

Received: 2010.11.09
Accepted: 2011.02.07
Published: 2011.02.19

Szczepienia przeciwprątkowe – BCG i co dalej?*

Vaccination against *M. tuberculosis* – what next after BCG?

**Marek Fol, Katarzyna Zawadzka, Magdalena Druszczyńska,
Magdalena Kowalewicz-Kulbat, Wiesława Rudnicka**

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Gruźlica (TB) ciągle stanowi bardzo poważny światowy problem zdrowia publicznego. Występowanie TB jest zdecydowanie większe w regionach ubogich i o dużej gęstości zaludnienia (Afryka, Azja), niż w krajach postrzeganych jako stosunkowo zasobne. Jednakże również i tam, zwłaszcza w Europie Wschodniej, problem gruźlicy staje się palący ze względu na coraz częściej pojawiające się szczepy wielolekooporne.

Leczenie gruźlicy jest trudne, gdyż wymaga długiego okresu stosowania kilku leków przeciwprątkowych, a czasami nieskuteczne – gdy pacjent został zainfekowany prątkami wielolekoopornymi lub wykazuje deficyty odporności (infekcja HIV). Najlepszą ochroną przed gruźlicą pozostaje więc zastosowanie skutecznej szczepionki.

Na początku XX wieku została wprowadzona do powszechnego użycia pierwsza i jak dotąd jedyna przeciwgruźlicza szczepionka BCG (Bacille Calmette-Guèrin). Dziś wiadomo, że preparat ten nie jest w pełni skuteczny. Mimo wielu badań i upływu czasu nie udało się jak dotąd uzyskać lepszej szczepionki przeciwgruźliczej. Prace mające na celu jej stworzenie są jednak bardzo szeroko zakrojone. Wiele z nowo opracowywanych preparatów jest w II i III fazie badań, a ich dotychczasowe rezultaty wydają się obiecujące. Poszukiwania nowych szczepionek obejmują kilka strategii: użycie osłabionych przez modyfikacje wirulentnych prątków *Mycobacterium tuberculosis*, rekombinowanych atenuowanych prątków *M. bovis* BCG, wyselekcjonowanych immunogennych białek mikobakterii lub kodującego je DNA, czy też innych wektorów drobnoustrojowych noszących antygeny prątkowe. Rozwój różnorodnych koncepcji jest niezwykle istotny, ponieważ zwiększa szanse otrzymania preparatów jak najbardziej skutecznych i bezpiecznych w immunizacji jak najszerszej grupy ludzi, nie tylko osób zdrowych, ale również tych z niedoborami odporności. W świetle trwających badań perspektywy uzyskania bardziej skutecznej szczepionki napawają pewnym optymizmem.

Słowa kluczowe: gruźlica • szczepionka • immunizacja • BCG

Summary

Tuberculosis (TB) still remains a huge global health problem. An increase in TB has been observed in many parts of the world, especially in poor and densely populated sub-Saharan Africa and Asia. Tuberculosis affects not only the developing countries but also the relatively wealthy regions of Europe, particularly Eastern Europe, where drug-resistant mycobacterial strains are increasingly reported.

* Publikacja została sfinansowana z grantu MNiSzW nr N N303 345035.

Control of tuberculosis expansion is very difficult. It requires the long-term use of anti-mycobacterial drugs. Additionally, the HIV epidemic and the phenomenon of multi-drug resistance are assumed to be responsible for the increase in TB cases. Therefore the most reasonable form of anti-TB protection seems to be effective vaccination.

At the beginning of the twentieth century the BCG vaccine was introduced into general use as the first and so far the only immune protector against tuberculosis. Now it is known that this vaccine is not powerful enough and induces protection at a relatively low level. Hence ongoing research on the development of a more powerful anti-mycobacterial vaccine is still needed. Many of the new formulations are in phase II or III of clinical trials and the results are promising. The search for new vaccines involves several strategies: modified virulence-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* strains, recombination of attenuated *M. bovis* BCG bacilli, immunogenic mycobacterial proteins and DNA encoding selected proteins as well as unrelated microorganisms used as carriers of mycobacterial antigens. The wide range of concepts is extremely important because new vaccines should serve for immunization of the broadest possible population, not only healthy individuals but also those who are immunocompromised.

Key words: tuberculosis • vaccine • immunization • BCG

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=933482>

Word count: 5428

Tables: –

Figures: –

References: 69

Adres autora: dr Marek Fol, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Uniwersytet Łódzki, ul. S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: marekfol@poczta.onet.pl

WSTĘP

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) to jeden z najbardziej rozpowszechnionych patogenów bakteryjnych człowieka. 24 marca 1882 r., podczas wykładu w Berlińskim Towarzystwie Fizjologicznym, Robert Koch ogłosił, że bakteria ta jest czynnikiem etiologicznym gruźlicy. *Mtb* występuje w postaci Gram-dodatniej pałeczki i charakteryzuje się wyjątkową budową ściany komórkowej. Cechuje się ona dużą zawartością lipidów, w tym kwasów mikolowych oraz innych specyficznych struktur, które warunkują kwasooporność tej bakterii. Prątek gruźlicy jest jednym z najstarszych patogenów ludzkich, który rozwinął kompleksowe strategie przetrwania [16,17,18]. Jedną z nich jest jego zdolność do utrzymywania się wewnątrz gospodarza przez długi okres w stanie utajonym [15,51].

Gruźlica (TB) stanowi poważny problem zdrowotny na świecie. Szacuje się, iż w 2008 r. u ponad 9 milionów osób rozwinęła się aktywna postać choroby. Rocznie jest ona przyczyną około 2 milionów zgonów [21]. Tym samym gruźlica obok AIDS stanowi chorobę o najwyższym stopniu śmiertelności dla ludzi, spowodowaną przez jeden czynnik zakaźny [19]. Ponadto szacuje się, że około 2 miliardy ludzi, czyli prawie 1/3 całej populacji, jest latentnie zakażona *Mtb* [38].

Większość przypadków gruźlicy odnotowuje się w krajach Azji Południowo-Wschodniej, charakteryzujących się bardzo dużą gęstością zaludnienia. Najgorzej w tych statystykach wypadają Indie, gdzie wykrywa się około 1,9 miliona nowych przypadków rocznie. Równie poważna sytuacja występuje w Chinach i Indonezji. Ogromny

odsetek zachorowań obserwowany jest również w Afryce Subsaharyjskiej, RPA, Ugandzie i Mozambiku, gdzie na 100000 osób stwierdza się ponad 500 przypadków zachorowań na gruźlicę. Problem gruźlicy wzrasta w przypadku osób zakażonych wirusem HIV, wśród których to właśnie gruźlica jest najczęstszą przyczyną śmierci. Zupełnie odmienna sytuacja panuje w krajach zachodniej Europy, gdzie gruźlica występuje znacznie rzadziej i na 100000 osób pojawia się średnio 10–50 zachorowań. Gruźlica, łącznie z malarią i AIDS określane są wspólną nazwą „The Big Three” (Wielka Trójka), a ich występowanie wiąże się m.in. z ubóstwem oraz ogromnymi dysproporcjami między krajami bogatymi i biednymi [13,15].

Do niedawna sądzono, iż gruźlica przestała być poważnym problemem zdrowia publicznego, ponieważ można ją skutecznie zwalczyć lekami przeciwprątkowymi. Kilka czynników przyczyniło się jednak do braku sukcesu w globalnej kontroli gruźlicy. Zaliczamy do nich: trudności w diagnostyce, czynniki społeczno-ekonomiczne na obszarach endemicznego występowania gruźlicy oraz to, że eradykacja bakterii z organizmu wymaga wielu miesięcy leczenia. Ponadto pojawiły się wielolekooporne postaci gruźlicy (MDR – multi drug resistant) i nadzwyczajnie lekooporne postaci gruźlicy (XDR – extensive drug resistant). MDR TB jest wywołana przez bakterie odporne na działanie dwóch podstawowych leków przeciwprątkowych – izoniazidu i rifampicyny. Natomiast prątek typu XDR TB charakteryzuje się opornością na wymienione wcześniej leki oraz najlepsze leki drugiej linii – fluorochinolony, a ponadto na jeden z trzech innych antybiotyków: amikacynę, kanamycynę lub kapreomycynę. Ta wielolekooporność sprawia, iż chorzy z gruźlicą XDR mają niewielkie

szanse wyleczenia i umierają mimo intensywnej, kosztownej i długotrwałej terapii. Wszystko to sprawia, iż zwalczanie gruźlicy ponownie stało się sprawą priorytetową w skali globalnej [13,15,50].

