

# Ocena odporności poszczepiennej po zastosowaniu skoniugowanej szczepionki przeciw *Haemophilus influenzae* typu b u dzieci przedwcześnie urodzonych

## Evaluation of postvaccinal immunity after immunization with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in preterm infants

DANUTA CHLEBNA-SOKÓŁ, JANUSZ PIOTR SIKORA, WIKTOR SABANTY, IWONA LIGENZA

Klinika Propedeutyki Pediatrii Instytutu Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Sporna 36/50, 91-738 Łódź

**Wprowadzenie.** U dzieci przedwcześnie urodzonych z niską masą urodzeniową z powodu niedoborów immunologicznych po przeprowadzeniu szczepień obserwuje się słabszą odpowiedź immunologiczną i mniejszą skuteczność serologiczną.

**Cel pracy.** Celem pracy była ocena stężenia przeciwciał anti-PRP w surowicy krwi u dzieci przedwcześnie urodzonych po zastosowaniu skoniugowanej szczepionki przeciw *Haemophilus influenzae* typu b (Hiberix) i uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy osiągane poziomy przeciwciał zabezpieczają przed zachorowaniem.

**Materiał i metody.** Oceny odporności poszczepiennej u 32 wcześniaków po podaniu szczepionki Hiberix dokonywano przy użyciu metody immunoenzymatycznej (ELISA), wykorzystując zestaw do oznaczania stężeń przeciwciał poszczepiennych przeciw Hib (BINDAZYME Human Anti *Haemophilus Influenzae* Enzyme Immunoassay Kit, The Binding Site, Birmingham, U.K.).

**Wyniki.** Stwierdzono ochronny istotny statystycznie wzrost miana przeciwciał poszczepiennych anti-PRP u 32 dzieci (100%). Nie stwierdzono znamiennych korelacji między urodzeniową masą ciała, czasem trwania ciąży a stężeniami przeciwciał osiągniętymi po szczepieniu. Wykazano natomiast istotną statystycznie zależność między urodzeniową masą ciała i czasem trwania ciąży a wyjściowymi stężeniami przeciwciał anti-PRP.

**Wnioski.** Wyniki badań dowodzą, że wszystkie wcześniaki osiągają po immunizacji szczepionką Hiberix ochronne poziomy przeciwciał poszczepiennych anti-PRP. Z powodu bardzo dobrej immunogenności i tolerancji zastosowanej szczepionki, powinna ona znaleźć się w obowiązującym kalendarzu szczepień ochronnych, szczególnie u dzieci przedwcześnie urodzonych.

*Alergia Astma Immunologia, 2004, 9(1), 50-54*

**Słowa kluczowe:** odporność poszczepienna, szczepienie przeciw Hib, wcześniaki

**Introduction.** Due to immunological deficiencies, a decreased immunological response and lower serological efficacy are observed after vaccinations in preterm infants with low birth weight.

**Aim of study.** This study was aimed to evaluate the levels of anti-PRP antibodies after immunization with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine (Hiberix) in preterm infants. Besides, we were interested if this immunization triggered the protective titres of postvaccinal antibodies.

**Material and methods.** We evaluated the postvaccinal immunity in 32 preterm infants by means of immunoenzymatic methods (ELISA), with commercially available test kit (BINDAZYME Human Anti *Haemophilus Influenzae* Enzyme Immunoassay Kit, The Binding Site, Birmingham, U.K.).

**Results.** The protective levels of anti-PRP antibodies were noticed in 32 children (100%). The increase of antibodies titers was statistically significant ( $p < 0.05$ ). No significant correlations between birth weight, gestational age and the levels of postvaccinal antibodies were noticed. However, statistically significant correlation between birth weight, gestational age and the initial concentrations of anti-PRP antibodies was found.

**Conclusions.** The results of the study prove that all preterm infants achieve the protective levels of anti-PRP antibodies after immunization with Hiberix. Due to its high immunogenicity this vaccine should be consider as the obligatory vaccination, especially in preterm infants. *Alergia Astma Immunologia, 2004, 9(1), 50-54*

**Key words:** postvaccinal immunity, Hib vaccination, preterm infants

---

Dzieci przedwcześnie urodzone z niską masą urodzeniową ze względu na niedojrzałość biologiczną i niedobory immunologiczne należą do grupy wysokiego ryzyka.

