MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2013, 65: 1 - 10

Badania eliminacji nietypowalnych szczepów *Haemophilus influenzae* na modelu zwierzęcym

The studies of elimination of nontypeable *Haemophilus influenzae* strains using the animal model of infection

Ewa Augustynowicz[1], Monika Zawadka[1], Aldona Wiatrzyk[1], Daniel Rabczenko[2], Anna Lutyńska[1]

[1] Zakład Badania Surowic i Szczepionek, [2] Zakład- Centrum Monitorowania i Analiz Stanu Zdrowia Ludności, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny

Donosowa immunizacja zwierząt jest skuteczną metodą pobudzenia odpowiedzi odpornościowej na błonach śluzowych i modelem przydatnym do opracowania szczepionki przeciw zapaleniu ucha środkowego wywoływanego szczepami niepoddającymi się typowaniu, określanymi dalej jako nietypowalne szczepy *Haemophilus influenzae*. W pracy oceniono poziom eliminacji nietypowalnych, charakteryzujących się odmiennymi genetycznymi determinantami zjadliwości, szczepów *H. influenzae* z nosogardła, płuc i uszu myszy oraz oddziaływania między szczepami podczas zakażeń mieszanych.

Słowa kluczowe: *nietypowalne Haemophilus influenzae, model zwierzęcy, kolonizacja*

ABSTRACT

Introduction: The intranasal immunization is considered the effective method to induce immunological response in the mucosa and the model useful to develop the vaccine against otitis media due to nontypaeble *Haemophilus influenzae* infections. In the study, elimination of NTHi strains isolated from healthy and carrier individuals, varying with several genetic determinants, from mice nasopharynx, lungs and ears tissues and the interactions among strains during mixed infections were evaluated.
Methods: Mice were infected with single and mixture of NTHi strains previously identified as non or potentially invasive. The curves of infections were drown from the averages of log cfu/mg values obtained for nasopharynx or ears leavages or lungs homogenates coupled

Badania wykonano w ramach projektu badawczego MNiSzW nr NN404519038.

with standard deviation at each time point using 5 mice. The significance of the differences was confirmed using ANOVA method.
Results: The course of infections induced with a single noninvasive or potentially invasive strains in the mice nasopharynx, ear or lung tissues were not found to differ in respect to the level and duration. Regardless the strain used, higher elimination rates in the ear and lung tissues in comparison with nasopharynx were fund. Different rate of elimination was found in the case of mixture infections where the strain, determined in the previous study as potentially invasive, was dominating.
Conclusion: The concurrence model among not-invasive and potentially invasive NTHi strains in the host niche was thus confirmed using *in vivo* model of infection.

Key words*: nontypeable Haemophilus influenzae, animal model, colonization*

WSTĘP

Nietypowalne szczepy *Haemophilus influenzae* (NTHi- nontypeable *H. influenzae*) są obok *Streptococcus pneumoniae* oraz *Moraxella catarrhalis* najważniejszym bakteryjnym czynnikiem etiologicznym zapalenia ucha środkowego (18). Choroba dotyczy ponad 80% populacji dzieci do 3 roku życia. Na świecie rocznie odnotowywanych jest ponad 709 mln i 650 mln przypadków, odpowiednio ostrego i nawracającego zapalenia ucha środkowego (17). Wobec skali zachorowań oraz długotrwałej i często nieskutecznej terapii antybiotykowej opracowanie szczepionki przeciw zapaleniu ucha środkowego pozostaje jednym z priorytetowych celów ochrony zdrowia publicznego (17, 18).

