

Received: 2014.01.28
Accepted: 2014.05.15
Published: 2014.06.09

Postępy w dziedzinie opracowania nowych szczepionek przeciw gruźlicy. 100 lat po wprowadzeniu BCG

Advances in the development of new vaccines against
tuberculosis. 100 years after the introduction of BCG

Katarzyna Krysztopa-Grzybowska, Anna Lutyńska

Zakład Badania Surowic i Szczepionek, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

Streszczenie

Szczepionka BCG od prawie 100 lat zabezpiecza dzieci przed najcięższymi postaciami gruźlicy, jednak jej skuteczność w zapobieganiu gruźlicy płuc u osób dorosłych jest bardzo zróżnicowana. Przeciwwskazaniami do stosowania BCG wynikającymi z zastosowania żywych atenuowanych prątków *M. bovis* jest zakażenie wirusem HIV oraz inne stany immunosupresji. Gruźlica nadal jest dużym problemem z trzech głównych powodów: słabej diagnostyki w krajach rozwijających się, długotrwałego leczenia lub przerwania leczenia powodującego pojawianie się lekoopornych prątków oraz zbyt małej skuteczności szczepionki wobec najbardziej rozpowszechnionej i ulegającej szybkiej transmisji gruźlicy płuc dorosłych. Opracowanie skuteczniejszej szczepionki przeciw gruźlicy niewątpliwie nadal jest priorytetem zdrowia publicznego. Eliminacja gruźlicy jako światowego problemu zdrowia publicznego do 2050 r. jest szczególnie ambitnym celem, którego osiągnięcie może zapewnić jedynie opracowanie oraz zastosowanie nowych środków interwencyjnych i nowoczesnych szczepionek. Obecnie 14 nowo opracowanych preparatów znajduje się w fazie badań klinicznych. Wśród nich znajdują się szczepionki profilaktyczne, które docelowo mają zastąpić BCG lub wzmocnić działanie BCG jako dawka przypominająca oraz szczepionki terapeutyczne, skracające czas leczenia przeciwgruźliczego. Celem pracy jest przedstawienie przełomowych badań nad nowymi szczepionkami przeciw gruźlicy, ich skuteczności, immunogenności oraz potencjalnego zastosowania w przyszłości.

Słowa kluczowe: szczepionka przeciw gruźlicy • BCG

Summary

The BCG vaccine used in the world for nearly 100 years protects children against the most severe forms of tuberculosis, but its effectiveness in preventing the most commonly occurring tuberculosis and the one burdened with the highest risk of transmission in adults is very diverse. Contraindications for BCG vaccination include HIV infection and other conditions of immunosuppression. Tuberculosis is a global problem difficult to control because of three main reasons: poor diagnostics in developing countries, long-term therapy or discontinuation of treatment resulting in the emergence of drug-resistant mycobacteria, and the availability of a TB vaccine which only protects children from the most severe forms of tuberculosis. BCG has little to no efficacy in preventing the most common adult pulmonary TB. The devel-

	opment of a more effective vaccine against tuberculosis is undoubtedly still a public health priority in order to improve control of the disease throughout the world. Elimination of TB as a global public health goal by 2050 is particularly ambitious and its achievement depends on the development and application of new intervention measures and newly designed vaccines. Currently, 14 newly developed products are undergoing clinical trials. These include a prophylactic vaccine capable of replacing the current BCG, booster vaccines to increase the effects of BCG, and therapeutic vaccines. The aim of the study is to present the current state of knowledge on cutting-edge research into new vaccines against tuberculosis, their efficacy, immunogenicity and potential use in the future.
Key words:	TB vaccine • BCG
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1108381
Word count:	3871
Tables:	–
Figures:	1
References:	42

Adres autorki: dr hab. Anna Lutyńska, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Zakład Badania Surowic i Szczepionek, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; e-mail: alutynska@pzh.gov.pl

WSTĘP

Mycobacterium tuberculosis (MTB) – etiologiczny czynnik gruźlicy, zwanej białą plagą, odkryty przez R. Kocha w 1882 r., w porównaniu do innych bakterii chorobotwórczych człowieka jest odpowiedzialny za największą liczbą zgonów [21]. Szacuje się, że na całym świecie gruźlicą zakażonych jest prawie 2 mld ludzi. Większość przypadków gruźlicy pozostaje niewykryta, ponieważ z 50 mln nowych zakażeń rocznie jest rozpoznawanych jedynie 9 mln [10]. Zachorowania na gruźlicę dotyczą przede wszystkim ludzi w wieku produkcyjnym, z których prawie 1,7 miliona umiera, w tym aż 98% w krajach rozwijających się. Sytuację obrazują dane szacunkowe wskazujące, że w każdej minucie każdego dnia na świecie u prawie 20 osób dochodzi do rozwoju gruźlicy oraz 4 zgonów w wyniku jej przebiegu [15]. Gruźlica od wieków pozostaje jedną z głównych przyczyn zachorowalności i umieralności ludzi na świecie, stanowiąc priorytetowe wyzwanie zdrowia publicznego. Poprawa rejestracji zachorowań na gruźlicę wydaje się także nadal złudna, gdyż przyrost populacji na świecie jest znacznie szybszy niż częstość jej wykrywania. Analizy liczb bezwzględnych potwierdzają, że zachorowalność na gruźlicę w ciągu ostatniej dekady nie uległa poprawie. Gruźlica występuje nadal powszechnie w większości rozwijających się krajów (np. zapadalność 340 przypadków na 100 000 mieszkańców Afryki Subsaharyjskiej). Uważano, że w krajach rozwiniętych kontrola gruźlicy jest zadowalająca, jednak raport Kaufmanna bezsprzecznie potwierdza pogorszenie wskaźników zapadalności na gruźlicę w 2009 r. w porównaniu z 1998 r. [15]. Pozostaje to niewątpliwie w związku z jej rozwojem u około jednej trzeciej osób zakażonych HIV. Nieskuteczność strategii walki z gruźlicą

została powiązana z rosnącym występowaniem szczepów MTB wielolekoopornych (multidrug-resistant – MDR, 440 tys. przypadków w 2008 r.), wielolekoopornych o rozszerzonej oporności (extensively drug-resistant – XDR, 963 przypadki w 2008 r.), a ostatnio także całkowicie lekoopornych (totally drug-resistant – TDR) [21,41]. W Polsce po raz pierwszy od wprowadzenia powszechnych szczepień BCG wzrost zapadalności na gruźlicę zaobserwowano w 2011 r. [13]. Wydaje się, że wytyczony przez WHO cel wyeliminowania gruźlicy jako zagrożenia zdrowia do 2050 r., nawet przy większym nakładzie środków finansowych na usprawnienie jej kontroli, nie będzie możliwy bez wprowadzenia do powszechnego programu szczepień szczepionki nowej generacji [38].

