



**МЕДИЦИНСКИ
УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

КАТЕДРА ПО ПЕДИАТРИЯ

д-р Илия Атанасов Мангъров

**Антитела срещу Бордетела пертусис
при родилки и техните новородени деца**

АВТОРЕФЕРАТ

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
за присъждане на образователна и научна степен
“ДОКТОР”**

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ
Доц. д-р Ралица Вилсон Георгиева, дм

София, 2020

Изказвам благодарност на:

Научен ръководител

Сърдечна благодарност на доц. д-р Ралица Вилсон Георгиева за нейната всеотдайна помощ, конструктивни предложения, отзивчивост и професионализъм.

Катедра по Педиатрия

Благодаря и на всички колеги от Катедра по педиатрия и специално на колегите от Клиниката по неонатология, които бяха винаги до мен и ме подкрепяха, помагаша и съветваха.

Първа специализирана акушеро-гинекологична болница за активно лечение „Света София“

Благодаря на колегите от родилна зала и от неонатологично отделение за предоставената възможност за събиране на данни.

Лаборатория по Клинична имунология – УБ Лозенец, София

Благодаря на д-р Цветелина Великова за оказаната помощ при извършване на серодиагностиката.

Съавтори

Благодаря и на всички съавтори в статиите: доц. Р. Георгиева, проф. К. Вутова, гл. ас. д-р Д. Влахова, д-р В. Велев, д-р Д. Дянкова, д-р С. Симеонова, д-р В. Данкова, д-р М. Павлова, д-р В. Томова, д-р Е. Николова.

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

**КАТЕДРА ПО ПЕДИАТРИЯ
КЛИНИКА ПО НЕОНАТОЛОГИЯ**

Д-р Илия Атанасов Мангърров

**Антитела срещу Бордетела пертусис
при родилки и техните новородени деца**

**АВТОРЕФЕРАТ
НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА
СТЕПЕН “ДОКТОР”**

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт“

Научна област „Медицина“

Научна специалност „Педиатрия“ Шифър: 03.01.50

Научен ръководител: Доц. д-р Ралица Георгиева, дм

София, 2020

Дисертационният труд е написан на 131 стандартни машинописни страници и е онагледен с 36 таблици и 57 фигури. Библиографската справка съдържа 188 литературни източника, от които 5 на кирилица и 183 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на Катедрен съвет (Протокол № 91/04.12.2019) към Катедрата по педиатрия, Медицински Университет – София.

Дисертантът е редовен докторант (Заповед № РК36-3200/27.12.2016 и РК36-774/03.05.2017) към Катедра по педиатрия към Медицински Университет – София и работи в Клиника по неонатология в Специализирана болница за активно лечение по детски болести „Проф. д-р Иван Митев“-ЕАД, София. Докторантът е отчислен с право на защита със Заповед № РК36-2685/27.12.2019.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 1 април 2020г. от 14.00 часа в аудиторията на СБАЛДБ „Проф. д-р Иван Митев“ - ЕАД, гр. София, бул. „Акад. Иван Гешов“ № 11, пред научно жури в състав:

Официални рецензенти:

Проф. д-р Златко Николов Кълвачев, дмн

Доц. д-р Гергана Петрова Стоянова, дм

Становища:

Проф. д-р Иван Олегович Литвиненко, дм

Проф. д-р Ваня Недкова Недкова-Коларова, дм

Проф. д-р Мирослава Николова Бошева, дм

Материалите по защитата са на разположение в деловодството на Катедра по педиатрия и в отдел „Наука“ на Медицински Факултет към Медицински Университет – София.

СЪДЪРЖАНИЕ:

I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	7
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	9
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	10
Дизайн на проучването	10
Лабораторни методи.....	11
Статистически методи.....	12
IV. РЕЗУЛТАТИ.....	14
Резултати от анкетата.....	14
Anti-PT IgG нива на майките	20
Anti-PT IgG нива на новородените	27
Общо двойки майка-новородено.....	31
Двойки майка-доносено новородено	40
Двойки майка-недоносено новородено	46
Трансплацентарен трансфер на антителата	51
Екстраполиране на антителата при новородените на 6 седмична възраст	61
Честота на инфекцията сред жени в детородна възраст	62
V. ДИСКУСИЯ	63
VI. ЛИТЕРАТУРА	73
VII. ИЗВОДИ.....	77
VIII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	78
IX. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	78

Използвани съкращения

г.с.	гестационна седмица
САЩ	Съединени американски щати
СЗО	Световна здравна организация
ACIP	Advisory Committee on Immunization Practices
<i>aP</i>	ацелуларна коклюшна ваксина
CDC	Center for Disease Control
DTwP	дифтерия, тетанус и целоклетъчна коклюшна ваксина
DTaP	дифтерия, тетанус и ацелуларна коклюшна ваксина за деца
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay - Ензимно свързан имуносорбентен анализ
FcRn	neonatal Fc receptor – неонатален Fc рецептор
GMC	geometric mean concentration - геометрична средна концентрация
IgG	Imunoglobulin G - имуноглобулин Г
IPV	Inactivated poliovirus vaccine – инактивирана полиовирусна ваксина
IU/ml	International Units per millilitre
PCR	Polymerase Chain Reaction – Полимеразна верижна реакция
PT	pertussis toxin - пертусис токсин
Td	tetanus, diphtheria – тетанус, дифтерия
Tdap	тетанус, дифтерия и ацелуларна коклюшна ваксина за възрастни
<i>wP</i>	целоклетъчна коклюшна ваксина

I. Въведение

Коклюшът (наричан още: магарешка кашлица, пертусис) е остро инфекциозно заболяване, което протича с прояви на катарално възпаление на горните дихателни пътища, последвани от стадий с пароксизмална кашлица, завършваща с инспираторен реприз и повръщане. Заболяването е силно заразно и може да доведе до сериозни усложнения, включително и смърт, най-често при новородените и кърмачетата. Коклюшната инфекция се причинява от *B. pertussis*, който е ендемичен за всички страни, като причинява периодични епидемии на всеки 3-4 години. Това донякъде може да се обясни с добре документираната изменчивост на *B. Pertussis* чрез поне три известни механизма: 1) антигенно изместване от покритите от aP ваксината антигени; 2) изтриване на покритите от aP ваксината антигени; 3) свръхпродукция на антигени.

Рутинната имунизация срещу коклюш е въведена в България през 1957 година. В България докладваните случаи на коклюш са сравнително малко. Според имунизационния календар на Република България, жените, които към 2019 година са в детеродна (15-46 години) възраст са били имунизирани с *wP*, като бустер са получили на 4 годишна възраст. *wP* ваксините поради самото си естество включват стотици или хиляди нестандартизирани антигени в различни концентрации, докато ацелуларните ваксини съдържат 1 – 5 високо пречистени антигени на *B. pertussis*. През последните 30 години и особено след въвеждането на ацелуларните ваксини за коклюш (*aP*), в световен мащаб се наблюдава постоянно увеличаване на случаите на коклюш във всички възрастови групи и най-вече сред новородените и най-малките непълно имунизирани кърмачета. Ключов момент е, че имунните реакции предизвиквани от *aP* ваксините се различават фундаментално от тези предизвиквани от *wP* ваксините и не водят до създаване на лигавичен имунитет.

Подобно на други протеинови антигени, съществува активен плацентен трансфер на майчините коклюш-специфични антитела, което води до значително повишени нива на

специфичен за коклюша IgG, достъпен за новородените. Като правило трансферираните майчини антитела напълно изчезват до 6-ия месец от живота на детето. Като пълна защита за кърмачета се счита периода след последната имунизация на 1 година и 4 месеца. Това прави децата до тази възраст много по-податливи на коклюшна инфекция.

В световен мщаб има необходимост от стандартизиране на програмите и методологията за откриване, потвърждаване и наблюдение на случаи на коклюш.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел

Целта на настоящата дисертация е да се установи честотата на прекарана коклюшна инфекция при жени в детородна възраст и до колко новородените са защитени от коклюшна инфекция при раждането им и непосредствено след него чрез обсервационно, проспективно, популационно проучване при родилки и техните новородени в Първа специализирана акушеро-гинекологична болница за активно лечение „Света София“ и в Клиника по неонатология на Специализирана болница за активно лечение по детски болести – “проф. д-р Иван Митев” за периода юни 2017 г. до март 2019 г.

Задачи

1. Събиране на демографски, биологични, социални и икономически данни сред жени в детородна възраст.
2. Да се измери нивото на IgG антитела срещу *V. pertussis* токсин (anti-PT IgG) при случайно подбрани български родилки и техните новородени и да се определи корелацията между майчините и детските антитела.
3. Да се определи има ли зависимост между титъра на антителата на новородените, възрастта на майката, техния пол, тегло при раждане и гестационната седмица на раждане.
4. Да се определи ефективността на майчино-детския трансплацентарен транспорт на антитела спрямо гестационната седмица на раждане.
5. Да се определи степента на защита на новородените в следствие преминалите трансплацентарно anti-PT антитела чрез екстраполиране на антителата при новородените на 6 седмична възраст.
6. Да се определи каква е честотата на прекарана коклюшна инфекция сред жени в детородна възраст в Република България спрямо получените резултати.
7. Да се предложи най-подходящата за българските условия стратегия за борба с коклюша във възрастта до началото на имунизациите.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Дизайн на проучването

Беше проведено обсервационно, проспективно, популационно изследване в родилна зала на Първа специализирана акушеро-гинекологична болница за активно лечение „Света София“ и в клиника по неонатология на Специализирана болница за активно лечение по детски болести – “проф. д-р Иван Митев” от юни 2017 г. до март 2019 г.

Критерии за включване в проучването:

- 1) съгласие от страна на майката
- 2) възраст между 14 и 46 години

Критерии за изключване от проучването:

- 1) деца с големи вродени дефекти
- 2) деца с хромозомни аномалии
- 3) бебета или майки със сериозни неврологични заболявания
- 4) бебета или майки със сърдечни заболявания
- 5) бебета или майки с бъбречни заболявания
- 6) двуплодна бременност

Всички родители, взели участие в проучването, бяха подробно информирани за целите, методите, начина на вземане на пробите, както и обществения принос от бъдещите резултати. Подписаха доброволно информирано съгласие (Приложение 1) и попълниха анкетна карта (Приложение 2), съдържаща демографски, биологични, социални и икономически характеристики на участниците. Такива са: възраст на майката, професия, образование, етническа принадлежност, тегло при раждането на новородените, ръст, гестационна възраст, начин на раждане, брой хора в домакинството и история на детската или антенатална ваксинация.

На всяко новородено беше извършен обстоен физикален преглед и бяха снети антропометрични показатели от лекар – неонатолог.

В изследването бяха включени 242 случайно подбрани български майки и техните 242 новородени. Поради неуспех при взимането или неправилно съхранение на кръвта, взета от майките, при 11 от двойките е изследвано само новороденото. Общият брой на майките е 231 майки, от които 191 майки на доносени новородени и 40 майки на недоносени новородени. Общият брой на новородените е 242 новородени, от които 196 са доносени и 46 са недоносени. Броят двойки майка-новородено е 231, от които 191 новородени са доносени и 40 са недоносени. Изследваните двойки бяха разделени в две кохорти: доносени новородени (родени с гестационна възраст ≥ 37) и недоносени (родени с гестационна възраст ≤ 36).

Лабораторни методи

Непосредствено преди раждането бяха взети 2 ml венозна кръв на майката във вакутейнер с Clot- активатор и гел, а непосредствено след раждането - 2 ml кръв от пъпната връв на новороденото. Всички кръвни проби бяха етикетирани и транспортирани до клинична лаборатория към университетска болница „Лозенец“. Там пробите бяха своевременно центрофугирани и беше отделен серум. Биологичният материал беше съхранен при -80°C до изследването на серумните антитела на пертусис токсин на майките и техните новородени. Серумният пертусис токсин (PT) IgG на майките и новородените е оценен чрез Bordetella pertussis toxin (PT) IgG ELISA имуноензимен тест (NovaTec Immundiagnostica GmbH, Германия). По данни на производителя аналитичната чувствителност на теста за детекция на anti-PT антитела е под 5 IU/ml. Резултатите бяха отчетени на ELISA четец при дължина на вълната 450 nm.

Резултатите се интерпретират както следва:

- < 40 IU/ml – няма индикации за скорошна инфекция

- ≥ 40 - < 100 IU/ml – съмнение за скорошна инфекция; препоръчва се тестване на нова проба след 7-10 дни
- ≥ 100 IU/ml – индикация за скорошна инфекция

Статистически методи

Дескриптивна статистика

- Вариационен анализ
- Честотен анализ
- Графично представяне на резултатите

Методи за проверка на хипотези

- Параметрични методи
 - paired t test t-тест – проверка за равенство на средните на две независими групи при нормално разпределение; за да се сравни нивото на титри на антитела между майката и нейното дете
- Непараметрични методи
 - Тест на Kolmogorov-Smirnov– проверка за нормалност на честотните разпределения при количествени променливи;
 - Тест на Mann-Witney при сравняване на две независими групи, когато разпределението не е нормално;
 - Chi-square test - при изследване на връзката между две категорийни променливи, като честотата на серопозитивизъм между майките и техните новородени.
 - Spearman корелационен тест – за изчисляване на връзката между продължителни променливи, като възраст на майката, гестационна седмица и anti-PT IgG титъра.

Използваното критично ниво на значимост е $\alpha=0,05$.

Съответната нулева хипотеза се отхвърля, когато Р стойността (P-value) е по-малка от α ($p < 0.05$).

За обработка на данните от проучването е използван специализираният статистически пакет SPSS версия 19.

Резултатите са докладвани като средни стойности за продължителните променливи и като n% за категорийните променливи. Когато е необходимо, за по-голяма пригледност, титрите на антителата са преставени като геометрични концентрации (GMC).

IV. РЕЗУЛТАТИ

Резултати от анкетата

Беше проведена анкета с 242 жени в родилна зала на Първа специализирана акушеро-гинекологична болница за активно лечение „Света София“ и в Клиника по неонатология на Специализирана болница за активно лечение по детски болести – “Проф. д-р Иван Митев” от юни 2017 г. до март 2019 г. От 242 проведени анкети, на всички въпроси са отговорили 74%. Средната възраст на анкетираните е $28,67 \pm 6,24$.

- С местоживеене София са 138 от жените. Останалите анкетирани са от провинцията.
- От 216 анкетирани, 110 са с висше образование, 87 са със средно образование и 19 са с основно образование.
- 205 от жените са българи и 37 – роми.
- Първескини са 126 жени, втора бременност са 76 жени, трета – 24, четвърта – 10, пета – 5 и осма бременност е 1 жена.
- От 242 новородени, от мъжки пол са 124 и от женски пол са 118.
- Средното тегло на новородените е представено на таблица 1

Таблица 1. Средно тегло на новородените

Група	n	Mean \pm SD	Min	Max
Недоносени	46	1910,33 \pm 646,19 g	895,00 g	3850 g
Доносени	196	3306,12 \pm 377,82 g	2550,00 g	4600 g
Общо	242	3040,81 \pm 703,31 g	895,00 g	4600 g

- Среден ръст на новородените е $48,34 \pm 3,51$ см (30 см до 54 см)
 - доносени $49,48 \pm 1,9$ см
 - недоносени $43,48 \pm 4,55$ см

- Според данните от проведената анкета, 43% от майките живеят в двучленно семейство, 34.3% в тричленно, 14.9% в четиричленно и 7.4% в многочленно семейство.
- 36 жени съобщават за продължителна кашлица през последните 2 години.

Не се наблюдава статистически значима разлика между наличието на продължителна кашлица (отговор от анкетата) и anti-PT IgG стойностите на майката.