Ze względu na to, że zapalenie ucha środkowego jest zakażeniem błon śluzowych, w wyniku którego dochodzi do nasilonego wydzielania swoistych przeciwciał wydzielniczych IgA oraz w mniejszym stopniu - w surowicy, docelowa szczepionka powinna zapobiegać kolonizacji oraz zakażeniom objawowym [2]. W dotychczasowych próbach opracowania tej szczepionki, w większości drogą podawania na błony śluzowe, jako antygeny stosowano zabite szczepy NTHi, oczyszczone białka błony zewnętrznej np. OMP P1, OMP P6, OMP P5, OMP 26, D15 lub fimbrie typu IV (Tfp), oraz pozbawiony właściwości toksycznych lipooligosacharyd (dLOS) z nośnikiem białkowym (TT) i toksyną choleryczną (CT-choleric toxin) jako adiuwantem (2, 7, 8, 4, 11, 19). Postęp dalszych badań rozwojowych jest uzależniony od standaryzacji badań oznaczania odpowiedzi immunologicznej, w tym opracowania modelu badań skuteczności *in vivo* z użyciem zwalidowanego modelu zwierzęcego. Dotychczas w badaniach patogenezy zapalenia ucha środkowego oraz kolonizacji górnych dróg oddechowych NTHi stosowano różne modele zwierzęce, m.in. świnki morskie, szynszyle oraz myszy (2, 7). Badanie z użyciem myszy było stosunkowo rzadko stosowane w badaniach nietypowanych szczepów *H. influenzae* ze względu na brak standaryzacji metod zakażania drogą oddechową. Nie mniej jednak, ostatnie wyniki badań potwierdzają, że po optymalizacji model ten może stać się w przyszłości modelem *in vivo* z wyboru (2). Jego zastosowanie może pozwolić na postęp w badaniach zapalenia ucha środkowego wywołanych przez różne czynniki wirusowe i bakteryjne, ale również wywoływane przez zakażenia mieszane wariantami szczepów bakteryjnych tego samego gatunku (2, 9).

Obecność na błonach śluzowych nosogardła różnych gatunków bakterii w tym samym czasie (np. *S. pneumoniae* i *H. influenzae* lub *S. pneumoniae* i *Staphylococcus aureus*) może znacznie zmieniać przebieg zakażenia, w porównaniu z obecnością w tej niszy bakterii tego samego gatunku (14). Znaczna kolonizacja górnych dróg oddechowych zdrowych dzieci (30-40%) i osób dorosłych (10-20%) szczepami NTHi oraz genetyczne zróżnicowanie tych szczepów pozwalają przypuszczać, że w obrębie niszy nosogardła występująca w tym samym czasie współkolonizacja może wpływać na oddziaływania między szczepami i przebieg zakażenia (13, 14). Szczepy NTHi kolonizujące błonę śluzową jamy nosowo-gardłowej wytwarzają szereg białek, które umożliwiając przetrwanie, mogą odgrywać znaczną rolę w swoistej konkurencji między drobnoustrojami (2).

Celem pracy była ocena poziomu eliminacji z nosogardła, płuc i uszu zakażanych donosowo myszy szczepów NTHi charakteryzujących się odmiennymi genetycznymi determinantami zjadliwości.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne. W badaniach użyto szczepy: NTHi 10 o profilu genów determinant zjadliwości *hif*7,3kpz, *hmw*A-, *tna*-, *lic2*B+ oraz szczep NTHi 182 o profilu genów determinant zjadliwości *hif*3,4kpz, *hmw*A-, *tna*-, *lic2*B+, oba izolowane z wymazu z tylnej ściany gardła zdrowego dziecka oraz szczep NTHi 300 o profilu genów zjadliwości *hif*-, *hmw*A+, *tna*-, *lic2*B+ izolowany z wysięku z ucha dziecka z zapaleniem ucha środkowego. Szczepy namnażano na agarze czekoladowym w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO_2 przez 18-24 godz.

Wykrywanie genów kodujących czynniki zjadliwości. Profil genów dla czynników zjadliwości *hif*, *hmw*A, *tna*, *lic2*B oznaczano wcześniej opisanymi metodami. Fragmenty genów kodujących informację o syntezie adhezyn fimbrialnych HA amplifikowano stosując startery purE(M) i pepN(M) (16); fragmenty genów kodujących syntezę adhezyn HMW1/HMW2 amplifikowano stosując startery rozpoznające sekwencje w obrębie genu *hmw*A (startery HMWP1H1/HMWP3RHI) (23); fragment genu *lic*2B amplifikowano z użyciem starterów lic2BF oraz lic2BR (20); fragment regionu nlpD-mutS genu *tna* amplifikowano z użyciem starterów nlpD-F i muts-R2 zgodnie z protokołem Martin i inni (15).

Model zwierzęcy. Badania prowadzono z użyciem myszy BALB/CANNCrlBR ze stada wsobnego, pochodzących z Instytutu Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa. W badaniach używano myszy o masie ciała 16-18 g. Badania na zwierzętach prowadzono w ściśle kontrolowanych warunkach, które zapewniały urządzenia klimatyczno - wentylacyjne (IVC Tecniplast Gazzada, Italy), po uzyskaniu zgody IV Lokalnej Komisji Etycznej ds. Badań na Zwierzętach (protokół 69/2009).