Zachorowaniom na gruźlicę zapobiega się przez stosowanie szczepień ochronnych. Dotychczas jedyną dopuszczoną do użycia szczepionką przeciwprątkową jest szczepionka BCG, którą zastosowano po raz pierwszy w latach 20. XX wieku. Sądzone wtedy, że po wprowadzeniu tego preparatu liczba nowych zachorowań na gruźlicę zostanie znacząco ograniczona, a tym samym problem tej choroby zostanie rozwiązany. Do tej pory podano dzieciom około 4 biliony dawek szczepionki BCG w 182 państwach. Mimo powszechnego stosowania na całym świecie szczepień przeciwgruźliczych, nie osiągnięto zamierzonego celu. Jest to wynikiem m.in. różnego stopnia odporności przeciwgruźliczej indukowanej u szczepionych. Właściwości ochronne BCG szacowane są na poziomie 0–80% w zależności od miejsca wykonania badań. Dowiedziono, że szczepionka BCG chroni skutecznie przede wszystkim dzieci do lat 15 (zwłaszcza przed najgroźniejszymi postaciami gruźlicy – gruźlicą ośrodkowego układu nerwowego i uogólnioną gruźlicą „prosówką”). U osób dorosłych, poziom ochrony wykonywanych w dzieciństwie szczepień BCG ocenia się najwyżej na 50% [50].

Biorąc pod uwagę dramatyczne statystyki lat 90. XX wieku, obrazujące zachorowalność na gruźlicę i śmiertelność spowodowaną tą chorobą, Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) ogłosiła globalne zagrożenie tym drobnoustrojem. Przyczyniło się to do utworzenia międzynarodowych strategii zwalczania gruźlicy. Opracowano m.in. program DOTS (Directly Observed Treatment Short-course), którego podstawę stanowi szybkie wykrywanie i bezpośrednio nadzorowane leczenie gruźlicy zestawem leków przeciwprątkowych. Program DOTS został zaakceptowany przez organizacje rządowe, korporacje przemysłowe i instytucje zajmujące się walką z gruźlicą (m.in. WHO). Jego celem jest opracowywanie warunków pomocy dla państw o najwyższym poziomie zachorowalności oraz zasad diagnostyki, leczenia i kontroli epidemiologicznej gruźlicy. Zgodnie z tym programem należy dążyć do zredukowania liczby zachorowań na gruźlicę, tak by do 2015 r. nastąpił spadek o 50%, a do roku 2050 powinien być odnotowywany mniej niż jeden przypadek aktywnej postaci gruźlicy na 100 000 osób. W ramach powyższej strategii wyróżniono kilka głównych celów. Zaliczamy do nich redukcję czasu leczenia i częstości ponownych zachorowań, opracowanie nowych leków oraz schematów leczenia gruźlicy XDR i MDR, a także terapii osób zakażonych jednocześnie *Mtb* i HIV [2,15,49]. **Szczególne znaczenie wśród zamierzeń programu walki z gruźlicą ma stworzenie nowej, bardziej efektywnej szczepionki przeciwprątkowej.**

Duża liczba nowych zakażeń *Mtb* i niski poziom ochrony przeciwprątkowej powstały po podaniu szczepionki BCG, oznaczają potrzebę opracowania lepszego szczepionkowego preparatu przeciwgruźliczego. W ośrodkach badawczych na świecie podejmowane są próby stworzenia takiego preparatu, który doprowadzi do efektywniejszego nabycia odporności przeciw prątkom gruźlicy [24]. Obecnie znajduje się kilka wariantów nowych szczepionek

przeciwgruźliczych w różnych fazach badań. W pracy omówiono wybrane nowe modele szczepionek przeciwprątkowych i związane z nimi perspektywy skutecznej ochrony przeciwgruźliczej, a w konsekwencji perspektywy ograniczenia występowania tej choroby.

SZCZEPIONKA BCG

Szczepionka BCG (Bacille Calmette-Guérin) jest preparatem powszechnie używanym do szczepień przeciwgruźliczych. Nazwa szczepionki pochodzi od nazwy prątków oraz nazwisk badaczy, którzy ją opracowali – Albert Calmette i Camille Guérin. Prątki Calmette-Guérin są atenuowanym szczepem *Mycobacterium bovis* (prątką bydłęcego) uzyskany w Instytucie Pasteura w Lille we Francji.

Po raz pierwszy ogłoszono, iż gruźlica jest chorobą zakaźną w połowie XIX w., kiedy to Jean Antoine Villemin w 1865 r. na jednym z posiedzeń francuskiej Akademii Medycznej przedstawił wyniki swoich badań. Dowodził, iż możliwa jest transmisja choroby z jednego osobnika na drugiego, co wykazał przez zarażenie królika materiałem pobranym od chorego na gruźlicę pacjenta oraz materiałem pobranym od chorego bydła [5,37]. Dopiero prace Roberta Kocha pozwoliły określić, iż czynnikiem etiologicznym ludzkiej gruźlicy jest *Mycobacterium tuberculosis*, a gruźlicy bydła – *Mycobacterium bovis*. Sądzone, iż na zasadzie analogii, podobnie jak w przypadku opracowania szczepionki przeciwko ospie, będzie można zastosować *M. bovis* do immunizacji ludzi w celu ochrony przed gruźlicą. Okazało się, że bezpośrednie zastosowanie *M. bovis* nie jest możliwe, gdyż doprowadza do rozwoju choroby. Przełom nastąpił po tym jak w 1908 r. Edmond Nocard wyizolował szczep *M. bovis* (zwany szczepem „Lait Nocard”) ze zmian chorobowych okolic sutka chorej na gruźlicę krowy i przesłał go do Alberta Calmette z Instytutu Pasteura w Lille. Calmette oraz jego współpracownik Camille Guérin wielokrotnie pasażowali prątki na podłożu hodowlanym. Po 230 pasażach zauważono, że *M. bovis* stracił swą zjadliwość, co umożliwiło wykorzystanie go do produkcji bezpiecznej szczepionki [60]. Warunkiem stosowania BCG jako szczepionki przeciwprątkowej była zatem utrata właściwości chorobotwórczych.

Obecnie w celach immunizacyjnych stosowanych jest na świecie 12 podszczepów BCG różniących się, w wyniku kilkudziesięcioletniego pasażowania, pod względem genotypowym i fenotypowym. Wszystkie jednak zachowują pierwotnie opisane właściwości protekcyjne, przy czym jednym z podszczepów o najsilniejszych cechach immunizacyjnych jest szczep brazylijski zwany BCG Moreau-Rio de Janeiro. Przywieziony został do Brazylii w 1927 r. i jest szczepem siostrzanym szczepu sprowadzonego do Urugwaju w 1925 r. przez Julio Elvio Moreau [6].

Po raz pierwszy BCG podano człowiekowi doustnie w 1921 r., kiedy to zaszczepiono noworodka urodzonego przez chorą na gruźlicę matkę [6]. Wkrótce szczepienia zostały wdrożone w całej Europie, a po II Wojnie Światowej WHO zaleciła rozszerzenie kampanii szczepień poza teren Europy [13,20,36,42,51].

Sposób podania szczepionki zmieniał się na przestrzeni lat. Pierwotnie szczepionka podawana była doustnie.

Po raz pierwszy szczepienie śródskórne przeprowadzono w 1927 r., a od 1939 r. praktykowano szczepienie przez wielopunktowe nakłucia skórne. Obecnie szczepionka podawana jest śródskórnie, chociaż jeszcze do 1968 r. bywała podawana doustnie [6].

Od wprowadzenia BCG przeprowadzono wiele badań klinicznych (pierwsze już w latach 30. ub.w.) aby ocenić skuteczność ochronną tej szczepionki. W wielu krajach jest ona podawana zaraz po urodzeniu i daje ochronę szczególnie przed gruźliczym zapaleniem opon mózgowych, w ciągu pierwszych 15 lat życia. Od początku istnieją kontrowersje na temat protekcyjnego działania szczepionki BCG zapobiegającego gruźlicy płuc u dorosłych. Podczas kontrolnych badań klinicznych wykazano, że poziom zabezpieczenia BCG przeciw chorobie płuc w Europie wynosi średnio 50%. Są jednak rejony świata, gdzie skuteczność ta jest znacznie wyższa (około 80%) i obszary, gdzie skuteczność bliska jest zeru (subkontynent indyjski). Ponadto wykazano, że ponowne podawanie szczepionki BCG młodzieży nie zwiększa zabezpieczenia przed najpowszechniej występującą płucną postacią gruźlicy [42,56,63].

Próbując wyjaśnić różnice w poziomie aktywności ochronnej szczepień BCG obserwowanej w różnych programach badawczych rozważa się zróżnicowane ryzyko ekspozycji na prątki środowiskowe [42].

Prątki środowiskowe to organizmy wszechobecne, które żyją w glebie. Ich liczba wzrasta wraz ze zmniejszaniem się długości geograficznej, a więc na obszarach położonych blisko równika ekspozycja na działanie tych bakterii jest największa. Podejrzewa się, że reakcje odpornościowe wzbudzone przez mikobakterie środowiskowe interferują z reakcją na szczepionkę BCG poprzez jej blokowanie lub maskowanie [42].