SZCZEPIONKA BCG

Szczepionka BCG (Bacille Calmette-Guérin) stosowana od prawie 100 lat jest jedyną dostępną szczepionką przeciw gruźlicy włączoną od 1974 r. do Światowego Rozszerzonego Programu Szczepień (EPI - Expanded Program on Immunization) [21]. Wszystkie stosowane na świecie do jej wytwarzania podszcypy BCG pochodzą od pojedynczego, wyizolowanego od zakażonej krwi dzikiego szczepu *Mycobacterium bovis*. W Instytucie Pasteura w Lille, na przestrzeni 13 lat, Albert Calmette i Camille Guérin poddali wirulentny szczep *M. bovis* 230 pasażom, co doprowadziło do jego atenuacji potwierdzonej w testach na różnych gatunkach zwierząt [26]. Tak przygotowaną szczepionkę BCG po raz pierwszy podano człowiekowi w 1921 r. Dokładne odtworzenie mechanizmów, w wyniku których doszło do atenuacji rodziciel-

skiego *M. bovis* jest obecnie niemożliwe, gdyż oryginalny szczep został utracony podczas I Wojny Światowej. Niemniej jednak analizy z zastosowaniem szczepów pochodnych, które zostały zdeponowane w różnych laboratoriach na świecie potwierdziły, że podstawową mutacją odpowiedzialną za utratę zjadliwości szczepu dzikiego jest delecja w regionie RD1 (region of difference) [30]. Mimo iż wszystkie stosowane obecnie podszcypy BCG pochodzą od pojedynczego rodzicielskiego izolatu *M. bovis*, odmienne warunki hodowli w różnych laboratoriach na świecie doprowadziły do powstania genetycznych różnic między szczepami. Pierwsze wyodrębnione podszcypy siostrzane to tzw. podszcypy wczesne, m.in. Russia (1924 r.), Moreau (1925 r.), Japan (1925 r.) i Sweden (1926 r.). Do podszcypów późnych zaliczane są m.in. Tice (1934 r.), Frappier (1937 r.), Birkhaug (1946 r.), Glaxo (1954 r.) i Pasteur (1961 r.) [2]. Obecnie aż 90% szczepionek BCG jest wytwarzanych z użyciem podszcypów Pasteur 1173 P2, Danish 1331, Glaxo 1077 i Tokyo 172. Niepożądane odczyny poszczepienne (NOP) po BCG są niezwykle rzadkie, w tym poważne miejscowe reakcje, tj. owrzodzenie lub zapalenie węzłów chłonnych występują z częstotnością mniejszą niż 1/1 000, a rozsiane zakażenia szczepionkowym szczepem BCG (prosówka) – mniejszą niż 2/1 000 000 wśród osób zaszczepionych i dotyczą przede wszystkim pacjentów z immunosupresją [25]. Obliczono, że na świecie podano ponad 4 miliardy dawek szczepionki BCG, tym samym potwierdzając jej bezpieczeństwo i efektywność. Rocznie na świecie jest dziś podawanych około 100 mln dawek szczepionki przeciw gruźlicy, jednak mimo jej powszechnego stosowania szczepionka BCG nie jest doskonała. Skuteczność ochronna BCG w zapobieganiu ciężkim postaciom choroby (zapalenie opon mózgowych, gruźlica prosówkowa) wynosi średnio 86% u dzieci, ale jest niewielka w zapobieganiu najbardziej rozpowszechnionej postaci – gruźlicy płuc u dorosłych. Przeciwwskazania do szczepień BCG dotyczą osób, które są nosicielami wirusa HIV lub cierpią na inne zaburzenia odporności [15,40]. Skuteczność szczepionki BCG oszacowana w wielu badaniach klinicznych i obserwacyjnych jest zróżnicowana i waha się 0-90%. Największą efektywność szczepień BCG obserwowano w Ameryce Północnej oraz północnej Europie, a najniższą w regionach tropikalnych [25]. Na różną efektywność szczepień może mieć wpływ nie tylko występowanie mikroorganizmów środowiskowych, w tym prątków niegruźliczych (NTM non-tuberculous mycobacteria), zdolnych do modyfikacji indukowanej szczepieniem BCG odpowiedzi ochronnej organizmu, ale także m.in. różnice genetyczne stosowanych podszcypów BCG. Różna zjadliwość prątków, faza rozwojowa choroby, zakłócające odpowiedź poszczepienną przewlekłe zakażenia pasożytnicze jelit, różne metody i schematy immunizacji, odmienne stężenia witaminy D i żelaza osób szczepionych oraz predyspozycje genetyczne mogą również wpływać na skuteczność szczepień [21,25,29]. Profil bezpieczeństwa szczepionki BCG i jej duża skuteczność zapobiegania najcięższym postaciom gruźlicy u dzieci uzasadniają jej stosowanie i wykonywanie analiz wpływu m.in. liczby dawek, drogi podania szczepionki, wieku szczepionych

oraz suplementacji diety na jej efektywność [25]. Jednak zróżnicowana i nie do końca wyjaśniona zmienność skuteczności BCG w zapobieganiu zachorowaniom na gruźlicę płuc wpływa na prowadzenie nasilonych badań nad opracowaniem szczepionki o lepszych właściwościach ochronnych.

