

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

des Universitätsklinikum Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr.med. Klaus Pfeffer

**Surveillance der Effektivität der Pertussis-Impfung: Verwendung von
diagnostischen Routinedaten zur Überwachung von azellulären Impfstoffen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Julia Mohr

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ. Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr.med. Carl Heinz Wirsing von König

Zweitgutachter: Univ. Prof. Dr.med. Ertan Mayatepek

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht:

M Riffelmann , J Mohr, W Hellenbrand, C H Wirsing Von Koenig: Time since last vaccine dose in PCR-positive and PCR-negative children with suspected pertussis to monitor pertussis vaccine effectiveness, *Eur J ClinMicrobiol Infect Dis.* 2014;33:805-8.

doi: 10.1007/s10096-013-2016-4.

1.1.1 Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	5
1.2 Erkrankung, Pathogenese, Epidemiologie	5
1.3 Impfstoffe	7
2 Patienten und Methoden	15
2.1 Patienten:	15
2.1.1 Studienkohorte	15
2.1.2 Patienten mit negativer PCR als Vergleichsgruppe	15
2.2 Untersuchungsmaterial:	16
2.3 Methoden: Real-time PCR:	17
2.4 Durchführung der real-time PCR	19
2.5 Fragebogen zur Erfassung der Infektionswege:	19
2.6 Vergleich mit bekannten epidemiologischen Daten	20
2.7 Statistische Methoden	20
3 Ergebnisse	21
3.1 Patienten mit Nachweis von Bordetellen DNA	21
3.2 Zeitpunkt der letzten Pertussis-Impfung	24
3.3 Analyse der Infektionsquellen	28
3.4 Analyse von Infektionsketten (Kontaktpersonen)	28
3.5 Fälle mit <i>B. parapertussis</i> -DNA Nachweis	30
3.6 Einzel-Kasuistiken	30
3.7 Vergleichsgruppe von Patienten ohne Nachweis von <i>Bordetella</i> - DNA	31
4 Diskussion	35
5 Zusammenfassung	43
6 Literatur	45
7 Anhang:	48
8 Abbildungsverzeichnis	56
9 Tabellenverzeichnis	57
10 Abkürzungsverzeichnis	58

1 Einleitung

1.2 Erkrankung, Pathogenese, Epidemiologie

Die Pertussis scheint eine relativ „neue“ menschliche Erkrankung zu sein und wurde 1609 erstmals mit ihrer typischen Symptomatik von Guillaume de Baillou beschrieben. In Deutschland wurde Pertussis früher auch „Stickhusten“ genannt, die Bezeichnung Keuchhusten ist allgemein gebräuchlich. In den englisch-sprachigen Ländern wird die Erkrankung nach dem typischen Einziehen am Ende der Hustenanfälle als „whooping cough“ bezeichnet, in Frankreich nach der gleichen Symptomatik als „Coqueluche“ (Hahnenschrei). Pertussis kommt weltweit vor und ist nach Schätzungen der WHO vor allem besonders in den nicht industrialisierten Ländern jährlich für etwa 300.000 Todesfälle vor allem im Säuglings- und Kindesalter verantwortlich.

Der Erreger der Pertussis, *Bordetella pertussis* ist ein kleines, unbewegliches, bekapseltes, aerobes, gramnegatives Stäbchenbakterium, das viele Virulenzfaktoren wie Pertussis-Toxin (PT), filamentöses Hämagglutinin (FHA), Trachea-Zytotoxin (TCT), Pertactin (PRN), hitzelabiles Toxin und Adenylatzyklase-Toxin bildet. Auf der Oberfläche des Bakteriums befinden sich äußere Membranproteine und Fimbrien (Agglutinogene); die Zellwand enthält Lipooligosaccharide. PT als der wesentliche Virulenzfaktor ist nach einem sogenannten A-B-Modell bakterieller Toxine aus unterscheidbaren Untereinheiten (S1–S5) aufgebaut und besitzt enzymatische Aktivität einer alpha-Ribosyltransferase mit dem Substrat der G-Proteine. Die Erkrankung Pertussis wird nur durch *B. pertussis* und *B. parapertussis* hervorgerufen. Weitere Mitglieder des Genus *Bordetella* sind vor allem tierpathogen oder kommen in der Umwelt vor.

Die Bakterien werden durch Tröpfchen übertragen wobei die Infektionsdosis mit etwa 100 CFU recht gering ist. Sie haften zunächst im Nasopharynx, die Vermehrung von *B. pertussis* und *B. parapertussis* erfolgt dann auf dem zilienträgenden Epithel der tieferen Atemwegsschleimhäute. Gegen Pertussis Geimpfte können nach Keuchhustenkontakt bei einem Ausbruch vorübergehend Bordetellen ausscheiden, auch ohne selbst zu erkranken. Ein lang dauernder asymptomatischer Trägerstatus bei Gesunden ist bisher nicht dokumentiert worden. Eine Infektion mit *B. pertussis*

sichert nur für etwa 3,5–12 Jahre einen Schutz vor einer Reinfektion. Diese kann je nach Abstand zur Vorinfektion und möglicherweise abhängig von der Infektionsdosis als banaler Infekt der oberen Atemwege, als sehr lang dauernder quälender Husten, oder als „klassischer“ Keuchhusten mit allen Symptomen ablaufen.

Die „klassische“ Symptomatik des Keuchhustens wird in drei Abschnitte unterteilt:

Das „Stadium catarrhale“ beginnt mit allgemeinen Symptomen einer Infektion der oberen Atemwege, wie Rhinorrhoe, aber meist ohne Fieber. In diesem Stadium ist die Ansteckungsfähigkeit besonders groß (Dauer ca. 1 bis 2 Wochen)

Im zweiten „Stadium convulsivum“ wird das Vollbild des Keuchhustens mit paroxysmalen, evtl. mehrfach aufeinander folgenden, stakkatoartigen Hustenattacken (besonders nachts), inspiratorischem Einziehen am Ende der Attacken, und Würgen und Erbrechen beobachtet. Petechien, Konjunktivalblutungen und Zungenbandgeschwüre können auftreten (Dauer im Mittel 3-6 Wochen, gelegentlich auch länger).

Im dritten „Stadium decrementi“ nimmt die Intensität und Frequenz der Hustenattacken langsam ab (Dauer im Mittel 2-6 Wochen, bis zu 10 Wochen möglich).

In einer weitgehend geimpften Bevölkerung wird dieses Vollbild der Erkrankung vor allem bei Ungeimpften, mitunter aber auch bei etwas älteren geimpften Kindern beobachtet.

Bei Neugeborenen und jungen Säuglingen fehlen je nach Alter mitunter die typischen Hustenattacken, unspezifische respiratorische Symptome und vor allem Apnoen sind dagegen häufig. In dieser Patientengruppe sind schwere Komplikationen wie Apnoen, Enzephalopathien und Pneumonien am häufigsten. Bei unter 6 Monate alten stationär behandelten Säuglingen wurde in 75 % eine Pneumonie, in 25 % eine beatmungspflichtige Apnoe, in 14 % Krampfanfälle und in 5 % eine Enzephalopathie diagnostiziert. Pro Jahr werden in Deutschland etwa 1–2 Todesfälle gemeldet, die vor allem Säuglinge betreffen. Aufgrund von Untersuchungen aus dem Vereinten Königreich ist von einer erheblichen Dunkelziffer mit einer größeren Zahl von Todesfällen auszugehen.

Von den Jugendlichen und Erwachsenen, die länger als eine Woche husten, leiden etwa 10%-20% an Pertussis. Das primäre Symptom ist lang anhaltender Husten, in 70–90 % anfallsartig auftretend. Die mittlere Hustendauer beträgt 36–48 Tage. Bei einem Viertel der Erkrankten, bei > 60-Jährigen über 40 %, führt Pertussis zu Komplikationen: Gewichtsverlust, Krampfanfälle, Synkopen, Pneumonie (ca. 10 %), Otitis media, Inkontinenz, Pneumothorax, Rippenbrüche und Leistenhernien.

Weltweit wird die Zahl der Pertussis-Fälle mit etwa 16 Millionen pro Jahr geschätzt, wobei 195.000 Todesfälle auftreten (<http://www.cdc.gov/pertussis/countries.html>). In Deutschland gibt es Meldedaten ausschließlich aus den neuen Bundesländern, wo die Meldungen an Keuchhusten in den letzten Jahren zwischen 10 und 40 pro 100.000 Bevölkerung schwankten [9].

1.3 Impfstoffe

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden die ersten Keuchhusten-Impfstoffe erprobt. Ein aus abgetöteten Bakterienzellen aus Flüssigkulturen hergestellter Impfstoff wurde in den 40er- und 50er-Jahren des vorigen Jahrhunderts entwickelt und ist mit geringen Modifikationen in vielen Ländern nach wie vor in Gebrauch. Aufgrund der lokalen und systemischen Nebenwirkungen dieser sogenannten „Ganzzell-Impfstoffe“ begann man in den 70er- und 80er-Jahren sogenannte „azelluläre“ Pertussis-Impfstoffe zu entwickeln, die seit den 90er-Jahren in vielen Ländern empfohlen werden [1,2].

Azelluläre Pertussis-Impfstoffe werden aus gereinigten Proteinantigenen eines bestimmten Stammes von *Bordetella pertussis* (Stamm Tohama) hergestellt. Die Bakterien werden in Flüssigkultur angezüchtet, die für die Impfstoffe verwendeten Antigene werden aus dem Überstand der Kultur gewonnen bzw. aus Bakterienlysaten gereinigt. Mittels verschiedener Reinigungsverfahren (meist Chromatographie) werden die Antigene in weitgehend reiner Form dargestellt. Für die industrielle Produktion können die Virulenzfaktoren Pertussis Toxin (PT), Filamenthämagglutinin (FHA), Pertactin (PRN) und eine Mischung aus den Fimbrientypen (FIM) 2 und 3 produziert werden. Zur Inaktivierung der enzymatischen Aktivität des PT und zur Stabilisierung von FHA werden die Produkte mit

Glutaraldehyd oder Formaldehyd behandelt. Eine Inaktivierung der Enzymaktivität des PT ist auch durch molekularbiologische Verfahren möglich [1].

Die in Deutschland zugelassenen und vertriebenen azellulären Pertussis-Impfstoffe aP (aP=“acellular Pertussis“) enthalten alle PT, FHA und PRN, manche noch FIM 2/3. Die Antigene werden zusammen mit Diphtherie-Toxoid und Tetanus-Toxoid an Aluminiumsalze adsorbiert.

Eine Zusammenstellung der in Deutschland zugelassenen Pertussis-Impfstoffe gibt Tabelle 1 wieder.

Infanrix GSK	Ab dem 2. Lebensmonat	25 µg FHA 25 µg PT 8 µg PRN
Pentavac SPMSD	Ab dem 2. Lebensmonat	25 µg FHA 25 µg PT

Tabelle 1: Zusammensetzung der Pertussis-Komponenten der in Deutschland zugelassenen Pertussis-Impfstoffe für die Grundimmunisierung von Säuglingen und für die Booster-Impfung im 2. Lebensjahr.

Daneben ist es mit den aP-Impfstoffen möglich geworden, auch ältere Kinder, Jugendliche und Erwachsene zu impfen, was mit den Ganzzellimpfstoffen wegen der erheblichen Rate an lokalen Nebenwirkungen nicht möglich war. Diese zur Auffrischimpfung ab der Kindheit zugelassenen Impfstoffe enthalten deutlich weniger Proteinantigene, was sowohl die Pertussis-Komponenten wie auch die Tetanus-Diphtherie und ggf. IPV-Komponenten betrifft [2].

Eine Übersicht über die Zusammensetzung der in Deutschland zugelassenen Auffrischimpfstoffe gibt Tabelle 2 wieder.

Boostrix (+ Polio) GSK	Ab 4 Jahre	8 µg PT 8 µg FHA 2,5 µg PRN	2 IE	20 IE
Covaxis SPMSD	Ab 4 Jahre	2,5 µg PT 5 µg FHA 3 µg PRN 5 µg FIM	2 IE	20 IE
Repevax SPMSD (+ Polio)	Ab 3 Jahre	2,5 µg PT 5 µg FHA 3 µg PRN 5 µg FIM	2 IE	20 IE

Tabelle 2: Auffrischimpfstoffe mit Pertussis-Komponenten

Es ist in Deutschland kein Mono-Impfstoff gegen Pertussis verfügbar.

Die Grundimmunisierung wird von der STIKO (www.rki.de/STIKO;
aktuelle Empfehlung:

http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2013/Ausgaben/34_13.pdf?__blob=publicationFile) ab dem vollendeten 2., 3., und 4. Lebensmonat mit drei Impfdosen empfohlen. Der durch diese Grundimmunisierung aufgebaute Schutz soll durch die im 2. Lebensjahr (14.-17. Monat) empfohlene Auffrischung verstärkt werden.

Für die Impfungen stehen die oben aufgeführten Kombination DTaP zur Verfügung sowie weiteren Kombinationsimpfstoffe, bei denen DTaP mit inaktivierten Polioviren

(IPV), dem Polyribositolphosphat von *Haemophilus influenzae* Typ b (Hib) und mit Hepatitis-B-Antigen (HBV) zu 4-, 5- und 6-fach-Impfstoffen kombiniert wird.

Auffrischimpfungen im und jenseits des Vorschulalters werden ebenfalls mit Kombinationsimpfstoffen durchgeführt: Tdap und TdapIPV, wobei wie in Tabelle 2 gezeigt, die Antigendosis in den Kombinationsimpfstoffen variiert, je nachdem ob sie zur Grundimmunisierung mit höherem Antigengehalt oder zur Auffrischimpfung mit reduziertem Antigengehalt vorgesehen sind.

Die weiteren von der STIKO empfohlenen Impfungen mit Pertussis-Komponenten sollen im Vorschulalter (4 - 6 Jahre), in der Adoleszenz (9 -17 Jahre) und bei Erwachsenen durchgeführt werden, wobei für Erwachsene derzeit nur eine einmalige Auffrischung empfohlen wird.