Ocena przebiegu zakażenia myszy zawiesinami szczepów NTHi. Zawiesinę zakażającą stanowiły pojedyncze szczepy NTHi namnażane w bulionie BHI z czynnikami wzrostowymi X, V o gęstości optycznej OD_{600nm}=1,6. Mieszaniny zakażające przygotowywano przez zmieszanie stosowanych zawiesin wyjściowych w stosunku 1:1. Każdej myszy, po wcześniejszym znieczuleniu, do każdego nozdrza, przy zastosowaniu półautomatycznego dozownika Hamilton, podawano 10 µl zawiesiny bakteryjnej o gęstości 10^8CFU. W każdej z badanych grup po 5 sztuk myszy poddawano eutanazji w dniu 0 (2 h

po zakażaniu) oraz po upływie 5, 8, 13, 21, 27, 34, 42, 48 i 56 dni. Tkanki tchawicy i płuc ważono, zawieszano w buforze fosforanowym z 10% hydrolizatem kazeiny do objętości 1 ml i homogenizowano 3 min 1/25 sek na lodzie, w homogenizatorze Retsch® MM301, a następnie ich 10-krotne rozcieńczenia wysiewano na podłoże agar czekoladowy.

Badania konkurencyjności szczepów NTHi z użyciem myszy. W każdej z badanych grup myszy zakażonych donosowo mieszaniną szczepów poddawano eutanazji po 5 sztuk myszy w dniu 0 (2 h po zakażaniu) oraz w 7, 13 i 27 dniu.

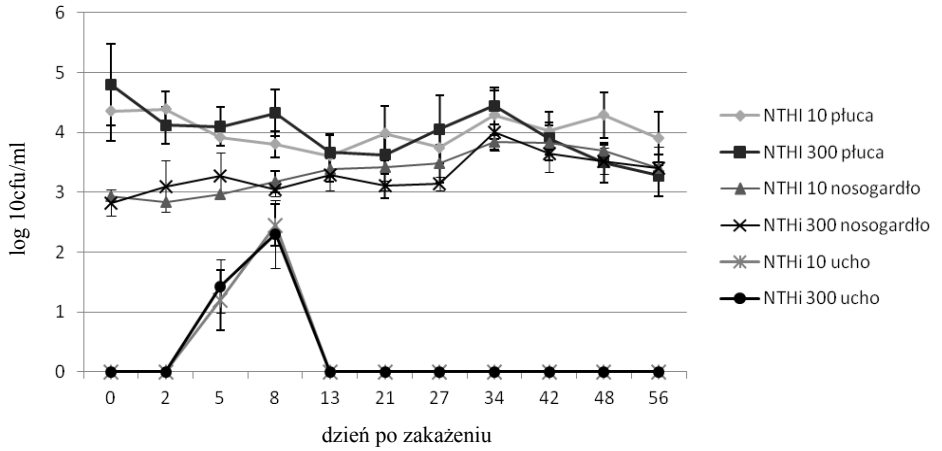
W każdym punkcie czasowym, z hodowli *in vitro* homogenizatów tkanki płucnej na podłożu agar czekoladowy wybierano 18-20 losowo wybranych kolonii *H. influenzae*, które namnażano i z każdej hodowli przygotowywano zawiesiny bakteryjne w 100 µl wody destylowanej. Po 3 krotnym zamrożeniu i rozmrożeniu, uzyskany lizat komórkowy wykorzystywano jako matrycę w reakcji PCR, w układach ze starterami stosowanymi do określenia genotypu *hif* oraz wykrywania obecności genu *hmw*A.

Analiza statystyczna. Krzywe przebiegu zakażania badanych szczepów wykreślono na podstawie uśrednionych wartości cfu/mg/popłuczyn z nosogardła, cfu/mg/popłuczyn z uszu oraz cfu/mg/homogenatu płuc po transformacji logarytmicznej wartości z uwzględnieniem odchylenia standardowego (SD) dla 5 myszy w kolejnych punktach czasowych. Znamienność różnic przebiegu krzywych eliminacji oceniano z użyciem testu ANOVA z użyciem programu R 2.15.0 (R Core Team, 2012 (5).