Inwazyjne zakażenia *Haemophilus influenzae* typu b (Hib) przebyte przez tych pacjentów we wczesnym dzieciństwie stanowią zagrożenie dla ich życia, zdrowia

i dalszego rozwoju. Z uwagi na niewielką liczbę wykonywanych na świecie szczepień przeciw Hib, zapobiega się jedynie około 5% wszystkich inwazyjnych zakażeń. Istotnym warunkiem zjadliwości tej bakterii jest antygen otoczkowy w postaci fosforanu polirybozylorybitolu (PRP). Patogeneza zakażeń Hib nie została jednakże całkowicie wyjaśniona; uważa się, że obecność polisacharydowej otoczki odgrywa pierwszoplanową rolę, ponieważ poprzez hamowanie opsonizacji uniemożliwia ona fagocytozę bakterii [1]. Indukcja przeciwciał przeciw otoczce szczepu typu b pozwala na uzyskanie swoistej odporności – wykazano bowiem istnienie korelacji pomiędzy ryzykiem zachorowania u dziecka a brakiem przeciwciał przeciwo-toczkowych [1]. Zatem wyizolowane z otoczki Hib antygeny stały się głównym składnikiem produkowanych szczepionek. Szczepionkę przeciw *Haemophilus influenzae* typu b zarejestrowano w 1985 roku w Stanach Zjednoczonych, natomiast adekwatne szczepienia po raz pierwszy przeprowadzono w 1986 roku w Finlandii. Wprowadzane w tym okresie czasu w Europie Zachodniej, a w 1991 r. w USA, programy szczepień ochronnych radykalnie zmieniły epidemiologię chorób związanych z Hib – problem inwazyjnych zakażeń wywołanych tym patogenem stopniowo zanika w tych krajach [2,3,4].

Uważa się, że prawie połowa wszystkich zakażeń Hib następuje podczas pierwszych dwunastu miesięcy życia, natomiast zakażenia objawowe występują najczęściej w wieku 4-18 miesięcy [5]. W USA i krajach skandynawskich zakażenie to jest najczęstszą przyczyną zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych u dzieci do lat 5, natomiast w Polsce zajmuje w tej grupie wiekowej drugie miejsce po zapaleniach opon mózgowo-rdzeniowych wywołanych przez *Neisseria meningitidis* [6]. Nosicielstwo w jamie nosowo-gardłowej poszczególnych serotypów Hib stwierdza się u 1-5% dzieci w wieku do lat 5 w krajach rozwiniętych, a u 30% dzieci w krajach rozwijających się. Bezobjawowe nosicielstwo może trwać wiele miesięcy, zależy od wieku i dotyczy najczęściej dzieci w okresie przedszkolnym i szkolnym [5]. Spośród czynników ryzyka zachorowania na inwazyjne zakażenia Hib wymienia się warunki środowiskowe (życie w zagęszczonych mieszkaniach, przebywanie w ośrodkach opieki) oraz czynniki genetyczne (wysoka częstość zachorowań u Indian amerykańskich (Navaho) czy Eskimosów z Alaski) [7,8].

Celem pracy była ocena stężenia przeciwciał przeciw Hib (anty-PRP) w surowicy krwi u dzieci przedwcześnie urodzonych po zastosowaniu szczepionki skoniugowanej przeciw *Haemophilus influenzae* typu b (Hiberix), podawanej łącznie z acelularną szczepionką przeciw krztuścowi (Infarix-DTPa) i uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy osiągnięte poziomy przeciwciał zabezpieczają przed zachorowaniem.

## PACJENCI I METODY

### Pacjenci

Badaniami objęto 32 dzieci uznanych za zdrowe, hospitalizowanych uprzednio z powodu wcześniactwa i jego powikłań na Oddziale Intensywnej Terapii i Anestezjologii oraz w Klinice Propedeutyki Pediatrii Instytutu Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Dzieci te urodziły się w 24-36 tygodniu ciąży ( $29,47 \pm 3,36$ ), z urodzeniową masą ciała od 600 do 2500g ( $1257,18 \pm 569,51$ ). Średnia arytmetyczna wieku pacjentów w momencie pierwszego szczepienia wynosiła  $223,97 \text{ dni} \pm 154,22$  (tab. I).