Die in Deutschland zugelassenen Impfstoffe haben ihre Wirksamkeit in einer Reihe von randomisierten kontrollierten Studien für Säuglinge [1] und in einer Studie für Jugendliche und Erwachsene [2] nachgewiesen. So führten Ward et al [2] eine multizentrische, randomisierte, doppelblinde Studie bei einem Kollektiv im Alter von 15 bis 65 Jahren durch, bei der entweder eine Dosis azellulärer Pertussis-Impfstoff oder in der Kontrollgruppe eine Dosis Hepatitis A-Impfstoff verimpft wurden. Es konnte gezeigt werden, dass der Pertussis-Impfstoff sicher war und mit einem so genannten „point-estimate“ zur Wirksamkeit von 0.93 einen Schutz unter Jugendlichen und Erwachsenen bot [2].

Obwohl die verschiedenen Studien untereinander nur eingeschränkt vergleichbar sind, kann für azelluläre Impfstoffe von einer Effektivität von etwa 85–90 % ausgegangen werden[1]. Deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Impfstoffen mit unterschiedlicher Zusammensetzung konnten bisher nicht beobachtet werden, obwohl in einer Studie in Schweden ein nicht vermarkteter Impfstoff mit zwei Komponenten (PT und FHA) eine deutlich geringere Wirksamkeit als ein parallel untersuchter Impfstoff mit fünf Komponenten aufwies (PT, FHA, PRN, FIM) [1]. Außerhalb von kontrollierten Studien haben jedoch alle zugelassenen Impfstoffe zeigen können, dass durch sie die Erkrankung effektiv kontrolliert wurde.

Die Schutzdauer der azellulären Impfstoffe wurde in mehreren Studien untersucht, die meist in Zusammenhang mit den Wirksamkeitsstudien durchgeführt wurden. Eine Zusammenfassung dieser verschiedenen Studien ist in Tabelle 3 [adaptiert aus 3] dargestellt.

Autor	Jahr	Impfstofftyp	Teilnehmer (n)	Datengewinnung	Follow-up Zeitraum	Unveränderte Schutzwirkung	Land der Studien
Simondon et al [4]	1997	PT, FHA	4181	Fall-Kontroll Studien in einer RCT	Bis zu 4,25 Jahren	Schutz nach Ganzzellimpfung länger als nach azellulärem Impfstoff	Senegal
Tindberg et al [5]	1999	PT, FHA	207	Follow-up einer Impfeffektivitätsstudie	10 Jahre	5.5	Schweden
Salmaso et al [6]	2001	PT, FHA, PRN	8432	Impfeffektivitätsstudie	3 Jahre	6	Italien
Lugauer et al [7]	2002	PT, FHA	10271	Kohortenstudie	6 Jahre	6	Deutschland
Gustaffson et al [8]	2006	PT, FHA, PRN bzw. PT, FHA, PRN, FIM	Surveillance	Aktive Surveillance	9-10 Jahre	6	Schweden

Tabelle 3: Studien zur gleichbleibenden Schutzwirkung von azellulären Pertussis-Impfstoffen (modifiziert nach Wendelboe et al., 2005 [3])

In Deutschland wurde zwar eine der oben beschriebenen Studien [7] durchgeführt, jedoch konnten hier neben den oben beschrieben aufwändigen kontrollierten Studien bzw. aktiven Surveillance Programmen auch die Meldedaten aus den neuen Bundesländern ausgewertet werden, da der Freistaat Sachsen bereits 1998 eine Impfung im Vorschulalter empfohlen hatte, die anderen neuen Bundesländer diesem Beispiel aber nicht gefolgt waren.

Abbildung 1 gibt die Ergebnisse der Meldedaten aus den neuen Bundesländern wieder [aus [9]: Hellenbrand et al., BMC InfectiousDiseases, 2009].

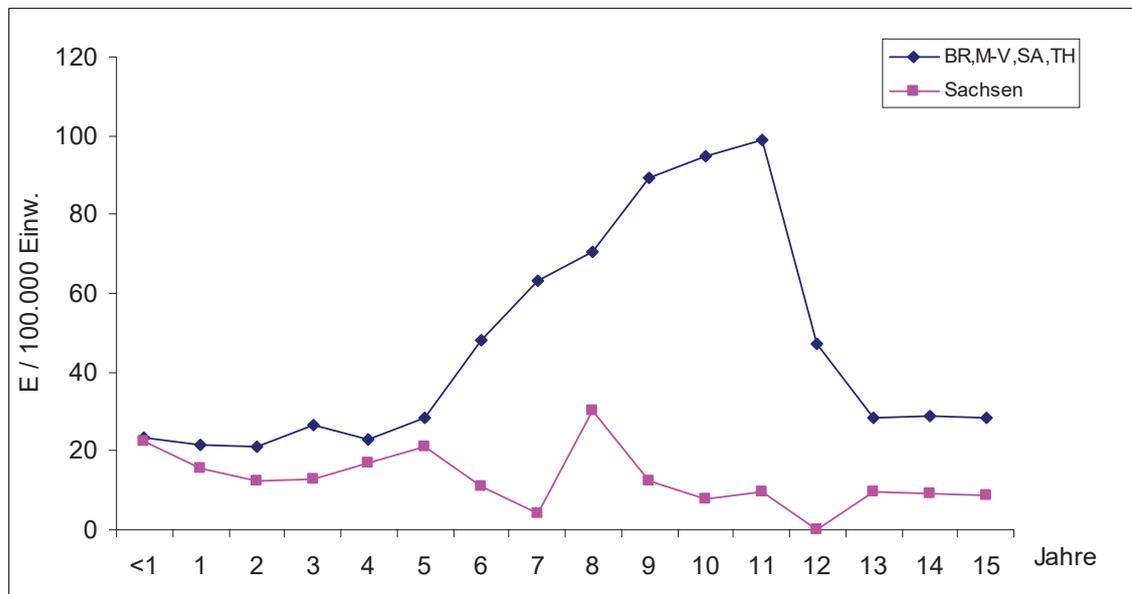


Abbildung 1: Altersverteilung der gemeldeten Pertussis Fälle aus Sachsen und gemeldete Pertussis Fälle aus Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen-Anhalt und Thüringen in den Jahren 2000-2003.

Aus der Abbildung wird erkenntlich, dass in den vier Bundesländern ohne Vorschulimpfung die gemeldete Inzidenz des Keuchhustens ab dem 6. Lebensjahr deutlich zunimmt.

Aus allen obigen Daten lässt sich also entnehmen, dass die Schutzwirkung der azellulären Impfstoffe nach vier Dosen demnach für 5–6 Jahre auf dem nach 3 Grundimmunisierungen erreichten Niveau bleibt, um dann sukzessiv abzufallen.

In allen Studien zur Wirksamkeit der Impfstoffe wurde auch nach einem serologischen Korrelat für die Schutzwirkung azellulärer Impfstoffe gesucht. Die durch die Impfung induzierten IgG-Antikörper gegen PRN und PT konnten in Studien

mit einer Schutzwirkung korreliert werden. Ein einfach messbares Korrelat für die Schutzwirkung von Pertussis-Impfstoffen wurde jedoch bedauerlicherweise nicht gefunden [1].

Erzeugen die Ganzzellimpfstoffe eine Immunantwort gegen alle Antigene des Bakteriums, so ist die Immunantwort bei azellulären Impfstoffen gegen einzelne Virulenzfaktoren des Bakteriums gerichtet. Nach Einführung der azellulären Impfstoffe zeigte sich bei der Überwachung der zirkulierenden Stämme von *B. pertussis*, dass diese sich gegenüber dem zur Herstellung der Impfstoffe verwendeten Stamm Tohama zunehmend verändern [10]. Diese Veränderungen betreffen vor allem die für die Impfstoffe verwendeten Virulenzfaktoren, wie zum einen das PRN, von dem mittlerweile acht verschiedene Typen beschrieben sind, und das PT, von dem verschiedene Typen und unterschiedliche Expressionsmuster bekannt sind. Bislang wurden jedoch keine epidemiologischen Hinweise dafür gefunden, dass sich die Effektivität der Impfstoffe oder aber deren Schutzdauer verändern.

In Anbetracht der sich verändernden bakteriellen Population muss daher die Effektivität der azellulären Pertussis-Impfung kontinuierlich überprüft werden. Ein Maß für die Wirksamkeit ist die Schutzwirkung gegen die Erkrankung. Ein anderes ist die Schutzdauer der Impfungen. In Ländern mit Meldepflicht und einer funktionierenden Surveillance kann dies aus den erhobenen Daten geschätzt werden.

Die Schutzwirkung gegen die Erkrankung lässt sich am ehesten in kontrollierten Studien untersuchen, die aber zeitaufwändig und teuer sind. Gleiches gilt für die Untersuchungen zur Schutzdauer, wobei hier die Zeit der Protektion nach der letzten Impfdosis ermittelt wird. Wie in Tabelle 3 dargestellt, ist diese Schutzdauer der Impfungen bislang vor allem in kontrollierten Studiensituationen untersucht worden, die aufgrund des Designs den Nachteil haben, erst nach längerer Studiendauer Ergebnisse zu liefern.

Ziel der hier beschriebenen Studie war es daher, zu untersuchen, inwieweit mit Hilfe von diagnostischen Routinedaten, ohne eine komplexe Studiensituation, ein

Surrogatmarker für die Dauer des Impfschutzes zu erheben. Der weitere Zweck der Studie war es daher auch, ein mögliches Verfahren vorzuschlagen, mit dessen Hilfe aufgrund von diagnostischen Routinedaten Änderungen in der Schutzdauer geschätzt werden kann.

Damit würde es möglich werden, auch kurzfristig und ohne größeren Aufwand abschätzen zu können, ob sich die Effektivität von azellulären Pertussis-Impfstoffen im Vergleich zu früheren Ergebnissen signifikant verändert hat, oder ob ggf. eine Änderung der Impfstoffe eine längere Schutzwirkung zur Folge hat.

2 Patienten und Methoden

2.1 Patienten:

2.1.1 Studienkohorte

In die Studie wurden Kinder im Alter zwischen einem Monat und 16 Jahren aufgenommen, bei denen aufgrund der Symptomatik in Kinderarztpraxen ein nasopharyngealer Abstrich zum Nachweis von Bordetella-DNA entnommen wurde.

Die Daten von Patienten, bei denen Bordetella-DNA (*B.pertussis* und/oder *B.parapertussis*) nachgewiesen werden konnte, wurden weiter erfasst und weiter analysiert.

Die primäre Diagnostik wurde aus medizinischer Indikation durchgeführt. Die sich daran anschließende Studie war demnach eine epidemiologische Studie ohne Intervention. Die Studie wurde durch die Ethik-Kommission der Ärztekammer Nordrhein geprüft (Nr.: 2006065).

Um eine Selektion zu vermeiden, analysierten wir konsekutive Abstriche aus insgesamt fünf Praxen für Kinder- und Jugendmedizin mit insgesamt acht Kinder- und Jugendärzt/Innen, die dem Institut für Hygiene und Labormedizin seit längerer Zeit Material zur Pertussis-PCR übersandt hatten und bei denen keine Änderung des diagnostischen Triggers zu erwarten war.

2.1.2 Patienten mit negativer PCR als Vergleichsgruppe

Insgesamt wurden von 178 Kindern im gleichen Zeitraum von drei Kinderarztpraxen mit insgesamt sechs Kinder- und Jugendärzten Nasopharyngealabstriche eingesandt, bei denen die real-time PCR auf Bordetella-DNA negativ war. Alle Krankenakten dieser Patienten wurden auf eine entsprechende Impfanamnese durchgesehen und protokolliert.

2.2 Untersuchungsmaterial:

Den Patienten wurden zum Nachweis der Bordetella-DNA nasopharyngeale Abstriche entnommen. Die Praxen waren in der Technik der Entnahme geschult; die Abstriche wurden mit flexiblen Dakron-Tupfern auf gedrahtem Aluminiumdraht entnommen und in sterilen Röhrchen mit AMIES Medium mit Holzkohle transportiert (Copan, Brescia Italien).

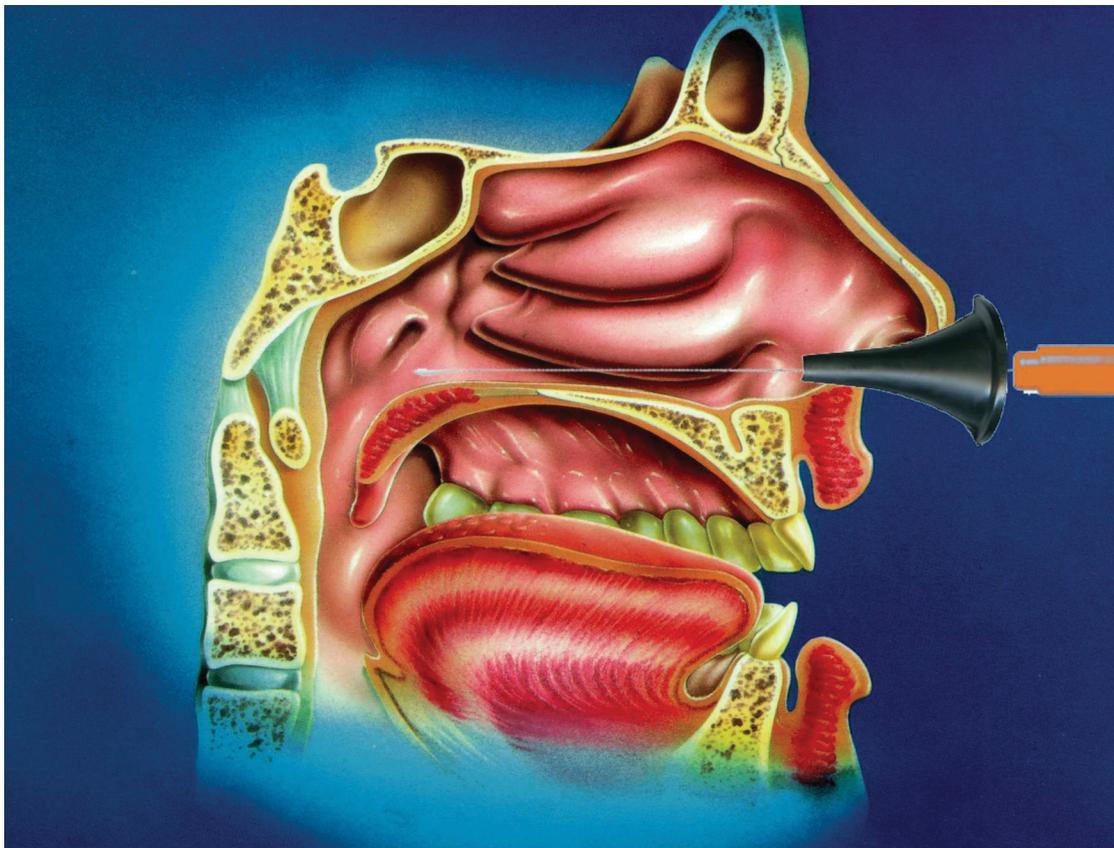


Abbildung 2. Anatomische Strukturen bei der Entnahme nasopharyngealer Abstriche (Abbildung mit Genehmigung Frau Prof. Dr. Nicole Guiso, Institut Pasteur, Paris)

<https://www.youtube.com/watch?v=DBrxP7vHM3Y&feature=youtu.be>

2.3 Methoden: Real-time PCR:

Die PCR dient dem Nachweis von *Bordetella pertussis*-DNA und *B.parapertussis*-DNA aus Nasopharyngealabstrichen.

