

Marta Prygiel, Wiesława Janaszek-Seydlitz, Bożena Bucholc

SKUTECZNOŚĆ I BEZPIECZEŃSTWO SZCZEPIONEK PRZECIWKO GRUŹLICY A ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA SZCZEPÓW *MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG

EFFICACY AND SAFETY OF VACCINES AGAINST TUBERCULOSIS IN THE RELATION TO GENETIC VARIABILITY OF *MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG STRAINS

Zakład Badania Surowic i Szczepionek Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

STRESZCZENIE

Wszystkie stosowane aktualnie na świecie szczepionki przeciwgruźlicze zawierają jako substancję aktywną atenuowany szczep *Mycobacterium bovis* (*Bacille Calmette-Guerin*). Szczep BCG uzyskany w 1921 r. przez *Calmette'a* i *Guerina* w wyniku wieloletniego pasażowania na pożywcze ziemniaczano-glicerynowej z dodatkiem żółci, został następnie przekazany do wielu laboratoriów na świecie w celu wytwarzania szczepionki przeciwgruźliczej.

Liczne pasáže szczepu *M. bovis* BCG przeprowadzone w różnych warunkach hodowli doprowadziły do licznych mutacji i powstania wielu podszczepów BCG różniących się znacznie pod względem skuteczności i bezpieczeństwa.

W pracy przedstawiono wyniki licznych badań mających na celu wykazanie różnic genetycznych pomiędzy różnymi podszczepami BCG, w celu znalezienia genów odpowiadających za ich wirulencję oraz właściwości ochronne. Możliwości opracowania szczepionki przeciwgruźliczej nowej generacji są dyskutowane.

Słowa kluczowe: Podszczepy BCG, skuteczność, bezpieczeństwo, mutacje, genom

ABSTRACT

All vaccines against tuberculosis used actually over the world contain *Mycobacterium bovis* BCG strains (*Bacillus Calmette-Guerin*) as active substance. Strain BCG, that was obtained in 1921 by *Calmette* and *Guerin* after 13 years of passaging on the potato-glycerol medium with addition of bile, was distributed to many laboratories for vaccine production.

The repeated passages of *M. bovis* BCG strain in different culture conditions caused the numerous mutations and formation of many BCG substrains that differed according to efficacy and safety.

The review of many publications related to genetic differences between BCG substrains was performed for identify the genes responsible for their virulence and protective characteristics.

Possibility of development of new generation vaccines against tuberculosis is discussed.

Key words: BCG substrains, mutation, gene, safety, efficacy

WSTĘP

Od zapoczątkowania masowych szczepień przeciwko gruźlicy zarówno w Polsce jak i na świecie, stosowany jest jeden typ szczepionki przeciwgruźliczej – szczepionka BCG zawierająca atenuowany szczep *Mycobacterium bovis* BCG (*Bacille Calmette-Guerin*). Nazwa szczepionki pochodzi od jej odkrywców *Alberta Calmette'a* (doktora medycyny) i *Camille Guerina* (lekarza weterynarii). Wirulentny szczep *Mycobacterium bovis* został wyizolowany około 1901 roku z mleka

krowy cierpiącej na gruźlicze zapalenie sutka. Wyizolowany szczep prątków posłużył naukowcom pracującym w Instytucie Pasteura w Lille do badań gruźlicy bydła. Aby zmniejszyć zjadliwość prątków, a co za tym idzie zminimalizować skutki infekcji u eksperymentalnie zakażanych zwierząt, badacze pasażowali zjadliwy szczep prątków bydłowego na podłożu ziemniaczano-glicerolowym z dodatkiem żółci. Po 13 latach pasażowania (1908-1921) wykonując 231 pasażów, *Calmette* i *Guerin* uzyskali zmutowany szczep *M. bovis*, który nie wywoływał czynnej gruźlicy u świnek morskich, królików, psów, bydła, koni, kurczaków i wielu innych zwierząt