WYNIKI

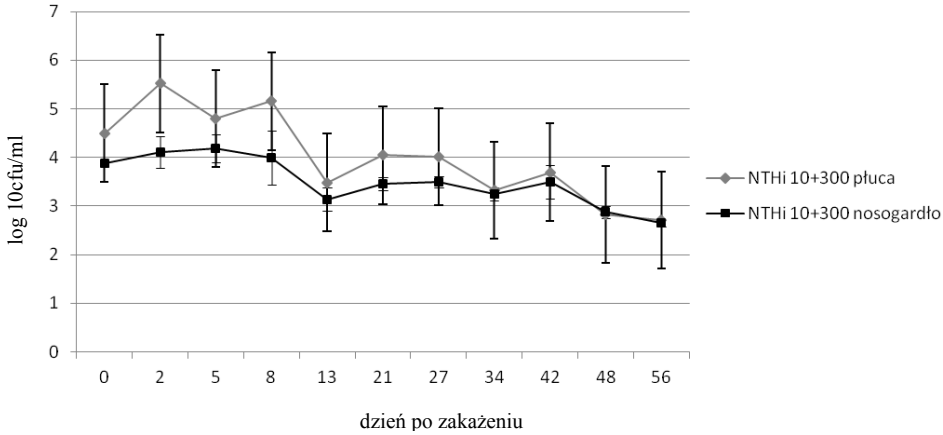
Zakażenie szczepem NTHi 10 przebiegało następująco: 2 godziny po zakażeniu (dzień 0) liczba bakterii (cfu) osiągała wartość 2,95 $\log_{10}$cfu/mg tkanki nosogardła i 4,35 $\log_{10}$cfu/mg tkanki płuc, natomiast w 8 dniu odpowiednio 3,25 $\log_{10}$cfu/mg oraz 3,75 $\log_{10}$cfu/mg. W kolejnych dniach po zakażeniu obserwowano względnie stały poziom liczby bakterii w nosogardle i płucach, wyrażony liczbą bakterii, odpowiednio w zakresie 2,80 - 4,20 $\log_{10}$cfu w przeliczeniu na mg tkanki nosogardła i tkanki płuc. W popłuczynach z ucha w dniu 5 obserwowano poziom zakażenia wyrażony liczbą bakterii 1,45 $\log_{10}$cfu, a następnie nasilone namnażanie bakterii, których liczba wzrastała do 2,32 $\log_{10}$cfu/mg tkanki ucha w 8 dniu zakażenia. W następnych punktach czasowych nie obserwowano wzrostu bakterii (Ryc. 1).

Krzywe przebiegu zakażenia szczepem NTHi 300 przyjmowały charakterystyczny, względnie stały poziom odpowiadający wartościom w zakresie 3,15 - 4,25 $\log_{10}$cfu w przeliczeniu na mg tkanki nosogardła i tkanki płuc myszy do 27 dnia po zakażeniu. W 34 dniu obserwowano nieznaczny wzrost namnażania bakterii w płucach i nosogardle do poziomu 4,50 i 4,10 $\log_{10}$cfu w przeliczeniu na odpowiednio mg tkanki nosogardła i tkanki płuc, po czym, odnotowywano nieznaczny spadek liczby bakterii odpowiadający w dniu 56 wartości 3,25 i 3,15 $\log_{10}$cfu w przeliczeniu na mg tkanki nosogardła i płuc (Ryc. 1). W popłuczynach z ucha obserwowano poziom zakażenia wyrażony liczbą bakterii 1,55 $\log_{10}$cfu w 5 dniu oraz nasilone namnażanie bakterii odpowiadające wartości 2,30 $\log_{10}$cfu/mg tkanki ucha w 8 dniu zakażenia. W następnych punktach czasowych nie obserwowano wzrostu bakterii. Analiza statystyczna potwierdziła, że niezależnie od tego czy zakażano myszy szczepem NTHi 10 czy NTHi 300 eliminacja bakterii była statystycznie większa w tkance płuc ($p= 0,003$) i tkance uszu ($p= 0,000$) w stosunku do nosogardła. Dla poziomu eliminacji szczepami NTHi 10 i NTHi 300 nie wykazano różnic znamiennych ($p= 0,976$) (Ryc. 1).