- 20 жени съобщават за продължителна кашлица на член от домакинството.

Не се наблюдава статистически значима разлика между наличието на продължителна кашлица в домакинството (отговор от анкетата) и anti-PT IgG стойностите на майката.

- Само 8 жени са отговорили, че и те и някой член от домакинството са имали продължителна кашлица в последните 2 години.
- Всички 242 жени са отговорили, че са имунизирани редовно според имунизационния календар на Република България. 236 от тях са получили целоклетъчна коклюшна ваксина, тъй като през 2008 година се въвежда бустерна доза с ацелуларна ваксина (**DTaP** + IPV) на 6 годишна възраст, а от 2010 г се преминава изцяло на ацелуларна ваксина за коклюш.
- В настоящето проучване има 8 жени, които попадат в кохортата да получат 2008 година бустерна ацелуларна ваксина.
- Нито една от майките не съобщава за приложение на **Tdap** по време на бременността или през последните 5 години.

Подбор на участниците

При 242 майки, поради неуспех при взимането или неправилно съхранение на кръвта, взета от майките, при 11 от пробите липсват резултати за майката. Същите са включени в обсъждането на отделните групи (майки, доносени и

недоносени) и са изключени от обсъждането на двойките новородено-майка.

В проучването бяха включени 231 случайно подбрани български майки и 242 новородени.

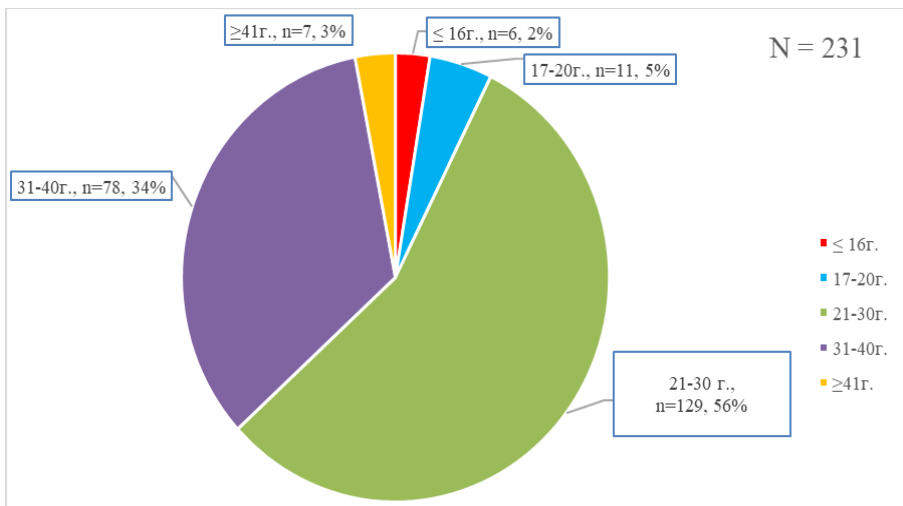
- Общо двойки майка-новородено са 231, от които двойки майка-доносено новородено – 191 и двойки майка-недоносено новородено - 40 (7 от тях са с тегло над 2500 г, но са родени ≤ 36 г.с.)
- **231 майки**, от които 191 майки на доносени новородени и 40 майки на недоносени новородени
- **242 новородени**, от които 196 са доносени и 46 са недоносени
- **11 майки**, от които 5 на доносени и 6 на недоносени деца не са включени в проучването поради неуспех при взимането или неправилно съхранение на кръвта взета от майките.

Участниците са разделени на две кохорти:

- **Група А** - 191 двойки доносено новородено-майка
- **Група Б** - 40 двойки недоносено новородено-майка

Възраст на майката

Средната възраст на родилките, взели участие в проучването е 28,67 години (диапазон 14-46 години). Не съществуват разлики по отношение на възрастовия диапазон между майките на доносените и недоносените. Средната възраст на майките в група А е 29,28 години (диапазон 15-46 години), а в група Б е 26,04 години (диапазон 14-45 години). На фиг. 29 е показано разпределението на всички родилки по възрастови групи. Най-голям дял са майките на възраст между 21- 30 години (56%), следвани от родилки на възраст между 31-40 години (34%). Най-нисък е дялът на родилки на възраст под 16 години - едва 2%, следван от родилки на възраст над 41 години (3%) и родилки между 17 и 20 годишна възраст (5%).



Фигура 1. Разпределение на майките (n=231) по години.

Пол на новородените

Общото разпределение на всички участници по пол е 124:118 съответно момчета:момичета (табл. 2).

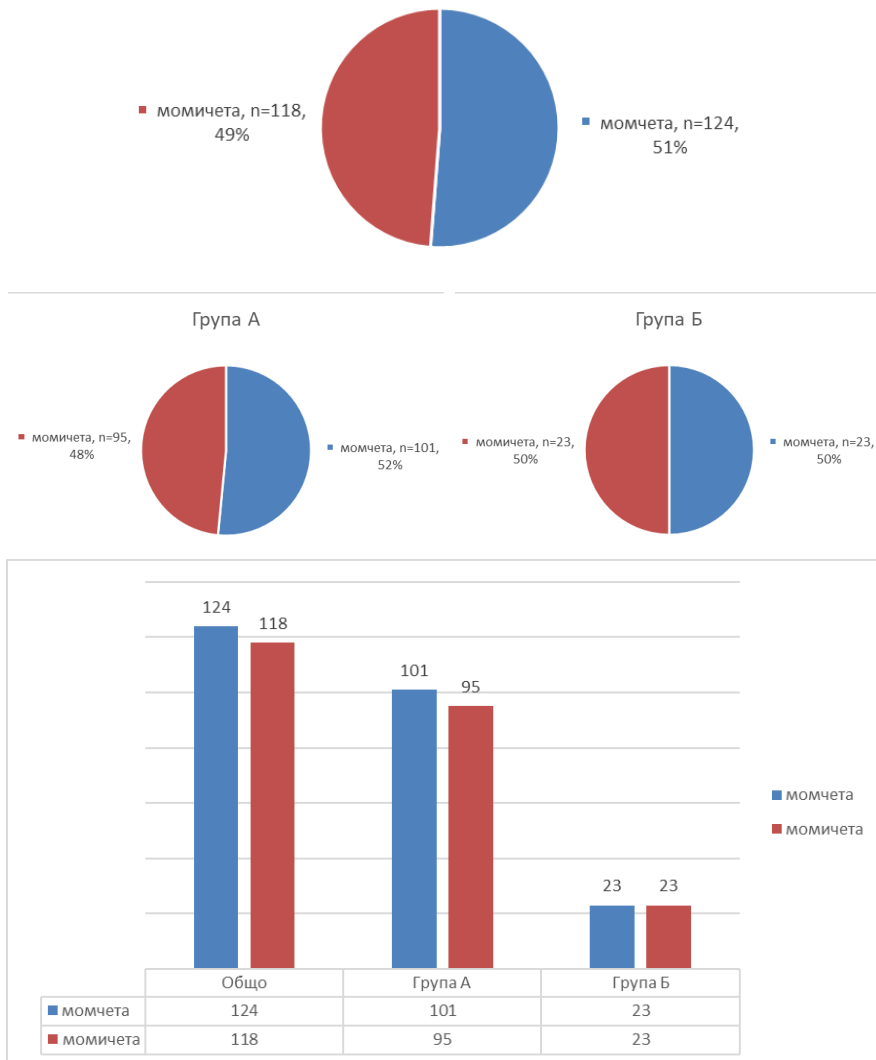
Таблица 2. Титър на антителата при мъжки и женски пол.

	Пол	N	GMC	SD	t	df	p
anti-PT IgG - майка	момчета	117	5,39	3,32	0,459	229	0,646
	момичета	114	4,96	4,74			
anti-PT IgG - бебе	момчета	124	6,59	4,20	0,197	240	0,844
	момичета	118	6,84	4,73			

Не се наблюдава статистически значима разлика в anti-PT IgG стойностите между мъжки и женски пол.

Новородените доносени (група А) са разпределени по пол съответно момчета:момичета - 101:95 момичета, а недоносените новородени (група Б) – 23:23. На практика не съществува

разлика по отношение на разпределение по пол в двете групи (фиг. 2).



Фигура 2. Разпределение на новородените по пол и групи.

Начин на раждане

Сто деветдесет и шест от всички изследвани родилки са родоразрешени след ≥ 37 г.с. (група А). От тях 117 са родили по оперативен механизъм, а 79 – по нормален механизъм (фиг. 31). Изследваните майки от група Б, които са родоразрешени ≤ 36 г.с. са общо 46. Само 5 от тях са родили per vias naturales, а останалите 41 са родоразрешени по оперативен път.

Гестационна възраст на новородените

В групата на доносите новородени средната гестационна възраст е 38,91 седмици (диапазон 37-42 седмици), а средното тегло при раждане е 3306,12 g (диапазон 2550-4600 g).

В групата на недоносите средната гестационна възраст е 33,37 седмици (диапазон 27-36 седмици), а средното тегло при раждане е 1910,33 g (диапазон 895–3850 g). Демографските характеристики на групите са обобщени в Таблица 3 и 4, фиг. 32 и 33.

Таблица 3. Средна гестационна възраст на новородените.

Група	N	Mean \pm SD (гестационна седмица)	Min	Max
Недоносени	46	33,37 \pm 3,14	27,00	41,00
Доносени	196	38,91 \pm 1,16	37,00	42,00
Общо	242	37,86 \pm 2,77	27,00	42,00

Таблица 4. Демографски характеристики на доносени и недоносени.

	Доносени (n=196)	Недоносени (n=46)
Възраст на майката	29.28 години (15-46)	26.04 години (14-45)
Начин на раждане (p.v.p./s.c.)	79/117	5/41
Пол (мъж/жена)	101/95	23/23
Гестационна възраст	38.91 г.с. (37-42)	33.37 г.с. (27-41)
Тегло при раждане (mean±SD)	3306.12±377.8 g (min 2550- max 4600)	1910.33±646.2 g* (min 895– max 3850) (p<0.05)

* Статистически значима разлика се наблюдава по отношение на теглото на недоносените новородени спрямо доносените (p<0.05).

Anti-PT IgG нива

Бяха изследвани общо 231 майки и 242 новородени. Изследваните двойки майка-новородени са общо 231. Поради неуспех при взимането или неправилно съхранение на кръвта, взета от майките, при 11 от пробите липсва кръв на майката. Общо двойки майка-новородено са 231, от които двойки майка-доношено новородено – 191 и двойки майка-недоношено новородено – 40.

Anti-PT IgG нива на майките

Кръвните проби на майките (2 ml) са вземани непосредствено преди раждането. Anti-PT IgG беше изследван чрез ELISA метод. Всички серумни концентрации на антителата бяха трансферирани логаритмично като средни геометрични концентрации (GMCs). Получените данни са представени на Таблица 5.

Таблица 5. GMC anti-PT IgG стойности на майките.

Възраст (години)	Брой майки	anti-PT IgG mean±SD (min-max IU/ml)	anti-PT IgG GMC (<40IU/ml)	anti-PT IgG GMC (>40IU/ml)
под 16	6	8.22±7.85 (2.52-23.84)	6.24	-
17 - 20	11	27.17±55.17 (0.49-191.74)	6.66	191.74 (n=1)
21- 30	129	10.81±17.75 (0.04-108.03)	3.96	63.49 (n=9)
31- 40	78	14.90±29.35 (0.14-195.29)	4.4	75.39 (n=7)
над 41	7	18.68±42.22 (0.01-114.36)	1.33	114.36 (n=1)
общо	231	13.15±25.67	4.13	74.58

GMC на майките е 5.17 IU/ml, като тази стойност варира от 74.58 IU/ml за тези > 40 IU/ml (n=18) и 4,13 IU/ml за тези < 40 IU/ml (n=213).

Според инструкциите за интерпретация на резултатите на използвания кит Bordetella pertussis toxin (PT) IgG ELISA kit (NovaTec, Immunodiagnostica, GmbH, Germany), стойности на anti-PT IgG ≥ 100 IU/ml се считат за индикация за скорошно прекарана коклюшна инфекция. При стойности на anti-PT IgG ≥ 40 -99,9 IU/ml има съмнение за прекарана скорошна инфекция. При стойности на anti-PT IgG < 40 IU/ml няма индикация за прекарана скорошна инфекция.

Според данните от проведената анкета, 43% от майките живеят в двучленно семейство, 34.3% в тричленно, 14.9% в четиричленно и 7.4% в многочленно семейство.

По възрастови групи и стойности на anti-PT IgG, данните са представени на табл. 6.

Таблица 6. Разпределение на anti-PT IgG стойностите на майките по възраст.

anti-PT IgG	под 16	17 - 20	21- 30	31- 40	над 41	общо
≥100 IU/ml		1	1	2	1	5
≥40 - 99,9 IU/ml			8	5		13
< 40 IU/ml	6	10	120	71	6	213
Общо						231
Потенциално незащитени						
≥5 - <10 IU/ml*	3	1	21	12	-	37
< 5 IU/ml	2	4	76	41	6	129
Общо						166 (72%) p < 0,05

* Според някои автори (Ercan et al, 2013; Shakib et al, 20), за потенциално незащитени трябва да се приемат стойности <10 IU/ml.

По литературни данни за потенциално защитни нива се считат anti-PT IgG >5 IU/ml, а други приемат >10 IU/ml. В проведеното изследване, потенциално незащитени са 69.6% от майките. Петте жени с нива на anti-PT IgG ≥100 IU/ml са от 2-, 3- и 4-членни семейства. Не се наблюдава връзка между нивата на anti-PT IgG и броя на членовете в семейството.

Всички 242 жени са отговорили, че са имунизирани редовно според имунизационния календар на Република България. 234 от тях са получили целоклетъчна коклюшна ваксина, тъй като през 2008 година се въвежда бустерна доза с ацелуларна ваксина (**DTaP + IPV**) на 6 годишна възраст, а от 2010 г се преминава

изцяло на ацелуларна ваксина за всички възрастови групи. В настоящето проучване 8 жени попадат в кохортата да са получили бустерна *aP* ваксина през 2008 година. При 2 от тях няма данни за anti-PT IgG. При останали 6 жени, пет са с anti-PT IgG $e < 10$ IU/ml. Тази бройка е твърде малка за да се направи извод относно въвеждането на ацелуларна бустерна ваксина в България.

Разпределението на майките на доносени деца по възраст и anti-PT IgG стойности са представени на табл. 7.

Таблица 7. Брой майки (на доносени), разпределени по anti-PT IgG стойности.

anti-PT IgG	под 16	17 - 20	21- 30	31- 40	над 41	общо
≥ 100 IU/ml			1	2	1	4
$\geq 40-99,9$ IU/ml			6	5		11
< 40 IU/ml	3	9	95	64	5	176
Общо						191
Потенциално незащитени						
$\geq 5- < 10$ IU/ml*	1	1	14	12		28
< 5 IU/ml	1	3	62	34	5	105
Общо						133 (69,6%) p < 0,05

* Според някои автори (Ercan et al, 2013; Shakib et al, 2010), за потенциално незащитени трябва да се приемат стойности < 10 IU/ml

GMC на майки на доносени деца е 5,17 IU/ml, като тази стойност варира от 69,43 IU/ml за тези > 40 IU/ml (n=15) и 4,15 за тези < 40 IU/ml (n=176).

Разпределението на майките на недоносени деца по възраст и anti-PT IgG стойности са представени на табл. 8.

