertussis vaccines are reviewed with particular reference to the interactions amongst them.

Giriş

Boğmaca hastalığı özellikle yeni doğanlarda ciddi sonuçlar doğuran ve dünyada bir yaş altı çocuklarda ölüme neden olan en önemli hastalıklardan biri olma durumunu korumakla beraber, hiç kuşku yok ki 1940'lardan bu yana hastalığa karşı uygulanan aşılama ile tüm dünyada boğmaca morbidite ve mortalitesinde önemli düşüşler olmuştur. Buna rağmen oldukça bulaşıcı akut bir bakteriyel hastalık olan boğmaca %90'ı gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere tüm dünyada senede 20-40 milyon vaka olarak görülmekte ve bunların 200-300 bini ölmektedir (1). Hastalık her yaşta olmakla beraber en çok ölüm yenidoğanlarda görülmektedir. Boğmacanın kontrolunda ise aşılama en akılcı yaklaşımdır. Bununla beraber klasik boğmaca aşılara atfedilen ciddi yan tesirlerin etkisi nedeniyle geçen dönemde bazı ülkelerde gözlenen aşı uygulamasındaki azalmalar sonucunda ortaya çıkan boğmaca epidemileri, 1980'lerden sonra yeni ve daha güvenilir bir aşı olarak hücresiz boğmaca aşısının bulunmasını sağlamıştır. Bunun yanında bu aşının pahalı olması nedeniyle geniş uygulama bulamaması şu anda dünyada iki tip boğmaca aşısı kullanılması durumunu yaratmıştır. Ancak 50 yılı aşkın boğmaca aşıları uygulamalarına karşın hastalık bir halk sağlığı problemi olarak önemini korumaya devam etmektedir. Özellikle son zamanlarda hastalığın gelişmiş ülkelerde zaman zaman epidemiler şeklinde ve aynı zamanda erişkinlerde de görülmesi gibi değişimler, boğmaca bağışıklığı, toplumlarda endemik olarak sirküle eden B. pertussis bakterisi ve aşılarında kullanılan B. pertussis suşlarının genetik ve yapısal komponentlerinin polimorfizm yönünden araştırılması çalışmalarını hızlandırmıştır. Bu yönde henüz açıklığa kavuşmayan önemli konular bulunmakla beraber ileri sürülen epidemiyolojik ve B. pertussis izolatlarına ait genetik değişiklikler ile kullanılmakta olan mevcut aşı suşları farklılıkları, aşılar arasındaki farklılıklar, aşı uygulama farklılıkları ve boğmaca hastalığı ile aşılarının neden hep gündemde olduğu bu araştırmada tartışılmıştır.

Boğmaca Hastalığı

Boğmaca hastalığı (pertussis / whooping cough) Bordetella pertussis tarafından oluşturulan akut bir solunum yolu hastalığıdır. Yaklaşık 7-14 günlük inkübasyon süresini takiben oluşan hastalık üç klinik evrede seyreder: Kataral faz, bir iki hafta sürer ve soğuk algınlığından ayırt edilemez. Bu nezle döneminde bakteri kolaylıkla izole edilebilir ve solunum yollarında semptomların giderek şiddetlenmesiyle öksürük artar. Ateş tipik olarak 38.5°C' den daha azdır. Hastalık, öksürüğün daha spazmodik bir hal alarak paroksizmal devreye girmesi ile karakterize olur. Bu devrede öksürük çok şiddetlidir ve mukusun nefes borusundan çıkarılması için çok fazla gayret sarf edilir. Mukusun temizlenmesinden sonra akciğerlere hızla hava girer ve hastada ötme şeklinde bir ses çıkar. Boğmaca öksürüğü denen bu ses sadece bu hastalığa özgüdür. Hasta öksürük sonunda genel olarak kusar ve yorgun uykuya dalar. Bu zamanda lenfositosis genellikle belirleyici özelliktedir. Hastalık seyrinde öksürüğe bağlı olarak şu komplikasyonlar görülebilir; deride ve konjonktivada hemorajiler,

dehidratasyon, pneumothorax vb. Birkaç hafta sonra öksürük ve kusmaların şiddeti azalır ve hasta konvalasent devreye girer. Kademeli olarak sağlığa dönülen konvalasent devrede Bordetella pertussis bakterisi hastadan izole edilemez. Bu devrede paroksizmal devre semptomları tekrar görülebilir, iyileşme için birkaç hafta geçmesi gerekir.

Hastalığın akut fazında bakteri bulunmaz ve klinik tablonun ortaya çıkmasında solunum yolunun bakteriyle invazyonu rol oynamaz. Bu tablonun gerçekleşmesinde uzun süre devam eden toksik bir etki önemlidir. En çok korkulan komplikasyonlardan biri olan sekonder enfeksiyonlara hastaların duyarlı hale gelmesi de yine bu toksikasyon sonucu konağın immün yanıtının zayıflamasına bağlanmaktadır. En yaygın komplikasyon ise pnömonidir. Boğmacanın sistemik etkisinde rol alan ve solunum yolundan absorbe edilen başlıca toksinler şunlardır; pertussis toksin, adenilatsiklaz toksin, dermonekrotik toksin, trakeal sitotoksin ve endotoksin.

Boğmaca morbidite ve mortalite yönünden en çok altı aydan küçük yeni doğanlarda etkili olmakla beraber, hastalık her yaşta görülebilmektedir. Antibiyotiklerin kullanımı paroksizmal devrede uygun olabilir ve daha çok ikincil enfeksiyonlardan hastayı koruyabilir. Bu nedenle toplumda hastalığın kontrolü aşı uygulaması ile korunmaya dayanmaktadır (2).

Boğmaca Aşıları

Etkili bir boğmaca aşısı 1940'lardan bu yana mevcut olup, 1950'lerin başında dünyada yaygın olarak uygulanmaya başlanmıştır. B. pertussis bakterisinin inaktif hücrelerinden hazırlanan bu tam hücre boğmaca aşısı (whole cell pertussis vaccine, wP) günümüzde de dünya ülkelerinin çok büyük bir bölümü tarafından kullanılmaktadır. %80'in üzerinde koruyuculuğu ve güvenilirliği belirlenmiş olan tam hücre aşısı tüm ülkelerde boğmacanın önlenmesinde esas role sahip olmuştur(3-7). Bununla beraber tam hücre aşılarının zaman zaman bazı istenmeyen reaksiyonlara neden olduğu da rapor edilmiştir. Tam hücre aşısından sonra lokal reaksiyonlar yaygın olarak, ateş ise enjeksiyonların %50'sinin üzerinde görülmektedir. Bunun yanında aşılama sonrası uyuklama, sinirlilik, iştahsızlık gibi nispeten yaygın sistemik reaksiyonlar da görülebilmektedir. Tam hücre aşılamasından sonra inatçı ağlama ve seyrek olarak ensefalomiyelit ve ölüm rapor edildiği de olmuştur. İstenmeyen reaksiyonlar tam olarak rapor edilmemekle beraber boğmaca aşısına ait bildirimlerin diğer aşılarla göre daha fazla olduğu gözlenmektedir (8,9).

Bu nedenle geçmişte bazı ülkelerde boğmaca bağışıklama programında kesintiler meydana gelmiş ve tam hücre aşısı ile ilişkilendirilen toksisite durumu, aşının uluslararası kabulünde ve bağışıklama programlarında büyük bir engel olmuştur. Örneğin, İngiltere'de bağışıklama oranı 1974'de %77'den 1978'de %30'a gerilemiş ve bunun sonucu olarak da 1977-1979'da boğmaca vakaları 102.500'e yükselmiştir. Japonya'da boğmaca bağışıklaması ile ilişkilendirilen iki ölüm olayını takiben pertussis bağışıklaması durdurulmuş, buna karşın rapor edilen vakalar 1971'de 206'dan 1979'da 13.109'a yükselmiş ve 41 ölüm bildirilmiştir. İsveç'te boğmaca insidansında 1957'den sonra düşüş başlamış ve 1972'de en düşük seviyeye ulaşmıştır. Daha sonra özellikle 1977-1978'de boğmaca vakalarında bir artış başlamış ve 1983'de en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Yüksek oranda bağışıklamaya rağmen görülen bu boğmaca salgını, aşının nörolojik riskleri de dikkate alınarak yararı konusunda şüphe ve ailelerde panik doğmasına neden olmuştur. Bu dönemde boğmaca aşılması çok düşük seviyelere gerilemiş ve pertussis vakaları aşılama tarihi boyunca görülmemiş seviyelere yükselmiştir (10-13).

Bu olaylar Japonya'da araştırmaların pertussise karşı koruyucu yanıtta sorumlu komponentleri içeren yeni ve daha güvenilir bir aşı geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmasını sağlamıştır. Japonya'da ulusal bir çaba ile koordineli olarak yürütülen ve 7 yılı aşkın bir süre devam eden çalışmalar sonunda *B. pertussis*'in en önemli komponentleri olan pertussis toksin (PT, Ptx) ve filamentous haemagglutinin (FHA) moleküllerine dayanan hücresiz boğmaca aşısı (acellular pertussis vaccine, aP) 1981'de uygulamaya girmiştir. PT aynı zamanda LPF(lymphocytosis promoting factor) olarak da bilinen AB modelinde ADP-riboziltransferaz aktivitesine sahip bir bakteri toksinidir. PT heksamerik global bir protein olup S1(26 024), S2 (21 924), S3(21 873), S4(12 058) ve S5(11 013) alt birimlerinden oluşur. S1 enzimatik aktiviteye sahip A alt birimdir. S2, S3 ve iki S4 altbirimi S5 ile bağlanarak B altbirim kompleksini oluşturur. B alt birim S1'e bağlanarak tam molekülü meydana getirir. B alt birim hücre membranındaki reseptöre bağlanma görevini görür. Tam PT molekülü kimyasal olarak detoksifiye edilerek toksoid formda (PTd) hücresiz aşılarda kullanılmaktadır. FHA molekülü bir hücre duvarı komponenti olup mikroorganizmanın solunum yolu epiteline bağlanmasıyla rol alan en önemli elemanlardan biridir. Aynı zamanda hücre dışında da bulunan FHA toksik değildir. PT ve FHA molekülleri her ikisi de hemagglutinasyon aktivitesine sahiptir. PTd ve FHA moleküllerinden oluşan ilk hücresiz boğmaca aşıları sınırlı klinik çalışmalardan sonra birçok üretici tarafından DTaP aşısı olarak Japonya'da lisans almış ve 2 yaş üzeri çocuklarda uygulanmaya başlanmıştır (10). O yıllarda hücresiz aşının esas komponenti olması ve pek çok biyolojik aktiviteye sahip bulunması nedeniyle PT'nin toksisite ve koruyucu bağışıklık etkisi arasındaki ilişkinin anlaşılması üzerine pek çok yayın yapılmıştır. Bu alışmalarda, PtxS1 alt birimi üzerinde koruyucu epitoplara belirlenmekle beraber subunit veya bunların kombinasyonlarının tam PT molekülü ile aynı yüksek koruyucu aktiviteyi göstermediği belirlenmiştir (14-16). 1986'da PT geni klonlanmış ve tanımlanmıştır (17,18). PT geni manipulasyonu ile toksik olmayan ancak immunojenik mutant PT proteinleri, genetik detoksifiye PT, elde edilerek hücresiz aşılar için önerilmiştir. Bunlardan bir tanesi, PT-9K/129G, hücresiz aşı üretimi için başarılı bulunmuş ve bu genetik detoksifiye protein ticari hücresiz boğmaca aşılarından birinde kullanılmaya başlanmıştır(19,20). Bu dönemde diğer *B. pertussis* antijen veya virulans faktörleri üzerine olan bilgiler de artmış, FHA, adenilat siklaz, pertactin, fimbria ve trakeal sitotoksin gibi komponentlerin izolasyonu, koruyucu etkileri araştırılmıştır(21- 26).