ZAKAŻENIE TB

Prątki gruźlicy są wydalane z powietrzem podczas oddychania, mówienia, kaszlu oraz kichania osoby z czynną gruźlicą, zakażając następne osoby drogą inhalacyjną [21,35]. Wdychane bakterie, docierając do pęcherzyków płucnych, są wychwytywane m.in. przez makrofagi pęcherzykowe i śródmiąższowe, komórki dendrytyczne (DC), a prawdopodobnie także komórki nabłonkowe [21]. MTB są pochłaniane przez wiele komórek z wykorzystaniem zarówno drogi zależnej, jak i niezależnej od opsonin. O rozwoju infekcji lub o wyeliminowaniu patogenu decyduje pierwsza faza zakażenia. Jej przebieg warunkuje sprawność mechanizmów odporności wrodzonej, głównie aktywności makrofagów, ale także wirulencja samych prątków [35]. Komórki fagocytarne (komórki dendrytyczne i makrofagi) dzięki licznym receptorom rozpoznającym wzorce molekularne drobnoustrojów i w obecności odpowiednich ligandów, ulegają aktywacji niszcząc drobnoustroje w fagolizosomach [15,16,35]. Eliminacja MTB z organizmu jest również uzależniona od apoptozy komórek [35], przy czym makrofagi zakażone prątkami ulegają apoptozie równie często jak nekrozie [11,35]. Rozwój apoptozy lub nekrozy jest uzależniony od stężenia cytokin i wirulencji prątków. Im wyższy stosunek TNF- α do IL-10 i mniejsza zjadliwość MTB tym częściej jest indukowana apoptoza. Indukcja programowanej śmierci zakażonych makrofagów jest uważana za jeden z najważniejszych przeciwprątkowych mechanizmów obronnych [11,23,32,35]. Nabyta odporność komórkowa rozwija się dopiero po 6-8 tygodniach od wniknięcia prątków do organizmu. Antygeny MTB są prezentowane przez cząsteczki MHC klasy II i I, prowadząc do stymulacji odpowiednio komórek T CD4⁺ i CD8⁺. Limfocyty T CD4⁺ różnicują się w różne typy limfocytów pomocniczych Th, głównie w komórki Th1 wytwarzające IL-2, IFN- γ i TNF- α , oraz komórki Th17, które aktywują wielojądrowe granulocyty (PNG), przyczyniając się do stosunkowo wczesnego powstawania odporności [21,35]. Limfocyty Th1 hamują rozwój limfocytów Th2, które wytwarzają: IL-4, IL-5 i IL-10, ograniczając tym samym wytwarzanie cytokin przez komórki Th1. Przesunięcie równowagi odpowiedzi immunologicznej w kierunku limfocytów Th2, stymulujących rozwój odpowiedzi humoralnej nie jest korzystne, ponieważ MTB jest patogenem wewnątrzkomórkowym [7,35]. Komórki T CD8⁺, poza wytwarzaniem IFN- γ i TNF- α , aktywujących makrofagi, działają jako limfocyty cytotoxiczne (Tc1), a wydzielając perforynę i granulizynę prowadzą do apoptozy komórek docelowych. Efektorowe komórki T, w czasie dalszych etapów odpowiedzi immunologicznej, są zastępowane przez komórki T pamięci (Tm), które wytwarzają wiele cytokin, zwłaszcza IL-2, IFN- γ i TNF- α [16,21].

Wykazano, że podczas infekcji MTB może modyfikować replikację z aktywnej na spowolnioną lub całkowicie zatrzymaną, czemu towarzyszą zmiany w profilu ekspresji poszczególnych genów, a w konsekwencji antygenów MTB dostępnych dla komórek układu immunologicznego [21]. W wyniku interakcji komórek układu odpornościowego i profilu wydzielanych cytokin wokół zainfekowanych makrofagów tworzą się różnej postaci ziarniniaki, które znacznie ograniczają dalsze rozprzestrzenianie się zakażenia. U ludzi wyróżnia się trzy dynamiczne typy struktur ziarniniaków: zawierające prątki MTB (solid granuloma); martwicze ziarniniaki typowe dla wczesnych etapów czynnej gruźlicy (necrotic granuloma); ziarniniaki serowaciejące występujące w końcowych etapach choroby lub ostrej fazy gruźlicy (caseous granuloma) [10]. Wewnątrz ziarniniaków prątki przechodzą w stan uśpienia stając się odporne na dalsze ataki ze strony układu immunologicznego. W takiej postaci mogą przetrwać wiele lat i uaktywnić się w czasie osłabienia odporności gospodarza [15,16,35]. Zatem odpowiedź immunologiczna w gruźlicy chroni organizm zakażonego przed rozprzestrzenieniem się infekcji, ale może się przyczynić w określonych warunkach do ułatwionej transmisji choroby. Z tych względów zadaniem nowo opracowanej szczepionki przeciw gruźlicy musi być, poza indukcją optymalnej odpowiedzi układu odpornościowego, zdolność do zapobiegania reaktywacji zakażeń latentnych [21].

Niedawne wyniki badań wykazały - jak dotąd niedocenioną - rolę limfocytów B w rozwoju ochronnej odpowiedzi przeciw zakażeniom MTB [20]. Potwierdzono, że wytwarzane przeciwciała mogą wpływać na zwiększone niszczenie MTB przez makrofagi, np. przez aktywację szlaku FcγR; stymulować napływ innych komórek układu immunologicznego, takich jak monocyty, neutrofile i komórki NK do miejsca infekcji; wspierać przetwarzanie i prezentację antygenów przez komórki dendrytyczne i makrofagi, a także korzystnie wpływać na aktywność bakteriobójczą komórek gospodarza [21].

Mimo intensywne badań nad mechanizmami powstawania gruźlicy, zjawisko odporności i odpowiedzi ochronnej przeciw MTB, nie zostało dotychczas w pełni poznane. Zakażenie MTB u ludzi i zwierząt laboratoryjnych wiąże się z opóźnieniem reakcji odpornościowej. Wykształcone przez prątki gruźlicy mechanizmy unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza przyczyniają się do hamowania apoptozy i autofagii komórek, blokady powstawania fagolizosomów, przenikania prątków z fagosomu do cytosolu, ograniczanie przetwarzania i prezentacji antygenów przez MHC, hamowania sygnalizacji receptora IFN-γ oraz migracji komórek dendrytycznych z płuc do miejscowych węzłów chłonnych [21,31]. Uważa się, że MTB może dodatkowo, poza aktywnym hamowaniem migracji już zakażonych komórek układu immunologicznego z płuc do węzłów chłonnych, preferencyjnie zakażać komórki o niewielkim potencjale migracyjnym np. komórki nabłonka. We wszystkich wyżej wymienionych przypadkach opóźnienie aktywacji swoistych komórek T

pozwala prątkom osiągnąć odpowiednią przewagę nad układem odpornościowym gospodarza [21]. Aktywacja lub supresja wielu złożonych mechanizmów zaangażowanych w rozwój odpowiedzi immunologicznej przeciw zakażeniom MTB może zatem wpływać na zwalczanie zakażenia lub jego dalszą transmisję do nowych wrażliwych gospodarzy [6].