Das hier beschriebene Verfahren basiert auf getrennter Detektion von *B. pertussis* und *B. parapertussis*-Genomen (so genannte simplex PCR). Prinzipiell ist jedoch auf Grund der Markierungen an den eingesetzten Sonden möglich, beide Erreger in einem PCR-Ansatz zu erfassen (duplex PCR), wobei allerdings die Sensitivität abnimmt [11, 12, 13].

Die Real-Time-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden (daher der Name „Real Time“). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs (der aus mehreren Zyklen besteht) wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der PCR (die wenige Zyklen in einem Lauf dauert) ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen.

Erläuterung des Verfahrens

Extrahierte DNA wird in einem Reaktionsansatz mittels PCR amplifiziert. Während des Annealingshybridisieren sowohl die beiden spezifischen PCR-Primer als auch zwei, für die Detektion mittels FRET (fluorescenceresonanceenergytransfer) erforderlichen fluorogenen Sonden am nachzuweisenden Genom. In dieser Phase liegen die beiden Sonden so dicht nebeneinander, dass Energie von der Fluoresceinmarkierten Sonde auf die mit LightCycler-RED 640 markierte Sonde übertragen werden kann. Die während jedes Zyklus vom LightCycler-RED 640 emittierte Fluoreszenz wird kontinuierlich gemessen.

Das analysierte PCR-Produkt des *B. pertussis*-Genoms ist ein 181 bp Fragment der IS 481 und das vom *B. parapertussis*-Genom ein 464 bp Fragment der IS 1001.

Im Anschluss an die PCR kann eine Analyse der Schmelzkurven erfolgen.

Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht wird (50 °C → 95 °C). Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff (z. B. SYBR Green I) freigesetzt, und es wird eine Fluoreszenzabnahme registriert. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist eine Unterscheidung möglich. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve gibt annähernd Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments.

Fluorescence resonance energy transfer (FRET):

Ein Donor-Fluorochrom, das durch eine Lichtquelle angeregt wird, gibt einen Teil seiner Energie an ein in ausreichender Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom ab. Nimmt der Abstand zwischen Akzeptor und Donor zu, so nimmt FRET und somit das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, während das des Donors zunimmt. Diese Methode ist sehr aufwendig und teuer, bietet aber die Vorteile der hohen Spezifität des Assays.

LightCycler-Sonden (auch Hybridisierungs-Sonden):

Die einfachste Möglichkeit der Nutzung des FRET zur Quantifizierung von Nukleinsäuren besteht in der Verwendung von LightCycler-Sonden. Zwei verschiedene, jeweils mit einem FRET-Donor bzw. FRET-Akzeptor markierte Oligonukleotide, die nebeneinander an die Ziel-Sequenz binden und damit die Fluorochrome in eine für den FRET ausreichende Nähe bringen, können als Sonden für die Quantifizierung der PCR-Produkte eingesetzt werden. Die Messung findet am Ende der Annealing-Phase in jedem Zyklus statt. Auch hier kann sich eine Schmelzkurvenanalyse anschließen.

2.4 Durchführung der real-time PCR

Nasopharyngealabstriche:

Vorbereitung der Tupfer: Tupferwatte (Dacron) vom Watteträger abschneiden, in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup oder ins SwabExtraction Tube System geben und 250 µl ATL-Puffer hinzufügen und aufarbeiten.

Zwischenlagerung: Die Untersuchungsproben wurden direkt nach Probeneingang extrahiert oder bei - 20 °C gelagert.

Der detaillierte Ablauf der real-time PCR ist im methodischen Anhang Nr. 2 dargestellt.

PCR: Interpretation der Ergebnisse

Proben werden als "positiv" bewertet, wenn das Fluoreszenzsignal der Probe statistisch signifikant ansteigt und eine für Polymerase-Kettenreaktionen typische Kinetik aufweist.

Ein weiteres Charakteristikum für die Interpretation stellt die Schmelzkurvenanalytik mit Bestimmung des Schmelzpunktes des PCR-Produktes dar. Die Schmelzkurve für die Amplifikation von IS 481 hat ihr Maximum bei 60,0°, die Schmelzkurve für IS1001 hat ihr Maximum bei 65,0°.

2.5 Fragebogen zur Erfassung der Infektionswege:

Die Studie hatte aufgrund ihres Designs keine primäre Kontrollgruppe. Um mögliche Selektionen auszuschließen, wurde bei den Familien der untersuchten Patienten versucht, die Infektionsquellen zu eruieren. Wir gingen davon aus, dass in unserem Patientengut kein größerer Selektions-Irrtum stattgefunden hätte, wenn die Infektionsquellen eine ähnliche Zusammensetzung wie in publizierten Studien aufweisen würden.

Hierzu wurde für die betroffenen Familien ein Fragebogen (siehe Anhang 1) versandt und in Telefoninterviews bzw. in persönlichen Interviews abgefragt.

2.6 Vergleich mit bekannten epidemiologischen Daten

Als weiteres Verfahren zum Vergleich unseres Studienkollektivs mit anderen Datenquellen analysierten wir, wie sich die Alterszusammensetzung der laut Länderverordnung in den neuen Bundesländern gemeldeten Pertussis Fälle im Vergleich zu den Studienpatienten verhielt. Diese Daten wurden mit entsprechenden Datenbankabfragen aus der öffentlich zugänglichen Datenbank SurvStat des Robert-Koch-Instituts extrahiert.

Zugangsweg:http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/SurvStat/survstat_inhalt.html

Ferner wurde die Zusammensetzung der Familien hinsichtlich Anzahl der im Haushalt lebenden Kinder in Krefeld aus den öffentlich zugänglichen Daten der Stadt Krefeld (<http://www.krefeld.de>) entnommen.

2.7 Statistische Methoden

Die gewonnenen Daten wurden aufgelistet. Kontinuierliche Variablen wurden in Tabellen zusammengefasst, diskrete Variablen wurden beschrieben.

Von den kontinuierlichen Variablen wurden statistische Grundgrößen mittels des Programmes SIGMA-Stat (Jandel Scientific, Erkrath) erfasst. Unterschiede von Mittelwerten zwischen Populationen wurden bei normal verteilten Variablen mittels T-Test, bei nicht normal verteilten Variablen mittels Rang-Summen-Test bzw. chi-Quadrat Test auf Unterschiede untersucht. Eine Signifikanz wurde bei $\leq 0,05$ angenommen. Überlebenskurven nach Kaplan-Meier wurden gleichfalls mit der obengenannten Software errechnet, hierbei gefundene Differenzen wurden mit dem log-Rank Test geprüft. Schätzungen zur Größe von Studienkollektiven zur Ermittlung von Differenzen wurden mittels t-Test-Power (SigmaStat, Systat) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Patienten mit Nachweis von Bordetellen DNA

Zwischen Mitte 2005 und Ende 2006 wurden insgesamt von 104 Kindern Nasopharyngealabstriche auf *B. pertussis*- oder *B. parapertussis*-DNA mittels real-time PCR positiv getestet. Alle diese positiv getesteten Abstriche waren von niedergelassenen Ärzten für Kinder- und Jugendmedizin eingesandt worden.

Von den 104 Kindern war *B. pertussis* – DNA bei 100 (95%) und *B. parapertussis* bei 4 Kindern (5%) nachzuweisen. In dieser Gruppe konnten keine Doppelinfektionen nachgewiesen werden. In die hier beschriebene Auswertung wurden lediglich die Kinder mit Nachweis von *B. pertussis*-DNA eingeschlossen.

Von diesen 100 Patienten waren 55 Mädchen und 45 Jungen mit einem Durchschnittsalter von 7,89 Jahren und einem mittleren Alter von 8,45 Jahren (5%-95% Intervall zwischen 0,8 – 13,3 Jahren). Das jüngste Kind war 1,3 Monate, das älteste 15,7 Jahre alt. Die Altersverteilung der Kinder ist in Abbildung 3 als Histogramm dargestellt. Auffallend war, dass insbesondere Kinder der Altersgruppe zwischen 4 und 8 Jahren stark vertreten waren.

Altersverteilung der Studienteilnehmer

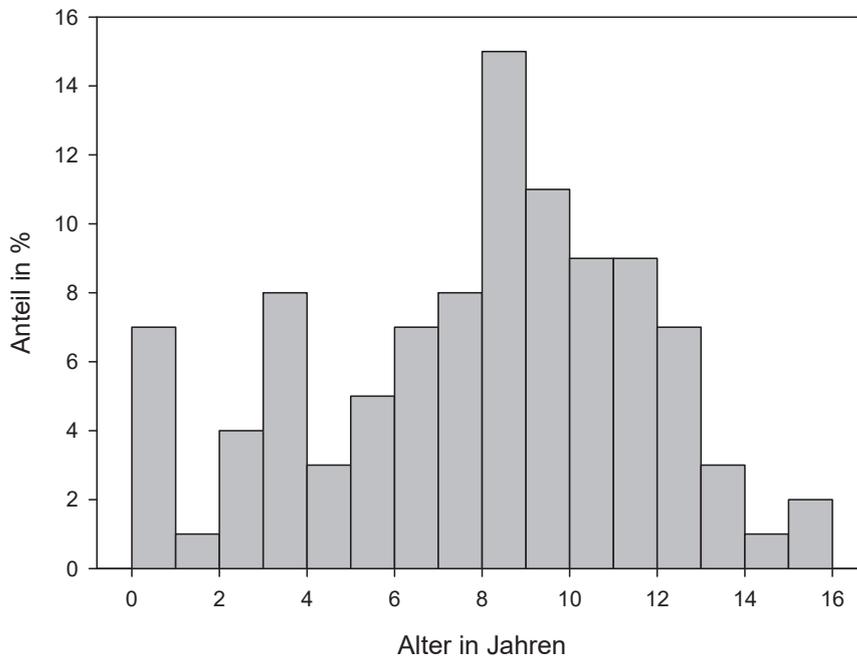


Abbildung 3: Histogramm der Altersverteilung der gesamten Studienkohorte

Für die Auswertung der Patientenakten wurden zunächst die behandelnden Kinderärzte kontaktiert. Alle Patientenakten der Kinderärzte wurden bezüglich des individuellen Impfstatus und der Patientenkontaktadressen vor Ort gesichtet. Bei 70 Kindern konnte eine komplette Impfanamnese erhoben werden, größtenteils durch die Aufzeichnungen des behandelnden Kinderarztes.

Die Familien der Kinder wurden angeschrieben und um ihre Einwilligung zur telefonischen oder persönlichen Kontaktaufnahme gebeten. Für die weitere Information über die positiv getesteten Kinder wurde ein Fragebogen (siehe Anhang Nr. 1) erstellt, mit dem die Symptome des positiv getesteten Kindes, sowie dessen individuelle Impfanamnese abgefragt wurden. Der Fragebogen enthielt ferner eine kurze Sozialanamnese, die insbesondere im Hinblick auf den Besuch von Kindertagesstätten, Kindergarten beziehungsweise der Schule, erhoben wurde. Auch Geschwister und andere enge Familienmitglieder wurden bezüglich pertussis-

typischer Symptome und individueller Impfanamnese befragt. Den Eltern wurde im Anschreiben freigestellt, ob ein telefonischer Kontakt oder ein persönlicher Besuch geeigneter erschienen. Von den 100 Familien der Kinder stimmten lediglich 43% der Befragung zu.

Die Befragung erfolgte entsprechend der gewünschten Form persönlich oder telefonisch nach dem oben beschriebenen standardisierten Fragebogen.

In einigen der anderen Fälle waren die Kinder im Rahmen einer Notfallkonsultation beim Kinderarzt vorstellig geworden, so dass keine Angaben über den Impfstatus vorhanden waren oder aber die Familien hatten den Impfausweis verloren.

Aufgrund der oben beschriebenen Daten wurden folgende Variablen untersucht:

1. Dauer des Impfschutzes, als Zeitabstand zwischen letzter Pertussis-Impfung und Nachweis von *B. pertussis*-DNA
2. die Analyse der Infektionsketten und die möglichen Infektionsquellen.

Aufgrund der vorliegenden Informationen ergab sich das in Abbildung 4 dargestellte Auswerteschema der Studienkohorte.