Hücresiz aşının insanda ilk denenmesinin Japonya'da gerçekleşmesinden sonra bir Japon reticisinin sadece PT(78 ug/doz) ve PT ile FHA (47 ve 93 ug/doz) içeren iki çeşit aşısı İsveç'de 1419 ve 1428 yeni doğanda iki doz uygulanarak test edilmiştir. 954 çocuğa da placebo(aşı solventi) uygulanmıştır. Aşılamayı takip eden aylarda kültür pozitif boğmaca hastalığı görülmesi durumuna göre aşıların koruyuculuğu %80 olarak belirlenmiş (27), uzun dönemde ise iki komponentli aşıların daha iyi koruma sağladığı bildirilmiştir (28). İsveç uygulamasında tam hücre aşısı yer almadıysa da sonuçlar hücresiz boğmaca aşılarının çocukları boğmacadan koruyabileceğini göstermiştir.

Hücresiz boğmaca aşısının kompozisyonuna daha sonra bazı üreticiler tarafından PTd (pertussis toksoid) ve FHA komponentlerine ilave olarak pertactin (69 kDa protein, PN) ve fimbria 2,3 proteinleri de dahil edilmiştir. Böylece hücresiz boğmaca aşıları bir, iki, üç veya beş komponentli (PT, PT/FHA, PT/FHA/PN, PT/FHA/PN/Fim2,3) olarak hazırlanmaya başlanmıştır. Bu tip aşıların yapılan bir çalışmada, ABD'de tam hücre lisanslı DTwP aşısı ile 13 hücresiz DTaP aşısı 2 binden fazla yeni doğanda karşılaştırılmış, reaksiyon yönünden hücresiz (aP) aşılarının tamamının tam hücre (wP) aşılarına göre daha az yan etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Bununla beraber, 2, 4 ve 6.

aylarda aşı uygulanan bebeklerin 1942'sinden aşı öncesi ve 3. uygulamadan 1 ay sonra alınan serum örneklerinde yapılan anti-PT, anti-FHA ve anti-PN antikor analizinde, aşılar arasında aşılama sonrası antikor titreleri yönünden belirgin farklılıklar gözlenmiştir. Her antijenin değerlendirilmesinde aşının içerdiği antijen miktarı ile antikor seviyesi arasında bazılarında zayıf korelasyon (örn. PT) ve bazılarında (örn. Fimbria) ise yakın korelasyon belirlenmiş, fakat genel olarak aP aşısının ölçülen antikorlar bakımından wP aşısından iyi olduğu ileri sürülmüştür (29,30). Bununla beraber aile içi çalışmalarda pertaktin ve fimbriya preexposure/antikor seviyelerinin tipik ve hafif boğmacaya karşı korunma ile ve anti-PT'nin sadece tipik boğmacaya karşı korunma ile ilişkisi olduğu belirtilmiştir. Anti-fimbriya, anti-pertaktin ve anti-PT'nin, aşı sonrası yanıtının korunma göstergesi olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (31). Bunun yanında klinik uygulamalarda çok komponentli pertussis aşılarının bir veya iki komponentli aşılarından tipik veya orta şiddette hastalığa karşı daha etkili olduğu belirtilerek (32), pertactin ve fimbria içeren aşılardan daha etkin olduğu bildirilmiştir (33). DTaP ve DTwP aşılarının yeni doğanlardaki etkinliği 6 yıl sonra hastalık geçirme durumuna göre değerlendirildiğinde ise iki aşının da sırası ile %89-92 etkin görüldüğü ileri sürülmüştür (34).

Bu çalışmalarla ABD, İsveç ve İtalya gibi ülkeler hücresiz boğmaca aşısı ile ilgilendiler. FDA 1992'de acellular pertussis (aP) aşısına tekrar (booster) uygulamada, 4. ve 5. dozlarda, 1996'da ise primer bağışıklamada yeni doğanlarda uygulanmasına onay vermiştir (35-37). 1990'lı yıllar boyunca ve hala günümüzde hücresiz aşılardan komponent kombinasyonları ve diğer aşılardan olan kombinasyon çalışmaları devam etmektedir. B. pertussis'in antijenlerinin tanımlanması ve saflaştırılması çabaları 20 yılı aşkın bir zamanda gerçekleşmiş ve bu komponentler çeşitli kompozisyonda hücresiz boğmaca aşılarını oluşturmuşlardır. B. pertussis bakterisinin kültür çalışmalarında son derece nazlı ve zor bir mikroorganizma olması yanında hücresiz aşı komponentlerinin elde edilmesinin de zor ve sofistike yöntemlere gereksinim göstermesi bu aşı teknolojisinin değerini arttırmıştır. Bu nedenle hücresiz boğmaca aşısı mevcut kombine aşılardan en pahalı komponentlerden biri olmuştur.

Hastalığın Yeniden Gündeme Gelişi

Son yıllarda boğmaca epidemilerinin aşı uygulama oranının yüksek olduğu gelişmiş ülkelerde görülmesi ilgi çekici olmuştur. ABD'de 1980'lerden bu yana yeni doğanlarda ve çocuklarda artan bağışıklama oranına rağmen adolesan ve erişkinlerde boğmaca hastalığının arttığı, bununla beraber yeni doğanlarda 1980'lere kıyasla 1990'larda boğmacanın %49 oranında fazlaştığı bildirilmektedir (100 000 yeni doğanda 34.2 vakadan 51.1 vakaya yükseldi). Boğmaca hastalığındaki artışın esas olarak 4 ay ve daha küçük bebeklerde olduğu ve bu nedenle de morbidite ve mortaliteyi önlemek için stratejilere ihtiyaç duyulduğu ileri sürülmüştür (38). 1997-2000 yıllarının değerlendirilmesinde de pertussis insidansının yeni doğanlarda, 3 doz aşı almış küçük çocuklar, adolesanlar ve erişkinlerde artmaya devam ettiği (39), ve bazı topluluklarda erişkinlerde boğmaca salgınının %10 gibi önemli oranlarda gözlemlendiği görülmüştür (40).

1997-2000 döneminde ABD'de toplam 29134 pertussis vakası bildirilmiştir. Boğmaca görülme sıklığı 100 000 popülasyonda 2.7/yıl olarak belirlenmiş ve bu vakaların %29'unun <1 yaş, %12'sinin 1-4 yaş, %10'unun 5-9 yaş, **%29'unun 10-19 yaş ve %20'sinin >20 yaş** olduğu bildirilmiştir. Boğmaca hastaları arasında en çok hastane tedavisi alan (%63), komplikasyon (%12 pneumonia) ve ölüm görülen grup ise < 6ay grubu olarak belirlenmiş, bütün yaş grupları arasında 26

encephalopathy ve 62 ölüm rapor edilmiştir. 1998-1999'da hastaların %58'inin ise >3 doz DTaP, DTwP veya DT ile aşılandığı belirtilmiştir (39). 2002'de ABD'de bir rafineride üç ay içinde 150 çalışan arasında 24 boğmaca vakası (21'i >20 yaş) tesbit edilmiştir. Bu olaylar nedeniyle, boğmaca hastalığının erişkinlerdeki tanısı ve erişkinlerin korunmasındaki stratejinin geliştirilmesi ihtiyacına işaret edilmiştir (41). Benzer şekilde 1993'de de açıklanamayan öksürüğü olan erişkinler arasında yapılan serolojik değerlendirmede, vakalar %26 oranında pertussis olarak kaydedilmişti. Bu tip hastalarda boğmacanın dikkate alınması gerekliliği ve yeni hücreşiz aşının gelecekte erişkinlerde kullanılmasının enfeksiyonun kontrolü için önemli olduğu bildirilmiştir (42).

Avusturalya, Kanada, Hollanda gibi bazı ülkelerde de boğmaca hastalığının yeniden önem kazanması durumu, öncelikle iki nedeni düşündürmüştür; bunlardan birincisi aşılama oranlarının bildiriminin doğru olup olmadığı, diğeri ise aşlar arasında ki kalite farkı olmuştur. Bunun yanında Hollanda'da üçüncü bir hipotez gündeme getirilmiştir ki, bu da B. pertussis bakterisinin zaman içinde aşıya adapte olmasıdır. Boğmaca aşısının 40 seneden fazla süredir yüksek oranda uygulanmasına karşın Hollanda da B. pertussis'in evriminin aşıya bağlı bağışıklıkla etkilendiği ileri sürülmüş ve klinik izolatlarla aşı suşları arasında antijenik farklılıkların, özellikle pertaktin ve pertussis toksin gibi proteinlerde, görüldüğü bildirilmiştir (43). 1996'da Hollanda'da beklenmeyen pertussis salgınında her yaşta hastaların bulunduğu ve hastalar arasında aşılanmamışlara göre aşıları olanların daha fazla olduğunun belirtilmesi, sirküle eden B. pertussis bakterisi ile aşı suşunun uyuşmaması ihtimalini düşündürmüştür. Bu durumda polimorfik bir B. pertussis popülasyonu ile yüz yüze olunduğu ve bakterinin kendini aşılamaa adapte etmiş olabileceği ileri sürülmüştür (44,45). Aynı zamanda Hollanda'da 1996-1997 epidemisi ile ilgili olarak yapılan analizlerde aşılama sonrasında zaman içinde oluşan korunmadaki düşüşün de patojendeki bir değişiklik nedeniyle olabileceği belirtilmiştir (46).