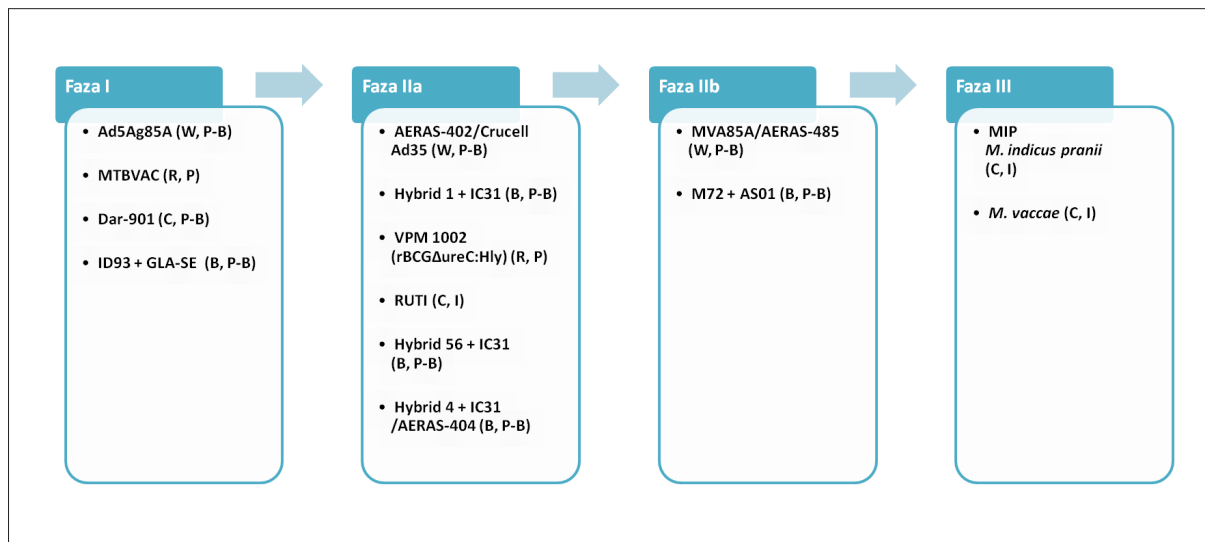
Wśród około 2 mld osób zakażonych prątkiem gruźlicy, aż 90-97% charakteryzuje postać utajoną, tzw. gruźlica latentna, a tylko u około 3-10% dochodzi do rozwoju aktywnego procesu chorobowego. Połowę przypadków gruźlicy aktywnej stanowi gruźlica pierwotna, rozwijająca się zwykle w ciągu dwóch lat od zakażenia, natomiast pozostałe przypadki to gruźlica popierwotna, wynikająca z reaktywacji zakażenia (zakażenie endogenne) bądź powtórnego zakażenia innym szczepem (zakażenie egzogenne). Zakażenia przebiegające w postaci utajonej są istotnym rezerwuarem patogenu, prowadzącym do rozwoju nowych aktywnych przypadków gruźlicy. Rozwój choroby jest uzależniony od sprawności układu immunologicznego gospodarza, a także od stopnia wirulencji prątków [21,35]. Na reaktywację może wpływać także podanie niektórych leków np. blokerów czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF-α)/IL-12/IL-23 w leczeniu chorób zapalnych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, choroba Crohna lub łuszczyca [17]. Powyższe fakty potwierdzają, że szczepionka BCG nie zapewnia odpowiedniej kontroli gruźlicy na świecie [21].

NOWE SZCZEPIONKI – GŁÓWNE ZAŁOŻENIA

Opracowaniu skutecznych szczepionek przeciw gruźlicy nie sprzyja dominująca rola odpowiedzi komórkowej w kontroli zakażenia MTB, utrudniona dostępność prątków dla komórek układu odpornościowego u osób z utajoną postacią gruźlicy oraz złożona natura prątków. Nadal nie w pełni wyjaśniono mechanizmy indukcji odpowiedzi odpornościowej i wciąż brakuje dostatecznie dobrych modeli zwierzęcych do badań odporności przeciwgruźliczej. Obecnie są prowadzone badania nad opracowaniem nowych strategii immunizacji:

- przed ekspozycją na gruźlicę – do stosowania u noworodków i młodych niemowląt w zastępstwie lub w celu wzmocnienia skuteczności szczepionki BCG przed narażeniem na gruźlicę oraz do zapobiegania gruźlicy u osób, które dotychczas nie zostały zakażone MTB;
- po ekspozycji na gruźlicę – do podawania osobom szczepionym lub bezobjawowo zakażonym w celu zmniejszenia progresji do aktywnej choroby;
- szczepionki terapeutyczne dla osób z czynną gruźlicą poddanych leczeniu farmakologicznemu w celu skrócenia czasu trwania terapii [38].

Nowa szczepionka, która mogłaby z powodzeniem zastąpić BCG powinna się charakteryzować lepszym profilem bezpieczeństwa i immunogenności, indukować dłużej trwającą odporność, w tym przed bardzo zjadliwymi lekoopornymi szczepami. Opracowanie bezpiecznej i skutecznej szczepionki chroniącej przed wszystkimi posta-



Ryc. 1. Opracowywane szczepionki przeciw gruźlicy znajdujące się na różnych etapach badań klinicznych [9,27]. Typ szczepionki: W – wektorowa, R – rekombinowana żywa, B – podjednostkowa (rekombinowane białko z adiuwantem), C – całokomórkowa. Strategia szczepienia: P-B – „prime-boost” (dawka pierwsza BCG + dawka przypominająca), P – „prime” (dawka pierwsza), I – immunoterapia

ciami gruźlicy we wszystkich grupach wiekowych, także wśród osób zakażonych HIV jest obecnie bezsprzecznym priorytetem zdrowia publicznego. Zsekwencjonowanie genomów MTB i *M. bovis* w latach 90 ub. w. pomogło lepszemu poznaniu komórkowych i molekularnych mechanizmów leżących u podstaw odpowiedzi immunologicznej w rozwoju gruźlicy. Dzięki rozwojowi technik manipulacji genetycznych prątków szczególnego znaczenia nabrały możliwości opracowania nowych, żywych szczepionek zawierających zmienione genetycznie szczepy mikrobakterii, wirusowych szczepionek wektorowych i podjednostkowych szczepionek rekombinowanych [37,40]. Obecnie dwie strategie zmierzające do poprawy efektywności szczepień przeciw gruźlicy są uważane za najbardziej obiecujące. W tzw. „prime-boost” po zaszczepieniu szczepionką BCG noworodków proponuje się podanie nowo opracowanej szczepionki niemowlętom w 3-9 miesiącu życia i młodzieży. Druga strategia wiąże się z zastosowaniem, zamiast dotychczasowej, wyłącznie nowo opracowanej szczepionki w postaci ulepszonej wersji szczepionki BCG lub żywej atenuowanej zawierającej szczep MTB. Przewiduje się, że nowa szczepionka zastąpi BCG [39,40]. W związku z brakiem wiarygodnych markerów ochronnej odpowiedzi immunologicznej oraz modeli doświadczalnych potwierdzających skuteczność proponowanych rozwiązań, opracowanie nowych szczepionek przeciw gruźlicy wiąże się z długimi i kosztownymi badaniami efektywności potencjalnych antygenów szczepionkowych [21,22]. Ze względu na priorytetowy charakter opracowania nowej szczepionki na badania z tego zakresu przeznaczono 4% funduszy (1,9 mld US\$) z programu „Global Plan to Stop TB” na lata 2011-2015 [39]. Ogłoszona 3 lutego 2011 r. rezolucja Parlamentu Europejskiego w sprawie poparcia „Inicjatywy na rzecz szczepień przeciw gruźlicy” (TBVI Tuberculosis Vaccines Initiative), integruje działania badawczo-rozwojowe