Таблица 8. Брой майки (на недоносени), разпределени по anti-PT IgG стойности.

anti-PT IgG	под 16	17 - 20	21- 30	31- 40	над 41	общо
≥100 IU/ml		1				1
≥40-99,9 IU/ml			2			2
< 40 IU/ml	3	1	25	7	1	37
						40
Потенциално незащитени						
≥5- <10 IU/ml*	2		7			9
< 5 IU/ml (потенциално незащитени)	1	1	14	7	1	24
						33 (83%) p < 0,05

* Според някои автори (Ercan et al, 2013; Shakib et al, 2010), за потенциално незащитени трябва да се приемат стойности <10 IU/ml

GMC на майки на недоносени деца е 5,19 IU/ml, като тази стойност варира от 106,63 IU/ml за тези > 40 IU/ml (n=3) и 4,06 за тези < 40 IU/ml (n=37).

Средната геометрична (GMC) стойност се използва като един по-обективен подход, когато резултатите следват нормално логаритмично разпределение. В настоящото изследване, такова разпределение е доказано статистически с теста на Колмогоров-Смирнов, затова е представяна и GMC на резултатите. В литературните данни, използвани за сравнение резултатите също са представени като средна геометрична стойност.

Нивата на anti-PT IgG отразяват не само циркулиращото антитяло от миналата ваксинация, но също и скорошна експозиция на коклюш. Транскрипцията на резултатите за anti-PT IgG е представена на табл. 9.

Таблица 9. Интерпретация на резултатите според инструкциите на производителя на кита.

стойност	обяснение
<5 (според някои източници ≥ 5 - <10 IU/ml)	серонегативна
5–40 IU/ml	няма данни за скорошна инфекция
40–99 IU/ml	вероятно излагане на коклюш
> 100 IU/ml	остра или скорошна инфекция

Чрез направен регресионен анализ, установихме, че 69,6% от бременните жени са серонегативни за anti-PT IgG <10 IU/ml, от които 55,8% с anti-PT IgG <5 IU/ml.

Деветдесет и два (92%) процента от серумните проби на майката не показват данни за скорошна инфекция, както е определено от нивата на anti-PT IgG <40 IU/ml (фиг. 3). От представените данни се вижда, че само 5 от майките имат стойност на anti-PT IgG ≥ 100 IU/ml, което се счита за индикация за прекарана скорошна инфекция.



Фигура 3. Процентно съотношение на anti-PT IgG стойностите на майките.

При стойности на anti-PT IgG $\geq 40-99,9$ IU/ml, според инструкциите на производителя на кита, се препоръчва повторен тест, поради съмнение за скорошна инфекция. Резултатите ни показват, че при 13 (6%) от родилките се препоръчва повторно изследване на антителата. Само една родилка от тази група е съобщила за продължителна пристъпна кашлица за последните 2 години.

Ако се разгледат и двете групи заедно (т.е. anti-PT IgG ≥ 40 IU/ml) резултатите показват, че честотата на вероятно прекарана скорошна коклюшна инфекция в настоящото проучване е 7.8%, т.е. 18 от всички родилки в изследването е възможно да са имали скорошна инфекция от коклюш. От тях само 2 майки

съобщават за скорошна пристъпна кашлица за последните 2 години в проведената анкета.

Anti-PT IgG нива на новородените

Кръвните проби на новородените (2 ml) са вземани от пъпната връв непосредствено след раждането. Anti-PT IgG беше изследван чрез ELISA метод. Всички серумни концентрации на антителата бяха трансферирани логаритмично като средни геометрични концентрации (GMCs). Получените данни са представени на таблица 10.

Таблица 10. Средни стойности на anti-PT IgG на новородените.

Възраст (години)	Брой новородени	anti-PT IgG mean±SD (min-max IU/ml)	anti-PT IgG GMC (IU/ml)
Общо доносени (≥37 г.с.)	196	20.45±34.35 (0,11-215,96)	7.21
Общо недоносени ≤ 36 г.с.	46	11.01±19.41 (0,17-101,79)	4.94*

* $p < 0.05$ в сравнение с доносените новородени

Средните стойности на anti-PT IgG и GMC на новородените спрямо възрастта са представени на таблица 11.

Разпределението на броя новородени по гестационна възраст, пол и диапазон на anti-PT IgG, са представени на таблица 12.

Таблица 11. Средни стойности на anti-PT IgG на новородените по гестационна седмица.

Гестационна седмица	Брой	anti-PT IgG mean±SD (min-max IU/ml)	anti-PT IgG GMC (<40 IU/ml)	anti-PT IgG GMC (>40 IU/ml)
27	1	0.17	0,17 (n=1)	
28	3	4.74±3.26 (2.24-8.42)	4.07	
29	2	2.98±3.37 (0.59-5.36)	1.79	
30	3	26.24±40.63 (2.06-73.15)	2.69	73.15 (n=1)
31	2	4.36±2.62 (2.51-6.21)	3.95	
32	7	16.48±20.01 (3.89-60.06)	7.81	60.06 (n=1)
33	5	2.13±1.41 (0.36-3.36)	1.57	
34	5	7.76±5.48 (3.4-15.04)	6.35	
35	5	6.05±5.43 (2.05-14.89)	4.48	
36	13	15.90±30.64 (1.22-101.79)	4.53	101.79 (n=1)
37	20	18.79±31.26 (0.43-117.21)	4.19	75.92
38	57	19.65±34.73 (0.13-215.96)	3.98	73.31
39	62	20.34±32.96 (0.11-196.01)	5.09	72.27
40	36	18.69±33.32 (0.20-182.48)	5.11	68.57
41	20	27.66±42.07 (0.15-189.66)	6.35	76.88
42	1	2.67	2.67 (n=1)	
Общо	242			

Таблица 12. Разпределение на брой новородени по гестационна възраст, пол и стойност на anti-PT IgG

Гестационна възраст в седмици	anti-PT IgG				
	< 40 IU/ml				
	потенциално незащитени				
	< 5 IU/ml ()	≥5- <10 IU/ml	< 40 IU/ml	≥40-99,9 IU/ml	≥100 IU/ml
27	1м		1м		
28	2м	1м	3м		
29	1м	1ж	2 (1м+1ж)		
30	2 (1м+1ж)		2 (1м+1ж)	1ж	
31	1м	1ж	2 (1м+1ж)		
32	1м	3 (1м+2ж)	6 (3м+3ж)	1ж	
33	5 (1м+4ж)		5 (1м+4ж)		
34	3 (2м+1ж)		5 (3м+2ж)		
35	3 (2м+1ж)	1ж	5 (3м+2ж)		
36	6 (3м+3ж)	2ж	12 (6м+6ж)		1ж
37	9 (4м+5ж)	4 (1м+3ж)	17 (7м+10ж)	1м+1ж	1ж
38	25(11м+14ж)	12 (7м+5ж)	48 (22м+26ж)	8 (6м+2ж)	1ж
39	25 (16м+9ж)	8 (4м+4ж)	52 (30м+22ж)	8 (5м+3ж)	2 (1м+1ж)
40	17 (10м+7ж)	3 (1м+2ж)	31 (16м+15ж)	4 (3м+1ж)	1ж
41	8 (5м+3ж)	2ж	16 (8м+8ж)	3ж	1м
42	1		1		
общо	110(62м+48ж)	38(15м+23ж)	208* (107м+101ж) (86%) ($p < .05$)	27(15м+12ж)	7 (2м+5ж)

*The t -value is -2.20249. The p -value is .018176.
 $p < .05$ anti-PT IgG > 40 в сравнение с anti-PT IgG < 40.

м- мъжки пол; ж – женски пол

Според инструкциите за интерпретация на резултатите на използвания кит (табл. 14), по възрастови групи и стойности на anti-PT IgG, данните за новородените са представени на табл. 13.

Таблица 13. Общ брой на доносени и недоносени новородени спрямо стойностите на anti-PT IgG.

anti-PT IgG	Общо недоносени (≤ 36 г.с.)	Общо доносени (≥ 37 г.с.)
≥ 100 IU/ml	1	6
$\geq 40-99,9$ IU/ml	2	25
< 40 IU/ml	43	165
$\geq 5- < 10$ IU/ml (потенциално незащитени)		
	9	29
< 5 IU/ml (потенциално незащитени)		
	25	85

* Според някои автори (Ercan et al, 2013; Shakib et al, 2010), за потенциално незащитени трябва да се приемат стойности < 10 IU/ml

От представените данни се вижда, че само 7 от новородените имат стойност на anti-PT IgG ≥ 100 IU/ml, което се счита за индикация за прекарана скорошна инфекция на майката. От 196 доносени новородени, потенциално незащитени от *B. pertussis* инфекция (anti-PT IgG < 10 IU/ml) са 114 новородени, което прави 58,2%. От 46 недоносени новородени, потенциално незащитени от *B. pertussis* инфекция (anti-PT IgG < 10 IU/ml) са 34 новородени, което прави 74%. ГМС на IgG към PT в серумни проби от майката и пъпната връв (новороденото), както в групата на доносените, така и в групата на недоносените, са обобщени в таблица 14.

Таблица 14. GMC anti-PT IgG стойности на новородените.

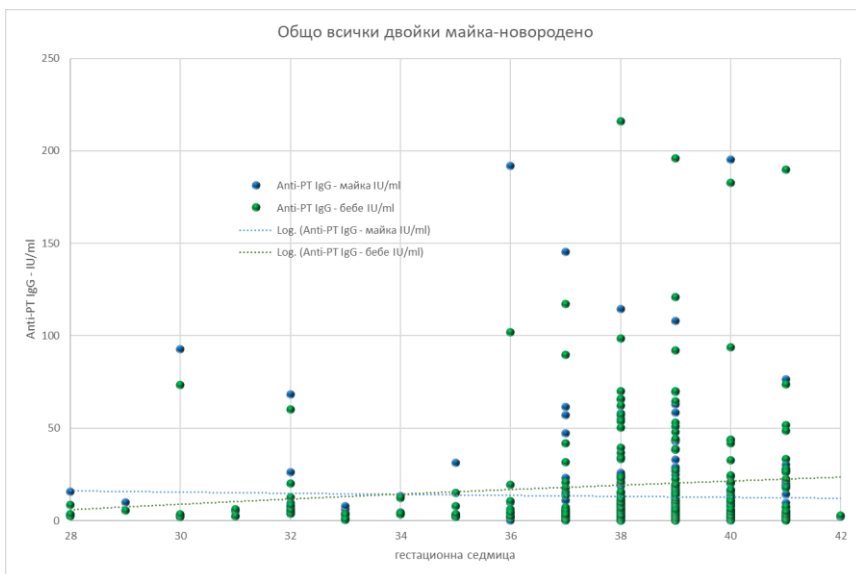
Anti-PT IgG	Група	n	GMC±SD	Min	Max
майка	Недоносени	40	5,19±3,47	0,17	191,74
	Доносени	191	5,17±4,12	0,02	195,30
	Общо	231	5,17±3,99	0,02	195,30
новородени	Недоносени	46	4,94±3,49*	0,17	101,79
	Доносени	196	7,21±4,65	0,11	215,96
	Общо	242	6,71±4,44	0,11	215,96

Няма разлики между групите по отношение на майчините anti-PT IgG нива в кохортата на доносените (група А) и в тази на недоносените (група Б), като съответно GMC anti-PT IgG е 5,17 и 5,19 IU/ml. GMC нивата на групата на недоносените са статистически значимо по-ниски от GMC нивата на децата, родени на термин (4,94/7,21 IU/ml; $p < 0.05$).

Общо двойки майка-новородено

В изследването бяха включени общо 231 двойки майка-новородено с пълни данни (фиг. 4). При разглеждане на резултатите по двойки, прилагането на Z-score наблюдениен анализ, се установява статистически значима разлика в разпределението на anti-PT IgG по двойки майка-новородено < 34 г.с. и >34 г.с.

Чрез представяне на логаритмична тенденция на резултатите, ясно се вижда позитивизиране на anti-PT IgG стойностите на новородените след 34 гестационна седмица.



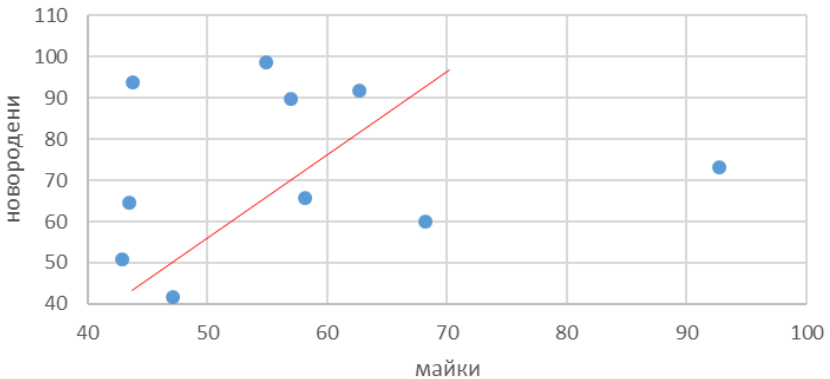
Фигура 4. Разпределение на anti-PT IgG по двойки майка-новородено.

The Z-Score is 3.18095. The p-value is .00074. The result is significant at $p < 0.05$.

При 7 новородени (36-41 г.с.) са измерени anti-PT IgG ≥ 100 IU/ml, докато само при 5 майки се наблюдава anti-PT IgG ≥ 100 IU/ml. Съпоставянето на данните за новородените със съответните майки сочи че при **4 двойки** има корелация между майка-новородено. При останалите 3 новородени, anti-PT IgG е ≥ 40 IU/ml.

Anti-PT IgG в границите ≥ 40 - < 99 IU/ml е измерен при 26 новородени, докато при майките този резултат е 13. Съпоставянето на данните за новородените със съответните майки сочи, че при **10 двойки** има корелация между майка-новородено (фиг. 5).

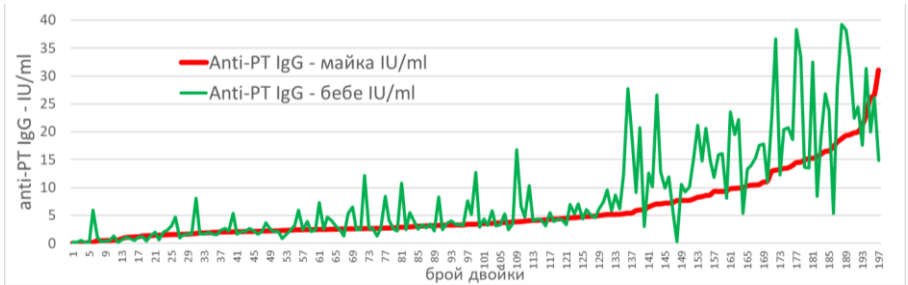
10 двойки майка-новородено с Anti-PT IgG ≥ 40
- < 99 IU/ml



Фигура 5. Разпределение на 10 двойки майка-новородено с anti-PT IgG ≥ 40 - < 99 IU/ml

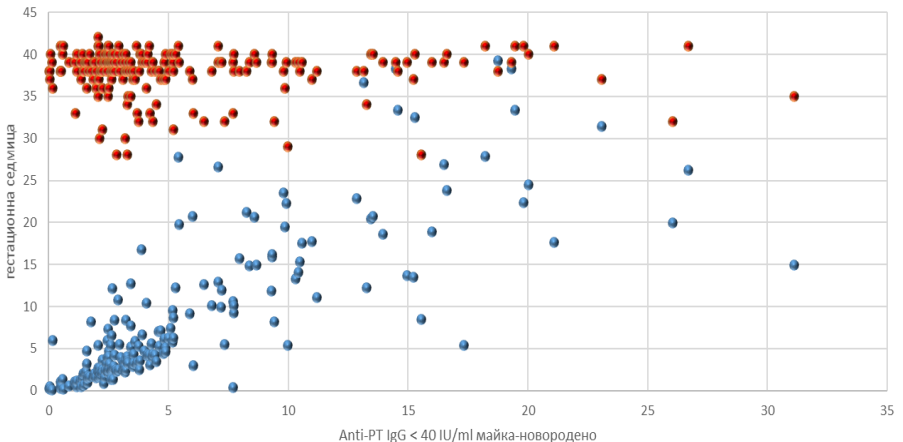
При 3 майки, anti-PT IgG е ≥ 40 - < 99 IU/ml, но при техните новородени резултатът е > 100 IU/ml, което говори за добър трансплацентарен транспорт.