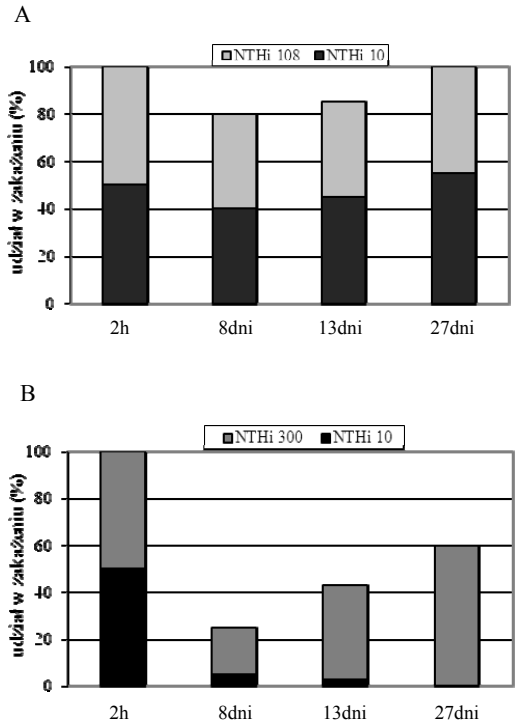


Ryc. 1. Dynamika eliminacji bakterii w popłuczynach z nosogardła, popłuczynach z ucha i tkanki płuc po donosowym zakażaniu myszy pojedynczymi zawiesinami szczepów nieinwazyjnego NTHi 10 i potencjalnie inwazyjnego NTHi 300.

Przebieg zakażenia mieszaniną szczepu NTHi 10 + NTHi 300 wyrażony wyjściowo (dzień 0) liczbą bakterii 3,95 $\log_{10}$cfu oraz 4,65 $\log_{10}$cfu w przeliczeniu na odpowiednio mg tkanki nosogardła oraz tkanki płuc, charakteryzował się nasilonym namnażaniem w 2-gim dniu osiągając wartości, odpowiednio 5,75 i 6,95 $\log_{10}$cfu w przeliczeniu na mg tkanki nosogardła i tkanki płuc myszy. Okres nasilonego namnażania bakterii trwał najczęściej do dnia 8, po czym odnotowywano stopniowy spadek liczby bakterii do poziomu porównywalnego z pierwszym dniem obserwacji (dzień 0), a następnie - stopniowe obniżanie poziomu liczby bakterii do poziomu 2,86 i 2,95 $\log_{10}$cfu w przeliczeniu na mg tkanki nosogardła i tkanki



Ryc.2. Dynamika eliminacji bakterii z popłuczyn z nosogardła oraz tkanki płuc myszy zakażanych donosowo mieszaną szczepów nieinwazyjnego NTHi 10 i potencjalnie inwazyjnego NTHi 300.



Ryc. 3. Częstość występowania w płucach myszy szczepów NTHi po donosowym zakażaniu myszy mieszaninami szczepów NTHi; A. myszy zakażane mieszaniną dwóch szczepów nieinwazyjnych NTHi 10 oraz NTHi 108; B. myszy zakażane mieszaniną szczepu nieinwazyjnego NTHi 10 oraz potencjalnie inwazyjnego NTHi 300.

płucnej w 56 dniu obserwacji (Ryc. 2). W tkance uszu nie obserwowano wzrostu bakterii po podaniu mieszaniny szczepu NTHi 10 + NTHi 300. Dla poziomu eliminacji mieszaniną szczepów NTHi 10+ NTHi 300 nie wykazano różnic znamiennych (p= 0,495) (Ryc. 2).

Analiza krzywych zakażania mieszaniny dwóch szczepów niezjadliwych NTHi 10 oraz NTHi 108 nie wykazała różnic poziomu zakażenia po 14 dniach, które utrzymywało się w płucach do 28 dnia (Ryc. 3A.B.).

Analiza krzywych zakażenia mieszaniny szczepu niezjadliwego NTHi 10 oraz potencjalnie inwazyjnego NTHi 300 wskazywała na przewagę szczepu NTHi 300. Szczep NTHi 10 wykorzystany do zakażania myszy był eliminowany z tkanki płucnej myszy do poziomu 5% w 13 dniu obserwacji oraz 3% w 28 dniu obserwacji. W 42 dniu obserwacji w płucach myszy nie wykrywano szczepów NTHi 10 (Ryc. 3A.B.).