Kanada da 2000 senesinde çıkan epidemide yaş profilinde değişiklik görüldüğü bildirilerek, genç adolesan ve adolesanlarda boğmacanın çok daha fazla görüldüğü, yeni doğan ve okul öncesinde duyarlılığın az olduğu belirtilmiştir. Bu durumu açıklamak için ise, bağışıklama programındaki değişme (hücreşiz boğmaca aşısına geçiş), yaşla azalan bağışıklık ve laboratuvar metodlarındaki değişimin dikkate alındığı ileri sürülmüştür (47). Kanada da 7-57 gün süreyle öksürüğü olan 442 adolesan ve yetişkin hastada boğmaca yönünden yapılan araştırmalarda önemli oranda (%19.9) boğmaca teşhis edildiği gösterilmiştir (48).

1999'da Avusturalya'da küçük bir şehirde meydana gelen boğmaca salgınında vakaların 5 ay ile 67 yaş arasında görüldüğü ve vakaların % 41'inin 9-11 yaş arasında bulunduğu bildirilmiştir. Bağışıklama kayıtlarının bu bölgede %96 olmasına karşın, zamanla bağışıklığın azaldığı ve 10 yaş altında eksik bağışıklama olmamasının, vakaların teşhis ve tedavilerine başlamada geç kalınmamasının önemli olduğu belirtilmiştir (49).

Boğmacanın son yıllarda İsrail'de de erişkinlerde arttığı ve özellikle geçmişte aşılanmış erişkin ve adolesanların B. pertussis'in başlıca bulaşma kaynağı olduğu bildirilmiş, uzun süreli öksürüğü olan erişkinlerde boğmacanın dikkate alınması gerektiği ifade edilmiştir (50).

Bordetella pertussis Yapısal Genleri ve Polimorfizm

B. pertussis suşlarında çok önceden beri bilinen faz değişiklikleri ile ilgili olarak, Bordetella popülasyonundaki genetik çeşitlilik ve türler arasındaki ilişkiler 1985'lerden sonra moleküler olarak araştırılmaya başlanmıştır (51-55). B. pertussis polimorfizmi bazı araştırmacılar tarafından belirlenmiş ancak bu durum ciddi olarak incelenememiştir. Bununla beraber, yüksek aşılama oranına rağmen 1980'lerden bu yana ABD, Fransa, Hollanda, Kanada, Avustralya gibi ülkelerde boğmaca insidansında artış ve zaman zaman ortaya çıkan epidemiler konunun güncelleşmesini sağlamıştır. Khattak ve Matthews'ın (1993) (54) pulsed-field jel elektroforez (PFGE) kullanarak klinik izolatlar ile fare-virulan challenge suşları arasında farklılıklar olduğunu belirterek, aşılama fare modelinde yapılan test değerlendirmesinde kullanılan challenge suşlarının uygunluğu üzerine şüphe ileri sürmeleri ve daha sonra Hollanda'da aşılama öncesi döneme ait izolatlar ile güncel izolatlar arasında bazı virulans faktörlerine ait gen yapılarında görülen farklılıklar, bazı B. pertussis suşlarının aşılara olan adaptasyonunu düşündürmüştür (55-57).

B. pertussis'in virulans faktörleri arasında adhesin'ler önemli bir yer tutar. Bu moleküller şunlardır: Filamentous hemagglutinin (FHA), fimbriae (Fim), pertactin (Prn), tracheal colonization factor (TcfA), ve BrkA (Bordetella resistance to killing). Diğer virulans faktörleri ise toksinlerdir: Pertussis toxin (PT, Ptx), adenylate cyclase toxin (CyaA, AC), dermonecrotic toxin (Dnt), tracheal cytotoxin. Ayrıca tip III sekresyon sistemi yoluyla salınan ve bsc lokusu tarafından kodlanan proteinler bulunmaktadır. Tracheal cytotoxin hariç tüm bu faktörler BvgAS sensory transduction sistemleri tarafından pozitif olarak regüle edilmektedir. Bordetella virulans geni (bvg) lokusun transkripsiyonunun kontrolü 350 baz çiftlik bir DNA fragmenti ile olmakta ve beş promotor içermektedir. Virulans gen ürünlerinden pertussis toksin (Ptx) B. pertussis'in en önemli komponentlerinin başında gelmektedir (16). Değişik araştırma grupları, çeşitli ülkelere ait klinik izolatlar ve aşı suşlarında virulans faktörlerinin genetik farklılıklar üzerine önemli çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Mooi ve ark.(1998) (57), Hollanda'da B. pertussis suşlarında yaptıkları gen dizi analizlerinde ptxs1 geni için üç allel buldular; s1A, s1B, s1D. Finlandiya klinik izolatları ve aşı suşlarında yaptıkları gen analizlerinde de prn ve ptx polimorfizmi göstermişlerdir (58). Benzer bir yapı gösteren her iki çalışma sonuçlarında, Hollanda ve Finlandiya aşı suşlarının aynı s1 ve prn allelleri (ör. s1B, s1D ve prn1) içerdiği belirlenmiştir. Ancak iki ülkede de klinik izolatlarda aşılamanın başlamasından sonra farklılık görüldüğü ve ptx ile prn varyantlarının 1990'lardan sonra arttığı bildirilmiştir. Finlandiya'da 1982-1990 da izole edilen tüm suşlarda aşı suşlarından farklı olarak, s1A aleli olarak tesbit edilmiştir. s1A alelinin sıklığı 1990'larda % 90-100 olmuştur. Enteresan bulgu, iki ülkenin B. pertussis popülasyonlarında 1990'larda görülen prn farklılığı olmuştur. prn4 aleli Hollanda'da gözlenmezken, prn2 ve prn3 sıklığı iki ülkede farklıydı: Hollanda'da % 36-51, Finlandiya'da % 72-12. İsveç'te ise Finlandiya'ya yakın bir değerde olduğu belirtilmiştir. Bununla beraber Finlandiya'da belirli bir boğmaca salgını görülmemiştir. Bu durum Fin aşısının antijenik varyasyona karşı koymak için yeterince potent olabileceği yönünde bir görüş ile açıklanılmaya çalışılmıştır. Hollanda'da boğmaca aşılmasının başladığı dönem öncesi ile aşılamanın başladığı ilk yıllarda (1953-1958) ptxS1 alellerinde önemli değişiklik olmamakla beraber, fimbriyal serotiplerin sıklığında değişme görülmüştür. 1965-1972 döneminde ise ptxS1 alellerinin sıklığında belirgin bir değişim gözlenmiştir. İzolatlarda ptxS1A aleli daha önce görülmezken bu dönemde % 71 sıklıkta bulunmuştur. Öte yandan fimbriyal serotip3 % 8 den % 92 ye yükselirken Fim3-ptxS1A kombinasyonu da % 89 oranında görülmüştür. Bu dönemde (1965-1972) mortalitenin aşılama öncesine göre 543 kat düşmesinin nedeninin, aşılamanın bu dönemde daha etkili olması ve bunun sonucu olarak B. pertussis popülasyonunda da büyük bir etki yapmış olabileceği şeklinde

belirtilmiştir. Aşılanmanın varyant suşların yayılması ve bu suşlar arasında yarışmacı dengeyi etkilediği, ancak *B. pertussis*'in toplam sirkülasyonunu azalttığı ileri sürülmüştür. Örneğin *ptxS1A* suşlarının, aşı suşlarının (*ptxS1B* ve *ptxS1D*) uyardığı bağışıklıktan daha az etkilenmiş olabilecekleri düşünülmüştür (59). Bununla beraber Hollanda'da 1990'larda boğmacada bir yükselme gözlemlendiği ve aynı zamanda potansiyel adaptif mutasyonların *ptxS1*, *tcfA* ve pertactin genlerinde görüldüğü bildirilmiştir (60). İzolatlardaki polimorfizm, bakteriyel patojenlerin moleküler epidemiyolojisini çalışmak için yeni bir yaklaşım olan çoklu lokus sekans tipleri (MLSTs) ile araştırılarak izolatları kategorize etmek için kullanılmıştır. Sonuç olarak, aşı suşları ile klinik izolatlar arasında sadece *ptx* ve *prn* için baz çifti uyumsuzluğu görülmüştür. Yüzeye bağlı proteinlerde de polimorfizm çalışılarak; *bipA*, *ompQ* ve *vag8* gibi genlerde sınırlı polimorfizm belirlenirken, dört ayrı *tcfA* aleli saptanmıştır. Bu çalışmada önceden gözlenen *ptxS1* ve *prn*'in polimorfik olduğu hususu teyit edilmiş ve S1 dışındakiler monomorfik görülerek, sadece *S3* geninde sessiz mutasyon belirlenmiştir. Ayrıca *fha* ve *fim2* genlerinde sessiz olmayan tek mutasyon gözlenirken *fim3* monomorfik olarak görülmüştür. Klinik izolatlarda yüzeye bağlı proteinlerde polimorfizmin azlığı veya olmayışının *prn*, *ptxS1* ve *tcfA*'da bulunan varyasyonun belirginliğini vurguladığı ileri sürüldü. Bu proteinlere ait polimorfik lokusun doğrudan immun sistem veya diğer hedef konaklar/reseptörler ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (61).