Anti-PT IgG стойност < 40 IU/ml е измерен при 198 новородени, докато при майките този резултат е 213. Съпоставянето на данните за новородените със съответните майки сочи че при **197 двойки** има корелация между майка-новородено (фиг. 6). При едно новородено (37 г.с.) с anti-PT IgG < 40 IU/ml, майката е със стойност 145.2 IU/ml. При останалите майки (n=16), новородените са с anti-PT IgG ≥ 40 IU/ml.



Фигура 6. Разпределение на 197 двойки майка-новородено с anti-PT IgG <40 IU/ml

Корелацията на anti-PT IgG <40 IU/ml спрямо гестационна възраст на 197 двойки-майка-новородено е представена на фиг.7.



Фигура 7. Корелация на anti-PT IgG спрямо гестационна възраст на 197 двойки.

Процентното съотношение на оформените двойки спрямо anti-PT IgG стойностите е представено на табл. 15.

Таблица 15. Процентно съотношение на двойките майка-новородено спрямо anti-PT IgG.

Група (Anti-PT IgG) - бебе		Група (anti-PT IgG) - майка			Общо
		<40 IU/ml	40-99,9 IU/ml	≥100 IU/ml	
<40 IU/ml	n	197	0	1	198 новородени
	%	92,5%	0%	20%	85,7%
40-99,9 IU/ml	n	16	10	0	26
	%	7,5%	76,9%	0%	11,3%
≥100 IU/ml	n	0	3	4	7
	%	0%	23,1%	80%	3%
Общо	n	213 майки	13	5	231 общо двойки
	%	100%	100%	100%	100%

Не се наблюдава сигнификантна разлика между anti-PT IgG GMC на майките на доносени и недоносени новородени, но има статистически значима разлика ($p=0,045$) между anti-PT IgG GMC на доносени и недоносени новородени (таблица 16).

Таблица 16. GMC стойности на майките и новородените.

	Майчино anti-PT IgG GMC (min-max IU/ml)	Новородено anti-PT IgG GMC (min-max IU/ml)
недоносени	5.19±1.08 (0.18-191.74)	4.94*±1.01 (0.17-101.79)
95% CI	4.11-6.27	3.93-5.95
доносени	5.17±0.58 (0.01-195.29)	7.21±0.65* (0.11-215.96)
95% CI	4.95-5.75	6.56-7.86
Стойност за p		* $p<0.05$ в сравнение с доносени

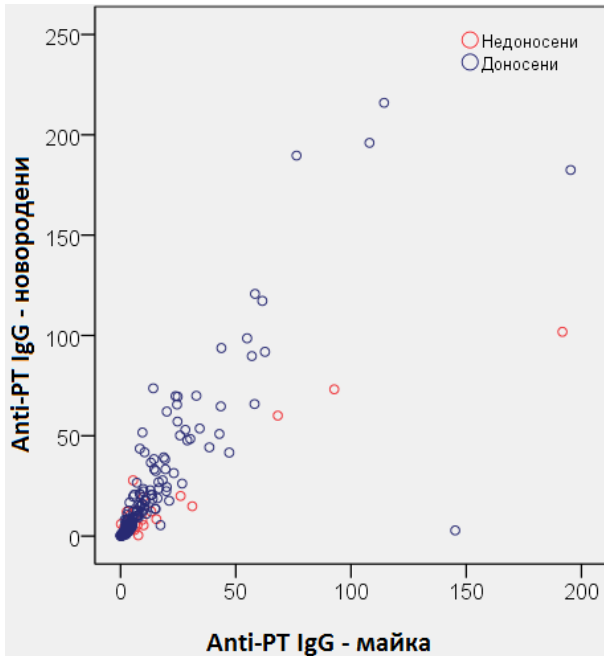
Сравнението на anti-PT IgG < 40 IU/ml и > 40 IU/ml е представено на таблица 17.

Таблица 17. Anti-PT IgG < 40 IU/ml и > 40 IU/ml при доносени и недоносени новородени

	Новородено GMC (anti-PT IgG < 40 IU/ml)	Новородено GMC (anti-PT IgG > 40 IU/ml)	
доносени	4.67±0.71 (n=165)	72.88±49.1 (n=31)	p<0.001
95% CI	3.96-5.38	64.87-100.9	
недоносени	4.08±1.04 (n=43)	76.48±21.3 (n=3)	p<0.001
95% CI	3.04-5.12	25.3-131.3	

Статистически значимо по-малко деца са с GMC anti - PT > 40 UI/ml.

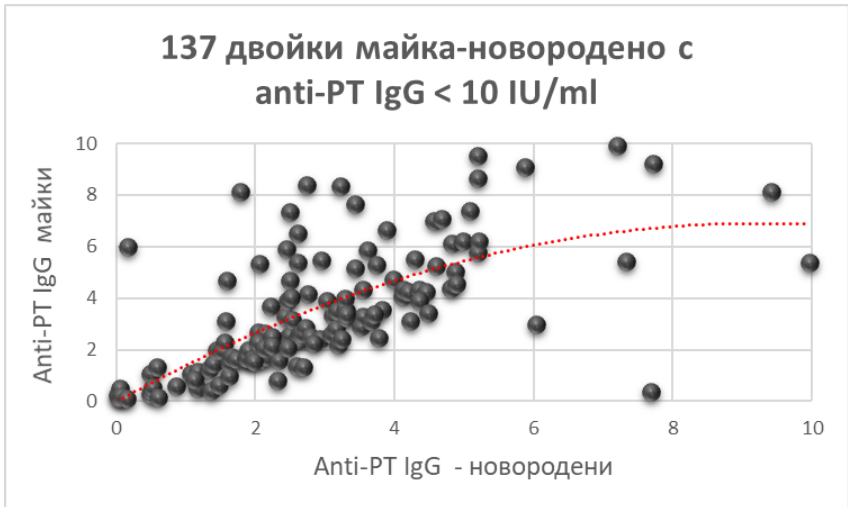
Сравнението на всички 231 двойки проби от майки-новородени показва, че майчините anti-PT корелират значително със стойностите на новородените. Корелацията общо за всички 231 двойки е представена на фиг. 8.



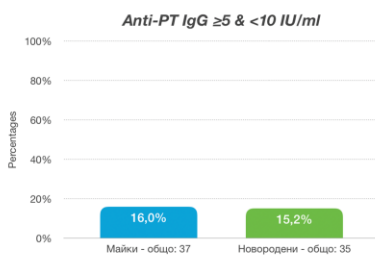
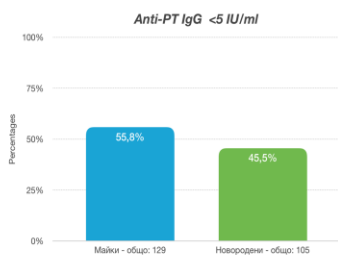
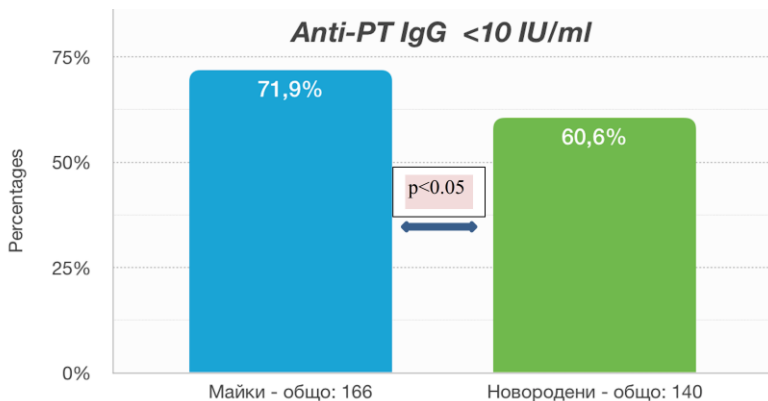
Фигура 8. Корелация на anti-PT IgG на новородени спрямо майки.

Съотношението на неонатално към майчино anti-PT IgG е положително при 65.37% (n=151) и негативно при 34.63% (n=80), което дава статистически значим резултат ($p < 0.01$) за положителен трансфер на антипертусис антитела от майката към новороденото.

При 137 двойки майка-новородено anti-PT IgG е < 10 IU/ml, което се счита за потенциална незащитеност на новородените и техните майки (фиг. 9 и фиг. 10).



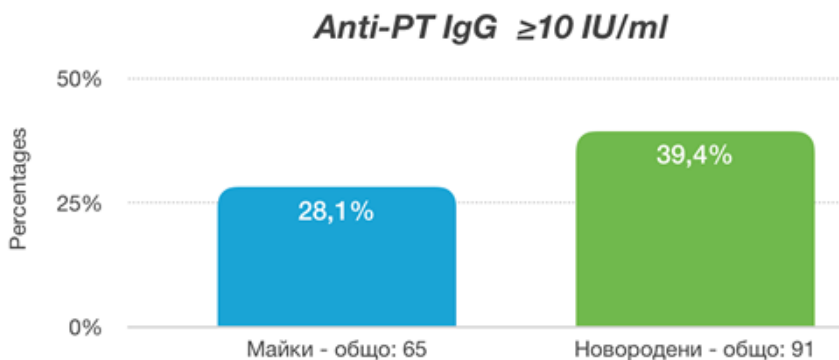
Фигура 9. Рангов корелационен коефициент на Spearman's rho за anti-PT IgG на майчините стойности спрямо стойностите на новородените ($Rho\ 0.899$, $p < 0.001$)



Фигура 10. Процентно съотношение на двойки майка-новородено с anti-PT IgG < 10 IU/ml.

Ако за потенциално защитни се приемат титри на anti – PT IgG \geq 10 IU/ml, то 28% (65/231) от всички родилки и 39,4% (91/231) от всички новородени имат защитни титри на антитела срещу В.

pertussis токсин. Средните съотношения на антитела за бебета и майки за anti-PT IgG са съответно 1,4 (фиг. 11).



Фигура 11. Процентно съотношение на двойки майка-новородено с anti-PT IgG ≥ 10 IU/ml.

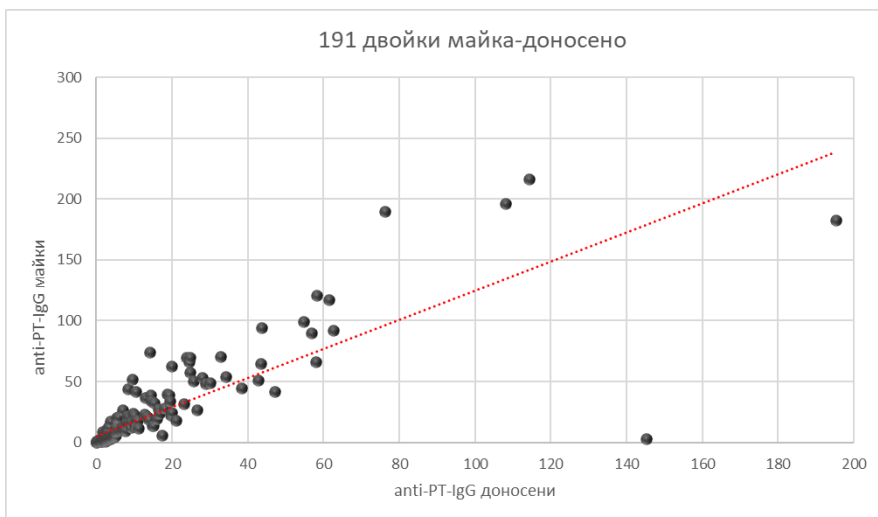
Ако за потенциално защитни се приемат титри на anti – PT IgG ≥ 5 IU/ml, то 44,2% (102/231) от всички родилки и 54,5% (126/231) от всички новородени имат защитни титри на антитела срещу B. pertussis токсин. Средните съотношения на антитела за бебета и майки за anti-PT IgG са съответно 1,24.

Анамнеза за продължителна кашлица

От 242 анкети попълнени от майките, само 14.8% (36 жени) съобщават за продължителна кашлица в последните 2 години. Само при 4 жени от тези 36 има вероятност за прекарана коклюшна инфекция през последните 5 години, ако се съди по нивата на anti-PT IgG ≥ 40 IU/ml.

Двойки майка-доносено новородено

В изследваната кохорта, в група А се оформиха 191 двойки майка-доносено с пълни данни. Корелацията на детските спрямо майчините anti-PT IgG за доносените новородени, е представена на фиг. 12.



Фигура 12. Рангов корелационен коефициент на Spearman's rho за anti-PT IgG на майчините стойности спрямо стойностите на доносени.

При 6 новородени (36-41 г.с.) са измерени anti-PT IgG ≥ 100 IU/ml, докато само при 4 майки се наблюдава anti-PT IgG ≥ 100 IU/ml. Съпоставянето на данните за новородените със съответните майки сочи че при **3 двойки** има корелация между майка-новородено (таблица 18). При 3 от новородените, anti-PT IgG на майките е в диапазона 58.32 до 76.34 IU/ml. При една майка със стойност anti-PT IgG ≥ 100 IU/ml, нейното новородено е със стойност 2.8 IU/ml. Този резултат вероятно може да се дължи на грешка при вземането на кръв от плацентата или други фактори, възпрепятстващи пасивното предаване на антитела от майката към плода.

Таблица 18. Двойки майка-доносено със стойност anti-PT IgG ≥ 100 IU/ml

anti – PT IgG ≥ 100 IU/ml при 3 двойки				
	майка	доносено	възраст в години/г.с	odd ratio
	114,36	215,96	42/38	1.88
	108,03	196,01	22/39	1.81
	195,29	182,48	31/40	0.93
mean \pm SD	139.23 \pm 48.66	198.15 \pm 16.84		1.54 \pm 0.53

Anti-PT IgG в диапазона ≥ 40 - < 99 IU/ml е измерен при 24 новородени, докато при майките този резултат е 11.

Съпоставянето на данните за новородените със съответните майки сочи че при **8 двойки** има корелация между майка-новородено (таблица 19). При 3 майки, anti-PT IgG е ≥ 40 - < 99 IU/ml, но при техните новородени резултатът е в порядъка на 117.21 до 189.66 IU/ml. При 16 новородени с anti-PT IgG е ≥ 40 - < 99 IU/ml, които не попадат в корелационна зависимост с техните майки, се наблюдават нива на anti-PT IgG < 40 IU/ml при всички майки, като при нито еден от тях не се наблюдава стойност < 5 IU/ml (от 9.37 до 38.53 IU/ml).