Tabela I. Charakterystyka dzieci przedwcześnie urodzonych poddanych szczepieniu

Analizowany wskaźnik	Średnia arytmetyczna (X)	Odchylenie standardowe (SD)	Wartości minimalne i maksymalne
Wiek w momencie I. szczepienia (dni)	223,97	154,22	70-784
Masa urodzeniowa (g)	1257,18	569,51	600-2500
Wiek płodowy (tyg.)	29,47	3,36	24-36

Wcześnieiki otrzymywały w jednej strzykawce dwie szczepionki – Hiberix (SmithKline Beecham) w dawce 10 mg oraz Infarix-DTPa (SmithKline Beecham) – w objętości 0,5 ml domięśniowo. Szczepionka Hiberix zawiera oczyszczony otoczkowy wielocukier w formie fosforanu polirybozylorybitolu *Haemophilus influenzae* typu b kowalencyjnie związany z toksoidem tężcowym (PRP-T).

U każdego dziecka wykonano trzykrotnie, w odstępach sześciotygodniowych, immunizację uprzednio wymienionymi szczepionkami; nie zaobserwowano niepożądanych odczynów poszczepiennych. Po 4 tygodniach od trzeciego szczepienia pobierano krew celem oznaczenia stężenia przeciwciał poszczepiennych i porównywano je z wartościami wyjściowymi. Uzyskane poziomy przeciwciał poszczepiennych anty-PRP uznawano za zadowalające (gdy stężenie przeciwciał anty-PRP było  $> 0,15 \mu\text{g/ml}$   $< 1 \mu\text{g/ml}$ ), jako dobre (gdy stężenie anty-PRP  $\geq 1 \mu\text{g/ml}$   $< 90 \mu\text{g/ml}$ ) i jako bardzo dobre (gdy stężenie anty-PRP było  $\geq 90 \mu\text{g/ml}$ ).

### Metodyka badań

Oceny odporności poszczepiennej po podaniu szczepionki Hiberix dokonywano przy użyciu metody immunoenzymatycznej (ELISA), wykorzystując zestaw do oznaczania stężeń przeciwciał poszczepiennych przeciw Hib (BINDAZYME Human Anti *Haemophilus Influenzae*

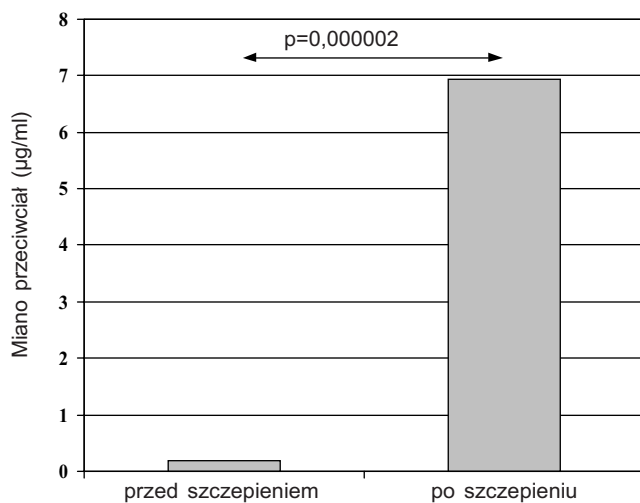
Enzyme Immunoassay Kit, The Binding Site, Birmingham, U.K.). Stężenia przeciwciał wyliczono według uzyskanych krzywych standardowych. Oznaczanie przeciwciał metodą ELISA wykonywano w Pracowni Immunologii Klinicznej SP ZOZ Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego Nr 4 w Łodzi.

### Metody statystyczne

Oceniając uzyskane wyniki wyliczono wartości średniej geometrycznej (GMT). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu nieparametrycznego (t. Wilcoxon), analizy wariancji (ANOVA) oraz współczynnika korelacji Spearmana ( $r$ ). Za poziom istotności statystycznej przyjęto wartość  $p < 0,05$ .

