

VOJENSKÉ ZDRAVOTNICKÉ LISTY

ROČNÍK LXVIII

DUBEN 1999

ČÍSLO 1-2

616-002.5-084

TUBERKULÓZA - TRENDY VÝVOJE NOVÝCH VAKCÍN

Prof. MUDr. Miroslav ŠPLÍNO, DrSc., Ing. Rudolf RYCHLÝ, CSc.
Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové
(rektor: plk. doc. MUDr. Svatopluk Býma, CSc.)

Úvod

Tuberkulóza (TBC) je nejčastější příčinou úmrtí mladistvých i dospělých osob a druhou nejčastěji se vyskytující infekcí na světě. Téměř jedna třetina světové populace je průběžně infikována a 20 milionů z těchto infikovaných má aktivní TBC. V tomto desetiletí může TBC usmrtit 30 milionů lidí. Více než 50 milionů osob může být infikováno multirezistentními kmeny. K nárůstu multirezistentních kmenů mohlo dojít proto, že v průběhu let nastal pokles bdělosti a podcenění incidence TBC a následné soustavné kontroly. Před výskytem multirezistentních kmenů byla kombinovaná léčba úspěšná ve více než 90 % léčených případů. Multirezistentní TBC je nejen vysoce infekční, ale ve své podstatě i špatně léčitelná, s vysokou mortalitou kolem 50 %. V současné době je TBC vedoucí příčinou úmrtí u HIV pozitivních osob, má rychlejší průběh s fatálním koncem kolem 80 %.

Tuberkulózu způsobuje *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) - šíří se kapénkami aerosolu, který se dostává do dolních dýchacích cest a vyvolává destrukci plicní tkáně. Při šíření krevní cestou může vyvolat systémové onemocnění s postižením mnoha orgánů včetně kostí, kloubů, sleziny, jater a mozku. Při expozici osob TBC zdroji dochází k infikování přibližně 50 % osob a u 15 % z nich k rozvoji onemocnění. Nedostatečná výživa, špatné životní podmínky a bída výraznou měrou potencují dramatické šíření tuberkulózy.

V současné době SZO doporučuje novou strategii kontroly TBC v celosvětovém měřítku, označovanou jako „DOTS“ - Directly Observed Treatment, Short-course, která zahrnuje:

- Prioritu přímé identifikace nemocného a odpovídající následnou léčbu.
- Kontrolu pacienta při požití každé léčebné dávky a provedení záznamu zdravotnickým pracovníkem.
- Pacient musí být léčen v systému, který zaručuje, že bude léčen!
- Správné dávkování antituberkulotik, známé jako „krátká léčebná kúra“.

Program musí podporovat vládní orgány. Důraz na kontrolu TBC se pokládá za důležitou politickou prioritu (WHO - The World Health Report, 1996).

Imunologie tuberkulózy

Mycobacterium tuberculosis je intracelulární patogen, který se pomnožuje v alveolárních buňkách. Iniciální růst Mt je spojen s vývojem přecitlivělosti pozdního typu, je charakterizován tvorbou malých nekrotických lézí se solidním kazeózním centrem tzv. tuberkulomů.

Granulomy obsahují T-lymfocyty a mononukleární fagocytující buňky v různé fázi maturace a aktivity. Po vzniku přecitlivělosti pozdního typu a tvorbě tuberkulomů umožňuje aktivace makrofágů buňkami CD4+ usmrcení bacilů Mt v tuberkulo-

mech. Aktivace makrofágů je základním mechanismem získané rezistence proti Mt. CD4+ jsou pomocné T-lymfocyty, které produkují interleukiny a následně aktivují makrofágy. Při vzniku přecitlivělosti pozdního typu k Mt CD4+ převládají nad CD8+ T-buňkami, které se uplatňují jako cytolytické buňky.