Таблица 19. Двойки майка-доносено със стойност anti-PT IgG ≥ 40 - < 99 IU/ml

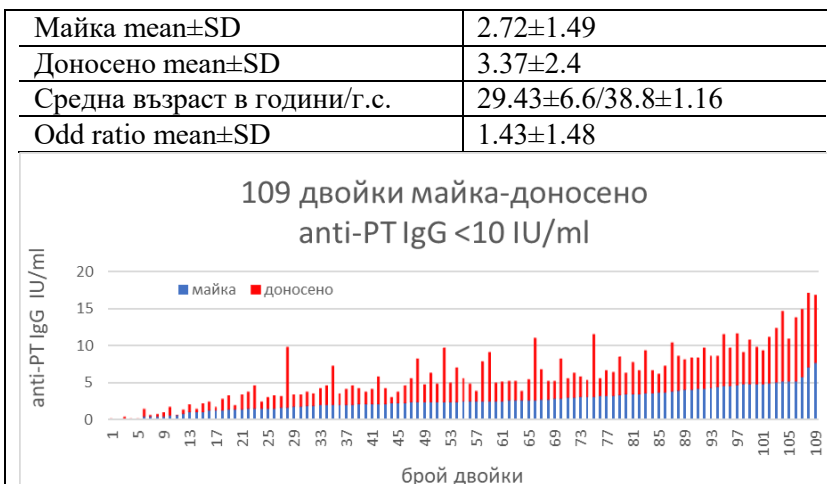
Anti-PT IgG ≥ 40- < 99 IU/ml при 8 двойки				
	майка	доносено	възраст в години/г.с.	odd ratio
	42.86	50.91	33/39	1.18
	43.49	64.64	27/39	1.49
	43.73	93.72	27/40	2.14
	47.15	41.62	29/37	0.88
	54.91	98.58	31/38	1.79
	56.95	89.71	36/37	1.57
	58.13	65.83	38/38	1.13
	62.66	91.82	33/39	1.46
mean \pm SD	51.24 \pm 7.81	74.60 \pm 21.68		1.46 \pm 0.4

Anti-PT IgG <40 IU/ml е измерен при 161 новородени, докато при майките този резултат е 176. Съпоставянето на данните за новородените със съответните майки сочи, че при **160 двойки** има корелация между майка-новородено (таблица 20). При едно новородено (37 г.с.) с anti-PT IgG <40 IU/ml, майката е със стойност 145.2 IU/ml. При останалите майки (n=16), новородените са с anti-PT IgG \geq 40 IU/ml (41.74 до 73.67 IU/ml).

Таблица 20. Процентно съотношение на двойките майка-доносено спрямо anti-PT IgG

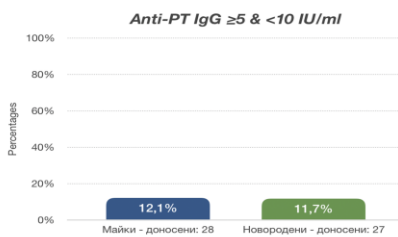
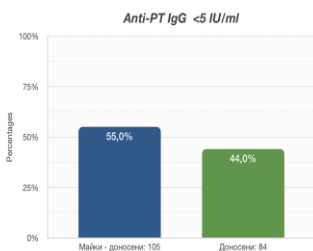
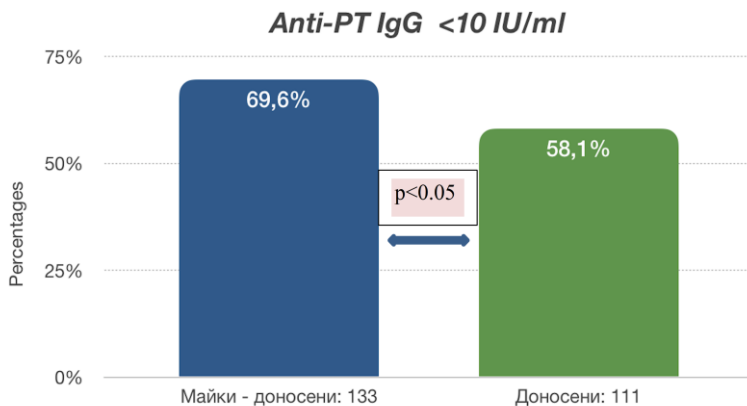
Доносени					
Група (Anti-PT IgG) - бебе		Група (Anti-PT IgG) - майка			Общо
		<40 IU/ml	40-99,9 IU/ml	\geq 100 IU/ml	
<40 IU/ml	n	160	0	1	161 доносени
	%	90,9%	0%	25%	84,3%
40-99,9 IU/ml	n	16	8	0	24
	%	9,1%	72,7%	0,0%	12,6%
\geq 100 IU/ml	n	0	3	3	6
	%	0%	27,3%	75%	3,1%
Общо	n	176 майки	11	4	191 общо двойки
	%	100%	100%	100%	100%

От 160 двойки майка-доносено с anti-PT IgG <40 IU/ml се оформят 109 двойки с anti-PT IgG <10 IU/ml (фиг. 13).



Фигура 13. 109 двойки майка-доносно с anti-PT IgG <10 IU/ml.

Процентното разпределение на двойките майка-доносно с anti-PT IgG <10 IU/ml е представено на фигура 14.



Фигура 14. Процентно съотношение на двойки майка-доношено с anti-PT IgG < 10 IU/ml

Ако за потенциално защитни се приемат титри на anti-PT IgG ≥ 10 IU/ml, то 29,3% (56/191) от двойките майка-доношено имат защитни титри на антитела срещу *B. pertussis* токсин.

Ако за потенциално защитни се приемат титри на anti-PT IgG ≥ 5 IU/ml, то 44,5% (85/191) от двойките майка-доношено имат защитни титри на антитела срещу *B. pertussis* токсин.

В групата на доносените, плацентарният трансфер на anti-PT IgG е позитивен при 69.6% от двойките, а ефективността на трансфера е 148%.

Анамнеза за продължителна кашлица

31 майки на доносени новородени са съобщили за продължителна кашлица в последните 2 години. При 8 от тях се съобщава за продължителна кашлица и при други членове на семейството. Измерените стойности на anti-PT IgG при тези 31 жени се движат в порядъка на 0.07 до 58.13 IU/ml. 29% от тях са потенциално защитени със стойност > 10 IU/ml. Майката, която е със стойност 58.13 IU/ml е с голяма вероятност да е боледувала от коклюшна инфекция през последните 5 години.

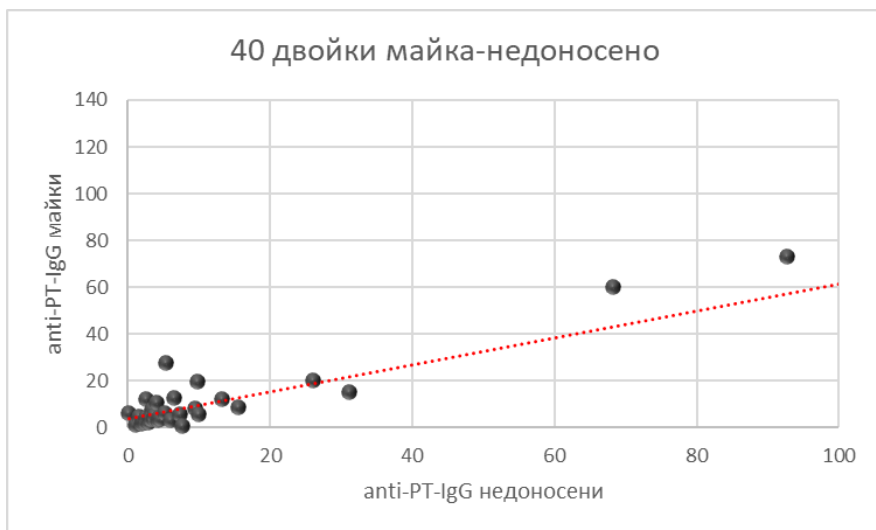
Двойки майка-недоносено новородено

В изследваната кохорта се оформиха 40 двойки майка-недоносено с пълни данни (фиг. 15 и табл. 22).

Само при **1 двойка** майка на 17 годишна възраст и нейното новородено-недоносено (36 г.с.; 2350 грама) е измерена стойност anti – PT IgG ≥ 100 IU/ml, както при новороденото (101.79 IU/ml), така и при майката (191.74 IU/ml).

Същата закономерност се наблюдава и при групата със стойност на anti – PT IgG ≥ 40 - <99 IU/ml. При **2 двойки** майка-недоносено се наблюдава корелация:

- 1.** Майка (29 г)/недоносено (32 г.с.; 1260 грама)– 68.20/60.06
- 2.** Майка (25 г)/недоносено (30 г.с.; 1500 грама) – 92.70/73.15



Фигура 15. Рангов корелационен коефициент на Spearman's rho за anti-PT IgG на майчините стойности спрямо стойностите на недоносени.

Таблица 22. Процентно съотношение на 40 двойки майка-недоносено спрямо anti-PT IgG

Недоносени					
Група (Anti-PT IgG) - бебе		Група (Anti-PT IgG) - майка			Общо
		<40 IU/ml	40-99,9 IU/ml	≥100 IU/ml	
<40 IU/ml	n	37	0	0	37 недоносени
	%	100%	0%	0%	92,5%
40-99,9 IU/ml	n	0	2	0	2
	%	0%	100%	0%	5,0%
≥100 IU/ml	n	0	0	1	1
	%	0%	0%	100%	2,5%
Общо	n	37 майки	2	1	40 общо двойки
	%	100%	100%	100%	100%

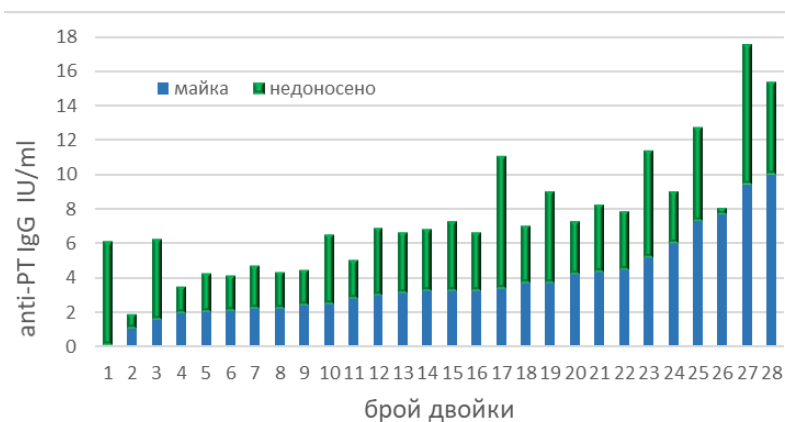
Anti-PT IgG <40 IU/ml е измерен при 37 недоносени и при техните 37 майки, като по този начин се формират **37 двойки** с корелация между майка-недоносено (табл. 23).

Таблица 23. Стойности на anti-PT IgG <40 IU/ml при 37 двойки майка-доносено

Anti-PT IgG <40 IU/ml при 37 двойки			
майка mean±SD	доносено mean±SD	средна възраст в години/г.с.	odd ratio mean±SD
5,98±6,43	6,54±6,02	26,05±6,4/33,54±3,11	2,25±5,78

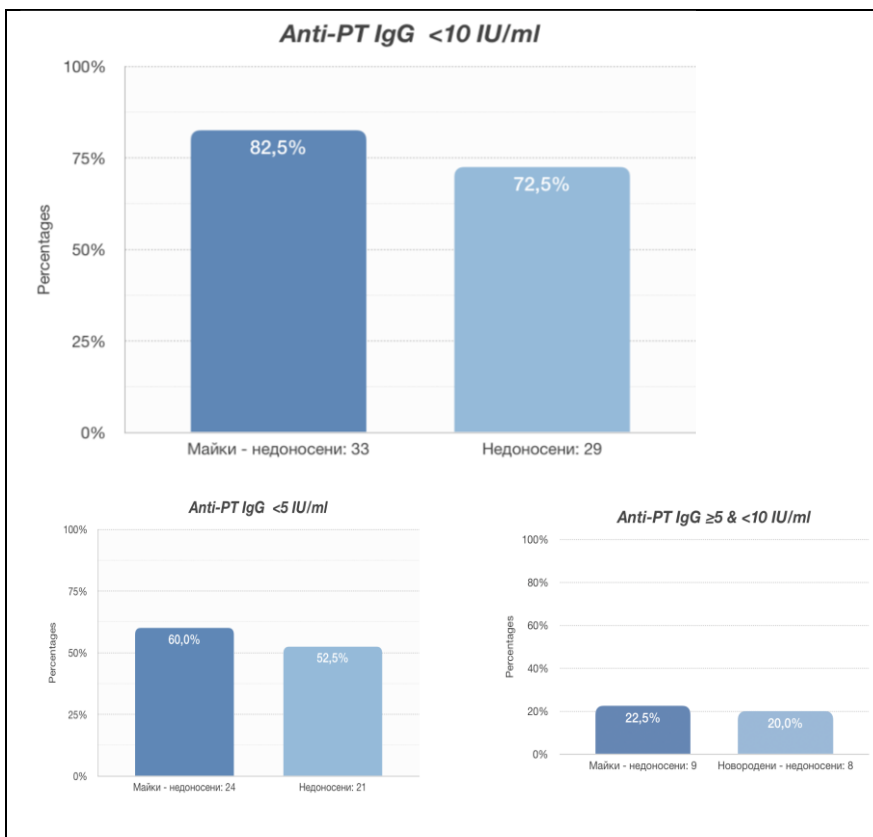
При 18 от 37 (48%) двойки майка-недоносено, нивата на anti-PT IgG на новородените недоносени са по-високи от майчинните стойности. Възрастта на майките варира от 14 до 35 годишна възраст; гестационна възраст е от 28 до 36. При **28 двойки** майка-недоносено anti-PT IgG е <10 IU/ml (фиг. 16).

Anti-PT IgG <10 IU/ml при 28 двойки майка-недоносено			
майка mean±SD	недоносено mean±SD	средна възраст в години/г.с.	odd ratio mean±SD
3,82±2,36	3,71±1,87	25,86±6,9/33,1±2,7	2,3±6,6



Фигура 16. 28 двойки майка-недоносено с anti-PT IgG <10 IU/ml.

Процентното разпределение на двойките майка-недоносено с anti-PT IgG <10 IU/ml е представено на фигура 17.



Фигура 17. Процентно съотношение на на двойки майка-недоносено с anti-PT IgG < 10 IU/ml

Ако за потенциално защитни се приемат титри на anti – PT IgG ≥ 10 IU/ml, то 15% (6/40) от двойките майка-недоносено имат защитни титри на антитела срещу *B. pertussis* токсин.

Ако за потенциално защитни се приемат титри на anti – PT IgG ≥ 5 IU/ml, то 35% (14/40) от двойките майка-недоносено имат защитни титри на антитела срещу *B. pertussis* токсин.

В групата на недоносените, плацентарният трансфер на anti-PT IgG е позитивен при 45% от двойките, а ефективността на трансфера е 78%.

Анамнеза за продължителна кашлица

5 майки на недоносени новородени са съобщили за продължителна кашлица в последните 2 години. Измерените стойности на anti-PT IgG при тези 5 жени се движат в порядъка на 0.16 до 191 IU/ml, но само една жена е със стойност > 10 IU/ml (191.74 IU/ml). Тя е на 17 годишна възраст и нейното новородено е със стойност 101.79 IU/ml. Вероятността тази жена да е боледувала от скорозна коклюшна инфекция е най-голяма.

Трансплацентарен трансфер на антителата

На таблица 24 е представено, че няма статистически значима корелация между anti-PT IgG при новородените и възрастта на майката и теглото при раждане, както в общата кохорта, така и в кохортата на недоносените и доносените новородени.

Таблица 24. Корелация между anti-PT IgG при новородените, възрастта на майката и теглото при раждане

Група	Anti-PT IgG – новородено ↔	възраст майка	тегло
Общо	R	-0,018	0,064
	p	0,775	0,319
	n	242	242
Недоносени	R	-0,228	0,222
	p	0,127	0,138
	n	46	46
Доносени	R	0,007	-0,018
	p	0,925	0,807
	n	196	196

В групата на недоносените, ефективността на плацентарния трансфер за anti-PT IgG е 78%, докато за доносените новородени е 148% (таблица 25). Съотношението на плацентарния трансфер на антитела е статистически значимо по-нисък в групата на недоносените в сравнение с групата на доносените ($p < 0.01$).