Amerika Birleşik Devletleri'nde de yüksek oranda aşıli olan bu toplumda 1980 ortalarından itibaren boğmaca artışı görülmesi ve 1990'ların ortalarında 10-19 yaşlarında bireylerde görülen boğmaca vaka sayılarındaki artış nedeniyle, 1935-1999 döneminde sirküle olan 1333 adet *B. pertussis* izolatının genetik alt tiplerinin belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır. İzolatların pulsed-field jel elektroforez analizlerinin *XbaI* enzimi kesimi ile gerçekleştirildiği bu çalışmada, güncel izolatlara ait pek çok PFGE profilinin homojen bir popülasyona işaret ettiği belirtilmiş, güncel izolatlarda genetik çeşitlilik en düşük olmasına rağmen elde edilen farklı profillerin oranı yüksek bulunmuştur (62, 63). Fransa'da 1991'den bu yana izole edilen *B. pertussis* suşlarının serotip, pulsed-field jel elektroforez, *ptS1* gen ve pertactin gen analizlerinde *B. pertussis* popülasyonunun evriminin devam ettiği ileri sürülmüştür (64). Buna karşılık Almanya'da 31 aşısız ve şiddetli boğmacalı çocukta izole edilen suşlar ile 32 orta semptomlu çocukta izole edilen suşların profillerini belirlemek için yapılan PFGE analizleri sonucunda suşlar arasında belirgin bir farklılık olmadığı bildirilmiştir (65). Varyant analizlerinde gen dizi çalışmalarının daha uygun olduğu özellikle not edilmiştir.

Oldukça ayrıntılı olarak gerçekleştirilen polimorfizm çalışmalarına karşın varyantlara yönelik nötralizasyon veya korumayı önleyecek bulgular gösterilememiştir. Örneğin üç komponentli hücresiz boğmaca aşısının, fare solunum modelinde S1 ve pertactin farklılığı bulunan klinik izolatlarla karşı oldukça etkili olduğu gözlenmiştir (66). Fransa'da 30 yılı aşkın bir süredir tam hücre aşı üretiminde kullanılan suşlar üzerinde yapılan çalışmada ise, bu suşlarda herhangi bir gen değişikliği, toksin ve adhesin ekspresyonunda değişiklik görülmediği ve sirküle eden suşlarda varyant bulunmasına karşın kullanılan aşının iyi koruma sağladığı ve epidemi görülmediği belirtilmiştir (67). Bir çalışmada da, pertussis toksin amino asit diziliminde meydana gelen değişikliklerin aşılama ile oluşan antikorların tanıma ve nötralize edici yeteneklerini değiştirmediği gösterilmiştir (68). Bu nedenlerle hastalığın yeniden gündeme gelmesinde veya daha derin olarak anlaşılmasında polimorfizmin henüz belirleyici bir etken olmadığı gözlenmektedir.

Genç ve Erişkinlerde Boğmaca Bağışıklığı

Hücre-siz boğmaca aşılarının etkinlik çalışmalarının değerlendirilmeleri bugün de devam etmekle beraber, boğmacaya karşı korunmada birinci derecede yeni doğanlara önem verilmesi uzun süre genç erişkinler ve erişkinlerde hastalığın farkına varılmamasına neden olmuştur. Ancak adolesan ve erişkinlerde boğmaca vakalarının tespiti yönünde gelişen laboratuvar teknikleri ve saha çalışmalarının sonuçları mevcut problemi daha açık olarak ortaya koymuştur. Özellikle gelişmiş ülkelerde genç ve erişkinlerin boğmaca bağışıklığı üzerine yapılan araştırmalarda, aşı uygulaması veya hastalık sonrasında boğmacaya karşı gelişen bağışık yanıtın zamanla azaldığı gözlenmiştir.

Erişkinlerde yapılan bir klinik çalışmada yetişkin tip dTpa (kombine yetişkin difteri-tetanoz-hücre-siz boğmaca) aşısının immünojenite değerlendirmesinde, aşı uygulamadan önce difteri antikorlarının %24.4, tetanoz antikorlarının %13.0 ve pertussis antijenleri PT, FHA, PN antikorlarının da %33.3 oranında seronegatif oldukları saptanmıştır. Aşılamadan bir ay sonra tüm bireylerin %93'ünden fazlasında koruyucu serum antikor seviyesi (≥ 0.1 IU/ml) ve üç pertussis antijenine karşı da %98'den fazla seropozitif antikor yanıtı olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada erişkinlerde DTP bağışıklığının zayıfladığı ve ek aşılamaya ile iyi düzeye geldiği gösterilmiştir (69). 1793 adolesan ve erişkinde aP aşı etkinliğini belirlemek için yapılan serolojik bir çalışmada, aşı öncesi kişilerin sadece %20, 68, 59 ve 39'unun sırası ile PT, FHA, PN, Fim 2,3 antikorlarına sınırda veya daha iyi düzeyde sahip olduğu gözlenmiştir (70). Bir başka aP değerlendirmesinde de adolesan ve erişkinler immunizasyon öncesi PT'de %19, FHA, PN ve fim2,3'de % 36-63 oranında sınırlar içinde antikor titresine sahip bulunmuş ve aşılamaya sonrası hepsinde önemli yükselme olmuş, 18 ay sonra ise antikor seviyelerinde gerileme görülmüştür. Elde edilen bulguların 2-9 yıl boyunca sınırın üzerinde antikor düzeyine sahip olunabileceğini gösterdiği ileri sürülmüştür (71). Boğmacalı erişkinlerde ve aP aşısı olan erişkinlerde 28 ay boyunca 6 ayda bir yapılan serolojik bir incelemede antikor yükselişinden sonra PT antikorlarında FHA, PN ve Fim2,3 antikorlarına göre daha fazla düşme olduğu ve enfeksiyonlularla aşıllılar arasında, aşıllılarda süre olarak daha kısa bir zamanda olmakla beraber, düşüş paterni yönünden belirgin bir fark bulunmadığı belirtilmiştir (72). 5 günden fazla süre öksürüğü olan Üniversite öğrencileri arasında da boğmaca insidansı karışık enfeksiyonlarla beraber önemli görülmüştür (73).

Buna karşın A.B.D de bir ilk okulda meydana gelen boğmaca salgınında yapılan araştırmada ise 3 doz altında boğmaca aşısı almanın büyük risk oluşturduğu ve aşılma serisinin tamamlanması ile ortalama %80 etkinlik sağlandığı bildirilerek, aşıli çocuklar arasında bağışıklık azalması görülmediği ve aşılamaya oranının yüksek tutulması gerekliliği ileri sürülmüştür (74). İspanya gibi yüksek bağışıklama oranına sahip başka bir ülkede de bazı duyarlı populasyon grupları bulunduğu ve bunların aşılama oranlarında eksiklik olduğu bildirilmiştir (75). Bu durum adolesan ve erişkinlerde görülen bağışıklık azalması veya eksikliğinin farklı nedenleri bulunabileceğini göstermektedir. Bunun yanında, bir çalışmada 65 yaş ve üzeri kişilerde 3 yıl boyunca yapılan serolojik bir takipte %19.7 oranında boğmaca enfeksiyonu gözlemlendiği ve semptomatik boğmacanın yaşlılarda da görülmesi nedeniyle aP aşısı uygulanmasının yaşlılar için uygun olacağı belirtilmiştir (76). Sonuç olarak bu çalışmalar toplumlarda genel olarak genç yaşlarda başlayarak boğmacaya karşı duyarlılığın önemli ölçüde arttığının belirlendiğini göstermektedir.

Aşılar tartışılmalı mı?

Oldukca yaygın aşı uygulamasına karşın boğmaca endemik bir hastalıktır. Çeşitli seroepidemiolojik çalışmalar göstermiştir ki, enfeksiyon sıklığı %1-4 boyutunda olabilmektedir. Bunun yanında ısrarcı öksürük hastalarının %30' unun B. pertussis ile enfekte olduğu ileri sürülmektedir (77). Bununla beraber, boğmaca hastalığına karşı toplumlar için tek korunma aracı olan aşılarla ilgili etkinlik değerlendirmeleri ve asgari kriterler ise üzerinde çok tartışılan konuların başında gelmektedir. Bugün boğmaca aşılarında hala tam bir standardizasyon ve test yöntemleri dahil pek çok hususta fikir birlikteliği bulunmamaktadır. Buna karşın B. pertussis bakterisini primer aşılar içinde üzerinde en fazla araştırma yapılan mikroorganizma olarak nitelemek mümkündür. Gerek hücre aşıları gerekse hücresiz aşıların özellikleri ve geçirdiği evreler sonucu elde edilen bilgi ve deneyimler ise boğmaca hastalığına karşı verilen mücadelenin sağlıklı yürütülmesi bakımından değerli ve ilginçtir.

Boğmacanın fakir ve gelişmekte olan ülkelerde bağışıklama oranlarındaki eksiklikler nedeniyle ciddi problem olmaya devam etmesi yanında, gelişmiş ülkelerde 1980'li yıllardan bu yana artan bağışıklama oranlarına rağmen zaman zaman epidemiler şeklinde yeniden önem kazanmasının nedenleri üzerine ciddi araştırmalar yapılmış ve çeşitli görüşler ileri sürülmüştür. Aşıların kalitesi yanında, B. pertussis'in evrimsel değişikliği ve aşı suşları ile klinik izolatlar arasında görülen polimorfizm, bağışıklığın zamanla zayıflaması, korunma ile humoral ve hücresele yanıt ilişkileri gibi konular literatürde tartışılmaktadır. Bunlardan evrimsel değişiklik olarak öne sürülen mutasyonlar çok iyi dokümanle edilmekle birlikte bu durumun B. pertussis immunojenitesinde değişiklik oluşturmadığı gözlenmektedir. Bütün bu araştırmalar ve tartışmalar ışığında öncelikle kullanılan aşıların standardize edilememesi ve aşılar arasındaki potens değişiklikleri durumu öncelikli olarak dikkate alınmalıdır. Birinci jenerasyon olarak kabul edilen tam hücre aşılarında kullanılan aşı suşlarının özellikleri ve üretim teknikleri aşıların etkinliği yönünden son derece önemlidir. Tam hücre boğmaca aşılarında faz 1 suşlarının (aglutinojen 1, 2, 3) kullanılması gerekli olmakla beraber (WHO teknik raporları 638, 800), faz 1 suşları arasında görülen farklılıklar da bağışık yanıt düzeyinde etkili olmaktadır. Örneğin faz 1 suşlarının önemli komponentleri fimbriya 2 ve 3 molekülleri bakterinin yüzey yapıları olarak kolonizasyonda çok önemlidir. Fimbriya alt birimlerinin suşlara göre sentez miktarı ve immünojeniteleri ise ciddi farklılıklar göstermektedir(yayınlanmamış bulgumuz). Bunun yanında tam hücre aşılarının kompozisyonunda proteinler, polisakaritler, lipidler ve nükleik asitler gibi pek çok molekül bulunmaktadır. Tam hücre aşılarıdaki bu komponentlerden bazıları virulans faktörleri olarak önemli ve antijenik olmakla beraber birçoğu da gereksiz ve toksiktir. Uygulamadaki mevcut tam hücre aşılarının değişen opasite unitesi (jerm miktarı) ve buna bağlı endotoksin miktarı ayrıca önemli bir lokal veya sistemik reaksiyon nedenidir. Aşı suşunun yeterince toksik olması ve aşı hazırlama tekniklerine göre değişen kalıntı pertussis toksin (PT) miktarları da aşıların bağışıklama gücünden sorumlu fakat aynı zamanda hücre aşılarının ciddi yan etkilerinin nedeni de olabilmektedir. Bu yönde yapılan deneylerde aktif pertussis toksinin farelerde anafilaktik sendrom uyarabildiği bildirilmiştir (78). Tam hücre aşılarının yan etkilerini azaltmak amacıyla İsveç'te 1970'lerde aşı kültürlerinde yapılan manipulasyonlar ise aşıların etkinliğini azaltmış ve 1979'da tam hücre aşısının uygulamadan kaldırıldığı fakat İsveç'te sonraki yıllarda boğmaca vakalarının çok ciddi boyutlara geldiği görülmektedir (79,80). Benzer şekilde İsveç ve İtalya'da yapılan karşılaştırmalı hücresiz ve hücreli aşı saha çalışmalarında ABD'de lisans almış tam hücre aşılarının çok az etkinlikte oldukları da görülmüştür (81-83). Kanada'da 1990 sonrasında