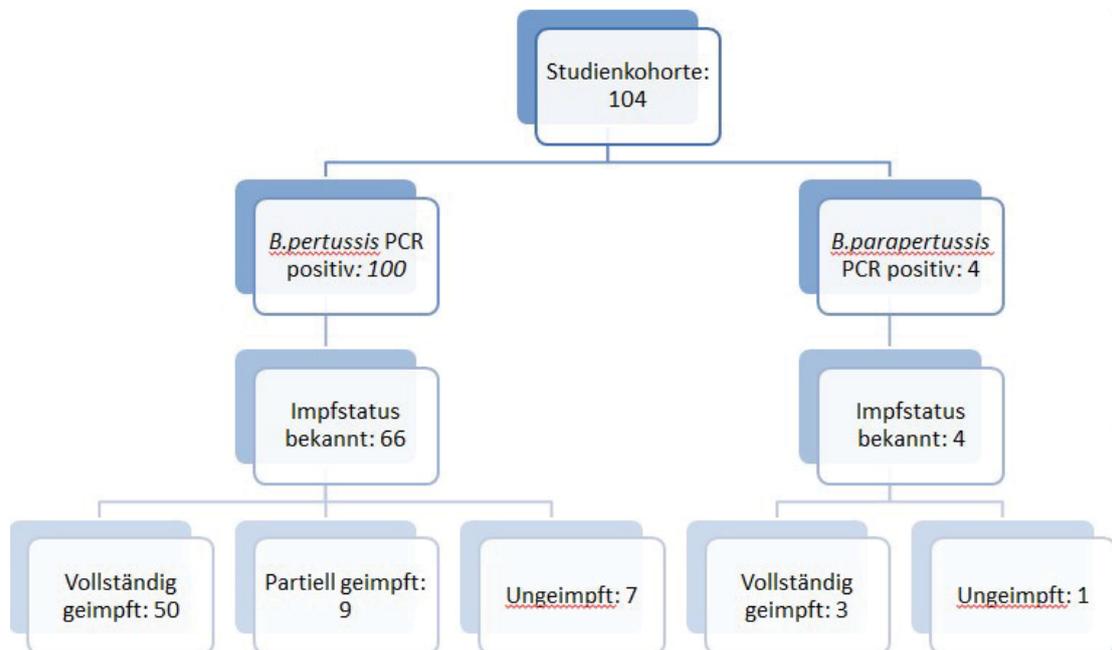


Abbildung 4: Studiendesign mit Angaben zur Zusammensetzung der Studienkohorte

3.2 Zeitpunkt der letzten Pertussis-Impfung

In Abbildung 5 ist der zeitliche Abstand zwischen positiver PCR und der letzten Impfdosis bei insgesamt 100 Kindern aufgezeigt.

Durchschnittlich lag die letzte Impfung 6,18 Jahre zurück und die mittlere Dauer lag bei 6,57 Jahren. Der kürzeste, aufgezeichnete Zeitraum betrug 0,50 Jahre, der längste Abstand zur letzten Impfung lag bei 11,13 Jahren, das 5%-95% Intervall lag zwischen 1,6 Jahren und 10,0 Jahren, das 25%-75% Intervall lag zwischen 4,3 Jahren und 8,0 Jahren.

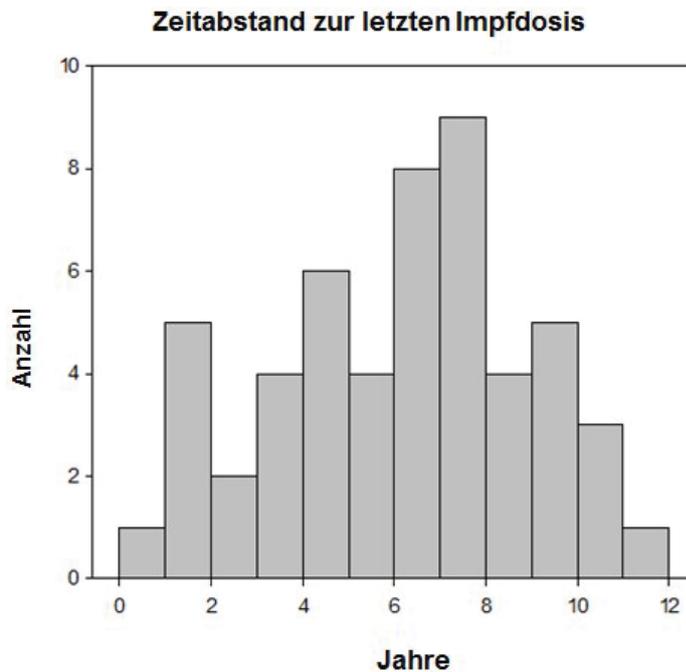


Abbildung 5: Histogramm zum Zeitabstand zur letzten Impfdosis

Lediglich bei 22 Kindern war eine Information über den für die letzte Impfdosis verwendeten Impfstoff zu erhalten. 15 Kinder waren mit einem GSK Biologicals Produkt (Infanrix® oder Boostrix®) und 7 Kinder mit einem Sanofi Pasteur MSD Produkt (Hexavac®) geimpft worden. Aufgrund der geringen Fallzahl wurde auf eine detaillierte statistische Auswertung verzichtet.

Wie aus der Abbildung 5 ersichtlich, lag bei insgesamt 11 Kindern der Zeitpunkt der letzten Impfung 36 Monate oder weniger zurück. Die in den Fragebögen beschriebene Symptomatik wurde für diese Kinder mit einem zeitlichen Abstand von unter 36 Monaten detailliert untersucht:

Von diesen 11 Kindern waren lediglich 2 nicht geimpft, 2 Kinder hatten eine Impfdosis erhalten, weitere 2 waren mit 3 Impfdosen unvollständig geimpft. Die übrigen 5 Kinder waren vollständig (4 Impfdosen) geimpft. Der zeitliche Abstand zwischen letzter Impfdosis und Infektion lag bei diesem Kollektiv zwischen 1 ½ - 2 ½

Jahren. Zum Vergleich diente die klinische Symptomatik bei solchen Kindern, bei denen ein Impfabstand von mehr als 8 Jahren gemessen wurde. Der quantitative Parameter, der aufgrund des Fragebogens untersucht werden konnte, war die Hustendauer, bei den anderen Symptomen konnte lediglich die qualitative Angabe bewertet werden.

Es fand sich, dass zwischen dem Kollektiv, das vor 36 Monaten und weniger immunisiert worden war, und den Studienteilnehmern, deren Impfung mehr als acht Jahre zurücklag, keine signifikanten Unterschiede in der klinischen Symptomatik (Hustendauer) und in der Verteilung der anderen Symptome festgestellt werden konnte.

Abbildung 6 zeigt die erhobenen Daten zum Impfabstand in einer Kaplan-Meier Kurve.

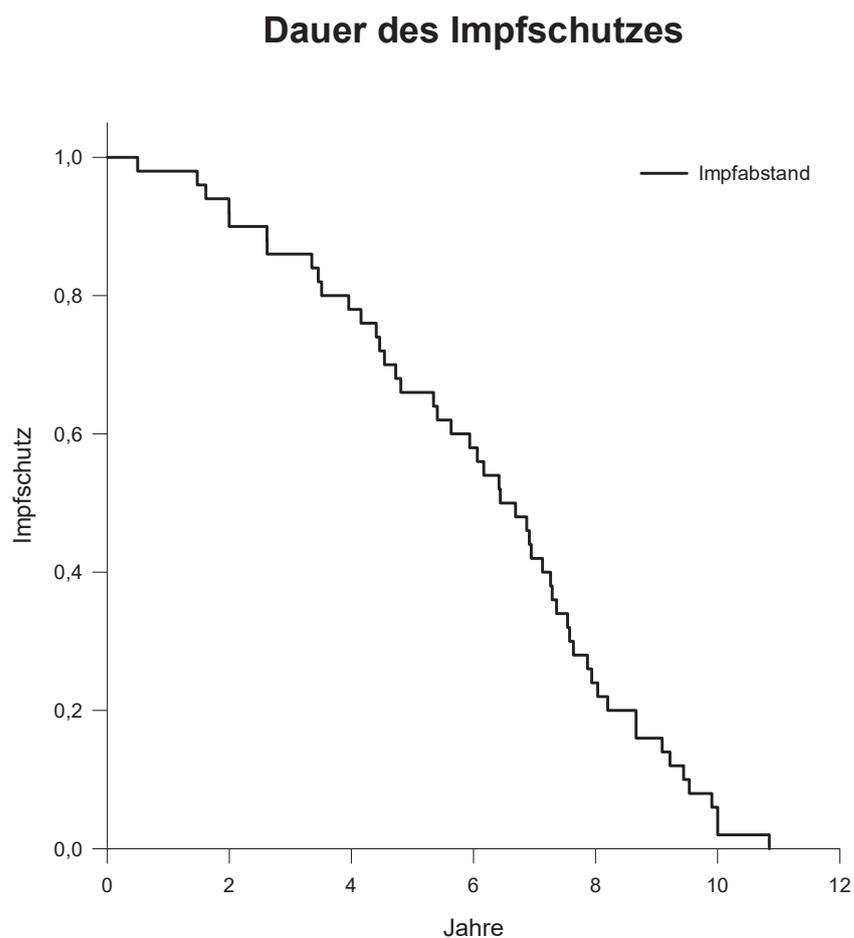


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve zur Dauer des Impfschutzes nach letzter Impfdosis

Bei dieser Art der Analyse wird deutlich, dass die Kinder zwar im Mittel etwas mehr als sechs Jahre geschützt sind, dass aber ein Durchbruch bei einem vollständig geimpften Kind wohl in Abhängigkeit von der Art der Exposition bereits früher möglich ist.

Die hier erhobenen Daten differenzierten nicht zwischen einem primären Impfversagen und einem Nachlassen des Impfschutzes („waning immunity“). Zur Kontrolle wurde daher eine weitere Kaplan-Meier Analyse durchgeführt, für die aufgrund der Ergebnisse der Feldstudien [1] angenommen wurde, dass es sich bei Fällen mit einem Abstand von weniger als 36 Monaten zur letzten Impfdosis um primäre Impfversager handeln könnte.

Abbildung 7 zeigt diese Kurve, bei der jedoch die durchschnittliche Dauer zur letzten Impfdosis lediglich von 6,18 Jahren auf 6,84 Jahre erhöht wurde.

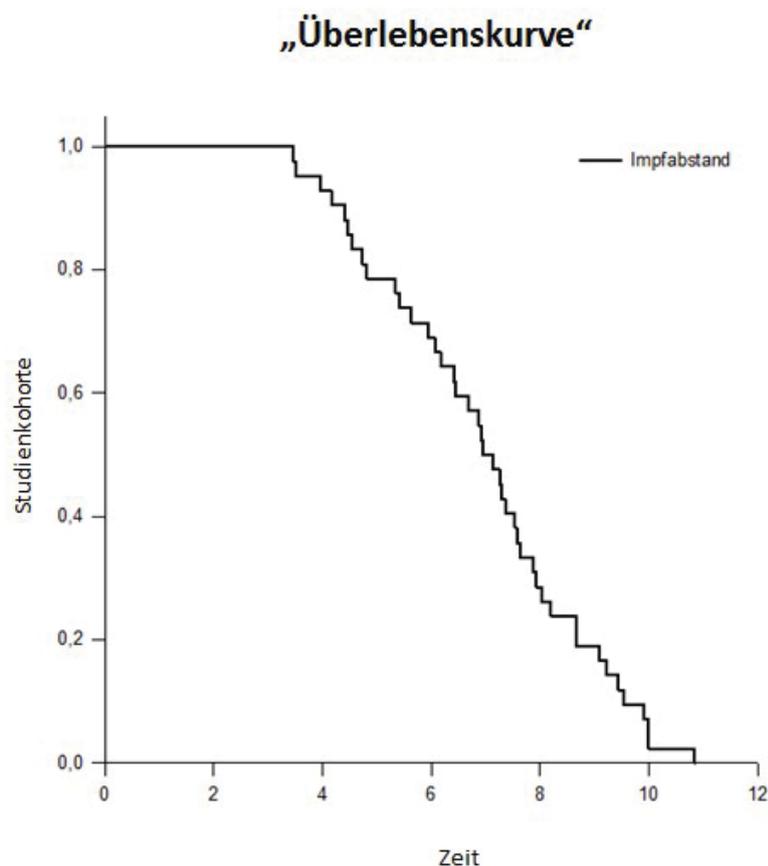


Abbildung 7: Zeitabstand zur letzten Impfung ohne Impflinge, deren Impfung weniger als 3 Jahre zurücklag (fragliche primäre Impfversager)

3.3 Analyse der Infektionsquellen

Wie beschrieben, benutzten wir die Analyse der Infektionsquellen im Wesentlichen zur Validierung unserer Daten. In Tabelle 4 werden die Infektionsquellen dargestellt. Bei 65% der untersuchten Kinder konnte die Infektionsquelle eruiert werden, in 35% war dies nicht möglich. Vor allem in der Schule steckten die Kinder sich gegenseitig an (44%), gefolgt von innerfamiliärer Ansteckung (38%).

Keine Infektionsquelle eruiert		35%
Infektionsquelle identifizierbar		65%
Familie	Geschwister	29%
	Erwachsene	9%
Schule		44%
Kindergarten		9%
Freunde		9%

Tabelle 4: Angaben zu möglichen Infektionsquellen

3.4 Analyse von Infektionsketten (Kontaktpersonen)

Tabelle 5 zeigt die Ausbreitung der Pertussisinfektion unter den Kontaktpersonen der Kinder mit positivem Pertussis-PCR-Nachweis im nasopharyngealen Abstrich. In 62% konnte eine Ausbreitung nachvollzogen werden, in 38% der Fälle war dies nicht möglich.

Die häufigste Verbreitung fand innerhalb der Familie, unter Geschwistern 52% und unter Erwachsenen 4%, statt, gefolgt von Kindergarten und Freunden.

Keine Ausbreitung		38%
Ausbreitung der Infektion		62%
Familie	Geschwister	52%
	Erwachsene	4%
Schule		0%
Kindergarten		4%
Freunde		2%

Tabelle 5: Angaben zur möglichen Ausbreitung (Infektionsketten)

Aus den oben geschilderten Daten haben wir versucht, die in Abbildung 8 schematisch aufgezeigten Infektionsketten zu konstruieren:

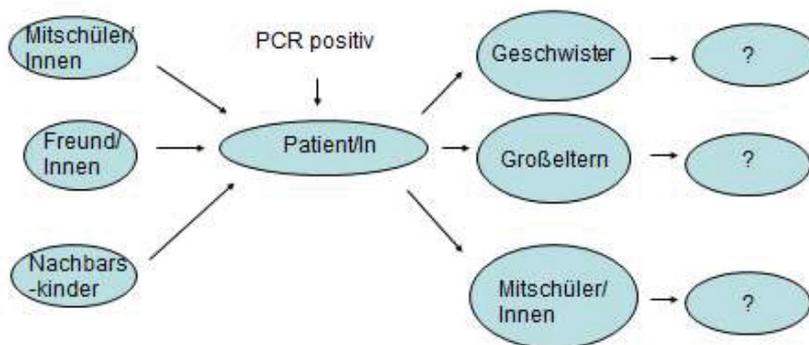


Abbildung 8: Schematisches Beispiel einer Infektionskette

3.5 Fälle mit *B. parapertussis*-DNA Nachweis

Von den 104 Kindern, bei denen positive nasopharyngeale Abstriche auf *Bordetella pertussis* und *Bordetella parapertussis* mittels real-time PCR detektiert wurden, fanden sich lediglich 4 Kinder positivem Nachweis von *Bordetella parapertussis*. Drei der Kinder waren vollständig gegen Pertussis geimpft, ein Kind hatte keine Impfdosis erhalten. Eines war unter 36 Monate alt.