służące opracowaniu nowej szczepionki przeciw gruźlicy [21,24]. Wstępna ocena bezpieczeństwa, toksyczności i efektywności nowych szczepionek przeciw gruźlicy w fazie laboratoryjnej i przedklinicznej jest przeprowadzana u myszy, świnek morskich, bydła i zwierząt naczelnych. Istotne różnice w mechanizmach rozwoju odpowiedzi immunologicznej u różnych gospodarzy, patologii gruźlicy i osiągnięte wyniki skuteczności dotychczas nie pozwoliły na zwalidowanie któregośkolwiek modelu na potrzeby powszechnego zastosowania [25].

NOWE SZCZEPIONKI

Do początków 2001 r. opracowano i przetestowano w badaniach przedklinicznych kilka nowych potencjalnych szczepionek przeciw gruźlicy. Obecnie ponad 20 preparatów nowej generacji jest w trakcie badań laboratoryjnych, co najmniej 16 znajduje się na etapie zaawansowanych badań przedklinicznych, natomiast aż 14 w fazie badań klinicznych (ryc. 1), w tym 11 szczepionek profilaktycznych znajduje się w I lub II fazie, a 3 szczepionki immunoterapeutyczne – w fazie II lub III [9,15,21,40]. Wśród nich 2 to szczepionki żywe rekombinowane – rBCG i rMTB; 3 wektorowe z zastosowaniem wirusa krowianki lub adenowirusa; 5 szczepionek podjednostkowych z adiuwantem, zawierających antygeny MTB oraz 4 szczepionki całokomórkowe, zawierające szczepy *M. indicus pranii*, *M. vaccae* i MTB.

SZCZEPIONKI ŻYWE REKOMBINOWANE

W genomie MTB zidentyfikowano ponad 120 genów nieobecnych u podszczipów BCG [8], co przyczyniło się do podjęcia działań w celu poprawy immunogenności szczepionki przeciw gruźlicy przez ekspresję immunodominujących antygenów swoistych wyłącznie dla MTB np.

ESAT6 czy CFP10 lub nadekspresję antygenów wytwarzanych w małej ilości przez BCG np. kompleksu Ag85 [21]. Ten ostatni wariant wykorzystano podczas pierwszych prób ulepszenia szczepionki BCG podszczerpu Tice, uzyskując rekombinowany szczep z nadekspresją antygeny 85B (Ag85B) o nazwie rBCG30. Preparat pomyślnie przeszedł kliniczne badania bezpieczeństwa fazy I, jednak dalsze prace z jego udziałem zostały wstrzymane [12,21]. Kolejna rekombinowana wersja BCG – AFRO-1, charakteryzująca się zwiększonym wytwarzaniem trzech antygenów: Ag85A, Ag85B oraz TB10.4, mimo potwierzonego profilu bezpieczeństwa i indukcji zwiększonego stężenia limfocytów T wytwarzających IFN- γ [28], nie była zdolna do indukcji większej ochrony przed zachorowaniem na gruźlicę w porównaniu do niezmodyfikowanego szczepu BCG Danish 1331 [21]. Zmiana antygeny ulegającego nadekspresji z TB10.4 na Rv3407 i dodatkowo zwiększone wytwarzanie perfringolizyny w przypadku szczepu Aeras-422, mimo wykazanego bezpieczeństwa u myszy z ciężkim niedoborem odporności i wzmoczonej immunogenności w stosunku do szczepów gruźliczych, podobnie nie przyniosła spodziewanych wyników i dalsze badania zostały wstrzymane na etapie fazy I z powodu wystąpienia reakcji niepożądanych (tj. reaktywacja półpaśca) [9,18].

Obiecujące wyniki uzyskano dla preparatu oznaczonego VPM1002, znajdującego się w fazie IIa badań klinicznych. Rekombinacja szczepu szczepionkowego BCG polegała na wprowadzeniu do jego genomu genu listeriolizyny (Hly) *Listeria monocytogenes*, którego ekspresja uniemożliwia 'ucieczkę' prątków z endosomu. Działanie enzymu osiągnięto przez zapewnienie odpowiedniego pH dzięki mutacji w genie ureazy C. Uzyskany szczep rBCG Δ ureC:hly z założenia powinien znacznie lepiej niż BCG indukować proces apoptozy zainfekowanych komórek gospodarza przez zwiększenie liczby komórek T CD8 $^{+}$ w sposób zależny od MHC klasy I. Zarówno badania na zwierzętach, jak i prowadzone w fazie I na ludziach, potwierdziły akceptowany poziom bezpieczeństwa i immunogenności szczepionki, co umożliwiło kontynuowanie dalszych prac w badaniach fazy IIa w Afryce Południowej [21,25,36].

Na początku 2013 r. I fazie badań klinicznych poddano preparat MTBVAC. Jest to pierwsza dotychczas opracowana żywa szczepionka zawierająca atenuowany szczep MTB uzyskany przez delecję fragmentów genów *phoP* i *fadD26*. Badania przedkliniczne potwierdziły jej bezpieczeństwo u myszy z zaburzeniami odporności, a także ochronę przed zakażeniem gruźlicą u świnek morskich i naczelnych. Dodatkowo potwierdzono potencjał MTBVAC do zapewniania dłużej trwającej ochrony w porównaniu z konwencjonalną szczepionką BCG [9].