DYSKUSJA

W badaniach oceniono poziom zakażeń szczepami NTHi reprezentującymi różne warianty zjadliwości oraz ich potencjalne oddziaływania podczas zakażeń mieszaninami szczepów w eksperymentalnym modelu donosowego zakażania myszy. Donosowa

immunizacja zwierząt jest skuteczną metodą pobudzenia odpowiedzi odpornościowej na błonach śluzowych i modelem przydatnym do opracowania szczepionki przeciw zapaleniu ucha środkowego wywołanego szczepami NTHi (7, 19, 24). Wiele immunogennych białek NTHi o potencjalnym zastosowaniu jako antygeny szczepionkowe charakteryzuje się wysoką heterogennością, często powiązaną z indukowaniem odpowiedzi ochronnej jedynie przeciw szczepom homologicznym (24). Fakt ten stanowi znaczny problem w przypadku przewlekłego i nawracającego zapalenia ucha środkowego, wywoływanych przez różniące się genetycznie warianty szczepów NTHi (2, 3). Wysoka zmienność populacji szczepów NTHi izolowanych z próbek materiału klinicznego pobranego od osób chorych oraz zdrowych, szczególnie od zdrowych dzieci, została udokumentowana w publikacjach wielu badaczy (6, 22). Podłoże opisywanej zmienności powiązano z horyzontalnym transferem genów, dużą liczbą sekwencji SSR oraz zdolnością szczepów NTHi do mimikry molekularnej (12, 22). Wymianie materiału genetycznego sprzyja potwierdzona wysoka częstość kolonizacji różnymi wariantami szczepów w tym samym czasie oraz nabywanie nowych wariantów szczepów (6). Badania zróżnicowania szczepów NTHi zasiedlających górne drogi oddechowe nosicieli w wieku dziecięcym wykazały, że średnio u 43% dzieci w wymazach z gardła izolowano w tym samym czasie mieszaniny 2-5 izolatów (2, 6). Podobnie z materiałów klinicznych dzieci z zapaleniem płuc z wymazów z gardła oraz z wycieku z ucha izolowano różne warianty szczepów NTHi (2, 21). Charakter oddziaływań pomiędzy szczepami zajmującymi tą samą niszę pozostaje zagadnieniem niewyjaśnionym, choć ostatnio opublikowano badanie potwierdzające słuszność takich hipotez (13). Z kolei doświadczenia z zakażaniem myszy mieszaninami szczepów *S. pneumoniae* i *H. influenzae* potwierdziły w efekcie końcowym przewagę *H. influenzae* (14). Interesujący jest fakt, że zakażenia pojedynczymi szczepami charakteryzowały się w porównaniu z mieszanymi zakażeniami dłuższym przebiegiem (13).

Przesłanką do podjęcia pracy było założenie, że szczepy NTHi zasiedlające różne nisze gospodarza wytwarzają czynniki zjadliwości, które umożliwiają przetrwanie szczepów w niszy jednego środowiska, ale nie muszą być wymagane do przetrwania w środowisku innej niszy (1). Dotychczasowe wyniki badań dystrybucji determinant genetycznych kodujących główne fimbrialne i niefimbrialne adhezyny (geny *hif*, *hmw* oraz *hia*), kodujących proteazę IgA1 (gen *iga*), tryptofanazę (gen *tna*,), LOS (trzy geny *lic*A, *lic*2A, *lgt*C) oraz glikozylotransferazę (gen *lic*2B) wykazały, że do inwazji ucha środkowego może dochodzić w sytuacji gdy szczep NTHi wytwarza określone czynniki zjadliwości (12, 16, 23). We wcześniejszych badaniach autorzy zidentyfikowali szczepy o profilu NTHi *hif*+, *hmw*A-, *tna*-, *lic*2B-, predysponowane do kolonizacji górnych dróg oddechowych człowieka oraz szczepy o profilu NTHi *hif*-, *hmw*A+, *tna*+, *lic*2B+, które są bardziej niż inne predysponowane do wywoływania zakażeń objawowych (szczepy potencjalnie inwazyjne) (2). Wyniki z zakresu genomiki NTHi potwierdzają występowanie wśród NTHi krążących w populacji dominacji określonych genotypów lub wybranych subpopulacji szczepów i powiązanie z niszą, którą zasiedlają w organizmie gospodarza, jak również z objawami choroby czy kolonizacją (1, 18, 22). W populacji szczepów NTHi w określonych warunkach może dochodzić do przewagi selekcyjnej i klonalnej ekspansji określonych genotypów szczepów NTHi, które predysponują do występowania inwazyjnych zakażeń u najmłodszych dzieci (20). Określona kombinacja szczepów NTHi o danym składzie czynników zjadliwości może być związana ze wzrostem ryzyka wystąpienia zakażenia objawowego lub większej intensywności przebiegu zakażenia. Podobnie wyniki badań typowania szczepów *H. influ-*

enzae metodą MLST (Multilocus Sequence Typing) potwierdziły związek między strukturą populacji i miejscem izolacji szczepu (12).