3.6 Einzel-Kasuistiken

Exemplarisch sollen im Folgenden einige typische und einige besonders auffällige Kasuistiken vorgestellt werden:

So berichtete die Mutter eines Jungen, dass in der Schule keine weiteren Fälle aufgetreten seien, ihr Sohn aber eng befreundet sei mit einem Jungen, in dessen Klasse mehrere Pertussisfälle aufgetreten waren.

In 2 Fällen wurden bei Halbgeschwistern positive PCR-Nachweise angetreten. Durch die Nachnamen war diese Tatsache zunächst nicht aufgefallen, allerdings dann durch eine gemeinsame Adresse beziehungsweise nach dem telefonischen Interview.

Ein weiterer, eher zufällig gefundener Infektionsweg, lag in der Nachbarschaft. So wohnten zwei Kinder, die durch unterschiedliche Kinderärzte betreut wurden und auch nicht in dieselbe Schule gingen, in einem Haus.

Es ist festzustellen, dass primär die Kontaktperson in der Familie gesucht werden sollte, aber auch Freunde, sowohl in der Schule, als auch außerhalb, Halbgeschwister, die gegebenenfalls auch nicht in einem Haushalt leben oder auch Nachbarn als Infektionsquelle zu beachten sind.

3.7 Vergleichsgruppe von Patienten ohne Nachweis von *Bordetella-DNA*

Bei insgesamt 178 Patienten wurden im Studienzeitraum in drei großen Kinder- und Jugendarztpraxen Abstriche entnommen, bei denen die *B. pertussis* PCR und die *B. parapertussis* PCR negativ waren.

Von diesen 178 Patienten waren 98 Mädchen und 80 Jungen mit einem Durchschnittsalter von 5,8 Jahren und einem mittleren Alter von 4,9 Jahren (5%-95% Intervall zwischen 0,8 – 13,3 Jahren). Das jüngste Kind war 0,8 Monate, das älteste 14,6 Jahre alt, die 25% und 75% Perzentile lagen bei 3,1 bzw. 8,4 Jahren.

	Anzahl	PCR positiv <i>B. pertussis</i>	PCR negativ	P
Gesamtpopulation*	258	80	178	
Impfstatusbekannt	150	51 (63.8%)	99 (55.6%)	0.22
Ungeimpft	14	5 (9.8%)	9 (9.1%)	0.88
Inkomplettgeimpft	15	5 (9.8%)	10 (10.1%)	0.95
Geimpft mit >4 Impfdosen	1	0	1	-
Komplett** geimpfte Population	120	41	79	-
Altersverteilung in Jahren (Median, Bereich)	120	8.4 (0.3-12.3)	3.32 (0.4-14.1)	<0.01
% männlich	120	41.5%	45.0%	0.67
Jahreseit letzter Impfung	120	6.05 (0.5-10.85)	2.22 (0.04-9.23)	<0.001

*Vier Fälle mit *B. parapertussis* wurden ausgeschlossen

**Altersentsprechende vollständige Impfung (STIKO), 3 oder 4 Dosen

Tabelle 6: Modifiziertes Studiendesign aufgrund der Ergebnisse der *B. pertussis* PCR und des verfügbaren Impfstatus.

Die Altersverteilung der Kinder ist in Abbildung 8 als Histogramm dargestellt. Das Alter dieser Kinder mit negativer PCR war von denen mit positiver PCR signifikant ($p < 0,01$) unterschiedlich.

Altersverteilung PCR-negative Gruppe

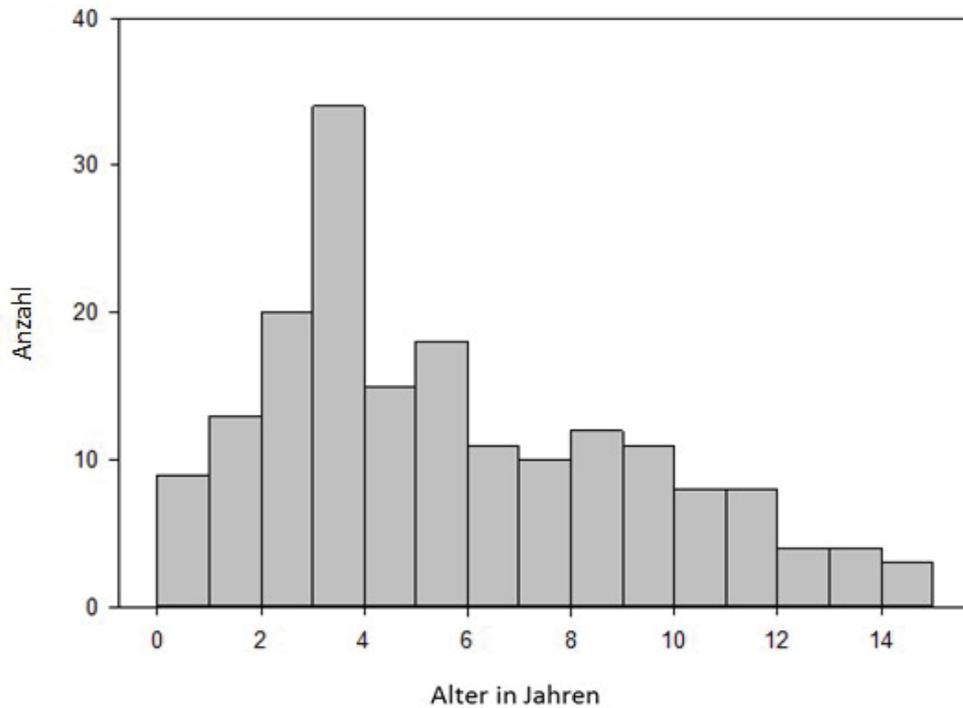


Abbildung 9: Histogramm der Altersverteilung der PCR-negativen Gruppe

Von Insgesamt 90 dieser Kinder war es möglich, eine Impfanamnese und das Datum der letzten Impfung aus den individuellen Daten zu erheben. Hierbei fand sich, dass der Abstand zur letzten Dosis von Pertussis-haltigen Impfstoffen in dieser Gruppe hochsignifikant ($p < 0,001$; Mann-Whitney Rangsummentest) kürzer war als in der PCR-positiven Gruppe. Fand sich dort (siehe auch oben) ein mittlerer Impfabstand von 6,57 Jahren, so betrug dieser in der PCR-negativen Gruppe lediglich 1,76 Jahre. Der durchschnittliche Impfabstand betrug 2,2 Jahre, der minimale 14 Tage und der maximale 9,2 Jahre. Die 25% und 75% Perzentile lagen zwischen 0,7 und 2,9 Jahren.

Zeitabstand zur letzten Impfung	Pos	Neg	OR	95% CI	Eff.	95% CI
0 – <2 Jahre	4	43	0.02	0-0.13	98%	87-100%
2 – <4 Jahre	5	25	0.04	0-0.26	96%	74-100%
4 – <6 Jahre	8	4	0.36	0.03-3.43	64%	-243-97%
6 – <8 Jahre	13	5	0.47	0.05-3.72	53%	-272-95%
>8 Jahre	11	2	REF			

Tabelle 7: Zeitabstand zur letzten Impfung bei PCR-positiven und PCR-negativen Patienten. Kinder mit mehr als acht Jahren Abstand zur letzten Impfung wurden als vermeintlich ungeimpfte Referenz definiert.

Abkürzungen:

Pos/Neg = Anzahl der Patienten mit positiver oder negativer *Bordetella* PCR

OR = Odds ratio

Eff. = grobe Schätzung der Effektivität

REF = Referenzpopulation

95% CI = 95% Konfidenzintervall

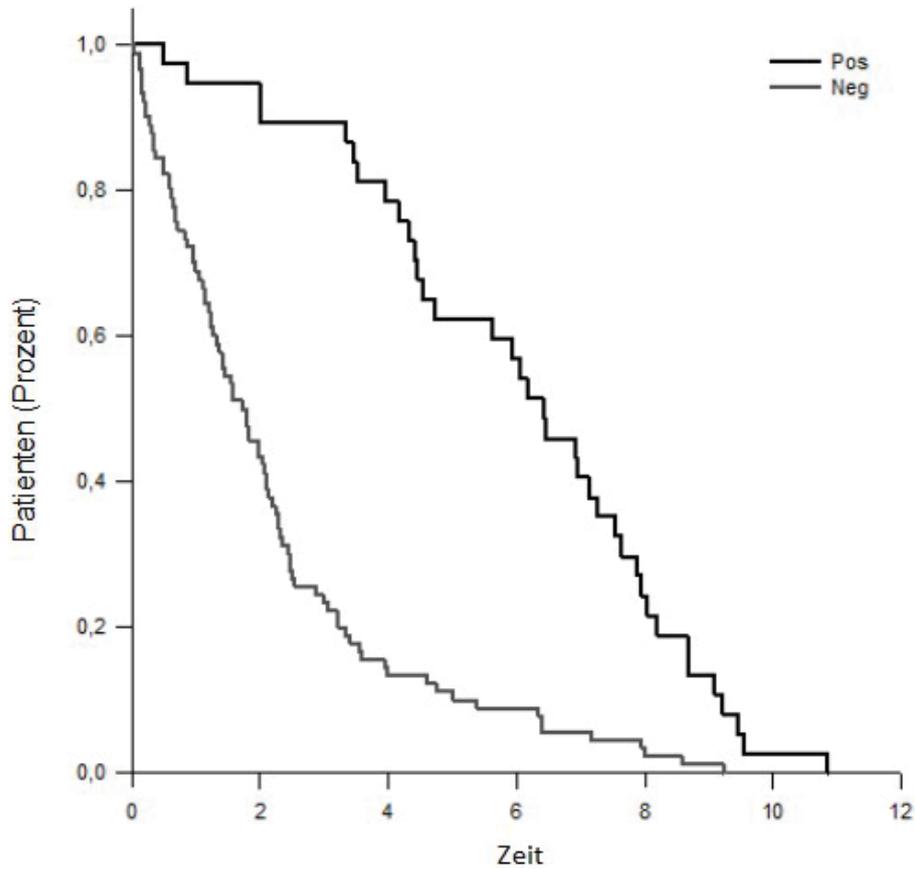


Abbildung 10. Zeitabstand seit der letzten Impfdosis bei Patienten mit positiven und negativen Ergebnissen im Nasopharyngealabstrich für *B. pertussis*-DNA

In lediglich 51 Fällen war es möglich, den Impfstoff zu ermitteln: so erhielten 36 Kinder Hexavac®, 13 Kinder Infanrix® oder Infanrix-hexa® und zwei ältere Kinder wurden mit Repevax® geimpft. Aufgrund der geringen Zahl wurde auch in dieser Gruppe auf eine statistische Analyse verzichtet.

4 Diskussion

Azelluläre Pertussis-Impfstoffe werden aus gereinigten Proteinantigenen eines bestimmten Stammes von *B. pertussis* (Stamm Tohama, ATCC) hergestellt. Die Bakterien werden in Flüssigkultur angezüchtet, die für die Impfstoffe verwendeten Antigene werden aus dem Überstand der Kultur gewonnen, bzw. aus Bakterienlysaten gereinigt. Für die industrielle Produktion können PT, FHA, PRN und eine Mischung aus FIM 2 und FIM 3 produziert werden. Die in Deutschland zugelassenen und vertriebenen azellulären Pertussis-Impfstoffe enthalten alle PT, FHA und PRN, manche enthalten noch FIM 2/3. Die Antigene werden zusammen mit Diphtherie-Toxoid und Tetanus Toxoid an Aluminiumsalze adsorbiert.

Es ist kein Monoimpfstoff gegen Pertussis verfügbar, neben der Kombination DTaP (bzw. Tdap; siehe oben) werden weitere Kombination mit inaktivierten Polioviren (IPV), mit Hepatitis-Bs-Antigen (HBV) und mit dem Polyribositolphosphat vom Haemophilus influenzae Typ b (Hib) hergestellt. Die Antigendosis in den Kombinationsimpfstoffen variiert, je nachdem ob sie zur Grundimmunisierung (höherer Antigengehalt) (Bezeichnung: DTaP) oder zur Auffrischimpfung (reduzierter Antigengehalt) (Bezeichnung: Tdap) vorgesehen sind.

Die in Deutschland zugelassenen azellulären Pertussis-Impfstoffe haben ihre Wirksamkeit in einer Reihe von randomisierten kontrollierten Studien für Säuglinge [1] und in einer randomisierten kontrollierten Studie für Jugendliche und Erwachsene [2] nachgewiesen. Ein einfach messbares Korrelat für die Schutzwirkung von Pertussis-Impfstoffen, wie beispielsweise Antikörper gegen PT oder andere Virulenzfaktoren, existiert nicht. Die durch die Impfung induzierten IgG-Antikörper gegen PRN und PT wurden zwar in Studien [14] statistisch mit einer Schutzwirkung korreliert, für den Einzelfall gibt es jedoch kein sicheres Korrelat. Die Immunogenität der Vakzinen ist hoch und betrug in allen Studien >95% für die darin enthaltenen Antigene.