Aby zbadać wpływ prątków środowiskowych na powstawanie odporności przeciwgruźliczej przeprowadzono badania porównawcze w grupach ludności zamieszkującej Wielką Brytanię i Malawi. Okazało się, że przed zaszczepieniem szczepionką BCG poziom odpowiedzi immunologicznej przeciw antygenom prątkowym u osób w Wielkiej Brytanii był niski, natomiast u osób w Malawi wysoki. Po podaniu szczepionki BCG badani w Wielkiej Brytanii wykazywali oczekiwaną reakcję, czyli wzrost poziomu odpowiedzi immunologicznej na antygeny prątkowe. W przypadku Malawijczyków szczepienie nie miało istotnego wpływu na tę odpowiedź. Doświadczenie to potwierdza założenia hipotezy maskowania, według której odpowiedź na prątki środowiskowe koliduje z odpowiedzią na wprowadzaną doskórnie szczepionkę BCG, poprzez jej blokowanie. Potwierdzono to w badaniach u zwierząt [42].

Różne poziomy ochrony przeciwprątkowej BCG mogą wynikać również z różnic genetycznych między różnymi szczepami BCG, jakie były używane do produkcji szczepionek na całym świecie [42,51].

Zrozumienie mechanizmów zmiennej skuteczności szczepionki BCG jest bardzo ważne w opracowaniu nowych, lepszych szczepionek przeciwprątkowych, co staje się niezbędnym zadaniem w sytuacji powstawania lekoopornych szczepów *Mtb*.

NOWE KIERUNKI POSZUKIWAWCZE SKUTECZNIEJSZEJ SZCZEPIONKI PRZECIWPRAŃKOWEJ

Podczas opracowywania nowych szczepionek przeciwprątkowych należy uwzględnić możliwość bezpiecznego ich zastosowania u osób zarażonych wirusem HIV lub lekoopornymi prątkami gruźlicy MDR i XDR. Nowa szczepionka powinna także wzmacniać odpowiedź komórkową na prątki gruźlicy u ludzi, u których podanie BCG w wieku noworodkowym, a do niedawna także szkolnym, nie wzbudziło efektu protekcyjnego [49].

Wyróżnia się dwie główne strategie w opracowywaniu nowych szczepionek przeciwgruźliczych. Pierwsza obejmuje stworzenie preparatów, które zastąpią dotychczasową szczepionkę BCG i będą się opierać na modyfikowanych szczepach BCG lub *Mtb*. Druga strategia skupia się na opracowaniu szczepionek typu „booster”. Mogłyby one zawierać wyselekcjonowane antygeny *Mtb* i byłyby podawane osobom już wcześniej immunizowanym szczepionką BCG. Ich użycie potęgowałoby właściwości protekcyjne dotychczas stosowanej szczepionki [42].

Szczepionki przeciwprątkowe, nad którymi trwają ostatnio badania, można podzielić na kilka rodzajów. Wśród nich wyróżniamy:

- szczepionki zawierające atenuowane mutanty *Mycobacterium tuberculosis*,
- rekombinowane szczepionki BCG,
- szczepionki zawierające szczepy BCG oraz inne prątki, np. *M. vaccae* lub *M. simiae*,
- szczepionki zawierające wirusy jako nośniki antygenów prątkowych,
- szczepionki podjednostkowe,
- szczepionki DNA.

Powyższe preparaty testowane są w różnych laboratoriach i jednostkach naukowo-badawczych w celu określenia ich bezpieczeństwa i skuteczności [36,42,56,68]. Obecnie testowanych jest na różnych etapach badań klinicznych nie mniej niż 6 nowych preparatów szczepionkowych [9,13,27].

ŻYWE, ATENUOWANE SZCZEPIONKI PRZECIWPRAŃKOWE

Szczepionki stanowiące atenuowane mutanty *M. tuberculosis*

W genomie *M. tuberculosis* występuje ponad 120 genów, które nie są obecne w szczepach BCG. Na tej podstawie postawiono hipotezę, że żywy, atenuowany prątek gruźlicy, który zawiera bardziej kompletny zestaw antygenów, może lepiej chronić niż dotychczasowa szczepionka BCG. Podstawowym warunkiem zastosowania *Mtb*, jako szczepionki jest jego skuteczna atenuacja przy jednoczesnym zachowaniu właściwości immunogennych [13]. Dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod inżynierii genetycznej otrzymano mutanty auksotroficzne *Mtb* w zakresie syntezy m.in. puryn [35], leucyny [29], lizyny [48], glutaminy [64] czy tryptofanu [58]. Szczepy takie przeżywały i namnażały się w organizmach zwierząt doświadczalnych nie powodując u nich objawów chorobowych. Niestety ich właściwości protekcyjne były równoważne lub częściej słabsze w porównaniu z właściwościami ochronnymi standardowej szczepionki BCG [13,56].

Eliminacja genu *secA2* u *Mtb* reprezentuje inny nurt podejścia w zakresie pozyskiwania atenuowanych szczepów *Mtb* do immunizacji. Gen ten odpowiada za powstawanie czynnika niezbędego do uwalniania przez komórki *Mtb* pewnej grupy białek, w tym dysmutazy ponadtlenkowej SodA, odpowiedzialnych za przekształcanie anionów ponadtlenkowych (superoxide anions) do nadtlenku wodoru (H₂O₂). Tak przygotowany mutant odznaczał się obniżoną zjadliwością i w przeciwieństwie do szczepu dzikiego *Mtb*, nasilał proces apoptozy zarażonych prątkami makrofagów. Antygeny tego mutantu były prezentowane limfocytom T w sposób promujący rozwój swoistych limfocytów cytotoksycznych o fenotypie CD8⁺. Badania na zwierzętach wykazały, że szczep Δ *secA2* *Mtb* zapewniał lepszą ochronę przed zjadliwymi prątkami *Mtb* niż obecnie stosowana szczepionka BCG [26].

Inną strategię pozyskania szczepów *Mtb* do szczepienia stanowią próby opracowania mutantów charakteryzujących się obniżoną zdolnością do utrzymywania się (persist) w organizmie poddawanych wakcynacji przy zachowaniu możliwie niezmienionych podstawowych procesów biologicznych. Skrócony czas utrzymywania się bakterii szczepionkowych w organizmie ma szczególne znaczenie w przypadku immunizacji osób z niedoborami odporności. Wyrazem tych poszukiwań jest opracowanie auksotroficznego szczepu *Mtb* w zakresie syntezy kwasu pantotowego (witaminy B₅). Wykazano, iż taki mutant odznacza się wysokim poziomem atenuacji nie tylko w organizmach zwierząt immunokompetentnych (myszy BALB/c), ale również w organizmach zwierząt z dużym niedoborem odporności (myszy typu SCID), a uzyskiwany poziom protekcji obserwowany u zwierząt szczepionych mutantem z deficytem syntezy witaminy B₅ i tych immunizowanych szczepionką BCG był porównywalny [53].

Jednym ze szczepów *M. tuberculosis* wykazującym atenuację przekraczającą nawet tę reprezentowaną przez szczep BCG jest *Mtb* SO2 [41]. Szczep ten uzyskano przez unieczynnienie genu *phoP* kodującego jedno z dwu białek dwukomponentowego systemu sygnałowego phoP/R. System ten jest jednym z najważniejszych elementów odgrywających rolę w wirulencji *Mtb*. Produkt genu *phoP* ma działanie regulatorowe w formowaniu złożonej struktury lipidów prątkowych, w tym tych nadających im charakter wirulentny. W badaniach u myszy wykazano, iż szczep *Mtb*SO2, użyty jako szczepionka, wykazywał działanie protekcyjne na poziomie zbliżonym do tego, jakie obserwowane było po podawaniu szczepionki BCG. Z płuc myszy szczepionych *Mtb*SO2 i tych immunizowanych BCG, zakażonych po szczepieniu w pełni zjadliwymi prątkami gruźlicy, izolowano podobną liczbę prątków, niższą niż liczba bakterii wykrywanych w płucach zwierząt nieimmunizowanych. Również liczba zwierząt, u których zakażenie *Mtb* spowodowało zmiany zapalne w płucach była podobnie zmniejszona w grupach szczepionych *Mtb*SO2 i BCG w porównaniu z grupą myszy nieimmunizowanych [4].

Obiektem zainteresowania w pozyskaniu nowego szczepu szczepionkowego stały się również mikobakterie określane jako *Mycobacterium* w (*Mw*). Są to nietypowe, szybko rosnące i niechorobotwórcze prątki [46]. Wykazują pokrewieństwo antygenowe zarówno z *M. leprae* jak i z *M. tuberculosis*. Stwierdzono, że zabite prątki *Mw* aktywowały

limfocyty Th1 do wytwarzania IFN- γ i IL-2 [55]. Dalsze badania z udziałem zwierząt wykazały, iż zabite prątki *Mycobacterium* w podawane razem z zawierającym dwumikolan trehalozy adiuwantem Ribi lepiej chroniły zwierzęta przed prątkami gruźlicy niż zabite prątki *M. tuberculosis* [56].

Szczepionki zawierające rekombinowany szczep *M. bovis* BCG

Prątki *M. bovis* BCG obecnie używane w szczepionkach przeciwgruźliczych utraciły część genów podczas długotrwałego procesu atenuacji. Zakłada się, że ponowne wprowadzenie genów kodujących określone antygeny lub „immunostymulatorów” do genomu BCG może wpłynąć na podwyższenie właściwości immunogennych tych bakterii. Tym samym poziom ochrony indukowany po podaniu szczepionki zawierającej tak udoskonalone drobnoustroje powinien być znacznie lepszy w stosunku do szczepionki pierwotnej [56].