Таблица 25. Корелация на трансплацентарен трансфер по Mann-Whitney test

Група	брой n	Ефикасност на трансфера	95% CI min	95% CI max	статистическа значимост
Недоносени	40 двойки	78%	60,8%	113,2 %	p<0.01
Доносни	191 двойки	148%	133,5	161,7 %	

Корелацията между майчините антитела и тези на техните новородени е изчислена чрез Spearman's rank correlation. Данните показват, че има статистически достоверна корелация на трансплацентарен трансфер на антипертусис антитела ($p < 0.01$) (таблица 26).

Таблица 26. Корелация на anti-PT IgG майка-новородено по Spearman's rank correlation.

	Anti-PT IgG - майка ↔ Anti-PT IgG - бебе		
	n	R	p
Общо	231	0,899	<0,001
Недоносени	40	0,675	<0,001
Доносни	191	0,928	<0,001

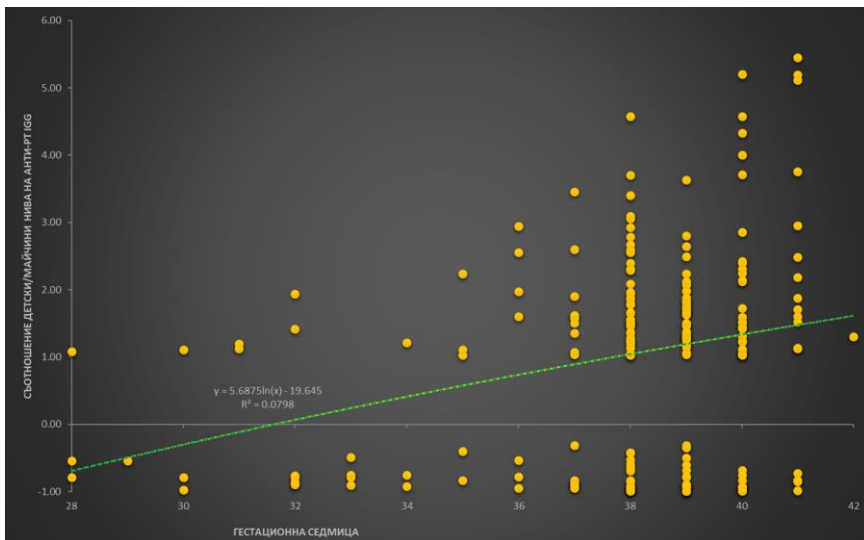
n - брой

R – силата на значимостта

p – статистическа значимост

По-високият плацентарен трансфер на anti-PT IgG в групата А (на доносените новородени) в сравнение с Група Б (на недоносените новородени), най-вероятно се дължи на това, че активният трансплацентарен транспорт нараства експоненциално след 33-34 седмица, което съвпада с получените резултати в настоящето изследване. Все пак трябва да се отбележи, че и двете групи новородени получават трансплацентарен трансфер на anti -PT IgG, тъй като IgG се пренася до 50% след 28-32 седмица от бременността. През третото тримесечие нарастването на концентрациите на фетален IgG между 29-41 г.с. е 2 пъти по-голямо от това през 17-28 гестационна седмица.

Многовариантен регресионен анализ на съотношението новородено/майка нива на anti-PT IgG спрямо гестационната седмица (фиг. 18). Установено е, че майчините anti-PT влияят върху на anti-PT на новородените както в доносената, така и в недоносената група.

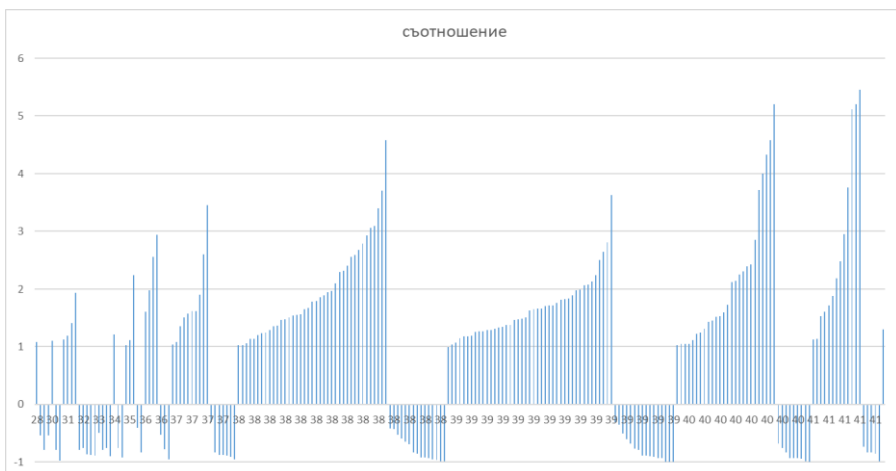


Фигура 18. Многовариантен регресионен анализ на съотношението anti-PT IgG новородено/майка спрямо гестационната седмица.

На фиг. 19 е представен плацентарния транспорт на всички дойки майка-новородено по гестационна седмица и представен като съотношение на anti-PT IgG на новородените спрямо майчините нива.

При доносените деца, anti-PT IgG под майчините нива имат 41,18% от родените през 37 седмица, 29,09% за 38 г.с., 27.59% за 39 г.с., 25,71% за 40 г.с. и 27.78% за 41 гестационна седмица.

При недоносените деца, anti-PT IgG под майчините нива имат 40% от родените през 28 гестационна седмица, 100% за 29 г.с., 40% за 30 г.с., 0% за 31 г.с., 41,66% за 32 г.с., 100% за 33 г.с., 25% за 34 г.с., 28,57% за 35 г.с. и 30% за 36 гестационна седмица.



Фигура 19. Плацентарен трансфер на всички двойки по гестационна седмица.

Потенциално защитни титри на антителата

Anti-PT IgG ≥ 5 IU/ml

В кохортата на двойките на недоносените, anti-PT IgG ≥ 5 IU/ml са имали 40% (n=16) от майките и 47,5% (n=19) от недоносените новородени (таблица 27). В кохортата на доносените новородени съответно 45% (86) от майките и 56% (n=107) от новородените родени на термин са имали anti-PT IgG ≥ 5 IU/ml.

Таблица 27. Потенциално защитени двойки с anti-PT IgG ≥ 5 IU/ml

Група	Anti-PT IgG	n	%
Майки – общо (n=231)	<5 IU/ml	129	55,8
	≥ 5 IU/ml	102	44,2
Майки – недоносени (n=40)	<5 IU/ml	24	60
	≥ 5 IU/ml	16	40
Майки – доносени (n=191)	<5 IU/ml	105	55
	≥ 5 IU/ml	86	45
Новородени – общо (n=231)	<5 IU/ml	105	45,5
	≥ 5 IU/ml	126	54,5
Недоносени (n=40)	<5 IU/ml	21	52.5
	≥ 5 IU/ml	19	47.5
Доносени (n=191)	<5 IU/ml	84	44
	≥ 5 IU/ml	107	56

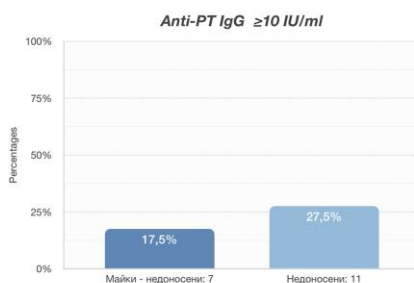
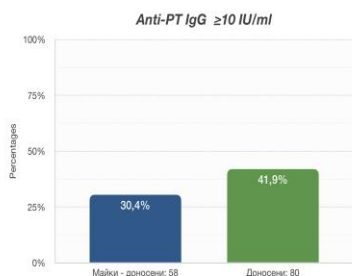
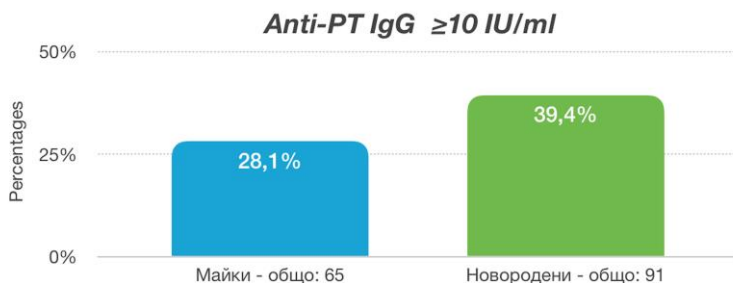
Anti-PT IgG ≥ 10 IU/ml

В кохортата на двойките на недоносените, anti-PT IgG ≥ 10 IU са имали 17.5% (n=7) от майките и 27,5% (n=11) от недоносените новородени (таблица 28 и фиг. 20). В кохортата на доносените новородени съответно 30,37% (n=58) от майките и 41,9% (n=80) от новородените родени на термин са имали anti-PT IgG ≥ 10 IU.

Таблица 28. Потенциално защитени двойки с anti-PT IgG ≥ 10 IU/ml

Група	Anti-PT IgG	n	%
Майки – общо (n=231)	<10 IU/ml	166	71,9
	≥ 10 IU/ml	65	28,1
Майки - недоносени (n=40)	<10 IU/ml	33	82,5
	≥ 10 IU/ml	7	17,5
Майки - доносени (n=191)	<10 IU/ml	133	69,63
	≥ 10 IU/ml	58	30,37
Новородени – общо (n=231)	<10 IU/ml	140	60,6
	≥ 10 IU/ml	91	39,4
Недоносени (n=40)	<10 IU/ml	29	72,5
	≥ 10 IU/ml	11	27,5
Доносени (n=191)	<10 IU/ml	111	58,1
	≥ 10 IU/ml	80	41,9

Забелязва се съществена разлика между двете кохорти. Петдесет и осем майки (30,4%) на родените доносени бебета имат anti-PT IgG ≥ 10 IU/ml. Това кореспондира и с висок дял на потенциално защитени доносени бебета (41,9%, n=80). В група Б само 7 от майките (17,5%) и 11 от бебетата (27,5%) притежават потенциално защитни антитела IgG ≥ 10 IU/ml.



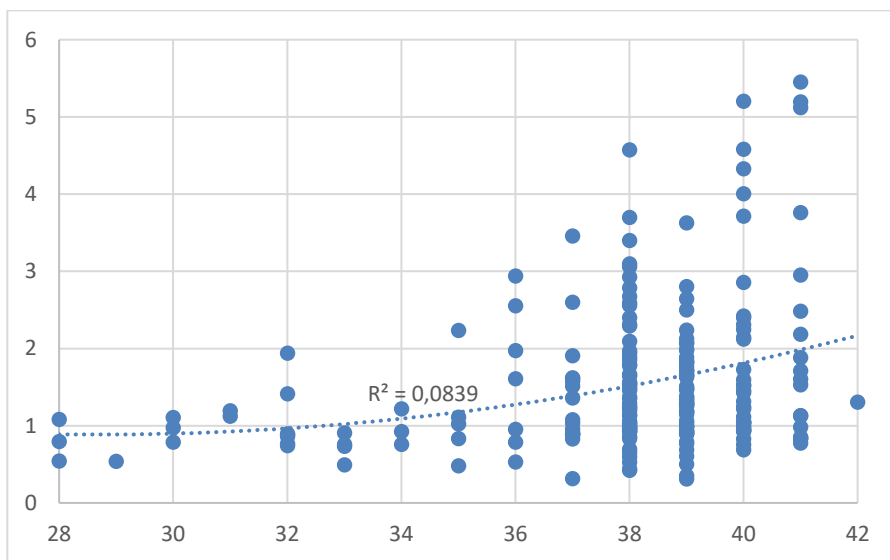
Фигура 20. Процентно съотношение на майки и новородени с anti-PT IgG ≥ 10 IU/ml.

Процентът на защитните концентрации на антитела за anti-PT в пробите от серум от пъпна връв е значително по-нисък в групата на недоносените, отколкото в групата на доносените ($p < 0.05$) (таблица 29).

Таблица 29. Процентно съотношение на 40 двойки майка-недоносено новородено спрямо anti-PT IgG <10 и ≥10 IU/ml

Anti-PT IgG		Недоносени	Доносени	Общо	X ²	df	p
< 10	n	34	114	148	3,89	1	0,049
	%	73,9%	58,2%	61,2%			
≥ 10	n	12	82	94			
	%	26,1%	41,8%	38,8%			
Общо	n	46	196	242			

В настоящето изследване наблюдавахме рязко покачване на anti-PT IgG след 33 гестационна седмица (фиг. 21). Във връзка с това може да се счита, че периода до 28 седмица е оптимален за провеждане на имунизация на майката, като се има предвид, че периода за изграждане на антитела е около 2 седмици.



Фигура 21. Позитивиране на трансплацентарния транспорт според гестационната седмица.

Според инструкциите за интерпретация на резултатите на използвания кит Bordetella pertussis toxin (PT) IgG ELISA kit (NovaTec, Immunodiagnostica, GmbH, Germany) стойности на anti-PT IgG ≥ 100 IU/ml се считат за индикация за скорошно прекарана коклюшна инфекция. Нашите резултати показват, че 5 от всички изследвани родилки са имали такива нива на антитела, като само една от тях е съобщила за продължителна пристъпна кашлица. Това показва, че честотата на коклюш сред жените в детеродна възраст в настоящето изследване е 2,2%. За последните години в Република България са регистрираните потвърдени случаи на коклюш за периода 2000 - 2017 година, според националния статистически Институт, са представени на таблица 30.

Таблица 30. Регистрирани, потвърдени случаи на коклюш в България за периода 2000-2017.

	2000	2005	2010	2013	2014	2015	2016	2017
Регистрирани случаи	106	242	54	89	52	35	98	116
Заболваемост на 100000	1.3	3.1	0.7	1.2	0.7	0.5	1.4	1.6

За периода 2000-2017 г. не са отчетени смъртни случаи в България, дължащи се на *B. pertussis* инфекция.

Получените данни в настоящето проучване за прекарана скорошна *B. pertussis* инфекция, в размер на 2.2% сред жените в детеродна възраст, не корелира с публикуваните данни за Република България за същата кохорта. Получените данни показват от една страна, че е вероятно много повече жени в детеродна възраст да са прекарвали скорошна инфекция с *B. pertussis*, както и че 72% от жените в детеродна възраст не са защитени срещу инфекция с *B. pertussis*.

При стойности на anti-PT IgG $\geq 40-99,9$ IU/ml, според инструкциите на производителя на кита, се препоръчва тестване на нова проба след 7-10 дни, поради съмнение за скорошна

инфекция. Резултатите в настоящето проучване показват, че при 13 (5,6%) от родилките се препоръчва повторно изследване на антителата. Само една жена от тази група е съобщила за продължителна пристъпна кашлица за период повече от две седмици през последните 2 години.

Тогава, ако включим и двете групи заедно, т.е. всички жени с anti-PT IgG ≥ 40 IU/ml, резултатите показват, че честотата на коклюш в настоящето проучване е 7.8%, т.е. 18 от 231 родилки, включени в изследването е възможно да са имали скорошна инфекция от коклюш. От тях само 2 майки съобщават в анкетата за продължителна кашлица за последните 2 години.

Екстраполиране на антителата при новородените на 6 седмична възраст

В нашето проучване, GMC на anti-PT IgG са 5,17 IU/ml в кръвта на майката и 6,71 IU/ml, съответно в кръвта от пъпната връв на новородените. Тези стойности на GMC в нашето проучване не са достатъчно високи, за да осигурят защита до първата ваксинация, приложена на 2-месечна възраст, тъй като полу-живота на anti-PT IgG е около 36,6 дни (6 седмици). Това означава, че след този период, антителата в общата кохорта ще са GMC 3,55 IU/ml, което ще е под потенциално защитните стойности (фиг. 22). Данните от настоящето изследване показват, че при около 75% от новородените деца (71.94% при доносените и 91.31% при недоносените), титрите на anti-PT IgG, на 6 седмична възраст са недостатъчни за осигуряване на защита от коклюш.