Daten aus Studien über die Schutzdauern für Ganzzell Impfstoffe und azelluläre Impfstoffe sind nochmals in Tabelle 8 zusammengefasst:

Jahr	Impfpräferenz	Studientyp	Schutzdauer	Land
1993	wP Jenkinson et al., 1988 [15]	Surveillance	8 Jahre	UK
1996	wP He et al., 1996 [14]	Surveillance	5-10	SF / CH
1999	wP van Buynder et al., 1999 [16]	Surveillance	5-14	UK
2003	wP Torvaldsen et al., 2003 [17]	Surveillance	6-9	AUS
2001	aP Salmaso et al., 2001 [6]	Impfstudie	6	I
2002	aP Lugauer et al., 2002 [7]	Kohortenstudie	6	D
2006	aP Tindberg et al., 1999 [5]	Impfstudie	6	S

Tabelle 8: Geschätzte Schutzdauer nach drei Dosen Pertussisimpfstoff adaptiert aus: The immunological basis of vaccination: Pertussis http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599337_eng.pdf

Im Einzelnen wurde die Schutzdauer beider Arten von Impfstoffen in mehreren Studien untersucht. Ausgangspunkt für die hier vorgelegte Studie war der Befund, dass im Gegensatz zu den Ganzzellvakzinen, wo eine große Variabilität beobachtet wurde, alle Studien über verschieden zusammengesetzte azelluläre Vakzinen fanden, dass die Schutzwirkung für 5 - 6 Jahre auf dem nach drei Grundimmunisierungen erreichten Niveau verbleibt, um dann sukzessiv abzufallen. Im Einzelnen ergaben die zitierten Untersuchungen folgenden Befunde:

Broutin et al [18] untersuchten in einer Studie 2004 in Niakhar im Senegal die Wahrscheinlichkeit, dass die Immunität gegen Pertussis verloren geht, sowie die durchschnittliche Dauer des Schutzes sowohl nach natürlicher Infektion als auch nach Impfung.

Im Senegal war Ende 1986 die Pertussis-Impfkampagne angelaufen, woraufhin in den Jahren von 1987-2000 ca. 43% der Kinder mindestens zwei Impfdosen erhielten. In 9% der Pertussisfälle waren die Kinder unter einem Jahr, 73% von diesen Kindern waren nicht geimpft. Bei 210/8629 konnte eine gesicherte, zweite Pertussisinfektion dokumentiert werden. Dabei lag der Anteil der nicht geimpften Kinder bei 1,6% gegenüber 0,8% im Kollektiv der geimpften Kinder. Das Alter bei Erstinfektion betrug bei den ungeimpften Kindern im Durchschnitt 5,8 Jahre, bei den geimpften Kindern lag es bei 5,3 Jahren. Diese Werte waren nicht signifikant.

Bei den Kindern, die zwei Pertussisepisoden erlitten, lag das mittlere Alter bei Erstinfektion bei 2,9 Jahren bei den nicht geimpften und bei 3,1 Jahren bei den geimpften Kindern. Das Alter bei der zweiten Infektion betrug 9,9 Jahre bzw. 8,2 Jahre, was signifikant ist.

Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass der Zeitraum zwischen Pertussisepisoden bei ungeimpften Kindern mit 7,1 Jahren länger ist, als bei den geimpften mit 5,1 Jahren.

2005 berichteten Edwards et al [19] über mögliche Infektionsquellen von Pertussis und die Impfschutzdauer nach Pertussis-Impfung im Kindesalter.

Insbesondere bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen konnte der stärkste Anstieg der Pertussisinfektionen nachgewiesen werden. In Studien konnte aufgezeigt werden, dass viele Infektionen von jungen Kindern durch eine Ansteckung bei Jugendlichen oder jungen Erwachsenen Familienmitgliedern, meist Geschwistern, erfolgte. Nicht- oder nicht-vollständig geimpfte Kinder haben ein höheres Risiko an einer schweren oder sogar lebensbedrohlichen Pertussisinfektion zu erkranken. Auch zeigten Infektionsausbrüche in Schulen eine klare Rolle der Jugendlichen bei der Übertragung von Pertussis, hier lag das durchschnittliche Alter bei 13 Jahren und die Übertragung zwischen Mitschülern konnte gesichert dargestellt werden.

Durch Impfung induzierter Schutz lässt nach 5 – 10 Jahren nach einer Impfung mit Ganzzellimpfstoff nach. Nach der Impfung mit azellulärem Impfstoff scheint die zelluläre Immunantwort länger erhalten zu bleiben als die humorale.

Zusammenfassend kommt [19] zu dem Schluss, dass eine Booster-Impfung bei Jugendlichen sich als sicher und effektiv erwiesen hat.

Wendelboe et al [3] stellten in einem Artikel 2005 die Immunitätsdauer gegen Pertussis nach natürlicher Infektion und nach Impfung gegenüber, welche anhand von Datenauswertung aus Literatur ermittelt wurde. Da nach den ersten Impferfolgen Ende der 1970er ein Infektionsanstieg zu beobachten war, musste davon ausgegangen werden, dass die durch Impfung erworbene Immunität zeitlich begrenzt ist. Zudem die Wahrscheinlichkeit der natürlichen Boosterung nach Impfung durch niedrigere Zirkulation von *Bordetella pertussis* in der Bevölkerung geringer ist.

In vorherigen Studien konnte eine Immunitätsdauer von 4 – 12 Jahren nach Ganzzellimpfung sowie Impfung mit azellulärem Impfstoff aufgezeigt werden, wobei die Impfschutzdauer nach Ganzzellimpfstoff eventuell etwas länger ist. Eine große Schwierigkeit einen Nachweis der Immunitätsdauer zu erbringen besteht darin, dass es keine sicheren serologischen Marker gibt. Ca. 2 Jahre nach natürlicher Infektion oder Impfung, sowohl nach Ganzzellimpfung als nach Impfung mit azellulärem Impfstoff, sinkt die Antikörperzahl unterhalb einer nachweisbaren Grenze, obwohl eine Immunität gegenüber der Erkrankung weiterhin bestehen bleibt.

Nach Datenlage muss man davon ausgehen, dass die schützende Immunität auch nach natürlicher Infektion nie lebenslang andauerte, sondern nach 7 – 20 Jahren nachließ. Die Dauer der Immunität sowohl nach Ganzzell- als auch azellulärer Impfung hält für 4 – 12 Jahre bei Kindern an.

Die Zusammenfassung [3] kommt zu dem Schluss, dass weitere Studien helfen würden, den optimalen Zeitpunkt und die geeignete Frequenz von Boosterimpfungen zu ermitteln und somit auch deren Rolle Pertussisinfektionen zu kontrollieren.

In einer Langzeit-follow-up-Studie von schwedischen Kindern die mit azellulärem Pertussis-Impfstoff im Alter von 3, 5 und 12 Monaten geimpft wurden, konnten

Gustafsson et al [8] im Jahr 2006 zeigen, dass die altersspezifische Inzidenz für 5 Jahre nach der dritten Impfdosis niedrig bleibt, sich aber im Alter von 6 – 8 Jahren erhöht.

Es konnte gezeigt werden, dass die höchste Inzidenz bei ungeimpften Kindern lag oder nach nur einer Impfdosis. Ein signifikanter Abfall der Inzidenz zeigt sich nach der zweiten und dritten Impfung mit azellulärem Pertussis-Impfstoff, ein erneuter Anstieg im siebten bis achten Lebensjahr. In der Ära vor der Pertussis-Impfung lag der Inzidenzgipfel bei 2 – 4 jährigen Kindern, in den folgenden Jahren zeigte sich ein Anstieg des Alters, so lag der Gipfel seit 2000 bei 5 Jahren, 2001 bei 6 Jahren, 2002 bei 7 Jahren und seit 2003 konstant bei einem Alter von 8 Jahren.

In Schweden konnte beobachtet werden, dass nach Einführung der Pertussis-Impfung mit azellulärem Impfstoff im Jahr 1996 ein deutlicher und rascher Rückgang der Pertussisinfectionen zu verzeichnen war und dass sich die Infektionsrate seit 2000 auf einem niedrigen Level stabilisiert hat.

Die Daten aus [8] zeigen somit, dass die Inzidenz für Pertussis nach der zweiten Impfdosis von DTaP im Alter von 5 Monaten merklich sinkt und dass der Schutz nach der dritten Dosis im Alter von 12 Monaten stabil bleibt bis zum 5. bis 6. Lebensjahr. In Schweden wird eine Boosterimpfung mit 10 Jahren empfohlen, da diese im Rahmen der 4. Dosis Diphtherie/Tetanus appliziert werden kann. Die Autoren stellen jedoch fest, dass anhand des geschilderten Inzidenzgipfels im Alter von 7 – 8 Jahren ein Auffrischung mit 10 Jahren nicht als optimaler Zeitpunkt für die Boosterung anzusehen ist.

Bereits im Jahr 2001 stellten Salmaso et al [6] die Ergebnisse einer in Italien durchgeführten Studie vor, bei der Effektivität des Impfschutzes von zwei DTaP-Impfstoff verschiedener Herstellern und einem DT-Impfstoff gegenüber gestellt wurden. In den ersten beiden Abschnitten der Untersuchung war gefunden worden, dass beiden DTaP-Impfstoffe eine schützende Wirkung für die ersten beiden Lebensjahre bzw. das dritte Lebensjahr nachgewiesen werden.

Im Anschluss sollte der Schutz vom dritten bis zum sechsten Lebensjahr überprüft werden. Bei der Nachuntersuchung innerhalb dieser 3 Jahre waren die diagnostisch gesicherten Pertussisinfectionen in allen drei Gruppen gleich verteilt und es zeigte

sich, dass die meisten Infektionsfälle im letzten Jahr der Studie und somit im Alter von 5 – 6 Jahren auftraten.

Die Gruppen unterschieden sich bei der durchschnittlichen Dauer der „Hustentage“ und auch der Tage mit spastischem Husten deutlich. Die Kinder in der DT-Gruppe husteten deutlich länger. Salmaso et al [6] kommen zu dem Schluss, dass der Impfschutz für 6 Jahre Bestand hat, so dass eine vierte Impfung im Vorschulalter zu empfehlen ist. Eine eventuelle zusätzliche Boosterimpfung in einem höheren Alter könnte ebenfalls helfen, Pertussisinfektionen bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen besser zu kontrollieren.

Da alle oben beschriebenen Studien ein relativ aufwändiges Design hatten, war es Ziel der hier vorgelegten Studie, zu überprüfen, ob auch mit Hilfe von Routinedaten aus dem diagnostischen Labor in Verbindung mit der Information über den Zeitpunkt der letzten Pertussis-Impfung vergleichbare Schätzungen zur Schutzdauer nach Impfung erheben lassen. Insoweit war diese Studie vor allem als eine Art „Proof-of-Principle“ angelegt.

Die diagnostischen Labordaten in Verbindung mit der Impfanamnese wurden genutzt, um die durchschnittliche Schutzdauer gegen Pertussis bei Kindern nach Impfung mit einem azellulären Impfstoff abzuschätzen.

Die Abschätzungen für die Dauer des Schutzes, die hierbei generiert wurden, sind mit denen nahezu identisch, die in komplexen und zeitaufwendigen Studien bezüglich der Effektivität der Impfung ermittelt wurden.

Für die Zukunft müssen Änderungen zur Abschätzung der Impfschutzdauer weiterhin untersucht werden. Wichtig wäre es, Verfahren zu finden, die weniger personal- und kostenintensiv sind.

Wie hier gezeigt werden konnte, konnten durch simple Routinedaten gleiche Mittelwerte des Impfschutzes ermittelt werden, wie sie in sehr teuren und aufwändigen Studien ebenso ermittelt wurden.

Eine weitere Möglichkeit wäre, eine regelmäßige Prüfung der Dauer des Impfschutzes mit einfachen Mittel, der sich bei Veränderung eine aufwändigere Impfstudie anschließt.

Auch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Infektionsquellen ähnliche sind, wie sie schon in anderen Studien aufgezeigt wurden.

Wie zum Beispiel in der schwedischen Studie von Storsaeter et al [20] im Jahr 2003, in der eine Transmission von kleinen Kindern, die an der oben bereits geschilderten schwedischen Impfstudie teilnahmen, auf andere Mitglieder des Haushaltes näher untersucht wurde.

Hierbei wurde bei klinischem Verdacht auf eine Pertussisinfektion, der durch genau definierte Kriterien gestellt wurde, nach objektiven, durch Laboruntersuchungen gesicherten, Parametern gesucht. Ein wichtiger Punkt war die Ermittlung von Infektionen innerhalb eines Haushaltes. So erfolgte bei positiver Testung einer Person die weitere Diagnostik aller anderen im Haushalt lebenden Personen. Es konnte bei 41% in Laboruntersuchungen Pertussis nachgewiesen werden, wobei von diesen nur 44% die klinischen Kriterien einer Infektion zeigten. 11% ohne Laborveränderungen hatten ebenfalls klinische Symptome und den festgelegten Kriterien zufolge eine Pertussisinfektion.

Die meisten Betroffenen hatten nur milde Symptome, so dass vermutlich die Pertussisinfektion außerhalb des Studiendesigns nicht diagnostiziert worden wäre. Auffallend war, dass in vorherigen Studien deutlich höhere Transmissionsraten eruiert wurden. So lagen die Werte in der amerikanischen Studie von Long et al [21] bei 83% Pertussisfälle bei im Haushalt lebenden Personen, wobei 28% Pertussissymptome aufwiesen. In der finnischen Studie von Mertsola et al [22] konnten auch bei 83% der im Haushalt lebenden Personen Pertussis nachgewiesen werden, hier zeigten sogar 44% klinische Symptome einer Pertussisinfektion. Storsaeter et al [20] vermuteten die Unterschiede für die hier beschriebene niedrigere Pertussisrate am ehesten darin begründet, dass in Schweden zwischen den Jahren 1979 und 1996 Pertussis nicht im Impfschema enthalten war und somit Jugendliche und junge Erwachsene einer höheren Exposition mit natürlich zirkulierenden *Bordetella pertussis*-Infektionen ausgesetzt waren. Dadurch wird eine natürliche Boosterung stattgefunden haben.

Kürzlich wurde eine Studie zur Effektivität der azellulären Pertussis-Impfung aus einer großen Krankenhauskette (HMO = Health Maintenance Organisation, hier Kaiser Permanente) veröffentlicht [23]. In weitgehender Übereinstimmung mit den

hier gefundenen Daten zeigten auch diese Autoren im Rahmen eines großen Pertussis-Ausbruchs in Kalifornien, dass bei den 8-12 Jährigen nur noch eine Impfeffektivität von 24% beobachtet wurde. Aufgrund der großen Datenbasis einer HMO war es möglich, zur Schätzung der Impfeffektivität die Durchimpfungsraten einer gesamten Kohorte als Grundlage herbeizuziehen. Der in der Arbeit auch in einer Abbildung gezeigte mittlere Impfabstand bewegt sich wie auch hier gefunden bei den acht- bis zehnjährigen Kindern zwischen vier und sechs Jahren.