CD4+ lymfocyty se dělí na TH1 a TH2 subpopulace, jejich produkce závisí na typu produkovaného cytokinu. CD4+ buňky produkují cytokiny, interferon gamma (IFN-gamma) a interleukin (IL-2), které se významně uplatňují při vývoji antimykobakteriální rezistence a jsou nezbytné při vzniku přecitlivělosti pozdního typu. INF-gamma aktivuje specificky makrofágy, stimuluje ingesci a jejich mikrobicidní účinek k Mt.

Přirození zabijáci - NK buňky - se také mohou významně uplatňovat v obraně organismu proti Mt. Mají schopnost lyzovat hostitelské buňky infikované mykobakteriálními patogeny, vykazují podobnou funkci jakou mají specifické cytolytické T-lymfocyty.

Vývoj vakcín proti tuberkulóze

1. Živé atenuované vakcíny

Živé atenuované vakcíny svým způsobem připomínají přirozenou infekci a v širokém rozsahu stimuluji imunitní systém.

BCG vakcína

Vakcína Bacille Calmette-Guérin (BCG) je nejčastější vakcínou používanou ve světě, ačkoli její protektivní aktivita je často kontraverzní. BCG vakcína je derivována z atenuovaného kmene *Mycobacterium bovis*. Do praktické vakcinace byla zavedena v roce 1921 jako relativně bezpečná, s malou incidencí nežádoucích reakcí. Některé studie prokázaly, že při opakované vakcinaci vytváří dostatečný booster imunologické odpovědi proti primární infekci, ale tento efekt je limitován následným průběhem možné reaktivace. Malá nebo žádná protekce po vakcinaci byla pozorována po deseti až patnácti letech. Vakcinace v dětském věku neochrání dospělé osoby před reinfekcí (1).

BCG vakcína je variabilní ve svém protektivním účinku v různých částech světa. Vakcinace redukuje riziko tuberkulózy přibližně o 50 %, ale efektivita kolísá od 0 do 80 %. Ve světovém měřítku se používají k přípravě vakcín různé kmeny. Ukazuje se, že BCG vakcína je méně efektivní u populace vystavené expozici přirozeně se vyskytujícím mykobaktériím v zevním prostředí (2).

Cytolytická odpověď k purifikovaným proteinovým antigenům je prokazována nižší než u živé BCG vakcíny. Bylo demonstrováno, že nestimulované periferní krevní mononukleární buňky vykazují

nižší nebo žádnou cytotoxickou aktivitu k cílovým buňkám, ke kterým byl přidán solubilní purifikovaný proteinový derivát (PPD) Mt. Následná stimulace vakcínou BCG u nestimulovaných periferních krevních mononukleárních však prokázala cytolytickou aktivitu proti několika mykobakteriálním antigenům. Tyto výsledky dokumentují, že živé atenuované vakcíny mohou vykazovat vyšší protektivní efekt než purifikované proteinové vakcíny (3).

Živá vakcína *M. bovis* BCG navozuje u vakcinovaných lidí aktivaci CD4+ a CD8+ T-buněk. Podání neživé vakcíny *M. bovis* BCG vede k aktivaci CD4+ T-buněk a jen k malé aktivaci CD8+ T-buněk.

2. Živé rekombinantní vakcíny

Pokrokem v přípravě nových živých atenuovaných vakcín proti TBC je využití rekombinantní DNA technologie. Jedním z postupů je exprese různých heterologních antigenů BCG. Jestliže známe kritická místa imunitní odpovědi u TBC, která byla identifikována a exprimována u BCG, pak nám to umožní lepší konstrukci živé atenuované vakcíny. Detailní znalost genů Mt odpovědných za virulenci nebo prodloužení doby přežívání v makrofázích je strategie, která se využívá v přípravě atenuovaných vakcín. Využití opakované mutagenese lze využít k získání rekombinantů s výměnou alel u Mt a přípravu rekombinantních klonů Mt.