Wobec tak wyraźnych różnic między szczepami NTHi można założyć występowanie wzajemnych ich odziaływań o różnym charakterze (synergia/antagonizm), czy też modelu konkurencji (*selective force*) między szczepami zasiedlającymi jednocześnie nosogardło, ucho środkowe i w dalszej kolejności po migracji powrotnej – nosogardło. Zakładając, że szczepy o profilu NTHi *hif*-, *hmw*A+, *tna*+, *lic*2B+ charakteryzują się wyższym potencjałem inwazyjności, ocenie poddano potencjalną konkurencyjność szczepów *in vitro* w odniesieniu do szczepu niezjadliwego. Uzyskane wyniki badania w przebiegu zakażenia pojedynczymi szczepami NTHi w nosogardle, jamie ucha i w płucach myszy nie potwierdziły różnic w poziomie i czasie zakażenia. Niezależnie od zastosowanego szczepu potwierdzono lepszą skuteczność ich eliminacji z uszu i płuc w porównaniu z nosogardłem.

W celu oceny oddziaływań między szczepami NTHi o różnym potencjale zjadliwości, myszy zakażano mieszaninami tych szczepów NTHi reprezentujących określone patotypy, przypisane szczepom potencjalnie inwazyjnym oraz szczepom nieinwazyjnym, wyizolowanym z materiału klinicznego pobranego od chorych z objawami zakażeń oraz z wymazu z gardła nosicieli. Powyższa ocena obejmowała długość i intensywność utrzymywania się zakażenia w czasie oraz oddziaływania między różnymi szczepami NTHi. W badaniach potwierdzono dominację szczepów o profilu NTHi *hif*-, *hmw*A+, *tna*+, *lic*2B+ w tkance płucnej myszy w porównaniu do wariantów szczepów nieposiadających tych genów, co może potwierdzać rolę adhezyn grupy HMW w zakażaniu szczepami NTHi oraz hipotezę konkurencyjności między szczepami w zajmowanej niszy gospodarza. Wykazane stopniowe wypieranie szczepów w płucach może wskazywać, że szczepy potencjalnie zjadliwe o profilu NTHi *hif*+, *hmw*A-, *tna*-, *lic*2B- zdolne do syntezy adhezyn HA nie były w stanie uzyskać przewagi selekcyjnej. Przewagę liczebną szczepu potencjalnie inwazyjnego obserwowano w obrębie niszy nosogardła jak i płuc.

Wykazano, że model donosowego zakażania myszy pojedynczymi szczepami NTHi nieinwazyjnego i potencjalnie inwazyjnego oraz mieszaniną tych szczepów różnią się między sobą. Badania z użyciem donosowego zakażania myszy potwierdziły silniejszą dominację szczepu NTHi określonego we wcześniejszych badaniach jako potencjalnie inwazyjny. W przebiegu zakażania myszy mieszaniną szczepów NTHi obserwowano trend zwiększania się udziału potencjalnie zjadliwych szczepów NTHi w płucach myszy w stosunku do szczepów nieinwazyjnych, potwierdzając tym samym przyjęte w pracy założenie występowania konkurencyjności między różnymi szczepami w zajmowanej niszy gospodarza.

PIŚMIENNICTWO

1. *Augustynowicz E, Szenborn L, Gzyl A, Ślusarczyk J.* Występowanie u dzieci z przedszkoli i domów małego dziecka potencjalnie inwazyjnych, bezotoczkowych szczepów *Haemophilus influenzae*. Med Dośw Mikrobiol 2007; 59: 103-12.
2. *Bakaletz LO*. Immunopathogenesis of polymicrobial otitis media. J Leuckoc Biol 2010; 87: 213-22.
3. *Faden H.* The microbiologic and immunologic basis for recurrent otitis media in children. Eur J Pediatr 2001; 160: 407-13.