### WYNIKI

Analiza statystyczna przy użyciu testu Wilcoxon wykazała, że wzrost ochronnego, średniego miana przeciwciał poszczepiennych anti-PRP w stosunku do podawanego antygenu otoczkowego Hib był istotny statystycznie ( $p < 0,05$ ) (GMT przed szczepieniem wynosiła  $0,1918 \mu\text{g/ml}$  w stosunku do  $6,9393 \mu\text{g/ml}$  po szczepieniu) (ryc. 1).

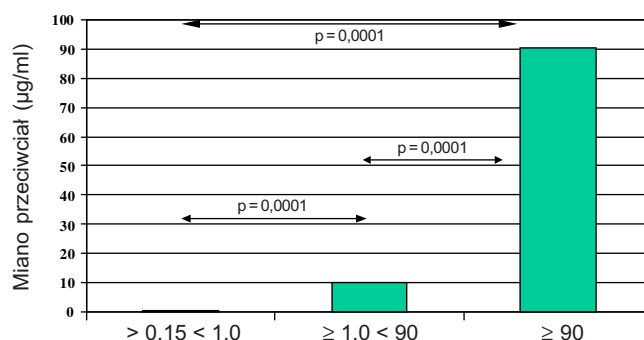


Ryc. 1. Średnia geometryczna (GMT) miana przeciwciał ( $\mu\text{g/ml}$ ) przeciw *Haemophilus influenzae* typu b przed i po 3 dawkach szczepionki

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono ochronny wzrost miana przeciwciał poszczepiennych przeciw PRP-T Hib u 32 dzieci (100%). Indywidualna analiza wykazała ponadto, że wszystkie wcześniaki prezentowały wyjściowe poziomy przeciwciał anti-PRP w stężeniach  $> 0,15 \mu\text{g/ml}$ , co według doniesień z piśmiennictwa uważa się za minimalne miano ochronne [9].

Przy użyciu analizy wariancji (ANOVA) wykazano, że w grupie dzieci, które odpowiedziały pozytywnie na

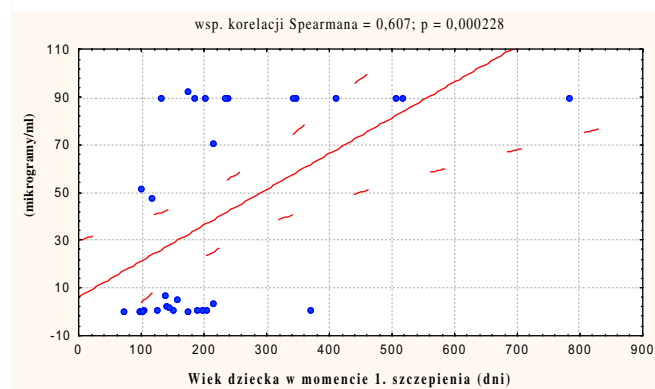
szczepienie przeciw *Haemophilus influenzae* typu b u 12 (37,5%) miano ochronne przeciwciał poszczepiennych anti-PRP było  $> 0,15 \mu\text{g/ml}$  ale  $< 1 \mu\text{g/ml}$  (GMT =  $0,416 \mu\text{g/ml}$ ); 8 dzieci (25%) wykazywało ochronny poziom przeciwciał wyższy tj.  $\geq 1 \mu\text{g/ml} < 90 \mu\text{g/ml}$  (GMT =  $10,081 \mu\text{g/ml}$ ); a u 12 kolejnych dzieci (37,5%) stwierdzono natomiast bardzo dobrą immunizację (GMT  $\geq 90,23 \mu\text{g/ml}$ ). Obserwowane różnice między poziomami przeciwciał poszczepiennych przeciw Hib badanych dzieci były istotne statystycznie  $p < 0,05$  (ryc. 2).



Ryc. 2. Średnia geometryczna (GMT) miana przeciwciał poszczepiennych anti-PRP ( $\mu\text{g/ml}$ ) u dzieci po 3 dawkach szczepionki Hiberix

Przy zastosowaniu współczynnika korelacji Spearmana wykazano istotną statystycznie dodatnią zależność między urodzeniową masą ciała i czasem trwania ciąży a wyjściowymi stężeniami przeciwciał anti-PRP (odpowiednio  $r = 0,664$ ,  $p = 0,000034$  oraz  $r = 0,627$ ,  $p = 0,00012$ ). Korelację o podobnym charakterze stwierdzono między stężeniem przeciwciał poszczepiennych anti-PRP a wiekiem dziecka w momencie rozpoczęcia szczepienia ( $r = 0,607$ ,  $p = 0,000228$ ) (ryc. 3).