Stabilita BCG vakcíny nabývá stále na větším významu především u HIV infekce. Jde o vyloučení nebo alespoň snížení potenciální nežádoucí reakce BCG vakcíny u imunokompromitovaných osob. Pro tyto účely byly připraveny BCG auxotropní mutanty, které vyžadují specifické faktory nebo metabolity. Za účelem posouzení bezpečnosti a protektivního efektu bylo v praxi testováno 5 kmenů na myších s kombinovaným defektem imunity. Výsledky potvrdily, že kmeny byly bezpečné pro imunosuprimované myši, vytvářely dobrou protektivní imunitu jako po podání BCG u konvenčních myší (4).

3. Peptidové vakcíny

Pro přípravu efektivních peptidových vakcín proti tuberkulóze je nutné identifikovat specifické antigeny a jejich schopnost navodit protektivní imunitu. Zatím není dostatečně známo, které proteiny jsou významné pro tvorbu protektivní imunitní odpovědi.

Mycobacterium tuberculosis

Vytváří řadu proteinů, které se mohou prezentovat jako antigeny:

- ESAT-6
- 30/32 kDa (85 komplex)
- 38 kDa (lipoprotein)
- 19 kDa (lipoprotein)

- MPT 64 (24 kDa)
- stresové proteiny (10 kDa, 65 kDa, 70 kDa, 90 kDa)

Stresových proteinů (10 kDa, 30 kDa, 38 kDa a 65 kDa) bylo použito jako rekombinantních antigenů ke zvýšení proliferativní odpovědi lidských T-buněk. Výše uvedené 4 antigeny vykazovaly přibližně stejnou indukční i protektivní odpověď Th1 buněk, ale ani jeden z těchto antigenů nebyl imunodominantní. V jiných pokusech byla potvrzena schopnost lidských T-buněk odpovídat na více než na jeden mykobakteriální antigen. To umožňuje soudit, že pro vývoj efektivní vakcíny je důležitá inkorporace více antigenů (5).

ESAT-6 je významný sekreční protein. U myši po opakovaném podání Mt došlo k mohutné odpovědi T-buněk na ESAT-6 ve smyslu tvorby protektivní imunity. Tento protein byl prokázán jen u Mt a *M. bovis*. Zdá se, že protein by mohl mít významnou diagnostickou cenu, protože tuberkulín (PPD) neumožňuje diferencovat mezi infekcí vyvolanou Mt a senzibilizací po vakcinaci BCG vakcínou (6).

Antigenní komplex 85 (Ag 85) zahrnuje 3 proteinové komponenty 85 A, 85 B, 85 C. Je produkován mohutně Mt, hromadí se v lidských mononukleárních fagocytech a v kultivačním médiu. Na modelu infikovaných morčat Mt vykazuje imunogenicitu. V pokusech in vitro bylo potvrzeno, že lidské monocyty infikované Mt tvoří 30 kDa antigenní komplex. Tento poznatek je důležitý pro vývoj subjednotkové vakcíny, protože uvolňování proteinu je významné pro intracelulární prezentaci antigenů (7).

MPT 64 antigen je klasický protein, je dobře detekovaný jak u Mt, tak i u kmenů *M. bovis* BCG a *M. bovis*. Studie, které prováděli Haslov a spol. dokumentují možnost využití tohoto proteinu v diagnostickém kožním testu (8). I když byl tento antigen demonstrován na molekulární úrovni u zvířecího modelu, není dostatečně známa jeho schopnost vytvářet protektivní imunitu u člověka.

Lipoarabinomannoside (LAM) - polyarabinozid s dlouhým řetězcem. Je znám jako antigen s různým biologickým efektem na buňky, především makrofágy. Je možné, že LAM může působit jako faktor virulence. Předpokládá se, že by mohl být využit k přípravě polysacharidové vakcíny.