4. *Hirano T, Jiao X, Chen Z* i inni. Kinetics of mouse antibody and lymphocyte responses during intranasal vaccination with a lipooligosaccharide-based conjugated vaccine. Immunol Letters 2006; 107: 131-9.
5. *Hothorn T, Bretz F, Westfall P*. Simultaneous inference in general parametric models. Biom J 2008; 50; 346-63.
6. *Kaur R, Chang A, Xu Q* i inni. Phylogenetic relatedness and diversity of non-typeable *Haemophilus influenzae* in the nasopharynx and middle ear fluid of children with acute otitis media. J Med Microbiol. 2011; 601841-8.
7. *Kodama S, Hirano T, Noda K* i inni. Nasal immunization with plasmid DNA encoding P6 protein and immunostimulatory complexes elicits nontypeable *Haemophilus influenzae*- specific long-term mucosal immune responses in the nasopharynx. Vaccine 2011; 29: 1881-90.
8. *Kodama S, Sabirov A, Suzuki M* i inni. Prevention of otitis media by nasal vaccine- an animal study. International Congress Series 2003; 1240: 93-5.
9. *Krishnamurthy A, McGrath J, Cripps AW, Kyd JM.* The incidence of *Streptococcus pneumonia* otitis media is affected by the polymicrobial environment particularly *Moraxella catarrhalis* in a mouse nasal colonization model. Microb Infect 2009; 11: 545-53.
10. *Kurono Y, Yamamoto K, Fujihashi S* i inni. Nasal immunization induces *Haemophilis influenzae* specific Th1 and Th2 responses with musical IgA and systemic IgG antibodies for protective immunity. J Infect Dis 1999; 180: 122-32.
11. *Kyd JM, Cripps AW.* Killed whole bacterial cells, a mucosal delivery system for the induction of immunity in the respiratory tract and middle ear: an overview. Vaccine 1999; 17: 1775-81.
12. *LaCross NC, Marrs CF, Gilsdorf JR*. Population structure in nontypeable *Haemophilus influenza*. Infect Genetic Evolution 2013; 14: 125-36.
13. *Lijek RS, Weiser JN.* Co-infection subverts mucosal immunity in the upper respiratory tract. Curr Opin Immunol 2012; 24: 417-23.
14. *Lysenko ES, Raner AJ, Nelson AL* i inni. The role of innate immune responses in the outcome of interspecies competition for colonization of mucosal surfaces. PLoS Pathogens, 2005; 1: 3-11.
15. *Martin K, Morlin G, Smith A* i inni. The tryptophanasa gene cluster of *Haemophilus influenza* type b: evidence for horizontal gene transfer. J Bacteriol 1998; 180: 107-18.
16. *Mhlanga-Mutangadura T, Morlin G, Smith A* i inni. Evolution of the major pilus gene cluster of *Haemophilus influenzae*. J Bacteriol 1998; 180: 4693-703.
17. *Monasta I, Ronfani L, Marchetti F* i inni. Burden of disease caused by otitis media: systematic review and global estimates. PLoS ONE 2012; 7: e36226.
18. *Murphy TF, Faden H, Bakaletz LO* i inni. Nontypeable *Haemophilus influenzae* as a pathogen in children. Pediatr Infect Dis J 2009; 28: 43-8.
19. *Noda K, Kodama S, Umemoto S* i inni. Nasal immunization with plasmid DNA encoding P6 protein and immunostimulatory complexes elicits nontypeable *Haemophilus influenzae*- specific long-term mucosal immune responses in the nasopharynx. Vaccine 2010; 28: 5068-74.
20. *Pettigrew MM, Foxman B, Marrs CF* i inni. Identification of the lipooligosaccharide biosynthesis gene *lic*2B as a putative virulence factor in strains of nontypeable *Haemophilus influenzae* that cause otitis media. Infect Immun 2002; 70: 3551-6.
21. *Pettigrew MM, Gent JF, Pyles RB* i inni. Viral-bacterial interactions and risk of acute otitis media complicating upper respiratory tract infection. J Clin Microbiol 2011; 49: 3750-5.
22. *Schumacher SK, Marchant CD, Loughlin AM* i inni. Prevalence and genetic diversity of nontypeable *Haemophilus influenza* in the respiratory tract of infants and primary caregivers. Pediatr Infect Dis J 2012; 31: 145-9.
23. *Van Schilfgaarde M, Ulsen P, Eijk P* i inni. Characterizationof adherence of nontypeable *Haemophilus influenzae* to human epithelial cells. Infect Immun 2000; 68: 4658-65.

24. *Wallace FJ, Clancy RL, Cripps AW*. An animal model demonstration of enhanced clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* from respiratory tract after antigen stimulation of gut associated lymphoid tissue. Am Rev Respir Dis 1989; 140: 311-6.

Otrzymano: 6 III 2013 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Badania Surowic i Szczepionek NIZP-PZH, tel.: 22 54 21 213, fax.: 22 54 21 311,
e-mail: eaugustynowicz@pzh.gov.pl