Фигура 22. Екстраполация на anti-PT IgG GMC на новородените на 6 седмична възраст.

Честота на инфекцията сред жени в детеродна възраст

Към 2018 година в Република България, жените в детеродна възраст (15-46 годишна възраст) са 1487603. Докладваните регистрирани и потвърдени случаи на коклюш сред жени в детеродна възраст са 8, което означава, че заболяемостта от коклюш при жени в детеродна възраст е 0.54 на 100000. В настоящето изследване, са установени 5 жени с прекарана скорошна инфекция, доказано с anti-PT IgG ≥ 100 IU/ml, което отнесено към цялата популация на жените в детеродна възраст към 2018 година, прави ниво на заболяемост в размер над 2000 случая. Огромната разлика в докладваните случаи и изчислената популация на коклюшна инфекция, най-вероятно се дължи на недокладване на случаите и наличието на една единствена лаборатория, която да проведе PCR за бърза диагностика.

V. ДИСКУСИЯ

Коклюшната инфекция се причинява от *B. pertussis*, Грам-отрицателен аеробен, капсулиран кокобацил, изолиран 1906 година. Ваксина срещу коклюш е разработена 1934 година и масовата имунизация започва 10 години по-късно. Първоначално създадената ваксина е целоклетъчна. От 1981 година започва разработването на ацелуларните ваксини (Kulenkampff et al, 1974; Miller et al, 1981). Рутинната имунизация с целоклетъчна ваксина срещу коклюш е въведена в България през 1957 година. Въпреки активната имунизация, в световен мащаб коклюшната инфекция е широко разпространена, причинявайки епидемии на всеки 3-4 години (WHO, 2018). Това донякъде може да се обясни с добре документираната изменчивост на *B. pertussis*. По аналогичен начин на антибиотичната резистентност, ваксините могат да упражнят натиск върху бактериите за еволюция в други антигенни изоформи на включените във ваксините протеини (Mooi et al, 2009; Belcher & Preston, 2015; King et al, 2010; Sealey et al, 2015; van Gent et al, 2012; Hardwick et al, 2002). В случая с *B. pertussis* тази адаптация се случва чрез поне три известни механизма: антигенно изместване от покритите от *aP* ваксината антигени; изтриване на покритите от *aP* ваксината антигени; и свръхпродукция на антигени. Bart et al. (2014) изследва изменчивостта на *B. pertussis* за последните 100 години и установява промени в антигенните генни алели, генетично различни от съдържащите се в *aP* ваксината. Във всеки един от случаите е имало преминаване от специфичните (включени във *aP* ваксините антигенни алели), към непокрити от *aP* ваксините алели. Един още по-дефинитивен път за „бягство“ е бил отбелязан от множество лаборатории - коклюшни изолати, които изцяло спират да експресират един или повече от гените за включените в *aP* антигени (Hegerle et al, 2012; Barkoff et al, 2012; Quinlan et al, 2014; Martin et al, 2015). Новите щамове, са били по-вирулентни към хората, давали са по-висока честота на хоспитализациите и смъртните случаи (Belcher & Preston, 2015; de Gouw et al, 2014; Octavia et al, 2012; Lapidot & Gill, 2016). Този полиморфизъм на *B. pertussis* не е достатъчен да се обясни

повишената заболяемост в цял свят. Интересен е случаят с Швеция, където повече от 20 години се използва моновалентна *aP* ваксина, която все още е ефективна, независимо от потвърдени щамове *B. pertussis* съдържащи невключени във ваксината алели (Lapidot & Gill, 2016). Около 10 години след въвеждането на *aP* ваксината в САЩ се наблюдава повишена заболяемост. Във Великобритания се наблюдава значително намаляване на заболяемостта след 1990 година, поради което от 1991 до 2010 година се спира бустер имунизацията, като се разчита на естествения имунитет, но значително повишаване на заболяемостта от коклюш се отчита от 2012 насам (Amirthalingam et al, 2013). България не прави изключение от тази статистика, въпреки, че честотата на коклюшната инфекция е сравнително ниска в сравнение с други Европейски страни, като Норвегия, Дания, Германия, където рутинно коклюшната инфекция е с висока честота. В тези страни обаче, делът на лабораторно потвърдени случаи е 100%, докато трябва да се отбележи, че в България има една лаборатория към Националния център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), където могат да се потвърдят резултатите. Това създава известна несигурност в абсолютния брой докладвани случаи на коклюшна инфекция в България.

По данни на СЗО за 2018 година, 160700 случаи на коклюш са завършили летално при деца под 5 годишна възраст (WHO, 2018), като 75% от тях са при деца на възраст под 2 месеца. Проучването на Halasa et al. (2008) доказва, че имунизационната практика насочена към новородените не може да осигури необходимата ранна защита от коклюшна инфекция. Според имунизационния календар на Република България, ваксинация срещу коклюш се започва на възраст от 6 - 8 седмици, последвано от имунизация на 3 месеца, 4 месеца и поне една година след третата имунизация, което е на 1 година и 4 месеца. Като правило трансферираните майчини антитела напълно изчезват до 6-ия месец от живота на детето. Като пълна защита за кърмачета се счита периода след последната имунизация на 1

година и 4 месеца. Това прави децата до тази възраст много по-податливи на коклюшна инфекция.

Подобно на други протеинови антигени, съществува активен плацентарен трансфер на майчините коклюш-специфични антитела, което води до значително повишени нива на специфичен за коклюша IgG, достъпен за новородените (Healy et al, 2004). През първия триместър от бременността, малко количество IgG се транспортира до плода (Simister, 2003). Трансплацентарният транспорт е приблизително 10% от майчината концентрация на 17-22 гестационна седмица и постепенно нараства до 50% при 28-32 седмици от бременност. През третото тримесечие нарастването на концентрациите на фетален IgG (между 29 и 41 седмица на бременността) е два пъти по-голямо от това на 17-28-та гестационна седмица. Въпреки това, количеството на трансплацентарно пренасян IgG е по-ниско до приблизително 34 седмици от бременността (Healy, 2012). Тези литературни данни напълно корелират с получените данни в настоящето проучване, тъй като установихме, че трансплацентарният трансфер сигнификантно се позитивира около 33 гестационна седмица.

Нивата на антитела на пертусис токсин IgG, определени като потенциално защитни, се основават на данни от проучвания за ефикасност на ваксината (Storsaeter et al, 1998; Cherry et al, 1988). Предполага се, че майките с най-високи нива на антитела ще раждат деца с по-високи нива на антитела и е по-вероятно те да бъдат защитени от коклюшна инфекция след раждането, отколкото бебета, родени от майки с по-ниски нива. Тъй като нивото на антитела, наличието на специфични антитела или профила на антитялото не е прието универсално като количествена серологична мярка за защита, в настоящето изследване беше направен анализ на родилките, новородените, двойки майка-доносено и двойки майка-недоносено с антитела към пертусис токсина, разделени в няколко групи според стойността на антителата: над 100, 40-99 и под 40 IU/ml (под 10, 5-10, над 5). От проведената анкета на 242 майки в проучването,

нито една не е получила имунизация с коклюшна ваксина за възрастни (*Tdap*) по време на бременността или последните 5 години. Следователно, жени с най-висок титър на антитела (≥ 100 IU/ml) са имали естествена среща с коклюшна инфекция скоро преди раждането. В настоящето изследване такива стойности са измерени при 5 от 231 жени. При 13 от 231 жени, измерените стойности са в диапазона 40-99,9 IU/ml, което е предпоставка, че тези жени са имали досег с инфекцията през последните 5-10 години. Двете групи заедно правят 7.8% от жените в проучването. Това е значително повече от докладваните случаи на жени в детеродна възраст за страната. Към 2018 година в Република България, жените в детеродна възраст (15-46 годишна възраст) са 1487603. Докладваните регистрирани и потвърдени случаи на коклюш сред жени в детеродна възраст са 8, а заболяемостта е 0.54 на 100000. Данните от настоящето изследване, отнесени към цялата популация на жените в детеродна възраст към 2018 година предполага над 2000 случая. Огромната разлика в докладваните случаи и изчислената популация на коклюшна инфекция в настоящето проучване, най-вероятно се дължи на нерегистриране и недокладване на случаите.

В настоящето проучване, за продължителна кашлица през последните години съобщават 36 жени, като само 8 са отговорили, че и те и някой член от домакинството са имали продължителна кашлица. Всички 242 жени са отговорили, че са имунизирани редовно според имунизационния календар на Република България. Целоклетъчна коклюшна ваксина са получили 234 жени, тъй като през 2008 година се въвежда бустерна доза с ацелуларна ваксина (*DTaP* + IPV) на 6 годишна възраст, а от 2010 г се преминава изцяло на ацелуларна ваксина за всички възрастови групи. В настоящето проучване има 8 жени, които са попаднали в кохортата да получат 2008 година бустерна *aP* ваксина. При 2 от тях няма данни за anti-PT IgG. При останали 6 жени, пет са с anti-PT IgG < 10 IU/ml. Тази бройка е твърде малка за да се направи извод относно ефективността от въвеждането на *aP* бустерна ваксина в

България. Необходимо е да се проведе подобно на настоящето проучване след 15-20 години, за да се установи ефективността на **aP** ваксината сред българската популация.

Концентрациите на anti-PT IgG и плацентарния трансфер на тези антитела бяха изследвани в две кохорти: двойки майки-доносени и майки-недоносени новородени, като резултатите са представени като anti-PT IgG IU/ml и/или GMC. GMC стойността се използва като един по-обективен подход, когато резултатите следват нормално логаритмично разпределение. van den Berg et al. (2010) съобщава, че майчините GMC на anti-PT IgG варират между 2.4–11 IU/ml. В кръвта от пъпната връв на новородените се съобщава, че GMC на anti-PT IgG варират между 4.1–16.2 IU/ml. Healy et al. (2004) измерват IgG титри при майки и бебета (n=64 двойки) до три специфични за коклюша антитела и намират изключително ниски нива на майчините (GMC 2.4 IU/ml) и детските антитела срещу пертусис токсин (GMC 4.1 IU/ml) при раждане, с бързо понижени нивата на антителата на бебетата на 2-месечна възраст (GMC 1.4 IU/ml). Измерените GMC на anti-PT IgG в настоящето проучване, са 5,17 IU/ml, съответно в кръвта на майката и 6,71 IU/ml, съответно в кръвта от пъпната връв на новородените. Тези стойности не са достатъчно високи, за да осигурят защита до първата ваксинация, приложена на 2-месечна възраст, тъй като полу-живота на anti-PT IgG е около 36,6 дни (6 седмици) (Fouda et al, 2018; Van Savage et al, 1990). Това означава, че след този период, антителата в общата кохорта ще са GMC 3,55 IU/ml, което ще е под потенциално защитните стойности определени от Storsaeter et al. (1998) и Cherry et al. (1998).

Двойки майка-новородено

В групата на двойките майка-доносено се наблюдава, че от 191 двойки, плацентарният трансфер на anti-PT IgG е позитивен (> 1 за anti-PT IgG) при 69.6% от двойките, а ефективността на трансфера е 148%, което е в унисон на данните от van den Berg et al. (2010) и Healy et al. (2004), които докладват, че съотношенията плацентарен трансфер при доносени новородени

варират между 126% и 169%. Потенциално незащитени с anti-PT IgG <10 IU/ml са 57% от двойките майка-доносно. При доносите деца, anti-PT IgG под майчините нива имат 41,18% от родените през 37 г.с., 29,09% през 38 г.с., 27,59% през 39 г.с., 25,71% през 40 г.с. и 27,78% през 41-ва гестационна седмица. Не се наблюдава зависимост между теглото на доносите деца и стойностите на anti-PT IgG. В настоящето изследване, групата на двойките майка-недоносно е сравнително малка – 40 двойки. Една майка има концентрации на anti-PT IgG (191.74 IU/ml), което е показателно за скорошен контакт с *B. pertussis*, а нейното дете е със стойност 101.79 IU/ml. Потенциално незащитени с измерен anti-PT IgG <10 IU/ml са 70% от двойките майка-недоносно. Резултатите от настоящето проучване показват, че GMS на anti-PT IgG от пъпната връв на доносите новородени е статистически значимо по-нисък от този на доносите (4.94 IU/ml за недоносени спрямо 7,21 IU/ml за доноси, $p < 0.05$). Тези данни са в унисон с проучванията на Van den Berg et al. (2010), Heininger et al. (2009) и Nomura et al. (2003). В настоящето проучване доказваме, че ефективността на трансплацентарния трансфер на майчините антитела срещу коклюш, е по-нисък при недоносени деца (78%), отколкото при доноси деца (148%) ($p < 0.05$). От 1 до 28 седмици постнатално, преждевременно родените произвеждат по-малко като количество и разнообразие IgG антитела в сравнение с родените на термин (Zemlin et al, 2007; Malek et al, 1996). При 55% от доносите се наблюдава негативно съотношение на плацентарния трансфер, докато при доносите той е 30.4% ($p < 0.01$). Настоящото изследване потвърждава съществуващите доказателства за по-нисък трансплацентарен трансфер на коклюшни антитела в преждевременно родените новородени, особено родените преди 33-та гестационна седмица. Трансплацентарният трансфер е многофакторен процес (Fouda et al, 2018), който най-вероятно е независим от основните причини, водещи до преждевременно раждане. Тези деца имат по-висок риск от заболяемост и смъртност поради тяхната незряла имунна система, малък трансфер на майчините антитела до 28-32 седмици от бременността и по-ранно намаляване на

нивата на IgG под защитното ниво от родените на термин (van den Berg et al, 2011).

Имунизация по време на бременността

Принципът на използване на трансплацентарния имунитет за защита на деца от болести, предотвратими от ваксини, не е нов. Ваксинацията на бременни жени с тетаничен токсид значително е намалила глобалната честота на неонатален тетанус. Намаляване с 29% на честотата на фебрилни респираторни заболявания и 63% намаляване на случаите на лабораторно потвърден грип при кърмачета, е наблюдавано при децата родени от майки, получили ваксинация срещу грип през третия триместър на бременността (Zaman et al, 2008). В Европа от 2012 година се препоръчва прилагане на Tdap ваксина по време на бременност (препоръчително през 27-32 гестационна седмица) (Vilajeliu et al, 2015; Eberhardt et al, 2016; Naidu et al, 2016; CDC, 2018). **Tdap** може да се приложи от 13 гестационна седмица до термин, в зависимост от индивидуалния подход към пациента. Налагането на **Tdap** по време на бременност е с цел повишаване на anti-PT IgG и тяхното пасивно предаване на новородените и защитата им до поставяне на първата имунизация. Безопасността на всяка ваксина е от първостепенно значение, но **Tdap** имунизацията по време на бременност не е систематично проучена, като оскъдните данни са от малки кохортни и постмаркетингови проучвания, и от US Vaccine Adverse Event Reporting System (Petousis-Harris et al, 2016). Съществуват две потенциални опасения по отношение на употребата на **Tdap** по време на бременност. Първо, липсват доказателства, че трансплацентарните майчини антитела, индуцирани от **Tdap** ваксина, прилагана по време на бременност, ще предпазят бебетата от коклюш. Необходими са перспективни широкомащабни проучвания в тази насока. На второ място е загрижеността, че **Tdap**, прилаган по време на бременност и високият трансплацентарен трансфер може да повлияе неблагоприятно ваксиналния отговор като инхибира сероконверсията, явление, известно като „притъпяване“ (Siegrist, 2003; Munoz et al, 2014). Този феномен е добре

известен при някои живи ваксини, като например морбили, но все още не е изяснено дали „притъпяването“ на отговора от трансферираните високи нива на антитела е проблем и за коклюшната инфекция. Поради незрялостта на детската имунна система, ваксинацията в твърде ранен стадий поражда само слаб серологичен отговор (Siegrist, 2008). Препоръчителните схеми за ваксинация срещу коклюш отразяват тези потенциални опасения, тъй като са разработени за подобряване и засилване на защитата с напредване на имунната система на кърмачетата и защитата от майчините антитела (Englund et al, 1995; Bento et al, 2017).