DNA vakcíny

Moderním přístupem k přípravě nové vakcíny proti TBC je náhrada BCG vakcínou DNA. Možnost použití DNA vakcíny v prevenci TBC je slibnou alternativou BCG. Má být konstruována tak,

aby kódovala několik selektivních antigenů, které by neinterferovaly v kožním testu. Prakticky by to umožnilo jednotnou produkci stabilní vakcíny s možností využití celosvětového vakcinačního programu.

Výběr antigenů pro DNA vakcínu je primárně limitován imunogenitou. I když imunogenita všech antigenů Mt nebyla zatím blíže charakterizována, dva antigenní komplexy se jeví jako vhodné:

Heat shock protein - hsp 65 a antigenní komplex Ag 85

Heat shock proteiny jsou známými antigeny, které jsou produkovány a uplatňují se v časně fázi imunitní odpovědi proti intracelulárním patogenům včetně mykobaktérií (9).

Antigenní komplex Ag 85 patří do skupiny proteinů aktivně secernovaných při proliferaci mykobaktérií, účastní se mohutné stimulace celulární imunitní odpovědi u infikovaných myši i u lidí. Z komplexu Ag 85 byly v pokusu na myších testovány 2 antigeny. U obou antigenů došlo k výrazné redukci počtu replikujících se mykobaktérií - 20krát až 40krát. Výsledky dokumentují tvorbu protektivní imunity navozením humorální a buňkami zprostředkované imunitní odpovědi.

Po aplikaci Ag 85 myším dochází k mohutné tvorbě protilátek proti Ag 85, především v třídě IgG1 a IgG2a typu. Buňky sleziny imunizovaných myši po stimulaci BCG in vitro vykazují výraznou proliferativní aktivitu lymfocytů. Humorální a buněčná odpověď po aplikaci DNA vakcíny v pokusu na myších je spojena s Th1 typem buněčné stimulace, která je podle předpokladů nezbytná v protekci organismu proti TBC infekci (10).

Souhrn

Článek zdůrazňuje celosvětovou závažnost humánní tuberkulózy a důslednější přístup k léčbě. Je podán stručný přehled imunologie tuberkulózy a přístupy ke konstrukci nových vakcín proti tuberkulóze.

Literatura

1. YOUNG, DB. - DUNCAN, K.: Prospectives for new interventions in the treatment and prevention of mycobacterial disease. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1995, vol. 49, p. 664-673.
2. FINE, PEM.: Variation in protection by BCG: Implications of and for heterologous immunity. *Lancet*, 1995, no. 3346, p. 1339.
3. TURNER, J. - DOCKRELL, HM.: Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live *Mycobacterium bovis* BCG activates cytolytic CD8+ T-cells in vitro. *Immunol.*, 1996, vol. 87, p. 339.
4. GULERIA, I., et al.: Auxotrophic vaccines for tuberculosis. *Nature Medicine*, 1996, vol. 2, p. 334-337.
5. BLOOM, BR., et al.: Immune response to recombinant mycobacterial proteins in patients with tuberculosis infection and disease. *J. Infect. Dis.*, 1996, vol. 174, p. 431-434.
6. HARBOE, M., et al.: Vaccines against tuberculosis. *Vac-*

- cines, 1996, vol. 14, p. 701-716.
7. HORWITZ, MA., et al.: Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, 1996, vol. 64, no. 8, p. 3038-3047.
8. ANDERSEN, B., et al.: Mapping of the delayed-type hypersensitivity-inducing epitope of secreted protein MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, 1995, vol. 63, no. 12, p. 4613-4618.
9. SILVA, C.: New vaccines against tuberculosis. *Brazil. J. Med. Biol. Res.*, 1995, vol. 28, p. 843-851.
10. HUYGEN, K., et al.: Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat. Med.*, 1996, vol. 2, no. 8, p. 893-898.

Klíčová slova: Tuberkulóza; Vakcinace; *Mycobacterium*; Cytokiny; Vakcíny.

Do redakce došlo 11. 1. 1999