çocuk-adolesan-erişkin sırası ile artan vaka sayılarının nedeni ise 1985-1998 arasında kullanılan zayıf aşılarda etkisine bağlanmıştır (84). Bu gözlemler 50 yılı aşkın süredir kullanılan tam hücre aşılarda koruma gücü bakımından farklılıklar olabileceğini göstermektedir. Bunun yanında tam hücre aşı suşlarının hemen her ülkede 40-60 sene gibi oldukça eski izolatlar olma durumunu muhafaza etmesi de dikkate değer bir husustur.

Öte yandan 1981’de Japonya’da uygulamaya giren ikinci jenerasyon yeni hücresiz boğmaca aşlarıyla ilgili gelişmeler de o tarihten bu yana devam etmektedir. İlk hücresiz aşılarda yer alan komponentler PT ve FHA birlikte saflaştırılarak elde edilip aşılarda kullanılmıştır. Bu çalışmalarda hazırlanan pek çok pilot aşı zararsızlık ve koruyuculuk yönünden test edilip, kliniklerde yan etki ve antikor oluşumu incelenmiştir. Uygulamada aşının zararsızlığı ve koruyucu immunojenitesi çocuk hekimleri ve boğmaca aşısı çalışma grubundaki temel bilimciler tarafından teyit edilmiştir. Bununla beraber o dönemde esas koruyucu antijen veya antijenlerin hangisi olduğu, PT veya FHA, ve bu antijenlerin aşıda hangi oranda bulunması gerektiği soruları o zaman da çözülmemiştir. Farklı üreticiler farklı oranlar ve farklı detoksifikasyon yöntemleri kullanmaktaydılar. Daha sonra geliştirilen yöntemlerle PT ve FHA’nın ayrı ayrı purifikasyonu gerçekleştirilerek aşılarda kimyasal yapıları tam olarak belirlenmiş, fakat farklı üreticiler farklı yöntemlerle farklı kompozisyonda aşılarda üretmeye devam etmişlerdir. Deneysel çalışmalarda pertussis toksoidin hücresiz aşının esas komponenti olduğu ve FHA’nın fare korunma yönteminde aşı etkinliğine katkı verdiği belirlenmiştir. Ancak bu iki antijenin aşısındaki oranı konusunda net bir sonuca varılamamıştır (85). Hücresiz aşının uygulamaya girdiği dönemden bu yana *B. pertussis* ve hücresiz aşılarda en önemli komponentleri PT ve FHA’nın purifikasyon yöntemleri de sürekli gelişmiştir (86).

Hücresiz aşılarda kullanıma girmesi ile boğmaca aşılarda saha etkinlikleri ve boğmaca bağışıklığı üzerine çok fazla sayıda araştırma yapılmıştır. Hücre aşılarda olduğu gibi hücresiz aşılarda etkinlik değerlendirmelerinde de farklılıklar belirlenmiştir (32, 87). Boğmacanın sadece pertussis toksin (PT) hastalığı olduğunu öne süren görüş doğrultusunda, difteriden korunmada olduğu gibi, toksoid PT’nin de tek başına yeterli bir aşı olacağı ileri sürülmüştür. İsveç, Göteborg’da 1995-1999 arası 61,219 çocukta 3 doz PTd (pertussis toksoid) uygulaması ile *B. pertussis* izolasyonu ve hastane yatışının tüm yaş gruplarında belirgin derecede düştüğü ve bu düşüşün erişkin ve aşı olmayan yeni doğanlarda da görüldüğünü belirtilerek, PTd uygulamasının *B. pertussis*’in toplumda yayılmasını azalttığını gösterdiği ileri sürülmüştür (88). Boğmacaya karşı bağışıklama çalışmalarında PTd nin esas ve tek başına yeterli antijen olduğu (89) ve aşı sonrası anti-PT düzeyi ile korunma arasında çok belirgin ilişki olduğu belirtilmiştir (90). Buna karşın anti-pertussis (Pn, Fim2,3 ve PT) antikor seviyeleri ile klinik koruma arasında istatistiksel olarak belirgin ilişki olduğu ve bu antikorların çok komponentli hücresiz aşılarda ve tam hücre aşılarda için koruyucu marker olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (91). Oysa yüksek serum aglutinin titresi belirlenmesi ile hastalıktan korunma sağlandığı 50 sene önce gösterilmiş (3-5), ancak bu ilişkiye ait bilgi eksikliği bulunmaktaydı. Bununla beraber bazı tam hücre aşılarda, aglutinojen serotip 3 (Fim3) enfeksiyonuna karşı serotip 2 (Fim2) enfeksiyonundan daha az koruma sağladığı gözlenmiştir. Bu nedenle iyi koruma sağlamak için hücresiz aşılarda bu antijenleri içermeleri gerektiği belirtilmiştir (92). Purifiye Fim 2,3 moleküllerinin üç komponentli hücresiz aşıya ilave edilmesinin korumayı geliştirdiği ve özellikle orta şiddetteki hastalığa karşı başarıda da Fim 2,3’ün önemli olduğu gösterilmiş (32) ve günümüzde hücresiz aşılarda aglutinojen komponentlerin önemi belirtilerek, pertaktin ve fimbriya içeren aşılarda daha etkili olduğu ileri sürülmüştür (93).

Tüm bu gelişmeler sonucu hücre-siz boğmaca aşılarının kompozisyon farklılıkları yanında etki bakımından da farklılıklara sahip olduğu görülmektedir. A.B.D’ de ilk uygulamaya giren 4 hücre-siz boğmaca aşısından ikisinin zayıf etkiye sahip olduğu ve bu ülkede son on yıl da zayıf hücre veya hücre-siz aşılar kullanıldığı belirtilmiştir. Bugün 10 yaş üzerindeki vakaların hepsinin bağışıklık azalması sonucu meydana geldiği ileri sürülmektedir (83). Bu durumda toplum bağışıklamasında kullanılan aşılarının hücre veya hücre-siz olması tercihinden önce potent olduğundan emin olunması daha önemli bir husus olarak görülmektedir.

Yeni Strateji

Boğmacaya karşı koruyucu bağışıklığın azalması sonucu adolesan ve erişkinler arasında hastalığa karşı duyarlılığın artmakta olduğu özellikle gelişmiş ülkelerden yapılan yayınlardan anlaşılmaktadır. Hatta hastalık sonrası gelişen bağışıklığın bile uzun süre -hayat boyu- devam etmediği ileri sürülmektedir (1,77,83). Buna karşın bazı ülkelerde aşılarının iyi derecede potent olması nedeniyle salgın görülmediği de bildirilmektedir (58,67). Bununla beraber boğmacadan korunmada tek araç olan aşılar arasındaki farklılıklar ve ideal aşının nasıl olması gerektiği ise hala tartışılmaktadır. Ancak kapsamlı klinik çalışmalar göstermiştir ki her iki kategoriden, tam hücre boğmaca (wP) ve hücre-siz boğmaca (aP) aşılardan, en iyi aşılar %80’den daha fazla koruma sağlamaktadır (1). Bu durumda boğmaca hastalığına karşı mücadelede en önemli iki konu bulunduğu görülmektedir. Bunlardan birincisi; her yaşta hastalık yapan *B. pertussis*’e karşı oluşan bağışıklık durumunun değerlendirilme kriterlerinin iyi belirlenmesi ve böylece en iyi aşılarla sağlanan koruyucu bağışıklık sürelerinin daha net anlaşılmasıdır. İkinci konu ise aşılarının koruyucu güçlerini etkileyen faktörler üzerine daha fazla bilgi üretilmesi ve testlerin geliştirilmesidir.