(1). Zmutowany szczep prątka bydłęcego rozesłano z Instytutu Pasteura do 34 różnych ośrodków badawczych na całym świecie w celu produkowania szczepionki. Niestety szczep ten od początku nie był homogeny pod względem bakteriologicznym, ponieważ nie otrzymano go z pojedynczej kolonii. Dla odmian hodowanych w różnych regionach świata, *Dubos* zaproponował nazewnictwo podszczeptów BCG opierające się na nazwach miast, państw lub firm, w których wyhodowano dany podszczep. Do najbardziej znanych podszczeptów BCG należą: francuski - Pasteur, czeski - Prague, duński - Copenhagen, brazylijski - Moreau, japoński - Tokio, rosyjski BCG – Russia, kanadyjski - Connaught oraz BCG-Glaxo, BCG-Gethenburg, BCG-Tice. Z czasem okazało się, że poszczególne podszczepty BCG znacznie różnią się pod względem morfologii kolonii na podłożach stałych, wirulencji resztkowej, immunogenności, odczynowości oraz właściwości ochronnych.

SKUTECZNOŚĆ SZCZEPIONKI BCG

Istnieje wiele prac na temat oceny skuteczności szczepień BCG. Początkowo skuteczność oceniano na podstawie porównania zachorowań i śmiertelności w grupie objętej szczepieniami i w grupie nieszczepionych. Wyniki tych badań wskazywały na wysoką skuteczność szczepień BCG w redukcji zapadalności na gruźlicę.

Pierwszą próbę badania bezpieczeństwa i skuteczności szczepionki przeciw gruźlicy na ludziach przeprowadzono w 1921 roku. Szczepieniami została objęta grupa niemowląt, których matki były chore na gruźlicę. Próby kliniczne przyniosły bardzo zadowalające rezultaty. Była to pierwsza szczepionka stosowana doustnie, która okazała się jednocześnie bezpieczna oraz efektywna w zapobieganiu zachorowaniom na gruźlicę wśród ludzi (2). W Europie szczepienia przeciw gruźlicy rozpowszechnione zostały między 1921 r. a 1930 r. (3). W większości krajów w 1927 roku szczepienie doustne zastąpiono szczepieniem śródskórnym, a w niektórych krajach jak Brazylia nastąpiło to dopiero w 1968 roku. Po 1930 r. rozpoczęły się pierwsze badania kliniczne szczepionki powiązane z badaniem skuteczności stosowanych szczepień na szeroką skalę. Pomyślne wyniki tych badań spowodowały, że Światowa Organizacja Zdrowia oraz UNICEF zarekomendowały szczepienia na skalę światową. Między 1948 r. a 1974 r. zaszczepiono około 1,5 mld ludzi na całym świecie (1, 2).

Obecnie skuteczność szczepionki BCG w ochronie przeciw płucnej postaci gruźlicy jest bardzo zróżnicowana i oceniana jest na 10-66 %, z kolei skuteczność szczepionki w zapobieganiu wszystkim postaciom gruźlicy szacowana jest na 16-73%. Co najważniejsze, szczepienia BCG redukują liczbę bardzo niebezpiecz-

nych uogólnionych postaci gruźlicy u dzieci, a ich skuteczność w zapobieganiu gruźliczemu zapaleniu opon mózgowych szacuje się na około 80% dla szczepionek pochodzących z różnych podszczeptów BCG (1, 2). Badania przeprowadzone w Hong-Kongu, obejmujące 300 tysięcy dzieci szczepionych dwoma preparatami: jednym zawierającym szczep BCG-Glaxo, a drugim BCG-Pasteur wykazały, że szczepionka BCG-Pasteur chroniła o ponad 40% więcej osób dorosłych przed rozwojem płucnej postaci gruźlicy w porównaniu do szczepionki BCG-Glaxo. Wiązało się to, między innymi, z różną zjadliwością podszczeptów BCG. Podszczep francuski do dzisiaj uważany jest za jeden z najsilniejszych podszczeptów stosowanych do produkcji szczepionki. Metaanaliza przeprowadzona przez *Milstein* na temat skuteczności i bezpieczeństwa stosowania szczepień BCG wykazywała, że o ile nie ma wystarczających dowodów na większą skuteczność jednych podszczeptów BCG w porównaniu z innymi (4), o tyle śmiało można powiedzieć, że silne podszczepty są bardziej reakto-genne i powodują więcej niepożądanych odczynów poszczepiennych (NOP). Według badań przeprowadzonych w USA w 1935 r. poziom skuteczności szczepionki w grupie szczepionych Indian wynosił 80%. Z kolei badania przeprowadzone w Madras i w Indiach, nie wykazały ochronnego działania szczepionki BCG przeciwko płucnej postaci gruźlicy (5). Mimo iż szczepienia BCG są najczęściej stosowanymi szczepieniami na świecie, skuteczność szczepionek jest nadal przedmiotem bardzo kontrowersyjnych opinii. Według wielu wakcynologów nie można uznać którejkolwiek szczepionki BCG za skuteczniejszą od pozostałych, niemniej jednak wciąż trwają prace mające na celu udowodnienie związku skuteczności i bezpieczeństwa szczepionki z użytym do jej produkcji podszczepem BCG (2, 5).