SZCZEPIONKI Z WEKTOREM WIRUSOWYM

W szczepionkach wektorowych jest wykorzystany osłabiony, niereplikujący się wirus, zdolny do przeniesienia DNA MTB do ludzkich komórek, w których dochodzi do transkrypcji immunogennego białka. Zastosowanie

wektorów wirusowych pozwala na klonowanie genów kodujących immunodominujące antygeny ze znaczną wydajnością [9,25]. Jest to najbardziej zaawansowany typ preparatów, wśród których 3 znajdują się obecnie w fazie badań klinicznych. MVA85A/AERAS-485 – zawiera niereplikujący się, zmodyfikowany wirus ospy krowiej Ankara umożliwiającą ekspresję antygeny MTB 85A. Innymi przykładami są AERAS-402/Crucell Ad35 – z niereplikującym się adenowirusem przejawiającym ekspresję antygenów MTB 85A, 85B i TB10.4 oraz Ad5Ag85A – niereplikujący adenowirus z ekspresją antygeny MTB 85A.

Największe nadzieje wśród szczepionek wektorowych wiązano dotychczas z preparatem MVA85A/AERAS-485, jednak opublikowane wyniki fazy IIb badań klinicznych, mimo wykazanego bezpieczeństwa, nie potwierdziły skuteczności zapobiegania gruźlicy i zakażeniu MTB u niemowląt wcześniej zaszczepionych BCG [9,19]. Stymulacja limfocytów T CD4 $^{+}$ do wytwarzania cytokin IFN- γ , TNF- α oraz IL-2 u ludzi okazała się słabsza niż u zwierząt. Ze względu na lepszą skuteczność preparatu u osób starszych w porównaniu do niemowląt obecnie, w Południowej Afryce i Senegalu, prowadzone są badania skuteczności szczepionki MVA85A u dorosłych nosicieli wirusa HIV uprzednio zaszczepionych BCG [9].

Preparat AERAS-402/Crucell Ad35, zarówno w badaniach na zwierzętach jak i przeprowadzonych w Południowej Afryce na zainfekowanych MTB dorosłych pacjentach uprzednio zaszczepionych BCG, okazał się dobrze tolerowany. Zaobserwowana indukcja limfocytów T CD4 $^{+}$ oraz limfocytów T CD8 $^{+}$ wytwarzających IFN- γ [1] przyczyniła się do kontynuowania dalszych badań nad tą szczepionką [9].

Szczepionka Ad5Ag85A, zaaplikowana donosowo zwierzętom, pozwoliła na uzyskanie lepszej ochrony przed zakażeniem MTB, zwłaszcza po podaniu jako dawki przypominającej po zaszczepieniu BCG [12,35]. W pierwszych badaniach na ludziach potwierdzono bezpieczeństwo i immunogenność preparatu, jednak pojawiły się pewne niepokojące dane związane z zastosowaniem adenowirusa serotypu 5 jako wektora. Obawy te wynikają z powszechnego występowania przeciwciał neutralizujących wobec adenowirusa serotypu 5 w populacji krajów rozwijających się, ale także związku między ich występowaniem a zwiększonym ryzykiem zakażenia wirusem HIV [9,25].

POJEDNOSTKOWE – BIAŁKA REKOMBINOWANE Z ADIUWANTEM

Wśród białek rekombinowanych potencjalnymi antygenami szczepionkowymi są przede wszystkim białka fuzyjne, będące kombinacją dwóch lub większej liczby antygenów, z adiuwantem o właściwościach immunostymulujących. Niektóre z nich występują u MTB i BCG np. białko wiążące fibronektynę (Ag85A i Ag85B), białko przesączu hodowli (CFP-10), proteaza serynowa pepA (Rv0125) i białko z rodziny PPE (Rv1196). Inne występują wyłącznie u MTB, np. wczesne białko antygenowe (ESAT-6) czy białko małej masy (TB10.4). Antygeny te podda-

wane są fuzji w różnych kombinacjach, a ich właściwości wzmacniane przez zastosowanie adiuwantów, tj. IC-31, składającego się z polipeptydu i oligodeksynukleotydów; AS01, komponentu aktywnej powierzchniowo saponiny i monofosforu lipidu A, czy nowego adiuwantu liposomalnego CAF01 [15]. Obecnie w fazie badań klinicznych znajduje się 5 szczepionek z białkami rekombinowanymi - M72 + AS01 (antygen Rv1196 i Rv0125; adiuwant AS01), Hybrid 1 + IC31 (antygen 85B i ESAT-6; adiuwant IC31), Hybrid 56 + IC31 (antygen 85B, ESAT-6 i Rv2660; adiuwant IC31), Hybrid 4 + IC31/AERAS-404 (antygen 85B i TB10.4; adiuwant IC31), ID93 + GLA-SE (antygen Rv2608, Rv3620, Rv1813, Rv3619; adiuwant GLA-SE) [21,25,40].

Najbardziej zaawansowany wśród wyżej wymienionych preparatów – M72 + AS01 znajduje się obecnie w fazie IIb badań klinicznych. Dotychczasowe wyniki wskazują na osiągnięcie dobrego profilu bezpieczeństwa z jednoczesną stymulacją odpowiedzi limfocytów T CD8⁺ oraz CD4⁺. Liczba komórek T po podaniu M72 + AS01 była wyższa u osób zakażonych MTB niż u osób niezakażonych, co sugeruje, że szczepienie może zwiększyć populację limfocytów, których obecność zainicjowało już naturalne zakażenie MTB [3,9].

Duże nadzieje wiąże się również ze szczepionką zawierającą białko fuzyjne Hybrid 1 i adiuwant IC31, zdolną do indukcji silnej odpowiedzi limfocytów T CD4⁺, znajdującą się obecnie w fazie IIa badań klinicznych. Wprowadzenie dodatkowego antygeny, ulegającego ekspresji u prątków w stanie latencji (Rv2660), doprowadziło do otrzymania białka fuzyjnego Hybrid 56, które w połączeniu z adiuwantem IC32 okazało się dobrze tolerowane, stabilniejsze i bardziej immunogenne niż Hybrid 1 [9].

Obecnie w I fazie badań klinicznych znajduje się szczepionka podjednostkowa ID93 z adiuwantem GLA-SE. Zawiera trzy antygeny ulegające ekspresji u prątków podczas aktywnej choroby i jeden wytwarzany w latencji. Badania laboratoryjne na zwierzętach potwierdziły jej zdolność wzmacniania odpowiedzi Th1 i Th2 oraz poprawę właściwości terapeutycznych preparatu. Podanie ID93 + GLA-SE z izoniazidem i rimfampicyną skracało czas leczenia i zwiększało przeżywalność myszy i małp [9].