Boğmaca bağışıklığının serolojik ilişkileri hala tam olarak gösterilememiş olmakla beraber, boğmaca geçiren (WHO kriterlerine göre: 21 günden fazla öksürük ve pozitif kültür) çocuklarda yapılan çalışmada anti-PT ve anti-FHA serum IgG antikorlarının anti-pertaktine göre daha belirgin olarak artış gösterdiği ve aşı-lı olmayan hasta çocuklarda bu antikorların teşhis için daha duyarlı olduğu gözlemlenmiştir (94). Bunun yanında anti-pertaktin, anti-fimbriya 2/3 ve anti-PT antikorlarının DTaP ve DTwP aşıları için koruma göstergesi olarak kullanılabileceği (95), fakat hücre-sel bağışık yanıtın da boğmaca bağışıklığında dikkate alınmasının gerekli olduğu görülmektedir. Bu yönde yapılan araştırmalarda hücre-sel bağışık yanıtın antikor azalmasına karşı çocuklarda daha uzun süre devam ettiği (96) ve bu yönde T-hücre ve IFN-gamma uyarı testlerinin aşılarının koruyucu bağışıklığının hayvan modelinde değerlendirilmesi amacı için kullanılabileceği, özellikle PT’ e karşı T-hücre yanıtının değerlendirilmesinin önemli olabileceği ileri sürülmüştür. Mevcut Avrupa Farmakope standartlarına göre tüm testlerden geçen hücre-siz aşı-larda bu yöndeki hayvan çalışmalarında farklılıklar bulunduğu gösterilmiştir (97). *B. pertussis*’ in organizmadan hızlı uzaklaştırılmasının, aşılama-yla uyarılan fonksiyonel IFN-gamma seviyesine bağlı olarak artan komplement bağlı-IgG2a antikorlarının yüksek seviyeleri ile olan ilgisi hayvan modelinde gösterilmiştir. Boğmacaya karşı optimal korunma için bağışık yanıtın hücre-sel ve humoral kollarının tamamlayıcı fonksiyona sahip olması (98), boğmaca bağışıklığının gerek hayvan modelinde gerekse insanda değerlendirilmesinde iki yanıtın birlikte düşünülmesi gerektiğini göstermektedir. Watanabe M ve ark.2002, (99) tarafından 6 hücre-siz aşı ile yapılan hayvan çalışmalarında, anti-FHA ve sonra anti-Fim antikor seviyelerinin tüm aşı-larda anti-PT ve anti-pertaktine (PN) göre daha yüksek olduğu

gözlenmiştir. Tam hücre aşılarında ise anti-Fim, anti-FHA ve anti-PN antikorlarının hemen hemen aynı seviyede meydana geldiği gösterilmiştir. Aynı zamanda bağışık hayvanların dalak hücrelerinin fimbriya uyarısından sonra en yüksek IFN-gamma sekresyonu gösterdiği ve PN uyarısına çok az veya hiç cevap vermediği bildirilmiştir. Bu ise koruyucu bağışık yanıtın değerlendirilmesinde fimbriya, FHA ve sonra diğer antijenlerin, humoral ve IFN-gamma düzeyini belirlemedeki rolünün sırası ile önemli olduğunu göstermektedir. Bununla beraber aşı formülasyonları ile bağışıklık düzeyi ve süresi ilişkisinin bu parametrelere göre belirlenmesi için yeterli saha çalışma sonuçlarının alınması gerekmektedir. Yine de anti-Fim, anti-FHA ile anti-PT titreleri bağışık yanıt düzeyini anlama amacına hizmet eden en önemli olgu olarak görülmektedir.

Aşıların koruyucu güçlerini etkileyen faktörlerin araştırılması ise potens değerlendirmelerinde ortak anlayışın sağlanabilmesi yönünden son derece önemlidir. Bazı komponentlerin sentez miktarı ve oluşturduğu antikor yanıtı bakımından aşı suşları arasında büyük farklar görülmesi aşılarda koruyucu gücünü etkilemektedir (yayınlanmamış bulgumuz). Mills ve ark.. (98) tarafından *Bordetella pertussis*'e karşı immunojenite mekanizmasının humoral ve hücrel yanıt olarak tek bir koruyucu antijene karşı olmadığı belirtilerek, korumanın immunolojik ilişkilerinin belirlenmesindeki başarısızlığın bu olguya bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Bizim humoral yanıt yönünden yaptığımız western-blot analiz çalışmaları da tam hücre aşısının farklı pek çok komponente karşı antikor yanıtı oluşturduğunu göstermiştir (yayınlanmamış bulgumuz). Saflaştırdığımız fimbriya moleküllerinin suşa göre çok büyük farklılıklar gösteren immünojenik özellikleri ise (yayınlanmamış bulgumuz) toplum bağışıklık düzeyini etkileyen önemli bir faktör olarak düşünülmektedir.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda görüldüğü gibi ciddi bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmekte olan boğmacada, gerek bağışıklık gerekse aşılarda düzeyinde tartışmalar sürmektedir. Adolesan ve erişkinlerde 1-2 hafta veya daha fazla öksürüğü olanların %12-36'sının *B. pertussis* ile infekte olduğunu gözlenmesi (48,77) ve çeşitli nedenlerle adolesan ve erişkinlerin yaygın olarak *B. pertussis* ile infekte olduklarının açık olarak belirlenmesi, bu kişilerin bebek infeksiyonlarının da başlıca kaynağı olduğuna işaret etmektedir. Boğmaca hastalığının oluşturduğu sağlık problemleri yanında bu hastalık ile ilişkilendirilen komplikasyonların bazıları da ciddi olabilmekte ve bu komplikasyonlar adolesan ve erişkinlerde de görülebilmektedir.

Bu durumda anahtar faktörün, aşılama veya enfeksiyon sonrası gelişen bağışıklığın bir süre sonra azalmasına izin vermeyecek yeni bir aşılama stratejisine gereksinim duyulması ve mevcut bağışıklama programlarının değiştirilerek kuvvetlendirilmesi olduğu kabul edilmektedir. Bu yönde çalışmalar yapmak üzere 2001'de kurulan ve uluslararası uzmanlar eşgüdümü olan Dünya Boğmaca Girişimi - the Global Pertussis Initiative – bağışıklama programlarını geliştirmek için stratejiler belirlemiştir. Boğmaca bağışıklığının zaman sınırı meselesi henüz çözümlenmemiş olarak devam etmekle beraber, tam hücre aşılarla (wP) sağlanan bağışıklığın 3-5 yıl sürdüğü ve aşılama 6-10 yıl sonra belirgin olarak düştüğü belirtilmektedir. Hücresiz boğmaca aşısına (aP) ait sınırlı veriler ise koruyucu bağışıklığın primer bağışıklamadan sonra 6 yıl veya fazla olduğu yönündedir. Bu nedenle yeni stratejide; adolesan ve erişkinlerin universal bağışıklaması yanında 4-6 yaşlarında okul öncesi aşılama, yeni anne ve ailenin bağışıklanması, sağlık çalışanlarının bağışıklanması, çocuk bakıcılarının bağışıklanması konuları yer almaktadır. Bu stratejinin başlıca hedefi de adolesan ve erişkin morbiditesini düşürmek, maternal immunitayı arttırmak ve yeni doğanlara bulaşmayı azaltmaktır (100). Stratejiye destek veren araştırmalarda; okul çocuklarının pertussis epidemilerinde önemli rol oynadıkları ve okul çocuklarına acellular pertussis aşısının uygulanmasının gerekliliği

belirtilmiştir (101). Polonya’da kullanılan aşılarda immunojenik yeterlilikte olmakla beraber koruyucu etkinin 10-13 yaşlarında düştüğü belirtilerek, beş yaş sonrasında çocukların tekrar dozuna ihtiyacı olduğu ileri sürülmüştür (102). 1994’de Kanada’da görülen boğmaca epidemisi sonrasındaki boğmacanın Kanada’da tekrardan halk sağlığı problemi olduğu belirtilerek tam hücre aşısının etkinliğinin doz ile oranlı olarak arttığı ve yaş uyumlu bağışıklamanın önemi bildirilmiştir (103). Hollandalı doktorlar hücresiz boğmaca aşısına 2005 yılında geçene kadar ailelerin çocuklarını eski aşı ile aşılatmaya devam etmeleri hususunda uyarıda bulunarak, 1996’dan bu yana sekiz aşısız çocuğun öldüğünü bildirmişler ve Hollanda’da 2004 senenin ilk altı ayında 1030 boğmaca vakasının rapor edilmesi nedeniyle 1996, 1999 ve 2001 epidemileri gibi bir epidemiden endişe edildiğini belirtmişlerdir (104). Fransa’da klasik boğmaca aşısının değerlendirilmesi yapılarak, Fransa’da primer seride tam hücre aşısına devam edilmesi ve 16-18’inci ayda birinci booster olarak hücresiz aşının kullanılabileceği ve 11-13 yaşta da hücresiz aşının uygulanması gerektiği bildirilmiştir (105).

Bugün pek çok ülkede okul öncesi boğmaca aşı tekrarı yapıldığı ve Almanya, Avustralya, Avusturya, Fransa, Kanada, İsviçre gibi ülkelerin adolesan boğmaca aşılama uyguladığı, yakın zamanda ise Avusturya ve Kanada’nın erişkinlerde rutin hücresiz boğmaca aşısını tavsiye ettiği görülmektedir (100). Düşük doz difteri ve tetanoz (dT) veya dT-inaktif polio aşısının (dT-IPV) erişkinlere her 10 senede uygulanması tavsiye edilen ülkelerde dTaP veya dTaP-IPV aşısına geçişin göreceli olarak kolay olacağı düşünülmektedir. Korunmanın ve maternal antikorların optimum seviyelerde sağlanabilmesi için de en yüksek oranda (>%85) aşılama uygulaması hedefinin tüm ülkeler için geçerli olduğu görülmektedir. Erişkin formülasyonlu dTaP ve aP aşılarının (beş komponentli) adolesan ve erişkinlerde güvenli ve immunojenik olduğu gösterilmekle beraber (106) adolesan ve erişkinler için pek çok ülkede lisans almış aşılarda daha fazla veriye gereksinim duyulmaktadır (100). Tüm bunlara ilave olarak boğmaca bağışıklamasının bulaşmayı ve hastalığın şiddetini etkili olarak azalttığı da bilinmektedir (107,108).

Sonuç olarak bugün boğmacaya karşı mücadelede daha bilinçli bir noktaya gelinmiş olmakla beraber daha çok bilgiye gereksinim olduğunu söylemek mümkündür. Bu mücadelede en önemli unsurun ise toplum bağışıklamasında kullanılan boğmaca aşılarının kalitesi ve aşı uygulama stratejilerinin iyi belirlenmesi olduğu görülmektedir. Bu unsurlar, yeni doğan bebekten yaşlı erişkinlere kadar hayati önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. www.who.int/vaccines-diseases/diseases/pertussisvaccine.shtml
2. **Willems RJL, Mooi FR** : From whole cell to acellular pertussis vaccines. Reviews in Medical Microbiology. 7: 13 (1996).
3. **Medical Research Council** : The prevention of Whooping – cough by vaccination. Br Med J I : 1463 (1951).
4. **Medical Research Council** : Vaccination against whooping cough. Relationship between protection in children and results of laboratory tests. Br Med J 2: 454 (1956).
5. **Medical Research Council** : Vaccination against whooping cough- final report. Br Med J I: 994 (1959).
6. **Mortimer EA, Jones PK** : An evaluation of pertussis vaccine. Rev Infect Dis 1: 927 (1979).