BEZPIECZEŃSTWO SZCZEPIONEK BCG

Do czasu wprowadzenia do produkcji szczepionki BCG systemu serii siewnej, podszczepty BCG używane do wytwarzania szczepionki w różnych krajach utrzymywano pasażując je systematycznie na podłożach płynnych. Sprzyjało to różnicowaniu się prątków. Innym powodem zróżnicowania prątków był fakt, że od początku szczep BCG nie był jednolity bakteriologicznie. Dlatego też poszczególne podszczepty BCG różnią się pod względem bezpieczeństwa i immunogenności, nigdy jednak nie zauważono ich powrotu do zjadliwości. W związku z tym dzielimy je na silne (np. Danish, Pasteur, Russia, Sweden) oraz słabe (np. Glaxo, Moreau, Japan, Prague); te pierwsze mają większą siłę immunogenną, a co za tym idzie dają więcej NOP, natomiast te drugie przeciwnie (6,7,9).

Pomimo że szczepionka BCG jest jedną z najbezpieczniejszych szczepionek stosowanych u ludzi, jest ona jedną z najbardziej reaktogennych szczepionek. Udoskonalenie metod produkcji szczepionki znacznie obniżyło odsetek występowania NOP. Obecnie NOP rejestrowane po szczepieniu BCG mają w ogromnej większości charakter łagodny i nie stanowią zagrożenia dla życia. Do najczęściej występujących zaliczamy: zmiany miejscowe (silne owrzodzenie i zmiana ropna w miejscu szczepienia) oraz zapalenie okolicznych węzłów chłonnych. Ciężkie NOP obejmują tzw. uogólniony rozsiew BCG, do którego zaliczamy rozsiew wielonarządowy – BCG-itis, zapalenie kości i szpiku kostnego - *osteitis* oraz toczeń układowy. Uogólniony rozsiew BCG występuje niezmiernie rzadko, z częstością od 1 do 10 przypadków na milion szczepionych osób, niestety najczęściej kończy się śmiercią. Występowanie NOP związane jest z wieloma czynnikami, z których najważniejsze to: dawka i użyty podszczep BCG, wiek i stan zdrowia szczepionej osoby, a także technika wykonania szczepienia. Podejrzewa się, że NOP po szczepieniu BCG może być znacznie więcej, niż wykazują to zgłoszenia (6-8).

ZMIANY GENETYCZNE W MATERIALE GENETYCZNYM PRĄTKÓW NA PRZESTRZENI LAT

Techniki molekularne polegają na wykrywaniu w genomie prątków sekwencji insercyjnych, delecji lub powtórzonych sekwencji DNA, których liczba i zmienność genetyczna stanowią marker identyfikacyjny. Każda z metod wykorzystujących właściwości jednego lub kilku markerów genetycznych prowadzi do uzyskania charakterystycznego dla danego szczepu wzoru genetycznego tzw. *fingerprint*. Dotychczas opublikowane prace z zakresu genetyki prątków znacznie przybliżyły poznanie mechanizmów atenuacji prątków oraz jej wpływu na skuteczność i bezpieczeństwo szczepionek przeciw gruźlicy oraz wyjaśniły różnice w immunogenności i toksyczności podszczepów BCG. Badania nad podobieństwem szczepów *Mycobacterium bovis* ukazują istnienie kilku polimorficznych *loci*.