Nie zaobserwowano natomiast istotnych korelacji między urodzeniową masą ciała, czasem trwania ciąży a stężeniami przeciwciał osiągniętymi po szczepieniu.



Ryc. 3. Miano przeciwciał poszczepiennych anti-PRP ( $\mu\text{g/ml}$ ) po 3 dawce szczepionki Hiberixu w zależności od wieku dziecka w momencie rozpoczęcia szczepień

## DYSKUSJA

Pacjenci z pierwotnymi i wtórnymi zaburzeniami odporności znacznie częściej aniżeli pozostali w danej populacji narażeni są na inwazyjne zakażenia Hib. W tej grupie należy wymienić dzieci przedwcześnie urodzone, u których często stwierdza się niedobory humoralnych i komórkowych mechanizmów obronnych. Podobne spostrzeżenia dotyczą chorych z nowotworami układu chłonnego, po splenektomii, u pacjentów leczonych immunosupresyjnie oraz u nosicieli HIV i chorych na AIDS, u których przebieg zakażenia Hib może być śmiertelny. Dlatego tak ważnym problemem stała się intensyfikacja prac nad immunogennością i odczynowością szczepionki przeciw Hib.

Stosowane obecnie szczepionki przeciw Hib są bezpieczne i skuteczne. Skojarzenie antygeny bakteryjnego z nośnikiem białkowym stworzyło kompleks o wysokiej immunogenności, który indukuje nie tylko odporność typu humoralnego, ale również swoistą odporność komórkową skierowaną przeciw zakażeniu Hib. Dzięki koniugacji polisacharydu otoczki bakteryjnej z białkiem zmienia się odpowiedź immunologiczna na zależną od limfocytów T, co znacząco poprawia immunogenność szczepionki i możliwość jej zastosowania u dzieci [1,9,10]. Antygen PRP skoniugowany może być z toksoidem tężcowym (Hiberix, ActHIB), błoniczym (HibTITER), białkiem meningokokowym (Pedvax) lub fimbriami *Bordetella pertussis* [9]. Nie ustalono dotychczas, jaki jest poziom przeciwciał gwarantujący ochronę przed zakażeniem Hib. Zakłada się, że krótkotrwała protekcja występuje przy minimalnym poziomie przeciwciał anty-PRP  $> 0,15 \mu\text{g/ml}$ , natomiast długotrwała protekcja uwarunkowana jest stężeniami przekraczającymi  $1 \mu\text{g/ml}$  [9,11].

W przeprowadzonych przez nas badaniach wykazaliśmy u wszystkich immunizowanych wcześniaków znamienny wzrost ochronnego miana przeciwciał poszczepiennych anty-PRP w stosunku do wartości wyjściowych (GMT =  $0,1918 \mu\text{g/ml}$  przed szczepieniem w stosunku do  $6,9393 \mu\text{g/ml}$  po szczepieniu). Zadowalającą immunizację uzyskano u 37,5% dzieci poddanych szczepieniu, dobrą u 25%, natomiast u pozostałych 37,5% badanych immunizację uznano za bardzo dobrą (GMT przeciwciał anty-PRP wynosiła  $90,23 \mu\text{g/ml}$ ). Wyniki te są zgodne z danymi z piśmiennictwa. Hussey i wsp. oceniając po 4 tygodniach odporność poszczepienną po trzykrotnym podaniu TETRActHib (skojarzonej szczepionki DTP i Hib) u dzieci w 6, 10 i 14 tygodniu życia stwierdzili u większości badanych stężenie przeciwciał anty-PRP  $> 0,15 \mu\text{g/ml}$ , a u 70% dzieci  $> 1 \mu\text{g/ml}$  [12]. Ci sami autorzy wykazali ponadto, że u badanych dzieci ochronne miano przeciwciał poszczepiennych utrzymywały się w 9 i 18 miesiącu życia (45% pacjentów wykazywało poziomy anty-PRP  $> 1 \mu\text{g/ml}$ ). Kirmani i wsp. obserwowali natomiast utrzymujące się po 7 latach ochronne miano przeciwciał anty-PRP ( $> 1 \mu\text{g/ml}$ ) u szczepionych we wczesnym dzieciństwie

dzieci; wyższe stężenia prezentowały dzieci urodzone o czasie w stosunku do tych urodzonych przedwcześnie [13].