7. **Pitman M.** History of the development of pertussis vaccine. *Dev Biol Stand* 73: 13 (1991)
8. **Cody CL, Baraff LJ, Cherry JD, Marcy SM, Manclark CR :** The nature and rate of adverse reactions associated with DTP and DT immunization in infants and children. *Pediatrics* 68: 650 (1981).
9. **Long SS, DeForest A, Pennridge Pediatric Associates, Smith DG, Lazaro C, Wassilak SGF:** Longitudinal study of adverse reactions following diphtheria-tetanus-pertussis vaccine in infancy. *Pediatrics* 85: 294 (1990).
10. **Sato Y, Kimura M, Fukumi H:** Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet* 1(8369): 122 (1984)
11. **Noble GR, Bernier RH, Esber EC, et al. :** Acellular and whole-cell pertussis vaccines in Japan; report of a visit by US scientists. *JAMA* 257:1351 (1987).
12. **Kimura M, Kuno-Sakai H:** Developments in pertussis immunization in Japan. *Lancet* 336:30 (1990).
13. **Cherry JD, Brunell PA, Golden GS, Karzon DT:** Report of The Task Force on Pertussis and Pertussis Immunisation. *Pediatrics* 81;933 (1988).
14. **Sato H, Sato Y :** Bordetella pertussis infection in mice: correlation of specific antibodies against two antigens, pertussis toxin and filamentous hemagglutinin with mouse protectivity in intracerebral or aerosol challenge system. *Infect Immun* 46: 415 (1984).
15. **Sato H, Ito A, Chiba J, Sato Y :** Monoclonal antibody against pertussis toxin: Effect on toxin activity and pertussis infection. *Infect Immun* 46: 422 (1984).
16. **Sato H, Sato Y :** Protective antigens of Bordetella pertussis. Mouse protection test against intracerebral and aerosol challenge of *B. pertussis*. *Dev Biol Stand* 61: 461 (1984).
17. **Locht C, Keith JM :** Pertussis toxin gene: Nucleotide sequence and genetic organization. *Science* 232:1258 (1986).
18. **Nicosia A, Perugini M, Franzini C et al. :** Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: Operon structure and gene duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4631 (1986).
19. **Nencioni L, Pizza M, Bugnoli M et al. :** Characterization of genetically inactivated pertussis toxin mutants: Candidates for a new vaccine against whooping cough. *Infect Immun* 58: 1308 (1990).
20. **Podda A, De Luca EC, Titone L et al. :** Acellular pertussis vaccine composed of genetically inactivated pertussis toxin: Safety and immunogenicity in 12- to 24- and 2- to 4-month – old children. *J Pediatrics* 120(5): 680 (1992).
21. **Relman DA, Domenighini M, Tuomanen E, Rappuoli R, Falkow S :** Filamentous hemagglutinin of *B. pertussis*: Nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2637 (1989).
22. **Brennan MJ, Li ZM, Cowell JL, et al. :** Identification of a 69-kilodalton nonfimbrial protein as an agglutinin of Bordetella pertussis. *Infect Immun* 56:3189 (1989)
23. **Shahin RD. et al. :** Characterization of the protective capacity and immunogenicity of the 69-kd outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. *J Exp Med* 171: 63 (1990).
24. **Gusio N, Szatanik M, Rocancourt M :** Protective activity of Bordetella adenylate cyclase – hemolysis against bacterial colonization. *Microb Pathog* 11: 423 (1991).
25. **Tuomanen E, Weiss A :** Characterization of two adhesins of Bordetella pertussis for human ciliated respiratory – epithelial cells. *J Infect Dis* 152: 118 (1985).

26. **Zhang JM, Cowell JL, Steven AC, ManClark CR** : Purification of serotype 2 fimbria of *Bordetella pertussis* and their identification as a mouse protective antigen. *Dev Biol Stand* 61:173 (1985).
27. **Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines** : Placebo-controlled trial of two acellular pertussis vaccines in Sweden--protective efficacy and adverse events. *Lancet* 1(8592):955(1988).
28. **Storsaeter J, Olin P** : Relative efficacy of two acellular pertussis vaccines during three years of passive surveillance. *Vaccine* 10(3):142 (1992).
29. **Decker MD** : Edwards KM, Steinhoff MC, Rennels MB, Pichichero ME, Englund JA, Anderson EL, Deloria MA, Reed GF. Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: adverse reactions. *Pediatrics* 96:557 (1995).
30. **Edwards KM, Meade BD, Decker MD, Reed GF, Rennels MB, Steinhoff MC, Anderson EL, Englund JA, Pichichero ME, Deloria MA** : Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: overview and serologic response. *Pediatrics* 96:548 (1995).
31. **Olin P, Hallander HO, Gustafsson L, Reizenstein E, Storsaeter J** : How to make sense of pertussis immunogenicity data. *Clin Infect Dis* 33(4): S288 (2001).
32. **Olin P, Rasmussen F, Gustafsson L et al.** : Randomized controlled trial of two component, three component, and five component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. *Lancet* 350: 1569 (1997).
33. **Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, Stehr K** : A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine* 16(20):1901 (1998).
34. **Lugauer S, Heininger U, Cherry JD, Stehr K** : Long-term clinical effectiveness of an acellular pertussis component vaccine and a whole cell pertussis component vaccine. *Eur J Pediatr* 161(3):142(2002).
35. **Centers for Disease Control and Prevention** : Pertussis Vaccination: Acellular Pertussis Vaccine for Reinforcing and Booster Use -- Supplementary ACIP Statement Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee. *MMWR* 41(RR-1);1 (1992).
36. **Centers for Disease Control and Prevention** : Pertussis Vaccination: Acellular Pertussis Vaccine for the Fourth and Fifth Doses of the DTP Series; Update to Supplementary ACIP Stat Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR* 41(RR-15), (1992).
37. **Centers for Disease Control and Prevention** : Food and Drug Administration Approval of an Acellular Pertussis Vaccine for the Initial Four Doses of the Diphtheria, Tetanus, and Pertussis Vaccination Series. *MMWR* 45(31): 676 (1996).
38. **Tanaka M, Vitek CR, Pascual FB, Bisgard KM, Tate JE, Murphy TV** : Trends in pertussis among infants in the United States, 1980-1999. *JAMA* 290(22) : 2968 (2003)
39. **Centers for Disease Control and Prevention** : Pertussis - United States, 1997-2000. *MMWR* 51(04): 73 (2002).
40. **Centers for Disease Control and Prevention** : Pertussis outbreak among adults at oil refinery- Illinois, August-October 2002. *MMWR* 52(1):1 (2003).
41. **Centers for Disease Control and Prevention** : Pertussis outbreak among adults at an oil refinery- Illinois, August-October 2002. *MMWR* 52(1): 1-49 (2003).
42. **Rosenthal S, Strebel P, Cassiday P, Sanden G, Brusuelas K, Wharton M** : Pertussis infection among adults during the 1993 outbreak in Chicago. *J Infect Dis* 171(6):1650 (1995).

43. Mooi FR, Loo IHM, King A : Adaptation of *B. pertussis* to vaccination : A cause for its reemergence. *Emerg Infect Dis* 7(3): 526 (2001).
44. Boven M, Melker HE, Schellekens JF, Kretzschmar M : A model based evaluation of the 1996-7 pertussis epidemic in The Netherlands. *Epidemiol Infect* 127(1):73 (2001).
45. Melker HE, Schellekens JF, Neppelenbroek SE, Mooi FR, Rumke HC, Conynr, Spaendonck MA : Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of The Netherlands: observation on surveillance data. *Emerg Infect Dis* 6(4): 348 (2000).
46. van Boven M, de Melker HE, Schellekens JF, Kretzschmar M : Waning immunity and sub-clinical infection in an epidemic model: implications for pertussis in The Netherlands. *Math Biosci* 164(2): 161 (2000).
47. Skowronski DM, De Serres G, MacDonald D, Wu W, Shaw C, Macnabb J, Champagne S, Patric DM, Halperin SA : The changing age and seasonal profile of pertussis in Canada. *J Infect Dis* 185(10): 1448 (2002).
48. Senzilet LD, Halperin SA, Spika JS, Alagaratnam M, Morris A, Smith B : Sentinel Pertussis is a frequent cause of prolonged cough illness in adults and adolescents. *Clin Infect Dis* 32(12):1691 (2001).
49. Cordova SP, Gilles MT, Beers MY : The outbreak that had to happen : *Bordetella pertussis* in north-west Western Australia in 1999. *Commun Dis Intell* 24(12): 375 (2000).
50. Yaari E, Yafe-Zimmerman Y, Schwartz SB, Slater PE, Shvartzman P, Andoren N, Branski D, Kerem E : Clinical manifestations of *Bordetella pertussis* infection in immunized children and young adults. *Chest* 115(5):1254 (1999).
51. Goldman S, Hanski E, Fish F : Studies on phase variation in *Bordetella pertussis*. *Dev Biol Stand* 61:255 (1985).
52. Musser JM, Hewlett EL, Peppler MS, Selander RK : Genetic diversity and relationships in populations of *Bordetella* spp. *J Bacteriol* 166(1):230 (1986).
53. Parker CD, Branes LV, Armstrong SK, Frank DW, Cole A : Cell surface antigens of *Bordetella pertussis*. *Dev Biol Stand* 61:123 (1985).
54. Khattak MN, Matthews RC : A comparison of the DNA fragment patterns of the mouse-virulent challenge strains and clinical isolates of *Bordetella pertussis*. *J Infect.* 27(2):119 (1993).
55. de Melker HE, Conyn-van Spaendonck MA, Rumke HC, van Wijngaarden JK, Mooi FR, Schellekens JF : Pertussis in The Netherlands: an outbreak despite high levels of immunization with whole-cell vaccine. *Emerg Infect Dis* 3(2):175 (1997).
56. Mooi FR, van Loo IH, King AJ : Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: a cause for its reemergence ? *Emerg Infect Dis* 7(3 Suppl):526 (2001).
57. Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, van der Heide HG, Gaastra W, Willems RJ : Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect Immun* 66(2):670 (1998).
58. Mooi FR, He Q, van Oirschot H, Mertsola J : Variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertussis toxin and pertactin in vaccine strains and clinical isolates in Finland. *Infect Immun* 67(6):3133 (1999).
59. van Loo IH and Mooi FR : Changes in the Dutch *Bordetella pertussis* population in the first 20 years after the introduction of whole-cell vaccines. *Microbiology* 148: 2011 (2002).