Най-важната констатация от нашето проучване е, че само 94 от 242 новородени (39%), са с потенциално защитни anti-PT IgG \geq 10 IU/ml независимо от коя кохорта са. Екстраполиране на антителата на новородените показват, че само 59 от тези 94 деца (25% от цялата кохорта) ще имат anti-PT IgG \geq 10 IU/ml на 6 седмици след раждането, когато се прави първата имунизация срещу коклюш. По този начин, около 75% (183 новородени) от децата вероятно са податливи на коклюшна инфекция до 6-седмична възраст, въпреки ефективното пренасяне на майчините антитела. От тях 110 деца са с anti-PT IgG $<$ 5 IU/ml, което означава, че приблизително половината деца нямат достатъчно трансферирани anti-PT IgG и са потенциално застрашени от *B. pertussis* инфекция в първите 6 седмици от живота си. Установено е, че бебетата, родени от майки със серологично доказателство за предходна коклюшна инфекция, е по-вероятно да имат потенциално защитни нива на антитела 6 седмици след раждането (Fouda et al, 2018). Тези данни показват, че чрез симулиране на предишна инфекция, т.е. майчина имунизация с ацелуларна ваксина срещу коклюш преди или по време на бременност, би могло да се осигури по-високи нива на anti-PT IgG и съответно ефективно трансплацентарно предаване на новородените. Това е доказано в серия от експерименти на Warfel et al. (2014) с животински модели. Трансферът на майчини антитела е есенциален за незрялата имунна система на новороденото. Трансферираните IgG

антитела осигуряват кратко-временен пасивен имунитет, който има регулаторна роля за развитието на хуморалния имунитет на новороденото.

Тъй като няма универсално приета серологична мярка за защита от коклюшна инфекция, предположихме, че бебетата в нашето проучване с високи нива на anti-PT IgG ≥ 40 IU/ml ($n=34$ от 242, 14%) са родени от жени, които са идентифицирани с високи нива на антитела. Майките с високи нива на anti-PT IgG ≥ 40 IU/ml в настоящето изследване са 18 от 231, 7.8%. Така се оформят само 14 двойки майка-новородено с корелация на anti-PT IgG ≥ 40 IU/ml, от които 11 двойки са при доносените деца и 3 двойки при недоносените. Тези жени вероятно са придобили нивата на антитела чрез коклюшна инфекция, тъй като никоя не е имала документирана история на имунизация срещу коклюш. Повишените титри на коклюшните антитела могат да персистерат 7 до 10 години след инфекцията или до 5 години след имунизация и по-високите нива на антитела са най-съвместими с прекарана инфекция в годините преди раждането (Wendelboe et al, 2005; Edelman et al, 2007; Barreto et al, 2007; Железова, 2016).

Докладвано е, че нивата на майчините патогенно-специфични IgG при раждане влияят върху ефективността на трансплацентарния IgG транспорт и че високите нива на майчините патогенно-специфични IgG при раждане водят до по-голяма продължителност на детската защита (Ballard et al, 1991; Englund, 2007; Healy, 2012). Беше направен корелационен анализ на съотношението на anti-PT IgG новородено-майка, за да се определи ефикасността на плацентарния трансфер. Установената корелация в настоящето проучване, между нивата на anti-PT IgG на майката и доносените новородени, е от особено значение. При недоносените установихме, че няма добра корелация между нивата на anti-PT IgG на майките и доносените новородени. Следователно, имунизацията на бременни жени е вариант за предизвикване на високи майчини нива на патогенно-специфични IgG, което от своя страна ще

доведе до високи нива на трансфер на майчините антитела през плацентата. Въпреки това, за недоносените, особено за тези под 32-ра гестационна седмица, имунизацията само на майката не би била толкова ефективна поради по-малкото количество транспорт на трансплацентарни антитела. Ето защо, както се препоръчва от АСІР (Murphy et al, 2008), стратегията на „пашкула“ в комбинация с майчината имунизация би била по-добър вариант за недоносените. От друга страна, имунизацията на недоносените деца е по-добре да се прави по календарна, а не по коригирана възраст, тъй като тази група е най-рискова.

В настоящето проучване, за първи път в България, е изследвана популация от жени в детеродна възраст и техните новородени относно нивата на коклюшните антитела и трансплацентарния им трансфер. Установена е силна корелация между нивата на коклюшните антитела на майките и тези от пъпната връв на новородените и подкрепя обосновката за майчина имунизация с цел предпазване на новородените от коклюшна инфекция. Друга възможна стратегия е въвеждането на ре-имунизация на всеки 10 години. В Република България, от 2020 година се въвежда ре-имунизация на 12 годишна възраст, както се препоръчва от АСІР (Murphy et al, 2008). Проучвания върху имунизацията с *Tdap* при юноши и възрастни показват, че в 93% от ваксинираните, над 5 IU/ml нива на пертусис токсин антителата персистират до 5 години след имунизацията (Edelman et al, 2007; Barreto et al, 2007). Тези данни налагат провеждането на бъдещи проучвания относно ефикасността и ефективността на *aP* ваксините.

VI. ЛИТЕРАТУРА

1. Железова Г. Ваксини за профилактика на респираторни бактериални инфекции. Изд. УИ „Св. Климент Охридски“ 2016.
2. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, et al. New ballard score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr* 1991;119:417-23.
3. Barreto L, Guasparini R, Meekison W, et al. Humoral immunity 5 years after booster immunization with an adolescent and adult formulation combined tetanus, diphtheria, and 5-component acellular pertussis vaccine. *Vaccine* 2007;25(48):8172–9.
4. Bento AI, King AA, Rohani P. Maternal pertussis immunisation: clinical gains and epidemiological legacy. *Euro Surveill* 2017;22(15). pii: 30510.
5. CDC Centers for Disease Control and Prevention: Pertussis (Whooping cough) Surveillance and Reporting, 2018 Available at: <http://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting.html>, Accessed 5 Sep 2019.
6. Cherry JD, Brunnel PA, Golden GS, et al. Report of the task force on pertussis and pertussis immunization – 1988. *Pediatrics* 1988;81:933-84.
7. Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, et al. A search for serologic correlates of immunity to Bordetella pertussis cough illnesses. *Vaccine* 1998;16(20):1901-6.
8. Edelman K, He Q, Maˆkinen J, et al. Immunity to pertussis 5 years after booster immunization during adolescence. *Clin Infect Dis* 2007;44(10):1271.
9. Englund JA. The influence of maternal immunization on infant immune responses. *J Comp Pathol* 2007;137(suppl 1):S16–9.
10. Englund JA, Anderson EL, Reed GF, et al. The effect of maternal antibody on the serologic response and the incidence of adverse reactions after primary immunization with acellular and whole-cell pertussis vaccines combined

- with diphtheria and tetanus toxoids. *Pediatrics* 1995;96(3 Pt 2):580-4.
11. Fouda GG, Martinez DR, Swamy GK. The Impact of IgG transplacental transfer on early life immunity. *Immunohorizons* 2018;2(1):14-25.
 12. Healy CM, Munoz FM, Rench MA, et al. Prevalence of pertussis antibodies in maternal delivery, cord, and infant serum. *J Infect Dis* 2004;190(2):335-40.
 13. Healy CM, Rench MA, Baker CJ. (2012). Importance of Timing of Maternal Combined Tetanus, Diphtheria, and Acellular Pertussis (Tdap) Immunization and Protection of Young Infants. *Clin Infect Dis* 2012;56(4):539-44.
 14. Heininger U, Riffelmann M, Leineweber B, et al. Maternally derived antibodies against *Bordetella pertussis* antigens pertussis toxin and filamentous hemagglutinin in preterm and full term newborns. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28(5):443-5.
 15. Malek A, Sager R, Kuhn P, et al. Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1996;36(5):248-55.
 16. Munoz FM, Bond NH, Maccato M, et al. Safety and immunogenicity of tetanus diphtheria and acellular pertussis (Tdap) immunization during pregnancy in mothers and infants: a randomized clinical trial. *JAMA* 2014;311(17):1760-9.
 17. Murphy TV, Slade BA, Broder KR, et al. Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of pertussis, tetanus, and diphtheria among pregnant and postpartum women and their infants recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) *MMWR Recomm Rep*. 2008;57(RR-4):1-51
 18. Nomura M, Kuno-Sakai H, Kimura M, et al. Dynamics of transplacental transmission of pertussis antibodies in premature and full-term infants. *Tokai J Exp Clin Med* 2003;28:21-6.

19. Petousis-Harris H, Walls T, Watson D, et al. Safety of Tdap vaccine in pregnant women: an observational study. *BMJ Open* 2016;6(4):e010911.
20. Siegrist CA. Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: review of hypotheses and definition of main determinants. *Vaccine* 2003;21(24):3406-12.
21. Siegrist CA. Blame Vaccine Interference, Not Neonatal Immunization, for Suboptimal Responses after Neonatal Diphtheria, Tetanus, and Acellular Pertussis Immunization *J Pediatr* 2008;153(3):305–7.
22. Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, et al. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 1998;16(20):1907-16.
23. van den Berg JP, Westerbeek EA, van der Klis FR, et al. Transplacental transport of IgG antibodies to preterm infants: a review of the literature. *Early Hum Dev* 2011;87(2):67-72.
24. van den Berg JP, Westerbeek EA, Berbers GA, et al. Transplacental transport of IgG antibodies specific for pertussis, diphtheria, tetanus, haemophilus influenzae type b, and *Neisseria meningitidis* serogroup C is lower in preterm compared with term infants. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:801–5.
25. Van Savage J, Decker MD, Edwards KM, et al. Natural history of pertussis antibody in the infant and effect on vaccine response. *J Infect Dis* 1990;161(3):473–9.
26. Warfel JM, Papin JF, Wolf RF, et al. Maternal and neonatal vaccination protects newborn baboons from pertussis infection. *J Infect Dis*. 2014a; 210(4): 604–10.
27. Wendelboe AM, Van Rie A, Salmaso S, et al. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24(5 Suppl):S58–61.

28. Zaman K, Roy E, Arifeen SE, et al. Effectiveness of maternal influenza immunization in mothers and infants. *N Engl J Med* 2008;359(15):1555-64.
29. Zemlin M, Hoersch G, Zemlin C, et al. The postnatal maturation of the immunoglobulin heavy chain IgG repertoire in human preterm neonates is slower than in term neonates. *J Immunol* 2007;178(2):1180-8.

VII. ИЗВОДИ

1. Заболеваемостта от коклюш при жени в детеродна възраст е 2,2% (5/231) в настоящето изследване, а със съмнение за скорошна коклюшна инфекция са 5.6% (13/231). Само 2 жени са съобщили за продължителна кашлица през последните 2 години, което означава, че заболяването може да протича безсимптомно при възрастните хора.
2. Жените в детеродна възраст (15-46 години) с anti-PT IgG над 10 IU/ml (потенциално защитени) са само 28%, а новородените с anti-PT IgG над 10 IU/ml (потенциално защитени) са 39%.
3. Плацентарният трансфер на anti-PT IgG при новородените деца е позитивен в 65% от двойките, а негативен при 35%. Това е активен процес, зависещ от много фактори.
4. Доказан е плацентарен трансфер на майчините anti-PT IgG, който е в пряка зависимост от гестационната седмица на раждането и сигнификантно се позитивира около 33 г.с.
5. Няма статистически значима корелация между антителата на новородените и възрастта на майката, теглото при раждане и пола.
6. Ефективността на плацентарния трансфер на anti-PT IgG при доношените деца е 148%, а при недоношените е само 78%.
7. При около 75% от новородените деца (71.94% при доношените и 91.31% при недоношените), титрите на anti-PT IgG, ще са недостатъчни за осигуряване на защита от коклюш на 6 седмична възраст.
8. Екстраполирането на данните от настоящето изследване, показва, че отнесено към 1487603 жени в детеродна възраст към 2018 година, фактическата заболеваемост от коклюш сред тази кохорта може да е много повече – приблизително 2000 случая.

9. Недоносените деца са по-уязвими поради ниските нива на трансфер на антитела и имунизацията при тях би следвало да се прави по календарна възраст, а не по коригирана.
10. Имунизацията преди или по време на бременността би осигурила достатъчно високи нива на anti-PT IgG през първите седмици от живота на новородените деца.

VIII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с оригинален характер

1. За първи път у нас е проведена серологична оценка на плацентарния трансфер на IgG антитела срещу *B. pertussis* токсин (anti-PT IgG) при 231 двойки майка-новородено в обсервационно, проспективно, популационно проучване.

2. Установяването на ниска защита при жени в детеродна възраст и новородени, особено недоносени, показва необходимостта от промяна в имунизационните стратегии при бременни и недоносени деца.

3. Доказано е, че заболяемостта от коклюш у нас при жени в детеродна възраст е много по-висока от официално регистрираните и докладвани случаи.

IX. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации

- **Мангъров И.** Актуални проблеми на коклюш инфекцията при новородени деца и малки кърмачета. Практическа педиатрия 2019;6.
- Влахова Д, Георгиева Р, Дянкова Д, Симеонова С, Томова В, Данкова В, **Мангъров И**, Николова Е. Късна неонатална инфекция. Практическа педиатрия 2019;6.
- Velev V, Vutova K, Pavlova M, **Mangarov I.** A Case of Fasciolosis in a 11-Year-Old Syrian Immigrant Boy. J Trop Pediatr 2019; Jul 13. pii: fmz043 (**IF 1.289**) <https://doi.org/10.1093/tropej/fmz043>

Участия в научни форуми

- **Mangarov IA**, Velikova TV, Ivanova IP, Georgieva RV. Pertussis toxin (PT) IgG antibodies in postpartum women and their newborns в XVth International Scientific Conference for Students and Young Doctors, 9-14 Oct. 2017, Pleven, Bulgaria (постер)
- **Мангъров ИА**, Великова ЦВ, Георгиева РВ. IgG антитела срещу бордетела пертусис у родилки и техните новородени. IV-та Научно-педиатрична конференция “Социално значими заболявания в детската възраст” 16-17 март 2018, гр. Велико Търново, България (постер)
- **Мангъров ИА**, Великова ЦВ, Георгиева Р. IgG антитела срещу бордетела пертусис токсин (anti-PT) у родилки и техните новородени. XIX-та Национална конференция за ОПЛ и педиатри с международно участие, Слънчев бряг, България 18-20 май 2018 (постер)
- **Мангъров И.** IgG антитела срещу бордетела пертусис токсин (anti-PT) у родилки и техните новородени (резултати). VI Национална Конференция по Неонатология с международно участие „Инфекциозна патология на новороденото” 12-14. 10. 2018г. гр. Трявна (презентация)
- **Мангъров И.** Актуални проблеми на пертусис профилактиката при недоносени деца. IV Национална педиатрична конференция профилактика, диагностика и терапия в детско-юношеската възраст клинични и терапевтични предизвикателства в педиатричната практика 11–14 април 2019, гр. Несебър (презентация)