Uzyskane przez nas wyniki ujawniły istotne statystyczne korelacje między wyjściowymi stężeniami anty-PRP a urodzeniową masą ciała szczepionych dzieci i czasem trwania ciąży (odpowiednio  $r = 0,664$  i  $0,627$ ). Wszystkie wcześniaki prezentowały wyjściowo minimalne poziomy przeciwciał anty-PRP uznawane za miana ochronne ( $> 0,15 \mu\text{g/ml}$ ). Obecność naturalnych przeciwciał w surowicy krwi dzieci przed zastosowaniem szczepionki należy tłumaczyć ich biernym przekazywaniem przez łożysko od uodpornionych matek. Wykazana przez nas istotna korelacja z urodzeniową masą ciała i czasem trwania ciąży potwierdza tezę o zwiększającej się przepuszczalności łożyska dla przeciwciał odpornościowych klasy IgG i jego dojrzewaniu wraz ze zwiększaniem się masy ciała i wieku płodowego dziecka. Nasze obserwacje potwierdzają doniesienia innych autorów. Przykładowo, Okoko i wsp. oznaczając poziomy swoistych przeciwciał IgG przeciw Hib i *Streptococcus pneumoniae* u 213 matek i ich noworodków wykazali, że wcześniactwo i niska masa urodzeniowa warunkują zmniejszone przechodzenie przez łożysko przeciwciał skierowanych przeciw antygenom zimmunizowanych matek [14]. Santosham i wsp. udowodnili, że skoniugowana szczepionka przeciw Hib podawana kobietom przed planowaną ciążą zwiększała odsetek niemowląt, które wykazywały ochronne miano naturalnych przeciwciał w momencie porodu i w drugim miesiącu życia [15]. Wiadomo, że stężenie przekazanych od matek przeciwciał stopniowo obniża się. Uważa się, że spadek poniżej wartości ochronnych następuje między 4 miesiącem a 3 rokiem życia.

Zaobserwowana w badaniach własnych istotna korelacja między mianem przeciwciał poszczepiennych a wiekiem dziecka w momencie rozpoczęcia szczepienia ( $r = 0,607$ ) wskazuje na to, że najlepsza immunizacja wystąpiła u dzieci najstarszych. Indywidualna analiza wykazała, że dzieci ze stężeniami przeciwciał poszczepiennych anty-PRP  $\geq 90 \mu\text{g/ml}$  pierwszą dawkę Hiberixu otrzymały powyżej 180 dnia życia. Nasze obserwacje są zbieżne z danymi z piśmiennictwa. Wiadomo bowiem, że w pierwszych miesiącach życia odporność humoralna niemowlęcia zależy od IgG przekazanych przez matkę i uruchomianej produkcji własnych immunoglobulin; jednakże IgG syntetyzowane w tym okresie wykazują niedobór podklasy IgG2, która mediuje odporność immunologiczną na antygeny polisacharydowe bakterii otoczkowych, w tym Hib [16]. Najwyższą odporność poszczepienną, obserwowaną w badaniach własnych po podaniu trzeciej dawki szczepionki przeciw Hib, można zatem tłumaczyć narastającymi z wiekiem poziomami podklasy IgG2. Jak wynika z przeprowadzonych badań wskazujących na bardzo dobrą immunogenność Hiberixu należałoby rozważyć

zastosowanie tej szczepionki także u starszych dzieci z przewlekłymi zaburzeniami odporności, często leczonych immunosupresyjnie, a narażonych w szczególności na zakażenie Hib.

Na podstawie wykonanych badań stwierdzono, że wszystkie dzieci przedwcześnie urodzone poddane immunizacji osiągają ochronny poziom przeciwciał poszczepionych anty-PRP zabezpieczający przed zakażeniem *Haemophilus influenzae* typu b. Z powodu bardzo dobrej immunogenności i tolerancji zastosowanej szczepionki powinna ona znaleźć się w obowiązującym kalendarzu szcze-

pień ochronnych u dzieci z grupy ryzyka jaką jest wcześniactwo.

*Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi z Funduszu Statutowego nr 503-107-4*

*Autorzy pracy składają serdeczne podziękowanie:*

- *Pani prof. dr hab.med. Marii Gołębiowskiej za cenne wskazówki i uwagi przy planowaniu badań*
- *Pani dr n.med. Dorocie Kardas-Sobantce za udział w opracowywaniu pierwszego projektu badawczego, który był podstawą do zaplanowania i realizacji badań prezentowanych w tej pracy*

## Piśmiennictwo

1. Adderson EE. Antibody repertoires in infants and adults: effects of T-independent and T-dependent immunizations. *Springer Semin Immunopathol* 2001; 23: 387-403.
2. Heath PT, McVernon J. The UK Hib vaccine experience. *Arch Dis Child* 2002; 86: 396-399.
3. Progress toward elimination of *Haemophilus influenzae* type b invasive disease among infants and children – United States, 1998-2000. *Morb Mortal Wkly Rep* 2002; 51: 234-237.
4. van Den Hof S, de Melker HE, Berbers GA, i wsp. Antibodies to *Haemophilus influenzae* serotype b in the Netherlands a few years after the introduction of routine vaccination. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 2-8.
5. Zieliński A. Wprowadzenie do epidemiologii chorób wywołanych przez *Haemophilus influenzae*. *Przegl Epidemiol* 1999; 53: 271-279.
6. Gałązka A. Choroby wywołane przez pałeczki *Haemophilus influenzae* typu b (Hib). I. Epidemiologia i znaczenie zdrowotne chorób Hib. *Przegl Pediatr* 1998; 28: 93-98.
7. Cochi SL, Fleming DW, Hightower AW. Primary invasive *Haemophilus influenzae* type b disease: A population – based assessment of risk factors. *J Pediatr* 1986; 108: 887-896.
8. Musser JM, Granoff DM, Pattiso PE i wsp. A population genetic framework for the study of invasive disease caused by serotype b strain of *Haemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 5078-5082.
9. Crowley-Luke A, Reddin K, Gorringer A i wsp. Formulation and characterisation of Bordetella pertussis fimbriae as novel carrier proteins for Hib conjugate vaccines. *Vaccine* 2001; 19: 3399-3407.
10. Kamboj KK, King CL, Greenspan NS i wsp. Immunization with *Haemophilus influenzae* type b-CRM (197) conjugate vaccine elicits a mixed Th1 and Th2 CD (4+) T cell cytokine response that correlates with the isotype of antipolysaccharide antibody. *J Infect Dis* 2001; 184: 931-935.
11. Granoff DM. Assessing efficacy of *Haemophilus influenzae* type b combination vaccines. *Clin Infect Dis* 2001; 33 (suppl. 4): S278-287.
12. Hussey G, Malan H, Hughes J i wsp. Safety and immunogenicity of TERTActHIB (a vaccine combining DTP vaccine and *Haemophilus influenzae* type B conjugate vaccine) administered to infants at 6, 10, and 14 weeks of age. *S Afr Med J* 2002; 92: 53-57.
13. Kirmani KI, Lofthus G, Pichichero ME i wsp. Seven-year follow-up of vaccine response in extremely premature infants. *Pediatrics* 2002; 109: 498-504.
14. Okoko BJ, Wesumperuma LH, Hart AC. Materno-foetal transfer of *H. influenzae* and pneumococcal antibodies is influenced by prematurity and low birth weight: implications for conjugate vaccine trials. *Vaccine* 2001; 20: 647-650.
15. Santosham M, Englund JA, McInnes P, i wsp. Safety and antibody persistence following *Haemophilus influenzae* type b conjugate or pneumococcal polysaccharide vaccines given before pregnancy in women of childbearing age and their infants. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20: 931-940.
16. Siwińska-Gołębiowska H. Rozwój odporności u dzieci i szczepienia ochronne przeciw chorobom zakaźnym (wybrane zagadnienia). w: *Materiały Konferencji Szczepień*, Ślesin 10-13 września 1997: 2-7.