Insgesamt konnten wir zeigen, dass der hier beschriebene Ansatz genutzt werden kann, um die Langlebigkeit des Schutzes durch die Impfung mit azellulärem Pertussis-Impfstoff zu überwachen. Zudem könnte er hilfreich sein, eine eventuelle Veränderung in der Schutzdauer aufzuspüren. Ein möglicher Nachteil dieses Ansatzes liegt im Fehlen einer Kontrollgruppe, so dass mit Hilfe dieses Surrogatmarkers lediglich ein Signal generiert wird, das einer Verifizierung in kontrollierten Studien bedarf.

Aufgrund der sehr ähnlichen Altersstruktur des hier untersuchten Kollektivs im Vergleich zur Altersstruktur der in den neuen Bundesländern gemeldeten PCR-positiven Fälle und wegen der weiter oben im Detail beschriebenen ähnlichen Zusammensetzung der Infektionsketten nehmen wir an, dass unsere Daten keinen größeren Bias hinsichtlich der Probandenselektion enthalten dürften.

Verwendet man den hier beschriebenen Ansatz würde eine Studie, die einen Unterschied von einem Jahr Schutzdauer mit einer statistischen Teststärke von 0,8 bei einem alpha von 0,05 nachweisen soll, mit etwa 125 positiv getesteten Patienten bestückt sein, eine Studie mit einer Stärke von 0,9 müsste entsprechend etwa 300 PCR-positive Patienten einschließen. Die Studiendaten sind aufgrund der Größe unseres Kollektivs (~100 positive Patienten) demnach lediglich für einen Vergleich mit einer Abweichung von mehr als 0,5 Jahren Schutzdauer geeignet,

5 Zusammenfassung

Fragestellung: Pertussis wird durch *Bordetella pertussis* oder auch durch *Bordetella parapertussis* hervorgerufen, kann in jedem Lebensalter vorkommen und ist insbesondere für Säuglinge eine mitunter lebensbedrohliche Erkrankung. Die aktuell zur Verfügung stehenden azellulären Impfstoffe sind sicher und effektiv. Da die Bakterien nicht durch die Impfung eradiziert werden können und weiter zirkulieren, ist es wichtig, die Effektivität der Impfstoffe kontinuierlich zu überwachen. Zur Frage der Dauer des Impfschutzes wurden mehrere aufwändige Studien durchgeführt, in denen die Dauer der unveränderten Wirkung auf 5-6 Jahre geschätzt wurde. Die hier beschriebene Studie beschäftigte sich damit, ob es möglich ist, ein aus diagnostischen Routinedaten abzuleitendes einfaches Korrelat für die Dauer des Impfschutzes zu entwickeln.

Methodik: Es wurden 100 konsekutiv gesammelte, in der PCR auf *B. pertussis*-DNA positiv getestete Pharyngealabstriche von Kindern zwischen 0 und 16 Jahren aus fünf verschiedenen Kinder- und Jugendarztpraxen eingeschlossen. Von diesen Kindern und Jugendlichen wurde neben anderen Daten der Abstand zur letzten Impfung gegen Pertussis sowie die gesamte Impfanamnese erhoben. Als Vergleichsgruppe wurden 189 Kinder aus drei der fünf Praxen definiert, von denen im gleichen Zeitraum eine in der PCR auf *B. pertussis*-DNA negativ getestete Probe eingesandt worden war. Auch bei diesen Kindern und Jugendlichen wurde der Abstand zur letzten Pertussis-Impfung ermittelt, sowie die Impfanamnese erhoben.

Ergebnisse: Das Kollektiv mit dem Nachweis von *B. pertussis*-DNA war im Mittel 8,45 Jahre alt mit einem 5-95% Intervall zwischen 0,8 und 13,3 Jahren. Der Abstand zur letzten Impfung betrug in dieser Gruppe durchschnittlich 6,18 Jahre und die mittlere Dauer betrug bei 6,57 Jahre. Das Kollektiv mit einer negativen *B. pertussis*-PCR war im Mittel 4,9 Jahre alt mit einem 5-95% Intervall zwischen 0,8 und 13,3 Jahren. Der mittlere Abstand zur letzten Pertussis-Impfung in der PCR-negativen Gruppe betrug lediglich 1,76 Jahre, der durchschnittliche Impfabstand betrug 2,2 Jahre. Die PCR-positive Gruppe war signifikant ($p < 0,05$) älter als die PCR-negative Gruppe. Die Unterschiede in der Dauer des Impfabstandes zwischen der PCR-

positiven Gruppe und der PCR-negativen Gruppe war hingegen hochsignifikant ($p < 0,001$).

Schlussfolgerung: Diese Studie war primär als „proof-of-principle“ angelegt. Der hier beschriebene einfache Ansatz kann genutzt werden, um die „Langlebigkeit“ des Schutzes durch die Impfung mit azellulärem Pertussis-Impfstoffen zu überwachen, indem mittels PCR-Ergebnis und Impfdokumentation ein Signal für eine Veränderung in der Schutzdauer relativ einfach und frühzeitig aufgespürt werden kann.

6 Literatur

1. Edwards KM, Decker MD: Pertussis Vaccine pp. 467-518 in: SA Plotkin, WA Orenstein P Offitt (Hrsg) Vaccines, 5 Auflage, 2008; Saunders, Philadelphia, PA, USA
2. Ward JI, Cherry JD, Chang SJ et al.: Efficacy of an acellular pertussis vaccine among adolescents and adults. N.Engl.J.Med. 2005; 353: 1555-1563
3. Wendelboe A, van Rie A, Salmaso S, Englund JE: Duration of Immunity against pertussis after natural infection or vaccination, 2005; Pediatr Infect Dis J 24: S58-S62
4. Simondon KB, Ndiaye T, Dia M et al.: Seasonal variations and trends in weight and arm circumference of non-pregnant rural Senegalese women, 1990-1997. Eur J Clin Nutr. 2008 Aug;62(8):997-1004. Epub 2007 May 30.
5. Tinberg Y, Blennow M, Granström M et al: A ten year follow-up after immunization with a two component acellular pertussis vaccine, Pediatr Infect Dis J. 1999 Apr;18(4):361-5
6. Salmaso S, Mastrantonio P, Tozzi AE et al.: Sustained efficacy during the first 6 years of life of 3-component acellular pertussis vaccines administered in infancy: the Italian experience. 2001, Pediatrics, 108: e81
7. Lugauer S, Heininger U, Cherry JD, Stehr K. et al: Long-term clinical effectiveness of an acellular pertussis component vaccine and a whole cell pertussis component vaccine. Eur J Pediatr. 2002 Mar;161(3):142-6.

8. Gustafsson L, Hessel L, Storsaeter J et al.: Long-term Follow-up of Swedish children vaccinated with acellular pertussis vaccines at 3, 5, and 12 month of age indicates the need for a booster dose at 5 to 7 years of age. 2006, *Pediatrics*, 118: 978-984
9. Hellenbrand W, Beier D, Jensen E, Littmann M et al: The epidemiology of pertussis in Germany: past and present.*BMC Infect Dis.* 2009 Feb 25;9:22
10. Mooi FR: *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically pathogen, 2010, *Infect Genet. Evol.* 2010; 10(1): 36-49
11. Koesters K, Riffelmann M, Wirsing von Koenig CH: Real-time lightCycler PCR for detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *B.parapertussis*. *J.Clin.Microbiology* 40: 1719-1722 (2002)
12. Riffelmann M, Wirsing von König CH, Caro V, Guiso N. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. *J.Clin.Microbiol.* 43, 10, 4925-4929 (2005)
13. Riffelmann M, Schmetz J, Bock S, Wirsing von Koenig CH. Preparation of *Bordetella pertussis* DNA from respiratory samples for real-time PCR by commercial kits.*Eur.J.Clin.Microb.Infect.Dis.* 27:142-145 (2008)
14. He Q, Edelman K, Arvilommi H, Mertsola J: Protective role of immunoglobulin G antibodies to filamentous heamagglutinin and pertactin of *Bordetella pertussis* in *Bordetella paparpertussis* infection. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 1996; 15: 793-98
15. Jenkinson D. Duration of effectiveness of pertussis vaccine: evidence from a 10 year community study. *Br Med J* 1988; 296: 612-614.
16. Van Buynder PG et al.: *Bordetella pertussis* surveillance in England and Wales 1995-1997. *Epidemiol.Infect.* 1999; 123:403-411

17. Torvaldsen S, Simpson JM, McIntyre PB: Effectiveness of pertussis vaccination in New South Wales, Australia, 1996-1998. *Eur.J.Epideiol.* 2003; 18:63-69
18. Broutin H, Simondon F, Rohani P et al.: Loss of immunity to pertussis in a rural community in Senegal. 2004, *Vaccine* 22: 594-596
19. Edwards KM: Overview of Pertussis, Focus on epidemiology, sources of infection and long term protection after infant vaccination, 2005, *Ped.Inf.Dis.J* 24: 104-108
20. Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L et al.: Low level of antipertussisantibodies plus lack of history of pertussis correlate with susceptibility after household exposure to *Bordetella pertussis*. 2003, *Vaccine* 21: 3542-3549
21. Long SS, Welkon CJ, Clark JL et al.: Widespread silent transmission of pertussis in families: antibodies correlates of infection and symptomatology, 1990, *J. Infect. Dis.* 161: 480-486
22. Mertsola J, Ruuskanen O, Eerola E et al.: Intrafamilial spread of pertussis. 1983, *J. Pediatr.* 103: 359-363
23. Witt MA; Katz PH, Witt DJ. 2012. Unexpectedly limited durability of immunity following acellular pertussis vaccination in preadolescents in a North American outbreak. *Clin.Infect.Dis.* 54: 1730-1735

7 Anhang:

- 1.) Fragebogen zum Interview hinsichtlich der Infektionsquellen
Seite 1:

Fragebogen

Praxis:

Patient:

Name: **Vorname:** **Geb. am:**

Geschlecht: männlich
weiblich

Einsenddatum des Materials: __/__/__

Familienname: _____

Adresse: _____

Telefon-Nummer: _____

Schule / -Klasse / Kindergarten / KITA

Impfstatus:

vollständig	<input type="checkbox"/>	
altersentsprechend	<input type="checkbox"/>	Anzahl <input type="checkbox"/>
unvollständig	<input type="checkbox"/>	Anzahl <input type="checkbox"/>
Adoleszenten-Booster	<input type="checkbox"/>	

Datum letzte Impfung: __/__/__

Impfstoff der letzten Impfung:

Fragebogen zum Interview hinsichtlich der Infektionsquellen Seite 2:

Geschwisterkind 1:

Geschlecht: männlich
weiblich

geb. am: __/__/__

Keuchhusten-Symptome im zeitlichen Zusammenhang mit der Keuchhustenerkrankung des / der Patient/-en/-in:

nein ja

Impfstatus:

vollständig
altersentsprechend Anzahl
unvollständig Anzahl
Adoleszenten-Booster

Datum letzte Impfung: __/__/__

Impfstoff der letzten Impfung:

2.)SOP der real-time PCR

Reagenzien und Geräte

- LightCycler - FastStart DNA Master HybridizationProbes (Roche):
 1. LightCycler - FastStart Enzyme (1a rotes Deckelchen): 15 x 64 µl (10x) readytouse „Hot Star“ reaction mix für PCR nach zusammen pipettieren von 1b und 1a
 2. LightCycler – FastStart Reaction Mix Hybridization Probes, 10x conc. (1b farbloses Deckelchen): FastStartTaq DNA polymerase, reactionbuffer, dNTPs (mit dUTP anstatt dTTP) und 10 mM MgCl₂
 3. MgCl₂ 25 mM (2 blaues Deckelchen): 2 x 1 ml
 4. steriles Aqua dest (3 farbloses Deckelchen): 7 x 1 ml
- Für *B. pertussis*:
 - Forward Primer (BP-1)
 - Reverse Primer (BP-2)
 - Sonde (BP-FLU)
 - Sonde (BP-LCR)
- Für *B. parapertussis*:
 - Forward Primer (BPa-1)
 - Reverse Primer (BPa-2)
 - Sonde (BPa-HP-1)
 - Sonde (BPa-HP-2)
- LightCyclerCapillaries (Roche)
- Tischzentrifuge 5417 C (Eppendorf)
- Sterile 1,5 ml EppendorfCaps (Eppendorf)
- LightCyclerCentrifugeAdapters: 32 AdaptersimAluminiumKühlblock (Roche)

Primer/Sonden Spezifikation für Pertussis:

Primer und Sonden stammen aus dem Bereich des IS 481 von B.pertussis

Primer BP-1: 5'- gAT TCA ATA ggTTgTATg CAT ggT T

Primer BP-2: 5'- TTC Agg CAC ACA AAC TTgATgggC g

Sonde (Fluorescein): BP-FLU: 5'- TCg CCA ACC CCC CAg TTC ACT CA-F

Sonde (LC-Red 640): BP-LCR: 5' - LC-RED-640-AgC CCggCCggATgA ACA CCC P

Accession Number:

Bordetella pertussis Tohama I: ATCC BAA-589, NCTC 13251

771672 Genom-NT laut Sanger Institut (<http://www.sanger.ac.uk>)

```
GCGAGGCCGG CTATCTGTGA A GATTCAATA GGTTGTATGC ATGGTT CATC CGAACCGGAT 60
TTGAGAAACT GGAAA TCGCC CACCCCCCAG TTCACTCA AG GAGCCCGGCC GGATGAACAC 120
CCATAAGCAT GCCCGATTGA CTTTCCTACG TCGACTCGAA ATGGTCCAGC AATTGAT CGC 180
CCATCAAGTT TGTGTGCCTG AA GCGGCCCG CGCCTATGGG GTCACCGCGC CGACTGTGCG 240
CAAATGGCTG GGCCGCTTCC TGGCTCAGGG CCAGGCGGGC TTGGCCGATG CGTCCTCGCG 300
CCCGACGGTC TCGCCCCGAG CGATTGCGCC GGCCAAGGCG CTGGCTATCG TGGAGCTGCG 360
CCGCAAGCGG CTGACCCAAG CGCGCATCGC CCAGGCGCTG GGCGTGTGAG CCAGCACCGT 420
CAGCCGCGTC CTGGCCCCGCG CCGGTCTGTC GCACCTGGCC GACCTGGAGC CGGCCGAGCC 480
```

Primer/Sonden Spezifikation für Parapertussis:

Primer und Sonde stammen aus IS1001-Genbereich

Primer Bpa-1: 5'- CAC CgC CTA CgAgTTggAgAT

Primer Bpa-2: 5'- CCT CgA CAA TgCTggTgT TCA

Sonde (Fluorescein-markiert) BPa-HP-1: gTT CTA CCA AAg ACC TgCCTgggC-F

Sonde (LC-RED 705): BPa-HP-2: LCR-AgA CAA gCCTgg AAC CAC Tgg TAC P

Accession Number:

Bordetellaparapertussis 12822: ATCC BAA-587, NCTC 13253

TGCGCGAACCGGATTGGTCCAAGATCGAGTATTTGGCGATGGACGAGTTTGCCCTGCACAAAGGGCATCGC
TACGCGACAGTGGTGGTCGATCCGATCGGCAGGCAGGTGCTGTGGATTGGCCCAGGACGCTCACGCGAGA
CGGCCCGGGCGTTCTTGAACAATTGCCGCCTGGGGCCGCCAACGCATCAAGGCCGTTGCCATCGACAT
GAC**CACCGCCTACGAGTTGGAGAT**CCAGGCCACAGCCCACAGGCGGAGATCGTCTATGACTTGTCCATG
TCGTGGCCAAGTATGGACGAGAGGTCATTGATCGGGTGC GCGTGGATCAGGCCAATCAACTACGCCAGGAT
CGTCCCACGACGAGGATCATCAAATCGAGTCGCTGGCTGCTGCTGCGCAACCGTGACAACCTGGATCGGCA
GCAGGCCGTCCGGCTCGACGAATTGCTGCAAGCCAACCAGCCGCTGCTGACGGTCTATGTCCTGCGTGACG
AACTCAAACGGCTCTG**GTTCTACCAAAGACCTGCCTGGGC****AGACAAGCCTGGAACCACTGGTAC**GAGCAG
GCCGAGCAAAGCGGAATAGCCGCCTTGAACACCTTCGCTCAGCGCTTCAAAGGCTATCTGCACGGCATCCT
GGCCAGATGCCGACATCCCC**TGAACACCAGCATTGTTCGAGG**GCATCAACAACACTATCAAGGTCATCAAGC
GGCGCGTTACGGCTACCGCGACCAGGAATACTTCTTCTCAAATCCGTGCCGCCTTCCCCGGCAATGCC
CGATGAACC

LagerungderReagenzien:

	Lagerung	Haltbarkeit
Fast startenzyme (1a)	bei - 15 °C bis - 25 °C	bis Verfallsdatum
Fast start reaction mix hybridisation probes (1b)	bei - 15 °C bis - 25 °C	bis Verfallsdatum
FastStart DNA Master Hybridisation Probes (1a + 1b)	- 15 °C bis - 25 °C, wiederholtes Auftauen und Wieder einfrieren vermeiden, lichtgeschützt! nach 1 x Auftauen 2 - 8 °C	3 Monate 1 Woche
MgCl ₂	bei - 15 °C bis - 25 °C	bis Verfallsdatum
Primer und Sonden	lyophilisiert bei 4 °C verdünnt bei - 15 °C bis - 25 °C	
A. bidest	bei Raumtemperatur	bis Verfallsdatum
Kontrollabstrichmaterial sowie deren Extrakte	bei - 20 °C oder bei - 80 °C (QM_VA_016)	

Qualitätskontrolle

In jedem Testansatz werden positive Kontrollen (niedrig und hoch positiv) sowie notemplate Kontrollen (NTC) mit analysiert.

Testlauf

Probenvorbereitung:

Das Untersuchungsmaterial sowie die Kontrollen werden mit dem QIAamp DNA Mini Kit extrahiert [12].

Positive Kontrollen:

Pro PCR Lauf werden je eine hoch positive (Crossingpoint ca. 25) Kontrolle (verdünnte Bakteriensuspension) und eine niedrig positive (Crossingpoint ca. 35) Kontrolle (verdünnte Bakteriensuspension) mitgeführt.

Negative Kontrolle:

Pro Testansatz wird mindestens ein PCR-Ansatz mit Wasser statt DNA-Extrakt mitgeführt.

Vorbereitung der Reagenzien

- „Hot Start“ reaction Mix: 1a und 1b Hütchen auftauen und kurz anzentrifugieren, 60 µl von dem 1b Hütchen (LightCycler – FastStartReaction Mix HybridizationProbes) in das Hütchen 1a (LightCycler – FastStart Enzyme) pipettieren und anschließend vorsichtig mit der Pipettenspitze mischen (nicht vortexen). Das Hütchen nun mit dem Etikett LightCycler – FastStart DNA Master HybridizationProbes bekleben und auf dem Deckel das rote Etikett mit der Nr.1 aufkleben.
- Primer BP-1, BP-2, Bpa-1 und Bpa-2 auf 10 pmol/µl mit Aqua dest verdünnen.
- Sonden BP-FLU, BP-LCR, BPa-HP-1 und BPaHP-2 auf 4 pmol/µl mit Aqua dest verdünnen.

Testdurchführung

1. Benötigte Menge an Reagenzien berechnen.

Arbeitsbereich (Mix-Platz)

2. Arbeitsfläche mit steriler Unterlage abdecken.
3. Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen und in den Kühlblock stellen, sowie die benötigten Capillaries in den Zentrifugen Adapter des Kühlblocks stellen (Capillaries nur mit Handschuhen anfassen!)
4. Master-Mix nach folgendem Schema in dem Kühlblock pipettieren (Volumenangabe beziehen sich auf eine Probe):

Master-Mix für Bordetella pertussis-PCR:

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
Aqua dest (farblose Kappe)	6,6 µl	
DNA Master (rote Kappe)	2 µl	
MgCl ₂ (blaue Kappe) 25 mM	2,4 µl	4 mM
Primer BP-1 (10 pmol/µl)	1 µl	0,5 pmol/µl
Primer BP-2 (10 pmol/µl)	1 µl	0,5 pmol/µl
Sonde BP-FLU (4 pmol/µl)	1 µl	0,2 pmol/µl
Sonde BP-LCR (4 pmol/µl)	1 µl	0,2 pmol/µl
Gesamtvolumen	15 µl	

Master-Mix für Bordetella parapertussis-PCR:

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
Aqua dest (farblose Kappe)	6,6 µl	
DNA Master (rote Kappe)	2 µl	
MgCl ₂ (blaue Kappe) 25 mM	2,4 µl	4 mM
Primer BPa-1 (10 pmol/µl)	1 µl	0,5 pmol/µl
Primer BPa-2 (10 pmol/µl)	1 µl	0,5 pmol/µl
Sonde BPa-HP-1 (4 pmol/µl)	1 µl	0,2 pmol/µl
Sonde BPa-HP-2 (4 pmol/µl)	1 µl	0,2 pmol/µl
Gesamtvolumen	15µl	

5. Mix vorsichtig mischen.
6. 15 µl Aliquot in die LightCycler Capillaries pipettieren.
7. Für die Negativ-Kontrolle jeweils 5 µl Aqua dest in eine Capillary pipettieren und mit dem Stopfen verschließen.

Arbeitsbereich III (Probenpipettier-Platz)

8. Je 5 µl DNA-Extrakt (Patientenmaterial, positive Kontrollen) hinzufügen.
9. Capillaries mit den Stopfen verschließen und die Capillaries mit den Einsätzen in die Zentrifuge stellen und bei 3000 rpm 5 sec zentrifugieren.
10. Capillaries in das Probenkarussell stellen.

Reihenfolge der Kontrollen und Patienten:

1. Negativ-Kontrolle Bordetella pertussis-PCR
2. Patient 1 und folgende Bordetella pertussis-PCR
3. Positiv-Kontrollen Bordetella pertussis-PCR
4. Negativ-Kontrolle Bordetella parapertussis-PCR
5. Patient 1 und folgende Bordetella parapertussis-PCR
6. Positiv-Kontrollen Bordetella parapertussis-PCR

Arbeitsbereich IV (Amplifikations-Platz)

11. Probenkarussell in den LightCycler stellen und Gerät starten.

Thermocycler-Bedingungen für die Bordetella pertussis und B. parapertussis:-PCR:

Programm 1 Denaturierung:

Cycle Program Data	Value
Cycles	1
Analysis Mode	None
Temperatures Targets	Segment 1
Target Temperature (°C)	95
Incubation Time (hrs:min:sec)	0:10:00
Temperature Transition Rate (°C/sec.)	20.0
Second Target Temperature (°C)	0
Step Size (°C)	0.0
Step Delay (Cycles)	0
Acquisition Mode	None

Programm 2: Amplifikation:

Cycle Program Data	Value		
Cycles	40		
Analysis Mode	Quantification		
Temperatures Targets	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Target Temperature (°C)	95	60	72
Incubation Time (hrs:min:sec)	10	10	20
Temperature Transition Rate (°C/sec.)	20.0	20.0	20.0
Second Target Temperature (°C)	0	0	0
Step Size (°C)	0.0	0.0	0.0
Step Delay (Cycles)	0	0	0
Acquisition Mode	None	Single	None

Programm 3: Schmelzkurve:

Cycle Program Data	Value		
Cycles	1		
Analysis Mode	Melting Curve		
Temperatures Targets	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Target Temperature (°C)	95	45	95
Incubation Time (hrs:min:sec)	0	30	0
Temperature Transition Rate (°C/sec.)	20.0	20.0	0.1
Second Target Temperature (°C)	0	0	0
Step Size (°C)	0.0	0.0	0.0
Step Delay (Cycles)	0	0	0
Acquisition Mode	None	None	Cont.

Programm 4: Cooling:

Cycle Program Data	Value
Cycles	1
Analysis Mode	None
Temperatures Targets	Segment 1
Target Temperature (°C)	40
Incubation Time (hrs:min:sec)	0:02:00
Temperature Transition Rate (°C/sec.)	20.0
Second Target Temperature (°C)	0
Step Size (°C)	0.0
Step Delay (Cycles)	0
Acquisition Mode	None

Die Interpretation der aufgenommenen Analysendaten erfolgt anhand der Amplifikationskurven sowie der Schmelzkurve.

Die *Bordetella pertussis*-PCR wird im Fluoreszenz Kanal F2 (Kanal für LC-Red 640) beurteilt, die *Bordetella paraptussis*-PCR im Fluoreszenz Kanal F3 (Kanal für LC-Red 705).

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Altersverteilung der gemeldeten Pertussis Fälle aus Sachsen und gemeldete Pertussis Fälle aus Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen-Anhalt und Thüringen in den Jahren 2000-2003.(Seite 12)

Abbildung 2: Anatomische Strukturen bei der Entnahme nasopharyngealer Abstriche (Abbildung mit Genehmigung Frau Prof. Dr. Nicole Guiso, Institut Pasteur, Paris)(Seite 16)

Abbildung 3: Histogramm der Altersverteilung der gesamten Studienkohorte (Seite 22)

Abbildung 4: Studiendesign mit Angaben zur Zusammensetzung der Studienkohorte (Seite 24)

Abbildung 5: Histogramm zum Zeitabstand zur letzten Impfdosis (Seite 25)

Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve zur Dauer des Impfschutzes nach letzter Impfdosis (Seite 26)

Abbildung 7: Zeitabstand zur letzten Impfung ohne Impflinge, deren Impfung weniger als 3 Jahre zurücklag (fragliche primäre Impfversager) (Seite 27)

Abbildung 8: Schematisches Beispiel einer Infektionskette (Seite 29)

Abbildung 9: Histogramm der Altersverteilung der PCR-negativen Gruppe (Seite 32)

Abbildung 10: Zeitabstand seit der letzten Impfdosis bei Patienten mit positiven und negativen Ergebnissen im Nasopharyngealabstrich für *B. pertussis*-DNA(Seite 34)

9 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Zusammensetzung der Pertussis-Komponenten der in Deutschland zugelassenen Pertussis-Impfstoffe für die Grundimmunisierung von Säuglingen und für die Booster-Impfung im 2. Lebensjahr. (Seite 8)
- Tabelle 2: Auffrischimpfstoffe mit Pertussis-Komponenten (Seite 9)
- Tabelle 3: Studien zur gleichbleibenden Schutzwirkung von azellulären Pertussis-Impfstoffen (modifiziert nach Wendelboe et al., 2005 [3]) (Seite 11)
- Tabelle 4: Angaben zu möglichen Infektionsquellen (Seite 28)
- Tabelle 5: Angaben zur möglichen Ausbreitung (Infektionsketten)(Seite 29)
- Tabelle 6: Modifiziertes Studiendesign aufgrund der Ergebnisse der *B. pertussis* PCR und des verfügbaren Impfstatus.(Seite 31)
- Tabelle 7: Zeitabstand zur letzten Impfung bei PCR-positiven und PCR-negativen Patienten. Kinder mit mehr als acht Jahren Abstand zur letzten Impfung wurden als vermeintlich ungeimpfte Referenz definiert.(Seite 33)
- Tabelle 8: Geschätzte Schutzdauer nach drei Dosen Pertussisimpfstoff adaptiert aus: The immunological basis of vaccination: Pertussis
http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599337_eng.pdf
(Seite 36)

10 Abkürzungsverzeichnis

PT = Pertussis-Toxin

FHA = filamentöses Hämagglutinin

TCT = Trachea-Zytotoxin

PRN = Pertactin

CFU = colony-forming unit

FIM = Fimbrientypen

aP = acellularpertussis

IPV = inaktivierten Polioviren

STIKO = Ständige Impfkommission

DTaP = Diphtherie Tetanus acellular pertussis

Hib = *Haemophilus influenzae* Typ b

HBV = Hepatitis-B-Antigen

Tdap = Tetanus diphtherie acellular pertussis

TdapIPV = Tetanus diphtherie acellular pertussis inaktivierten Polioviren

DNA = Desoxyribonukleinsäure

PCR = Polymerasekettenreaktion

FRET (fluorescenceresonanceenergytransfer)

Pos/Neg = Anzahl der Patienten mit positiver oder negativer *Bordetella*-PCR

OR = Odds ratio

Eff. = grobe Schätzung der Effektivität

REF = Referenzpopulation

95% CI = 95% Konfidenzintervall

wP = „Ganzzell-Impfstoffe“

DT-Impfstoff = DiphtherieTetanus-Impfstoff

HMO = Health Maintenance Organisation

WHO = Weltgesundheitsorganisation

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Krefeld, den 15. März 2014

Unterschrift