Rekombinowane szczepionki BCG (rBCG) są konstruowane technikami inżynierii genetycznej. W ten sposób uzyskano rekombinaty BCG z ekspresją różnych cytokin, takich jak IL-2, IFN- γ lub GM-CSF, które mogłyby wzmocnić odpowiedź na antygeny *Mtb*. Opracowany został również rekombinant z ekspresją listeriolizyny wykazujący zwiększoną zdolność stymulowania limfocytów T CD8⁺. Niedawno skonstruowano również szczepy BCG wytwarzające białka Ag85B i Rv3425 należące do grupy białek PPE pochodzących od *Mtb* (rBCG: Ag85B- Rv3425). Białka tej grupy zawierają w N-końcowej części łańcucha peptydowego sekwencję aminokwasów Pro-Pro-Glu, od której została utworzona nazwa grupy białek PPE [56]. Geny związane z syntezą białek PPE (wraz z inną grupą niespokrewnionych z PPE białek PE) zajmują aż około 9% całego genomu *Mtb*, natomiast same białka są uznawane za podstawowy rezerwuuar zróżnicowania antygenowego prątków gruźlicy [12]. Wykazano, iż białko Rv3425 *Mtb* ma właściwości immunogenne wzmocniające odpowiedź typu Th1/Th2. Wyrazem tego jest m.in. wzrost stężenia IFN- γ w hodowlach splenocytów i intensywne wytwarzanie IgG1 w organizmach myszy immunizowanych białkiem Rv3425. Obserwacje te w połączeniu z informacjami o immunodominującej roli tego białka stwarzają przesłanki by rozważyć Rv3425 jako dobrego kandydata do prac nad nowymi szczepionkami przeciwgruźliczymi [66].

Nowo opracowywana szczepionka, zwana rBCG30, zawiera rekombinowany szczep BCG charakteryzujący się nadekspresją mikolylotransferazy (MSP) [30,31,32,33], sekrecyjnego białka o masie 30 kDa, znanego także jako α -antygen lub Ag85B [7]. Białko to jest wydzielane zarówno do podłoża wzrostu, jak i wewnątrz makrofagów fagocytykujących prątki [30].

W badaniach efektywności konstruowanych szczepionek przeciwgruźliczych, zwierzęciem z wyboru jest świnka morska, wykazująca dużą wrażliwość na chorobotwórcze działanie *Mtb*. Dodatkowo reakcje immunologiczne i pewne procesy patologiczne rozwijane przez świnki morskie zakażane prątkami gruźlicy przypominają te obserwowane u ludzi. Niezwykle ważny jest sposób zakażenia zwierząt. U ludzi pierwotna gruźlica zazwyczaj jest gruźlicą

pluc. Dlatego w badaniach efektywności szczepionek przeciwgruźliczych zaleca się zakażenie zwierząt aerozolem. W celu określenia efektywności protekcyjnej skonstruowanej szczepionki rBCG30, świnkom morskim podawano śródskórnie rekombinanta rBCG30 lub szczepionkowe prątki BCG, a 10 tygodni później, zwierzęta zakażano aerozolem zawierającym wirulentne *Mtb*. Zaobserwowano, że zwierzęta immunizowane rekombinantem rBCG30 efektywniej usuwały prątki gruźlicy *Mtb* z organizmu, a ponadto przeżywały dłużej niż te, które były uodporniane prątkami BCG. Zwierzęta immunizowane nową szczepionką miały słabiej zaznaczone zmiany patologiczne w płucach, wątrobie i śledzionie w porównaniu ze zwierzętami, które otrzymały szczepionkę BCG. Szczepionka rBCG30 okazała się pierwszą szczepionką nowej generacji indukującą w modelu zwierzęcym bardziej efektywne mechanizmy protekcyjne w porównaniu z tradycyjnym preparatem BCG [30,33]. W 2008 r. opublikowano wyniki badań I fazy testów klinicznych szczepionki rBCG30 u ochotników. Wykazały one, że rBCG30 jest preparatem bezpiecznym i dobrze tolerowanym przez zaszczepione osoby. W hodowlach komórkowych, pobudzał on efektywnie namnażanie się swoistych limfocytów pomocniczych CD4⁺ i cytotoksycznych CD8⁺, a także wzbudzał intensywne wytwarzanie IFN- γ . W wymiarze klinicznym szczepionka ta wykazywała podobną aktywność immunologiczną do tej obserwowanej po użyciu standardowego preparatu BCG [28,57].

W celu podniesienia właściwości immunogennych prątków rBCG30 stworzono rekombinanta charakteryzującego się ekspresją ludzkiego IFN- γ (rBCG30/hIFN- γ). Świnki morskie immunizowane takim rekombinantem, a następnie zakażane *Mtb* szybciej eliminowały wprowadzane inhalacyjnie prątki *Mtb* niż świnki immunizowane prątkami BCG [34,49].

Bardzo ważną cechą szczepionek przeciwprątkowych powinna być możliwość ich stosowania u osób z obniżoną odpornością komórkową np. zakażonych wirusem HIV. Uwzględniając ten aspekt opracowano kolejną wersję szczepionki – rBCG(mtb)30, zawierającą mutanta rBCG30 z defektem syntezy mikobaktyny, która jest potrzebna prątkom do pozyskiwania żelaza. Dzięki temu mutant defektywny rBCG(mtb)30 miał utrudnioną replikację w makroorganizmie, ale użyty do immunizacji świnek morskich zapewnił im szybszą niż szczep BCG eliminację wirulentnych prątków *Mtb* i nasilił rozwój nadwrażliwości późnej (DTH – delayed hypersensitivity) na rekombinowane białko 30 kDa (rAg85B) [34,49].

Kolejnym przykładem rekombinowanej szczepionki przeciwprątkowej, która została dopuszczona do badań przedklinicznych jest szczepionka $\Delta ureChly^+$ rBCG. Wirulentne prątki *Mtb*, a w pewnym okresie czasu także atenuowane prątki BCG, przeżywają wewnątrz pęcherzyków endosomalnych (fagosomów) bakterii. Zatem ich antygeny są przetwarzane endosomalnie i pobudzają głównie limfocyty T pomocnicze CD4⁺. Autorzy szczepionki $\Delta ureChly^+$ rBCG podjęli próbę bardziej efektywnego zaangażowania limfocytów cytotoksycznych T CD8⁺ w odpowiedź przeciwprątkową. Prątki Calmette-Guérin zostały tak zmodyfikowane, by wykazywały ekspresję genu listeriolizyny (Hly) *Listeria monocytogenes*. Białko to wykazuje optimum aktywności w pH kwaśnym zbliżonym do 5,8, podczas gdy

początkowo kwaśne pH fagosomu zawierającego pochłonięte prątki ulega neutralizacji. Aby temu zapobiec szczepionki BCG zmodyfikowano dodatkowo poprzez delecję genu ureazy ($\Delta ureC$). Brak tego enzymu pozwala na utrzymanie kwaśnego środowiska fagosomu, tworząc w ten sposób optymalne środowisko dla właściwości cytolitycznych listeriolizyny. Niszczy ona błonę fagosomu, a uwolnione prątki przedostają się do cytosolu komórki makrofagowej, są przetwarzane do peptydów w proteasomach i pobudzają swoiste limfocyty cytotoksyczne CD8⁺ [22].

Skuteczność nowej szczepionki, sprawdzano u myszy podanych ekspozycji na aerozol zawierający 2 różne szczepy *Mycobacterium tuberculosis*, laboratoryjny szczep H37Rv i klinicznie izolowany szczep Beijing. Badania te dowiodły, że rekombinant BCG z ekspresją tylko listeriolizyny wywołuje odporność ochronną lepszą niż pierwotna szczepionka BCG. Wykazano także lepsze właściwości immunogenne szczepu rekombinowanego BCG z ekspresją listeriolizyny i inaktywowanym genem ureazy w porównaniu ze szczepem wyposażonym wyłącznie w listeriolizynę [22]. W przypadku prątków $\Delta ureC Hly^+$ rBCG dochodzi do pobudzenia swoistych limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ w sposób alternatywny z wykorzystaniem tzw. krzyżowego przetwarzania antygenów egzogennych w cytosolu komórek prezentujących antygen (komórek dendrytycznych i makrofagów) i łączenia ich z cząsteczkami MHC klasy I [22,49]. Szczepionka ta weszła w I fazę badań klinicznych w 2008 r. [39].

Odmianą strategię reprezentują szczepionki, których koncepcja opiera się na uzyskaniu rekombinowanych szczepów BCG wykazujących ekspresję nie białek prątkowych, lecz określonych białek makroorganizmu, o których wiadomo, iż odgrywają rolę w przebiegu zakażenia lub pełnią rolę immunoregulatorową. Przykładem takich rozwiązań jest szczep BCG z ekspresją IFN- γ lub BCG z ekspresją IL-18. Wstępne badania na zwierzętach wykazały, że rekombinanty takie wywołują silną odpowiedź limfocytów T na antygeny mikobakterii [10].