60. **van Loo IH, van der Heide HG, Nagelkerke NJ, Verhoef J, Mooi FR** : Temporal trends in the population structure of *Bordetella pertussis* during 1949-1996 in a highly vaccinated population. *J Infect Dis* 179: 915 (1999).
61. **van Loo IH, Heuvelman KJ, King AJ, Mooi FR** : Multilocus sequence typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes. *J Clin Microbiol* 40(6):1994 (2002).
62. **Hardwick TH, Plikaytis B, Cassiday PK, Cage G, Peppler MS, Shea D, Boxrud D, Sanden GN** : Reproducibility of *Bordetella pertussis* genomic DNA fragments generated by XbaI restriction and resolved by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 40(3):811 (2002).
63. **Hardwick TH, Cassiday P, Weyant RS, Bisgard KM, Sanden GN** : Changes in predominance and diversity of genomic subtypes of *Bordetella pertussis* isolated in the United States, 1935 to 1999. *Emerg Infect Dis.* 8(1):44 (2002).
64. **Weber C, Boursaux-Eude C, Coralie G, Caro V, Guiso N** : Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years. *J Clin Microbiol.* 39(12):4396 (2001)
65. **Heininger U, Frei R, Cherry JD, Stehr K** : Comparison of pulsed field gel electrophoresis patterns of *Bordetella pertussis* isolates from unvaccinated children with severe or mild pertussis. *Pediatr Infect Dis J* 23(3): 211 (2004).
66. **Boursaux-Eude C, Thiberge S, Carletti G, Guiso N** : Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection: II. Sequence variation and protection induced by a tricomponent acellular vaccine. *Vaccine* 17(20-21):2651 (1999).
67. **Njamkepo E, Rimlinger F, Thiberge S, Guiso N** : Thirty-five years' experience with the whole-cell pertussis vaccine in France: vaccine strains analysis and immunogenicity. *Vaccine* 20(9-10):1290 (2002).
68. **Hausman SZ, Burns DL** : Use of pertussis toxin encoded by ptx genes from *Bordetella bronchiseptica* to model the effects of antigenic drift of pertussis toxin on antibody neutralization. *Infect Immun* 68(6):3763 (2000).
69. **Van Damme P, Burgess M** : Immunogenicity of a combined diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine in adults. *Vaccine* 22(3-4): 305 (2004).
70. **Cherry JD, Chang SJ, Klein D, et al.** : Prevalence of antibody to *Bordetella pertussis* antigens in serum specimens obtained from 1793 adolescents and adults. *Clin Infect Dis.* 39(11):1715 (2004).
71. **Le T, Cherry JD, Chang SJ, et al.** : Immune responses and antibody decay after immunization of adolescents and adults with an acellular pertussis vaccine:the APERT Study. *J Infect Dis* 190(3):535 (2004).
72. **Heininger U, Cherry JD, Stehr K** : Serologic response and antibody-titer decay in adults with pertussis. *Clin Infect Dis* 38(4):591 (2004).
73. **Jackson LA, Cherry JD, Wang SP, Grayston JT** : Frequency of serological evidence of *Bordetella* infections and mixed infections with other respiratory pathogens in university students with cough illnesses. *Clin Infect Dis.* 31(1):3 (2000).
74. **Khetsuriani N, Bisgard K, Prevots DR, Brennan M, Wharton M, Pandya S, Pop A, Flora K, Dameron G, Quinlisk P** : Pertussis outbreak in elementary school with high vaccination coverage. *Pediatr Infect Dis J* 20(12): 1108 (2001).

- 75. Segura del Puzo J, Sanz Moreno JC, Gascon Sancho MJ, Ramos Lledo E, de Ory Manchou F, Fernandez Diaz M :** Pertussis outbreak in a poorly immunized community. *Med Clin (Barc)*. 119(16): 601 (2002).
- 76. Hodder SL, Cherry JD, Mortimer Jr EA, et al. :** Antibody responses to Bordetella pertussis antigens and clinical correlations in elderly community residents. *Clin Infect Dis* 31(1):7 (2000).
- 77. Cherry JD :** Epidemiological, clinical, and laboratory aspects of pertussis in adults. *Clin Infect Dis* 28: S112 (1999).
- 78. Steinman L, Weiss A, Adelman N, et al. :** Pertussis toxin is required for pertussis vaccine encephalopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8733 (1985).
- 79. Romanus V, Jonsell R, Bergquist SO :** Pertussis in Sweden after the cessation of general immunization in 1979. *Pediatr Infect Dis J* 6(4):364 (1987).
- 80. Taranger J, Trollfors B, Bergfors E, Knutsson N, Lagergard T, Schneerson R, Robbins JB :** Immunologic and epidemiologic experience of vaccination with a monocomponent pertussis toxoid vaccine. *Pediatrics* 108(6): E115 (2001).
- 81. Gustafsson L, Hallander HO, Olin P, Reizenstein E, Storsaeter J :** 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 (1996).
- 82. Donato Greco, M.D., Stefania Salmaso, D.Biol. et al. :** A Controlled Trial of Two Acellular Vaccines and One Whole-Cell Vaccine against Pertussis. *N Engl J Med* 334:341 (1996).
- 83. Cherry JD :** The science and fiction of the "resurgence" of pertussis. *Pediatrics* 112(2): 405 (2003).
- 84. Ntezayabo B, De Serres G, Duval B :** Pertussis resurgence in Canada largely caused by a cohort effect. *Pediatr Infect Dis J* 22(1):22 (2003).
- 85. Sato Y, Sato H :** Development of Acellular Pertussis Vaccines. *Biologicals* 27: 61 (1999).
- 86. Özcengiz E, Kılınç K, Büyüktanır Ö, Günel A :** Rapid purification of pertussis toxin (PT) and filamentous hemagglutinin (FHA) by cation-exchange chromatography. *Vaccine* 22(11-12):1570(2004).
- 87. Taranger J, Trollfors B, Bergfors E, Knutsson N, Lagergard T, Schneerson R, Robbins JB :** Immunologic and epidemiologic experience of vaccination with a monocomponent pertussis toxoid vaccine. *Pediatrics* 108(6):E115 (2001).
- 88. Taranger J, Trollfors B, Bergfors E, et al. :** Mass vaccination of children with pertussis toxoid--decreased incidence in both vaccinated and nonvaccinated persons. *Clin Infect Dis* 33(7):1004 (2001).
- 89. Taranger J, Trollfors B, Bergfors E, et al. :** Immunologic and epidemiologic experience of vaccination with a monocomponent pertussis toxoid vaccine. *Pediatrics* 108(6):E115 (2001).
- 90. Taranger J, Trollfors B, Lagergard T, et al. :** Correlation between pertussis toxin IgG antibodies in postvaccination sera and subsequent protection against pertussis. *J Infect Dis* 181(3):1010 (2000).
- 91. Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P :** Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to Bordetella pertussis. *Vaccine* 16(20):1907 (1998).

92. **Miller E, Farrington CP** : The current epidemiology of pertussis in the developed world: UK and West Germany. *Tokai J Exp Clin Med* 13: 97 (1988).
93. **Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, Stehr K** : A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine* 16(20):1901 (1998).
94. **Trollfors B, Lagergard T, Gunnarsson E, Taranger J** : Determination of pertactin IgG antibodies for the diagnosis of pertussis. *Clin Microbiol Infect* 9(7):585 (2003).
95. **Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P** : Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 16(20):1907 (1998).
96. **Cassone A, Ausiello CM, Urbani F, Lande R, Giuliano M, La Sala A, Piscitelli A, Salmaso S** : Cell-mediated and antibody responses to *B. pertussis* antigens in children vaccinated with acellular or whole-cell pertussis vaccines. *Arch. Pediatr Adolesc Med* 151:283 (1997).
97. **Ausiello CM, Lande R, Stefanelli P, et al.** : T-cell immune response assessment as a complement to serology and intranasal protection assays in determining the protective immunity induced by acellular pertussis vaccines in mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(4) : 637 (2003).
98. **Mills KH, Ryan M, Ryan E, Mahon BP** : A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 66(2) : 594 (1998).
99. **Watanabe M, Komatsu E, Sato T, Nagai M** : Evaluation of efficacy in terms of antibody levels and cell-mediated immunity of acellular pertussis vaccines in a murine model of respiratory infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 33(3):219 (2002).
100. **Forsyth KD, Campins-Marti M, Caro J, Cherry JD, Greenberg D, Guiso N, Heininger U, Schellekens J, Tan T, von Konig CH, Plotkin S** : Global Pertussis Initiative. New pertussis vaccination strategies beyond infancy: recommendations by the global pertussis initiative *Clin Infect Dis* 15;39(12):1802 (2004).
101. **Brennan M, Strebel P, George H, et al.** : Evidence for transmission of pertussis in schools, Massachusetts, 1996: epidemiologic data supported by pulsed-field gel electrophoresis studies. *J Infect Dis* 181(1):210 (2000).
102. **Zielinski A, Czarkowski MP** : Studies of effectiveness of vaccination against pertussis during 1997-1998 outbreak in Poland. *Przegl Epidemiol* 55(1-2):207 (2001).
103. **Bentsi-Enchill AD, Halperin SA, Scott J, MacIsaac K, Duclos P** : Estimates of the effectiveness of a whole-cell pertussis vaccine from an outbreak in an immunized population. *Vaccine* 15(3):301 (1997).
104. **Sheldon T** : Dutch doctors warn parents over whooping cough vaccine. *BMJ* 329(7464): 476 (2004).
105. **Fletcher MA, Saliou P, Ethevenaus C, Plotkin SA** : The Efficacy of whole cell pertussis immunisation: collected data on vaccine produced in France. *Public Health* 115(2):119 (2001).
106. **Halperin SA, Smith B, Russell M et al.** : 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* 31;18(14):1312 (2000).
107. **Preziosi MP, Halloran ME** : Effects of pertussis vaccination on transmission: vaccine efficacy for infectiousness. *Vaccine* 21(17-18):1853 (2003).

108. Preziosi MP, Halloran ME : Effects of pertussis vaccination on disease: vaccine efficacy in reducing clinical severity. *Clin Infect Dis* 15;37(6):772 (2003).