SZCZEPIONKI CAŁOKOMÓRKOWE LUB FRAGMENTY CAŁYCH KOMÓREK

Uzyskanie inaktywowanych, bądź niezdolnych do replikacji całych komórek lub ich fragmentów na początku lat 90 ub.w. doprowadziło do opracowania szczepionek, dla których rozpoczęto fazę badań przedklinicznych. Jedna z nich znajduje się w I fazie, inna w II i dwie pozostałe w III fazie badań klinicznych.

Szczepionka z zastosowaniem inaktywowanego szczepu *M. vaccae* uzyskała zróżnicowane wyniki wstępne w poszczególnych rejonach geograficznych. U pacjentów zakażonych gruźlicą, którym podano jedną dawkę - w Ugandzie i trzy dawki - w Argentynie wykazano szybszą poprawę stanu zdrowia w porównaniu z grupą

otrzymującą placebo [5,14]. W Tanzanii podanie jej osobom zakażonym wirusem HIV, uprzednio zaszczepionym pięcioma dawkami szczepionki BCG, potwierdziło odpowiedni profil bezpieczeństwa i możliwość uzyskania znacznej ochrony przeciw zakażeniu gruźlicą [4,9].

Inną szczepionką zawierającą inaktywowany szczep *M. vaccae* jest Dar-901, znajdujący się obecnie w fazie I badań klinicznych, w której oceniane jest bezpieczeństwo podania trzech dawek osobom dorosłym HIV(+), uprzednio zaszczepionym BCG [9,34].

M. indicus pranii (Mw, MIP) to szybko rosnące, niepatogenne prątki, stosowane w profilaktyce trądu. Po 10 latach od podania szczepionki MIP zaobserwowano spadek liczby przypadków gruźlicy. W badaniach na zwierzętach potwierdzono indukcję silnej odpowiedzi Th1 i Th17 przez aktywację zarówno limfocytów T CD8⁺ jak i CD4⁺. Obecnie, po ukończeniu fazy III badań klinicznych, preparat jest zarejestrowany w Indiach, jako szczepionka terapeutyczna, wspomagająca leczenie pacjentów z gruźlicą [9].

Szczepionką terapeutyczną potencjalnie przeznaczoną dla pacjentów z aktywną i latentną gruźlicą jest RUTI. W jej produkcji hodowla MTB uzyskana w warunkach stresu jest następnie poddana fragmentowaniu, odtoksygnianiu i zamknięciu w liposomach [16]. W badaniach przedklinicznych przeprowadzonych na zwierzętach i badaniach klinicznych u pacjentów HIV(-) i HIV(+), potwierdzono jej dobrą immunogenność, a także profilaktyczne działanie [9,33]. Prace nad szczepionką nadal trwają.