Preparaty typu „booster”: szczepionki pojednostkowe, z białkami fuzyjnymi, szczepionki genetyczne

Istotną rolę w badaniach odporności przeciwzakaźnej odgrywa identyfikacja determinant antygenowych bakterii, sprawdzenie ich roli podczas indukcji odpowiedzi immunologicznej, a następnie izolacja fragmentów rozpoznawanych przez limfocyty T i użycie ich do otrzymywania szczepionek. Preparaty zawierające jeden bądź więcej oczyszczonych lub częściowo oczyszczonych peptydów antygenowych rozpoznawanych przez komórki układu immunologicznego nazywane są szczepionkami pojednostkowymi [15,20]. Opracowywanie takich szczepionek jest wyrazem poszukiwań stabilnych i bardziej bezpiecznych preparatów, zwłaszcza dla osób z niedoborem odporności.

Pojęcie „genetyczne uodpornienie” pojawiło się kilkanaście lat temu i wiąże się z nową koncepcją rozwoju szczepionek przeciw czynnikom zakaźnym. Indukcja odpowiedzi immunologicznej następuje po podaniu szczepionki zawierającej wyłącznie materiał genetyczny, obejmującej sekwencje kodujące wybrane cząsteczki antygenowe.

W porównaniu do białkowych podjednostkowych szczepionek, oczyszczenie i produkcja szczepionek DNA jest często mniej kosztowna. Szczepionki DNA są również prostsze w opracowaniu i z tych powodów były wykorzystywane jako modele do badania immunogenności oraz ochronnego działania pojedynczych antygenów *Mycobacterium tuberculosis*. Szczepionki te u myszy wywoływały dobrą odpowiedź immunologiczną, wykorzystując szerszy repertuar antygenowy limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, w porównaniu ze szczepionkami podjednostkowymi. Ochrona powstająca po podaniu szczepionki DNA stanowiła 50–80% ochrony powstającej pod wpływem BCG, w tych samych warunkach eksperymentalnych. Jednoczesne użycie kilku szczepionek DNA lub immunizacja konstruktami niosącymi informację genetyczną dla dwu lub większej liczby antygenów, warunkowałyby zwiększenie działania ochronnego w stosunku do monowalentnej szczepionki DNA. Interesujące jest to, że szczepionki DNA mogą wywoływać działanie protekcyjne u myszy, które nie mają limfocytów CD4⁺. Dzięki temu szczepionki te mogłyby być wykorzystane u osób zarażonych wirusem HIV, które cechują się najwyższym ryzykiem rozwoju gruźlicy [13,20]. Istnieją przykłady nakazujące ostrożność w rozpatrywaniu zastosowania szczepionek DNA do ochrony przed gruźlicą. Szczepionki DNA mogą bowiem indukować odpowiedź immunologiczną prowadzącą do reakcji patologicznych w chwili naturalnego zakażenia drobnoustrojami wirulentnymi. Szczepionki DNA kodujące antygeny Hsp60 *M. leprae* oraz Ag85 *M. tuberculosis* wykazywały działanie ochronne u świnek morskich zakażanych dożylnie *M. tuberculosis*. Jednak szczepionki te u świnek morskich zakażanych aerozolem zawierającym prątki *Mtb* powodowały poważne zmiany nekrotyczne w płucach, których nie obserwowano u zwierząt kontrolnych [59].

Jedną z pierwszych szczepionek przeciwprątkowych bazujących na pojedynczym białku prątkowym jest szczepionka MVA85A, wykorzystująca wirus, jako nośnik antygenów *Mtb*. Użyty w niej wirus krowianki typu Ankara (MVA) już wcześniej sprawdził się doskonale w końcowej fazie kampanii szczepień przeciwko ospie właściwej, okazując się bardzo bezpieczną szczepionką. Wirus ten utracił m.in. zdolność replikacji w komórkach ludzkich [39,42]. Na potrzeby badań nad nowymi szczepionkami przeciwgruźliczymi, MVA został wyposażony w podjednostkę silnie immunogennego antygeny sekretoryjnego (Ag85A) *M. tuberculosis*.

MVA85A należy do szczepionek typu „booster”, do stosowania u osób dorosłych, które były immunizowane szczepionką BCG w wieku noworodkowym i szkolnym, u których doszło do osłabienia odporności poszczepiennej. Podawanie takim osobom dodatkowych dawek szczepionki BCG nie nasila odporności na gruźlicę. Szczepionki typu „booster” mogłyby również pobudzać mechanizmy odpornościowe skuteczniej zabezpieczające przed gruźlicą gdyby były podawane dzieciom niedługo po noworodkowym podaniu szczepionki BCG [42,47,49].

Wstępne badania skuteczności szczepionki MVA85A przeprowadzono u myszy, świnek morskich i naczelników [45,65]. Podczas tych testów analizowano trzy grupy osobników. Pierwsze immunizowano wyłącznie BCG, drugie zaszczepiono BCG, a następnie doszczepiono MVA85A,

natomiast ostatniej grupie nie podawano żadnych preparatów prątkowych. Następnie zwierzęta zainfekowano aerozolem zawierającym *Mtb*. Doświadczenie wykazało, że osobniki doszczepiane szczepionką MVA85A charakteryzowały się lepszą protekcją niż zwierzęta zaszczepione wyłącznie BCG [45]. Pierwsze próby kliniczne u ludzi z udziałem szczepionki MVA85A zostały podjęte w 2002 r. [43]. Przeprowadzono je u osób nieszczepionych BCG, z ujemnym testem tuberkulinowym. Badania wykazały bezpieczeństwo szczepionki oraz jej immunoreaktywność. Szczepionka indukowała wysoki poziom antygenowościsłych limfocytów T wytwarzających IFN- γ , co jest szczególnie istotne w świetle wiedzy o mechanizmach odporności przeciwprątkowej. Bowiem wydzielany przez pobudzone limfocyty T, głównie typu Th1, IFN- γ nasila aktywność prątkobójczą makrofagów, które tym samym przestają być niszą życiową prątków gruźlicy [44]. U osób szczepionych w przeszłości BCG, po podaniu szczepionki MVA85A, obserwowano 5–30-krotne nasilenie wytwarzania IFN- γ przez limfocyty T w stosunku do cytokiny wydzielanej przez komórki T osób immunizowanych tylko BCG [44]. Do kwietnia 2008 r. preparatem MVA85A258 zaszczepiono 258 zdrowych osób z terenów endemicznych gruźlicy w Afryce Południowej i Zachodniej, nie zaobserwowano żadnych poważnych objawów niepożądanych z tym związanych, ani u ochotników pozostających w rodzinnych kontaktach z chorymi na gruźlicę ani u osób spoza takiej grupy [11,23,42]. Wyniki najnowszych badań z lat 2006–2008 opublikowane w ub.r. [54] są potwierdzeniem wysoce immunogennych właściwości szczepionki MVA85A. Doprowadzała ona do silnej i długotrwałej odpowiedzi immunologicznej zarówno u dzieci, jak i u nastolatków nieszczepionych BCG, pochodzących z terenów endemicznych gruźlicy w Afryce Południowej. Indukowała liczne subpopulacje limfocytów T CD4⁺ wykazujących ekspresję IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-17, GM-CSF, przy czym subpopulacją dominującą były komórki CD4⁺ wykazujące koekspresję IFN- γ , TNF- α i IL-2. W grupie dzieci zidentyfikowano dodatkowo subpopulację limfocytów T CD4⁺, które oprócz tych trzech cytokin wykazywały ekspresję GM-CSF, a w grupie młodocianych powyższe trzy cytokiny i IL-17. W żadnej z badanych grup wiekowych nie stwierdzono natomiast limfocytów T CD8⁺-swoistych w stosunku do Ag85A, jakie wykrywano wcześniej u osób poddanych szczepieniu MVA85A, które w przeszłości otrzymywały standardową szczepionkę BCG [8,11,54]. Spośród dwóch typów limfocytów T CD4⁺ pamięci immunologicznej, centralnych o fenotypie CCR7⁺CD45RA⁻ i efektorowych charakteryzujących się brakiem obu markerów (CCR7⁻CD45RA⁻), u dzieci i młodocianych poddanych szczepieniu MVA85A, prawie po 2 miesiącach od podania szczepionki, wykrywano jedynie efektorowe komórki CCR7⁻CD45RA⁻ [54]. Kolejnych interesujących danych na temat skuteczności nowej szczepionki MVA85A powinny dostarczyć badania kliniczne fazy Iib [42].

Agger i wsp. wykorzystali do opracowania nowej szczepionki antygeny ESAT-6 i TB-10.4 obecne w regionie RD1 wirulentnych prątków *M. tuberculosis* i *M. bovis*, którego brakuje w atenuowanych prątkach *M. bovis* BCG, bowiem został utracony podczas atenuacji. W myśl koncepcji, iż utrata ta może być przyczyną niedostatecznej skuteczności szczepionki BCG, zaproponowano przygotowanie

preparatu zawierającego utracone antygeny, który mógłby być podawany łącznie z tradycyjną szczepionką BCG. Do zwiększenia efektywności nowego preparatu użyto również adiuwant nowej generacji – IC31. W jego składzie znalazło się białko kationowe KLKL(5)KLK oraz immunostymulatorowy oligodeoksynukleotyd ODN1, pełniący funkcję białka sygnałowego poprzez receptor TLR9. Skuteczność szczepionki Ag85B-ESAT-6 podawanej wraz z adiuwantem IC31 sprawdzono u zwierząt, u których obserwowano znaczące pobudzenie swoistych limfocytów T pomocniczych CD4⁺ i wydzielanie IFN- γ oraz IL-2 [3]. Szczepionka ta była dobrze tolerowana przez zdrowe osoby z wykluconym zakażeniem latentnym *M. tuberculosis* i ujemnym odczynem tuberkulinowym. Szczepionka tego typu mogłaby być w przyszłości stosowana u dzieci, niedługo po szczepieniu tradycyjną BCG („early boost”) lub u dorosłych, u których działanie protekcyjne tradycyjnej szczepionki uległo osłabieniu („late boost”) [1,49,57].

Przykładem szczepionki typu „booster” jest również preparat AERAS-402 bazujący na rekombinowanym adenowirusie 35, który utracił swe właściwości replikacyjne i który dzięki inżynierii genetycznej wykazuje ekspresję trzech białek *M. tuberculosis*: Ag85A, Ag85B i TB10.4 [40]. Ten rodzaj wirusa wybrany został z myślą o zastosowaniu, jako nośnik antygenów prątkowych, głównie w krajach Afryki Subsaharyjskiej, w których osoby zakażone wirusem HIV wytwarzają przeciwciała przeciwko adenowirusowi 5 i 35 [40]. Z kolei spośród trzech mikolylotransferaz (określanych jako Ag85A, 85B i 85C) wydzielanych przez *Mtb* na zewnątrz komórki, właśnie Ag85A oraz Ag85B okazują się najsilniejszymi antygenami, będącymi głównym celem limfocytów T w zakażeniach prątkowych. Białko TB10.4, wraz z TB10.3 i TB12.9, należy do podrodziny białek sekrecyjnych z grupy ESAT-6 i może być silnie rozpoznawane przez układ odpornościowy niż samo białko ESAT-6 [14]. Szczepionkę opartą na powyższych komponentach (AERAS-402) użyto do spotęgowania odpowiedzi immunologicznej wywołanej tradycyjną szczepionką BCG lub nowo zaprojektowaną szczepionką AFRO-1. Zawiera ona rekombinowany szczep BCG wykazujący ekspresję białek Ag85A, Ag85B i TB10.4, pochodzących od *M. tuberculosis*, a ponadto wykazuje ekspresję perfringolizyny (PfoA), której zadaniem jest ułatwienie ucieczki bakterii z pęcherzyków endosomalnych do cytosolu komórki. Badania przeprowadzone na makakach rezusach wykazały, iż schemat szczepień obejmujący pierwotną immunizację szczepionką AFRO-1 oraz dwie dawki szczepionki AERAS-402 okazał się bardziej efektywny niż ten z zastosowaniem standardowej szczepionki BCG. Efektywność ta wyrażała się m.in. bardziej intensywnym wytwarzaniem IFN- γ i silniejszą proliferacją limfocytów T CD8 $\alpha\alpha^+$ w odpowiedzi na antygen Ag85B. Jest to szczególnie istotne gdyż limfocyty o tym fenotypie stanowią populację limfocytów T biorących udział w formowaniu się antygenoswoistych limfocytów T pamięci immunologicznej, zarówno u zwierząt jak i u ludzi [40].

Ze względu na pojawiające się koncepcje zastosowania białka ESAT-6 do projektowania nowych narzędzi diagnostycznych i narzędzi monitorujących efektywność szczepień w zakażeniach gruźliczych, coraz większą uwagę przywiązuje się do białka TB10.4, jako tego, które z powodzeniem może zastępować białko ESAT-6 w nowo opracowywanych szczepionkach. Przykładem takiej strategii jest Hybrid 1

– szczepionka podjednostkowa oparta na białku fuzyjnym Ag85B-TB10.4. Mimo iż TB10.4 i ESAT-6 są kodowane przez geny tej samej rodziny, to w szczepie BCG ekspresji podlega tylko gen TB10.4, podczas gdy gen kodujący ESAT-6 uległ delecji w trakcie wieloletniej atenuacji. W badaniach u myszy wykazano, że immunizacja białkiem fuzyjnym Ag85B-TB10.4 (oczyszczony produkt pozyskiwany z hodowli rekombinowanego szczepu *E. coli*), w połączeniu z adiuwantem DDA/MPL, skutkowała rozwojem odpowiedzi protekcyjnej na poziomie porównywalnym z odpowiedzią wywołaną BCG. Ponadto okazało się, że fuzyja białka TB10.4 z Ag85B zwiększała immunogenność TB10.4 (w porównaniu do samego TB10.4), w przeciwieństwie do ESAT-6, który poddany fuzji z Ag85B wydaje się tracić swą immunodominującą rolę. Powyższe obserwacje sprawiają, że Hybrid 1 może się stać dobrym kandydatem na nową szczepionkę przeciwko gruźlicy [14].

Wśród białek mikobakteryjnych rozpatrywanych jako kandydaci do opracowania nowych szczepionek znalazły się również Pst-3, białko38kDa, czy białka szoku cieplnego 60, 65 i 70. Preparaty genetyczne (DNA) z ich udziałem, często w połączeniu z genami kodującymi Ag85B lub ESAT-6, były badane z wykorzystaniem modeli zwierzęcych. Niedawno opracowano szczepionkę zawierającą proteinę PPE44 należącą do rodziny białek rodziny PPE. Immunizacja myszy preparatem DNA zawierającym plazmid kodujący natywne lub rekombinowane białko PPE44 generowała ochronę przeciwzakaźną zbliżoną do uzyskiwanej po immunizacji BCG [56]. Obiektem zainteresowania są również białka mikobakterii, o których jeszcze stosunkowo niewiele wiadomo: MPT64 i MPT83. Białko MPT83 (Rv2873), chociaż wydzielane jest do środowiska wzrostu w niedużych ilościach, to charakteryzuje się wysoką immunogennością [25]. W oparciu o ten antygen opracowano dwa warianty szczepionki: MPT83-DNA i MPT83-RNA. Obie indukowały antygenoswoistą odpowiedź immunologiczną zarówno komórkową jak i humoralną, co wykazano na modelu zwierzęcym. Na podobnym poziomie kształtowało się wytwarzanie swoistych przeciwciał, IL-2 i IFN- γ . Szczepionka typu RNA wydaje się jeszcze bardziej bezpieczna od DNA ze względu na krótkotrwałą naturę ekspresji białek z nośnika RNA, jednak okres protekcji będący efektem takiego szczepienia jest mniej trwały [69]. Białko MPT64 (Rv1980c) *M. tuberculosis* ma również charakter sekrecyjny i podlega ekspresji wyłącznie w okresie aktywnych podziałów komórkowych [67]. Gen białka MPT64 znalazł się w dwuskładnikowej szczepionce DNA obejmującej dodatkowo gen kodujący Ag85B bądź MPT83. Pierwsze obserwacje u zwierząt wykazują, iż szczepionki takie mają wysoki potencjał indukowania mechanizmów protekcyjnych na poziomie porównywalnym bądź nawet przewyższającym ten indukowany przez BCG [61,62]. Co ciekawe, białko MPT64 jest również w III fazie badań klinicznych mających na celu określenie jego przydatności w detekcji aktywnej gruźlicy, jako czynnika mogącego zastąpić tuberkulinę [67].

PODSUMOWANIE

Potrzeba opracowania nowej szczepionki skutecznie indukującej mechanizmy protekcyjne przeciwko *Mycobacterium tuberculosis* wydaje się oczywista. Masowe szczepienia w skali światowej, mimo iż prowadzone od niemalże wieku,

nie przyniosły spodziewanych efektów w postaci zminimalizowania liczby zachorowań na gruźlicę w wymiarze globalnym. Przyczyn tego stanu rzeczy należy poszukiwać w wielu płaszczyznach, społeczno-ekonomicznych, specyfice samego drobnoustroju, a może przede wszystkim w ograniczonej efektywności protekcyjnej tradycyjnej szczepionki BCG. Obecność szczepów MDR-TB i XDR-TB stanowi dodatkowy bodziec do poszukiwań efektywniejszych rozwiązań immunizacyjnych.

Rozwiązania te można przedstawić w postaci dwóch nurtów: pierwszy – dążący do opracowania szczepionki mającej zastąpić dotychczas stosowaną i drugi – mający na celu uzupełnienie i spotęgowanie efektywności szczepionki BCG.

W pierwszy nurt poszukiwawczy wpisują się szczepionki bazujące na żywych, atenuowanych szczepach *M. tuberculosis* bądź rekombinantach tradycyjnego szczepu *M. bovis* BCG, wykazujących pożądane cechy, w tym ekspresję określonych antygenów *Mtb* lub białek gospodarza. Opracowując szczepionki bazujące na atenuowanych szczepach *Mtb* należy jednak pamiętać o możliwości rewersji otrzymanych mutantów do postaci w pełni zjadliwej. Stąd też proponuje się by takie drobnoustroje zawierały

przynajmniej dwie mutacje, jedną dotyczącą ważnych szlaków metabolicznych i drugą dotyczącą ich właściwości immunogennych [13,52].