PODSUMOWANIE

Niedoskonałość jedynej dostępnej szczepionki przeciw gruźlicy stanowi jedną z głównych przyczyn powodujących, że choroba ta w skali globalnej wciąż stanowi nieopanowany problem zdrowia publicznego. Szczepionka przeciwgruźlicza BCG jest stosowana od prawie 100 lat jednak jej skuteczność w zapobieganiu najbardziej rozpowszechnionej postaci, gruźlicy płuc u dorosłych, jest niewielka. Opracowanie i wprowadzenie do powszechnego programu szczepień szczepionki nowej generacji zdaje się zatem jedynym środkiem umożliwiającym realizację celu jakim jest wyeliminowanie gruźlicy do 2050 r. Aktualnie ponad 20 preparatów jest w trakcie badań laboratoryjnych, co najmniej 16 znajduje się na etapie badań przedklinicznych, natomiast aż 14 w fazie badań klinicznych. Zaobserwować można dwa nurty: w pierwszym – celem jest opracowanie szczepionki, która zastąpi dotychczasową, natomiast w drugim – uzyskanie szczepionki stanowiącej uzupełnienie BCG. Zaawansowane badania prowadzone są zarówno dla preparatów profilaktycznych jak i immunoterapeutycznych, a wśród nich dla szczepionek żywych rekombinowanych, wektorowych, podjednostkowych z adiuwantem oraz całokomórkowych. Ta różnorodność podejść i mnogość rozwiązań daje nadzieje na opracowanie szczepionki, która będzie w stanie docelowo przyczynić się do eliminacji gruźlicy.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abel B., Tameris M., Mansoor N., Gelderbloem S., Hughes J., Abrahams D., Makhetha L., Erasmus M., de Kock M., van der Merwe L., Hawkrigde A., Veldsman A., Hatherill M., Schirru G., Pau M.G. i wsp.: The novel tuberculosis vaccine, AERAS-402, induces robust and polyfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells in adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2010; 181: 1407-1417
- [2] Behr M.A., Small P.M.: A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine*, 1999; 17: 915-922
- [3] Day C.L., Tameris M., Mansoor N., van Rooyen M., de Kock M., Geldenhuys H., Erasmus M., Makhetha L., Hughes E.J., Gelderbloem S., Bollaerts A., Bourguignon P., Cohen J., Demoitié M.A., Mettens P. i wsp.: Induction and regulation of T cell immunity by the novel tuberculosis vaccine M72/AS01 in South African adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2013; 188: 492-502
- [4] de Bruyn G., Garner P.: *Mycobacterium vaccae* immunotherapy for treating tuberculosis. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2003; CD001166
- [5] Dlugovitzky D., Fiorenza G., Farroni M., Bogue C., Stanford C., Stanford J.: Immunological consequences of three doses of heat-killed *Mycobacterium vaccae* in the immunotherapy of tuberculosis. *Respir. Med.*, 2006; 100: 1079-1087
- [6] Dorhoi A., Reece S.T., Kaufmann S.H.: For better or for worse: the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* balances pathology and protection. *Immunol. Rev.*, 2011; 240: 235-251
- [7] Flynn J.L.: Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis*, 2004; 84: 93-101
- [8] Fol M., Zawadzka K., Druszczyńska M., Kowalewicz-Kulbat M., Rudnicka W.: Szczepienia przeciwprątkowe - BCG i co dalej? *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 93-103
- [9] Frick M.: The TB Vaccines Pipeline. Where are we going, where have we been? W: 2013 Pipeline Report, red. T. Horn, S. Morgan. HIV i-Base/Treatment Action Group, 2013: 263-283
- [10] Gengenbacher M., Kaufmann S.H.: *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2012; 36: 514-532
- [11] Gil D.P., León L.G., Correa L.I., Maya J.R., Paris S.C., García L.F., Rojas M.: Differential induction of apoptosis and necrosis in monocytes from patients with tuberculosis and healthy control subjects. *J. Infect. Dis.*, 2004; 189: 2120-2128
- [12] 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 bacille Calmette-Guérin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers. *J. Infect. Dis.*, 2008; 198: 1491-1501
- [13] Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc: Biuletyn Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, <http://www.igichp.edu.pl/> (15.01.2014)
- [14] Johnson J.L., Kanya R.M., Okwera A., Loughlin A.M., Nyole S., Hom D.L., Wallis R.S., Hirsch C.S., Wolski K., Foulds J., Mugerwa R.D., Ellner J.J.: Randomized controlled trial of *Mycobacterium vaccae* immunotherapy in non-human immunodeficiency virus-infected ugandan adults with newly diagnosed pulmonary tuberculosis. The Uganda-Case Western Reserve University Research Collaboration. *J. Infect. Dis.*, 2000; 181: 1304-1312
- [15] Kaufmann S.H.: Fact and fiction in tuberculosis vaccine research: 10 years later. *Lancet Infect. Dis.*, 2011; 11: 633-640
- [16] Kaufmann S.H., Hussey G., Lambert P.H.: New vaccines for tuberculosis. *Lancet*, 2010; 375: 2110-2119
- [17] Keane J., Gershon S., Wise R.P., Mirabile-Levens E., Kasznica J., Schwieterman W.D., Siegel J.N., Braun M.M.: Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor α -neutralizing agent. *N. Engl. J. Med.*, 2001; 345: 1098-1104
- [18] Kupferschmidt K.: Infectious disease. Taking a new shot at a TB vaccine. *Science*, 2011; 334: 1488-1490
- [19] Lalvani A., Sridhar S., von Reyn C.F.: Tuberculosis vaccines: time to reset the paradigm? *Thorax*, 2013; 68: 1092-1094
- [20] Maglione P.J., Chan J.: How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Immunol.*, 2009; 39: 676-686
- [21] Ottenhoff T.H., Kaufmann S.H.: Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *PLoS Pathog.*, 2012; 8: e1002607
- [22] Parida S.K., Kaufmann S.H.: The quest for biomarkers in tuberculosis. *Drug Discov. Today*, 2010; 15: 148-157
- [23] Park J.S., Tamayo M.H., Gonzalez-Juarrero M., Orme I.M., Ordway D.J.: Virulent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 2006; 79: 80-86
- [24] Rezolucja Parlamentu Europejskiego z dnia 3 lutego 2011 r. w sprawie „Inicjatywy szczepienia przeciwko gruźlicy” (TBVI). <http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?type=TA&reference=P7-TA-2011-0039&language=PL&ring=B7-2011-0075> (15.01.2014)
- [25] Rowland R., McShane H.: Tuberculosis vaccines in clinical trials. *Expert Rev. Vaccines*, 2011; 10: 645-658
- [26] Sakula A.: BCG: who were Calmette and Guérin? *Thorax*, 1983; 38: 806-812
- [27] Stop TB Partnership Working Group on New TB Vaccines. Tuberculosis vaccine candidates – 2011. <http://www.tbvi.eu/about-us/downloads.html> (15.01.2014)
- [28] Sun R., Skeiky Y.A., Izzo A., Dheenadhayalan V., Imam Z., Penn E., Stagliano K., Haddock S., Mueller S., Fulkerson J., Scanga C., Grover A., Derrick S.C., Morris S., Hone D.M., Horwitz M.A., Kaufmann S.H., Sadoff J.C.: Novel recombinant BCG expressing perfringolysin O and the over-expression of key immunodominant antigens; pre-clinical characterization, safety and protection against challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine*, 2009; 27: 4412-4423
- [29] Szczuka I.: *Wakcynologia. W: Wakcynologia. II. Alfa Media Press, Bielsko-Biała 2007 365-390*
- [30] Teo S.S., Shingadia D.: BCG vaccine. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2005; 568: 117-134
- [31] Urdahl K.B., Shafiani S., Ernst J.D.: Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. *Mucosal Immunol.*, 2011; 4: 288-293
- [32] van Helden P.D., Hoal E.G.: A new TB vaccine: fact or fiction? *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 2013; 36: 287-294
- [33] Vilaplana C., Gil O., Cáceres N., Pinto S., Diaz J., Cardona P.J.: Prophylactic effect of a therapeutic vaccine against TB based on fragments of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, 2011; 6: e20404
- [34] von Reyn C.F., Mtei L., Arbeit R.D., Waddell R., Cole B., Mackenzie T., Matee M., Bakari M., Tvaroha S., Adams L.V., Horsburgh C.R., Palangyo K., DarDar Study Group: Prevention of tuberculosis in Bacille Calmette-Guérin-primed, HIV-infected adults boosted with an inactivated whole-cell mycobacterial vaccine. *AIDS*, 2010; 24: 675-685
- [35] Vrba A., Kwiatkowska S.: *Mycobacterium tuberculosis* jako przykład patogenu wewnątrzkomórkowego. Wzajemne relacje między mikro- i makroorganizmem. *Pol. Merkur. Lekarski*, 2009; 27: 508-513
- [36] Winau F., Weber S., Sad S., de Diego J., Hoops S.L., Breiden B., Sandhoff K., Brinkmann V., Kaufmann S.H., Schaible U.E.: Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity*, 2006; 24: 105-117
- [37] World Health Organization and Stop TB Partnership: The Global Plan To Stop TB 2011-2015 <http://www.stoptb.org/global/plan/> (15.01.2014)

[38] World Health Organization and Stop TB Partnership: Tuberculosis Vaccine hope for the future. http://www.stoptb.org/wg/new_vaccines/assets/documents/TB%20Vaccine%20brochure%20latest.pdf (15.01.2014)

[39] World Health Organization: Global Tuberculosis Control 2011. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/en/ (15.01.2014)

[40] World Health Organization: Global tuberculosis report 2012. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2012/en/ (15.01.2014)

[41] World Health Organization: Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 Global report on surveillance and response. <http://www.who.int/tb/publications/2010/978924599191/en/> (15.01.2014)

[42] Xing Z., McFarland C.T., Sallenave J.M., Izzo A., Wang J., McMurray D.N.: Intranasal mucosal boosting with an adenovirus-vectored vaccine markedly enhances the protection of BCG-primed guinea pigs against pulmonary tuberculosis. *PLoS One*, 2009; 4: e5856

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.