Idea drugiego nurtu zasadza się na koncepcji preparatów typu „booster”, które służyć mają nie tyle zastąpieniu szczepienia BCG, co zintensyfikowaniu i uzupełnieniu protekcyjnego działania szczepionki o korzeniach z początku ubiegłego stulecia. Koncepcja ta obfituje wielością proponowanych rozwiązań i kombinacji starannie wyselekcjonowanych białek w postaci szczepionek podjednostkowych, białek fuzyjnych oraz tzw. szczepionek genetycznych bazujących głównie na DNA, ale również i na RNA. Preparaty tego typu zdają się przynosić wielowymiarowe korzyści, nie tylko z punktu widzenia bezpieczeństwa ich stosowania, ale również precyzji mechanizmów protekcyjnych skierowanych przeciwko ściśle wybranym antygenom.

Mnogość proponowanych rozwiązań pozwala patrzeć w przyszłość z ostrożnym optymizmem (część szczepionek przeszła już pierwsze fazy testów klinicznych u ludzi), a także z wiarą, że wiek XXI przyniesie skuteczne narzędzie w walce z globalnym problemem, jakim gruźlica niestety nadal pozostaje.

PIŚMIENICTWO

- [1] Aagaard C., Dietrich J., Doherty M., Andersen P.: TB vaccines: current status and future perspectives. *Immunol. Cell Biol.*, 2009; 87: 279–286
- [2] Abu-Raddad L.J., Sabatelli L., Achterberg J.T., Sugimoto J.D., Longini I.M.Jr., Dye C., Halloran M.E.: Epidemiological benefits of more-effective tuberculosis vaccines, drugs, and diagnostics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 13980–13985
- [3] Agger E.M., Rosenkrands I., Olsen A.W., Hatch G., Williams A., Kritsch C., Lingnau K., von Gabain A., Andersen C.S., Korsholm K.S., Andersen P.: Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31. *Vaccine*, 2006; 24: 5452–5460
- [4] Aguilar D., Infante E., Martin C., Gormley E., Gicquel B., Hernandez Pando R.: Immunological responses and protective immunity against tuberculosis conferred by vaccination of Balb/C mice with the attenuated *Mycobacterium tuberculosis* (*phoP*) SO2 strain. *Clin. Exp. Immunol.*, 2006; 147: 330–338
- [5] Alves-Dunkerson J., Dunkerson D.: Tuberculosis. <http://www.dentallearning.org/course/fde0014/course.htm> (09.10.2010)
- [6] Barreto M.L., Pereira S.M., Ferreira A.A.: BCG vaccine: efficacy and indications for vaccination and revaccination. *J. Pediatr.*, 2006; 82: S45–S54
- [7] Belisle J.T., Vissa V.D., Sievert T., Takayama K., Brennan P.J., Besra G.S.: Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science*, 1997; 276: 1420–1422
- [8] Beveridge N.E., Fletcher H.A., Hughes J., Pathan A.A., Scriba T.J., Minassian A., Sander C.R., Whelan K.T., Dockrell H.M., Hill A.V., Hanekom W.A., McShane H.: A comparison of IFN γ detection methods used in tuberculosis vaccine trials. *Tuberculosis*, 2008; 88: 631–640
- [9] Brennan M.J.: The tuberculosis vaccine challenge. *Tuberculosis*, 2005; 85: 7–12
- [10] Britton W.J., Palendira U.: Improving vaccines against tuberculosis. *Immunol. Cell Biol.*, 2003; 81: 34–45
- [11] Brookes R.H., Hill P.C., Owiafe P.K., Ibanga H.B., Jeffries D.J., Donkor S.A., Fletcher H.A., Hammond A.S., Lienhardt C., Adegbola R.A., McShane H., Hill A.V.: Safety and immunogenicity of the candidate tuberculosis vaccine MVA85A in West Africa. *PLoS*, 2008; 3: e2921
- [12] Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E. III, Tekaiia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S., Barrell B.G.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 1998; 393: 537–544
- [13] Delogu G., Fadda G.: The quest for a new vaccine against tuberculosis. *J. Infect. Dev. Ctries*, 2009; 3: 5–15
- [14] Dietrich J., Aagaard C., Leah R., Olsen A.W., Stryhn A., Doherty T.M., Andersen P.: Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. *J. Immunol.*, 2005; 174: 6332–6339
- [15] Dietrich J., Doherty T.M.: Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with the host: consequences for vaccine development. *APMIS*, 2009; 117: 440–457
- [16] Flynn J.L., Chan J.: Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Curr. Opin. Immunol.*, 2003; 15: 450–455
- [17] Flynn J.L., Chan J.: Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001; 19: 93–129
- [18] Fol M.: *Mycobacterium tuberculosis* – jak przetrwać na wrogim terenie? Postępy Mikrobiol., 2008; 47: 387–392
- [19] Frieden T.R., Sterling T., Munsiff S.S., Watt C.J., Dye C.: Tuberculosis. *Lancet*, 2003; 362: 887–899
- [20] Gaciąg Z.: Szczepionki. W: *Immunologia*. Red.: M. Jakóbsiak. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998, 419–434
- [21] Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. WHO report 2009. WHO, Geneva, 2009; http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ (30.01.2011)
- [22] Grode L., Seiler P., Baumann S., Hess J., Brinkmann V., Eddine A.N., Mann P., Goosmann C., Bandermann S., Smith D., Bancroft G.J., Reytrat J., van Soolingen D., Raupach B., Kaufmann S.H.: Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. *J. Clin. Invest.*, 2005; 115: 2472–2479
- [23] Hawkrigde T., Scriba T.J., Gelderbloem S., Smit E., Tameris M., Moyo S., Lang T., Veldsman A., Hatherill M., Merwe L., Fletcher H.A., Mahomed H., Hill A.V., Hanekom W.A., Hussey G.D., McShane H.: Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy adults in South Africa. *J. Infect. Dis.*, 2008; 198: 544–552
- [24] Hewinson R.G.: TB vaccines for the World. *Tuberculosis*, 2005; 85: 1–6
- [25] Hewinson R.G., Michell S.L., Russell W.P., McAdam R.A., Jacobs Jr. W.R.: Molecular characterization of MPT83: a seroreactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPT70. *Scand. J. Immunol.*, 1996; 43: 490–499

- [26] Hinchey J., Lee S., Jeon B.Y., Basaraba R.J., Venkataswamy M.M., Chen B., Chan J., Braunstein M., Orme I.M., Derrick S.C., Morris S.L., Jacobs W.R.Jr., Porcelli S.A.: Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Invest., 2007; 117: 2279–2288
- [27] Hoft D.: Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. Lancet, 2008; 372: 164–175
- [28] Hoft D.F., Blazevic A., Abate G., Hanekom W.A., Kaplan G., Soler J.H., Weichold F., Geiter L., Sadoff J.C., Horwitz M.A.: A new recombinant bacilli Calmette-Guérin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers. J. Infect. Dis., 2008; 198: 1491–1501
- [29] Hondalus M.K., Bardarov S., Russell R., Chan J., Jacobs W.R.Jr., Bloom B.R.: Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun., 2000; 68: 2888–2898
- [30] Horwitz M.A., Harth G.: A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis. Infect. Immun., 2003; 71: 1672–1679
- [31] Horwitz M.A., Harth G., Dillon B.J., Masleša-Galić S.: A novel live recombinant mycobacterial vaccine against bovine tuberculosis more potent than BCG. Vaccine, 2006; 24: 1593–1600
- [32] Horwitz M.A., Harth G., Dillon B.J., Masleša-Galić S.: Extraordinarily few organisms of a live recombinant BCG vaccine against tuberculosis induce maximal cell-mediated and protective immunity. Vaccine, 2006; 24: 443–451
- [33] Horwitz M.A., Harth G., Dillon B.J., Masleša-Galić S.: Recombinant bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000; 97: 13853–13858
- [34] Horwitz M.A., Harth G., Tullius M.V., Dillon B.J., Masleša-Galić S.: New more potent and safer recombinant BCG vaccines against tuberculosis. W: Tuberculosis: From Lab Research to Field Trials. Kaufmann S.H.E., Smith I., Nathan C.F., Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. March 20–25, 2007, Vancouver, Canada, p. 60
- [35] Jackson M., Raynaud C., Laneelle M.A., Guilhot C., Laurent-Winter C., Ensergueix D., Gicquel B., Daffe M.: Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *M. tuberculosis* cell envelope. Mol. Microbiol., 1999; 31: 1573–1587
- [36] Janaszek W., Szczuka I.: Szczepionka przeciw gruźlicy – BCG. W: Szczepionki i immunoglobuliny. Red.: W. Magdzik. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1999, 13–23
- [37] Jean Antoine Villemin. Br. Med. J., 1892; 2(1663): 1091
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2421387/> (09.10.2010)
- [38] Lin P.L., Flynn J.L.: Understanding latent tuberculosis: a moving target. J. Immunol., 2010; 185: 15–22
- [39] Liu J.: New vaccine against tuberculosis: current developments and future challenges. Sci. Found. China, 2009; 17: 50–58
- [40] Magalhaes I., Sizemore D.R., Ahmed R.K., Mueller S., Wehlin L., Scanga C., Weichold F., Schirru G., Pau M.G., Goudsmit J., Kuhlmann-Berenzon S., Spangberg M., Andersson J., Gaines H., Thorstensson R., Skeiky Y.A., Sadoff J., Maeurer M.: rBCG induces strong antigen-specific T cell responses in rhesus macaques in a prime-boost setting with an adenovirus 35 tuberculosis vaccine vector. PLoS, 2008; 3: e3790
- [41] Martin C., Williams A., Hernandez-Pando R., Cardona P.J., Gormley E., Bordat Y., Soto C.Y., Clark S.O., Hatch G.J., Aguilar D., Ausina V., Gicquel B.: The live *Mycobacterium tuberculosis* phoP mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. Vaccine, 2006; 24: 3408–3419
- [42] McShane H.: Vaccine strategies against tuberculosis. Swiss Med. Wkly., 2009; 139: 156–160
- [43] McShane H., Pathan A.A., Sander C.R., Goonetilleke N.P., Fletcher H.A., Hill A.V.: Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials. Tuberculosis, 2005; 85: 47–52
- [44] McShane H., Pathan A.A., Sander C.R., Keating S.M., Gilbert S.C., Huygen K., Fletcher H.A., Hill A.V.: Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85B boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. Nat. Med., 2004; 10: 1240–1244
- [45] McShane H., Pathan A., Sander C., Whelan K., Beveridge N., Minassian A., Fletcher H., Price D., Ota M., Hawkrigde T., Adegbola R., Hanekom W., Roederer M., Hussey G., Hill A.: Boosting BCG with MVA85A – Results from clinical trials. W: Tuberculosis: From Lab Research to Field Trials. Kaufmann S.H.E., Smith I., Nathan C.F., Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. March 20–25, 2007, Vancouver, Canada, p. 61
- [46] National Cancer Institute Drug Dictionary <http://www.cancer.gov/drugdictionary/?CdrID=571076> (10.10.2010)
- [47] Pathan A.A., Sander C.R., Fletcher H.A., Poulton I., Alder N.C., Beveridge N.E., Whelan K.T., Hill A.V., McShane H.: Boosting BCG with recombinant modified vaccinia Ankara expressing antigen 85A: different boosting intervals and implications for efficacy trials. PLoS, 2007; 2: e1052
- [48] Pavelka M.S.Jr., Chen B., Kelley C.L., Collins F.M., Jacobs J.W. Jr.: Vaccine efficacy of a lysine auxotroph of *M. tuberculosis*. Infect. Immun., 2003; 71: 4190–4192
- [49] Rudnicka W., Rudnicka K.: 60 lat szczepień BCG. Osiągnięcia, przebrane i nadzieje – nowe szczepionki przeciwgruźlicze w programach klinicznych. Postępy Mikrobiol., 2008; 47: 379–385
- [50] Rudnicka W., Szpakowski P., Włodarczyk M., Kowalewicz-Kulbat M., Druszczyńska M., Fol M.: Genetyczne i cytokinowe wyznaczniki odpowiedzi na szczepionkę BCG u studentów Uniwersytetu Łódzkiego. Nowa Medycyna, 2009; 2: 90–94
- [51] Salyers A.A., Whitt D.D.: Gruźlica powrót dawnego wroga. W: Mikrobiologia. Różnorodność, chorobotwórczość i środowisko. Red.: Z. Markiewicz. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003; 336–340
- [52] Sambandamurthy V.K., Derrick S.C., Jalapathy K.V., Chen B., Russell R.G., Morris S.L., Jacobs W.R. Jr.: Long-term protection against tuberculosis following vaccination with a severely attenuated double lysine and pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun., 2005; 73: 1196–1203
- [53] Sambandamurthy V.K., Wang X., Chen B., Russell R.G., Derrick S., Collins F.M., Morris S.L., Jacobs W.R.Jr.: A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. Nat. Med., 2002; 8: 1171–1174
- [54] Scriba T.J., Tameris M., Mansoor N., Smit E., van der Merwe L., Isaacs F., Keyser A., Moyo S., Brittain N., Lawrie A., Gelderbloem S., Veldsman A., Hatherill M., Hawkrigde A., Hill A.V., Hussey G.D., Mahomed H., McShane H., Hanekom W.A.: Modified vaccinia Ankara-expressing Ag85A, a novel tuberculosis vaccine, is safe in adolescents and children, and induces polyfunctional CD41 T cells. Eur. J. Immunol., 2010; 40: 279–290
- [55] Singh I.G., Mukherjee R., Talwar G.P., Kaufmann S.H.: *In vitro* characterization of T cells from *Mycobacterium w*-vaccinated mice. Infect. Immun., 1992; 60: 257–263
- [56] Singhal N., Bisht D., Joshi B.: Immunoprophylaxis of tuberculosis: an update of emerging trends. Arch. Immunol. Ther. Exp., 2010; 58: 97–106
- [57] Skeiky Y.A., Sadoff J.C.: Advances in tuberculosis vaccine strategies. Nat. Rev. Microbiol., 2006; 4: 469–476
- [58] Smith D.A., Parish T., Stoker N.G., Bancroft G.J.: Characterization of auxotrophic mutants of *M. tuberculosis* and their potential as vaccine candidates. Infect. Immun., 2001; 69: 1142–1150
- [59] Taylor J.L., Turner O.C., Basaraba R.J., Belisle J.T., Huygen K., Orme I.M.: Pulmonary necrosis resulting from DNA vaccination against tuberculosis. Infect. Immun., 2003; 71: 2192–2198
- [60] Teo S.S., Shingadia D.: BCG vaccine. W: Hot topics in infection and immunity in children II. Adv. Exp. Med. Biol., 2005; 568: 117–134
- [61] Tian X., Cai H., Zhu Y.X.: Protection of mice with a divalent tuberculosis DNA vaccine encoding antigens Ag85B and MPT64. Acta Biochim. Biophys. Sin., 2004; 36: 269–276
- [62] Tian X., Cai H., Zhu Y.X.: Immunogenicity and protection of divalent DNA vaccine encoding antigens MPT83 and MPT64 of *Mycobacterium tuberculosis*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2005; 85: 1410–1413
- [63] Tuberculosis prevention trial. Trial of BCG vaccines in south India for tuberculosis prevention: first report. Bulletin WHO, 1979; 57: 819–827
- [64] Tullius M.V., Harth G., Horwitz M.A.: Glutamine synthetase GlnA1 is essential for growth of *M. tuberculosis* in human THP-1 macrophages and guinea pigs. Infect. Immun., 2003; 71: 3927–3936
- [65] Verreck F.A., Vervenne R.A., Kondova I., van Kralingen K.W., Remarque E.J., Braskamp G., van der Werff N.M., Kersbergen A., Ottenhoff T.H., Heidt P.J., Gilbert S.C., Gicquel B., Hill A.V., Martin C., McShane H., Thomas A.W.: MVA85A boosting of BCG and an attenuated, phoP deficient *M. tuberculosis* vaccine both show protective efficacy against tuberculosis in rhesus macaques. PLoS, 2009; 4: e5264

- [66] Wang J., Qie Y., Zhang H., Zhu B., Xu Y., Liu W., Chen J., Wang H.: PPE protein (Rv3425) from DNA segment RD11 of *Mycobacterium tuberculosis*: a novel immunodominant antigen of *Mycobacterium tuberculosis* induces humoral and cellular immune responses in mice. *Microbiol. Immunol.*, 2008; 52: 224–230
- [67] Wang Z., Potter B.M., Gray A.M., Sacksteder K.A., Geisbrecht B.V., Laity J.H.: The solution structure of antigen MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* defines a new family of beta-grasp proteins. *J. Mol. Biol.*, 2007; 366: 375–381
- [68] Williams A., Hatch G.J., Clark S.O., Gooch K.E., Hatch K.A., Hall G.A., Huygen K., Ottenhoff T.H., Franken K.L., Andersen P., Doherty T.M., Kaufmann S.H., Grode L., Seiler P., Martin C., Gicquel B., Cole S.T., Brodin P., Pym A.S., Dalemans W., Cohen J., Lobet Y., Goonetilleke N., McShane H., Hill A., Parish T., Smith D., Stoker N.G., Lowrie D.B., Källenius G., Svenson S., Pawlowski A., Blake K., Marsh P.D.: Evaluation of vaccines in the EU TB Vaccine Cluster using a guinea pig aerosol infection model of tuberculosis. *Tuberculosis*, 2005; 85: 29–38
- [69] Xue T., Stavropoulos E., Yang M., Ragno S., Vordermeier M., Chambers M., Hewinson G., Lowrie D.B., Colston M.J., Tascon R.E.: RNA encoding the MPT83 antigen induces protective immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect. Immun.*, 2004; 72: 6324–6329

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.