DELECJE GENÓW

Genom *Mycobacterium bovis* BCG ujawnia istnienie 10 delecji (RD1-RD10) w porównaniu do genomu *Mycobacterium tuberculosis* (10, 11). Trzy pierwsze RD1-RD3 są specyficzne tylko dla *Mycobacterium bovis* BCG, w genomie *Mycobacterium bovis* brak jest siedmiu pozostałych regionów (RD4-RD10). Jedne z pierwszych badań przeprowadzonych przez Mahaira-

sa i in. ujawniły występowanie w genomie atenuowanych szczepów BCG (BCG Connaught) trzech delecji RD1, RD2 oraz RD3 (12). Delecja RD1 występuje we wszystkich genomach szczepów BCG, natomiast obecność tego regionu wśród wirulentnych laboratoryjnych i klinicznych szczepów *M.bovis* oraz *Mycobacterium tuberculosis* jest cechą konserwatywną. Region RD1 (9,5 kb) jest nieobecny u wszystkich atenuowanych szczepów BCG. Zatem można przypuszczać, że może on odgrywać istotną rolę w patogenności prątków innych podszczepów. Sekrecyjne białka kodowane przez geny tego regionu są przedmiotem badań wielu wakcynologów i mogą mieć znaczenie w opracowaniu nowych szczepionek przeciw gruźlicy. Region ten zawiera dziewięć genów (Rv 3871-Rv 3879). Funkcja transkryptów tych genów nie jest dokładnie poznana, wiadomo jednak iż dwa z nich (Rv 3874 oraz Rv 3875) odpowiadają za translację dwóch najważniejszych antygenów *Mycobacterium*: białek ESAT-6(*esxA*) oraz CFP-10 (*esxB*) (12- 14). Dowodem na istnienie związku pomiędzy zmiennym regionem RD-1 a patogennością szczepów *Mycobacterium tuberculosis* jest powrót wirulencji i immunogenności prątków po ponownym włączeniu regionu RD-1 do genomu atenuowanych prątków. Natomiast delecja badanego regionu z genomu *M. tuberculosis* powoduje spadek zdolności bakterii do wywołania choroby, chociaż nie powoduje całkowitej utraty zjadliwości (15). Sugeruje to, że utrata właściwości chorobotwórczych BCG ma związek nie tylko z delecją omawianego regionu, ale również z innymi mutacjami. Podobnie jest z regionem RD-2, szczepy z delecją tego regionu są mniej immunogenne w porównaniu ze szczepami posiadającymi region RD-2.

Występowanie regionów RD 4-RD 10 jest charakterystyczne dla *Mycobacterium africanum* oraz *Mycobacterium microti*, co wiąże się prawdopodobnie z patogennością i wirulencją prątków. Wśród znanych produktów kodowanych przez te rejony są: inwazyjna Mce, trzy fosfolipazy, kilka białek PE, PPE, hydrolaza oraz sekwencje inercyjne.

Zatem; w genomie szczepów *Mycobacterium* występują dwa rodzaje delecji, jedne obecne wśród szczepów *M. bovis* BCG, ale nieobecne w *M. bovis* i *M. tuberculosis*, a drugie nieobecne zarówno w *M. bovis* jak i w *M. bovis* BCG, ale obecne wśród prątków *M. tuberculosis*. Badania Brodina i in. (16) dowiodły, że region RD-1 zawiera geny odpowiadające za system sekrecyjny *snm* (jeden z pięciu systemów sekrecyjnych, jakie można znaleźć w genomie *M.tuberculosis*), który odpowiada za produkcję w/w białek wydzielniczych. Wykazano, że system sekrecyjny kodowany przez region RD-1 ma związek z aktywacją bądź hamowaniem szeregu reakcji związanych z patogennością prątków, takich jak hamowanie drogi aktywacji makrofagów (liza zaatakowanej komórki, hamowanie wydzielania

cytokin oraz fagocytozy), supresja prezentacji antygenów limfocytom T przez komórki dendrytyczne, a także przemieszczanie się prątków do cytozolu. Inaktywacja genów kodujących system sekrecyjny ESAT-6/CFP-10 powoduje osłabienie przeżycia prątków *M. tuberculosis* w makrofagach oraz redukcję wirulencji ocenianej w badaniach na myszach. Interakacja prątków z układem immunologicznym gospodarza zachodzi przez receptory *Toll like* (TLR) (11, 16).

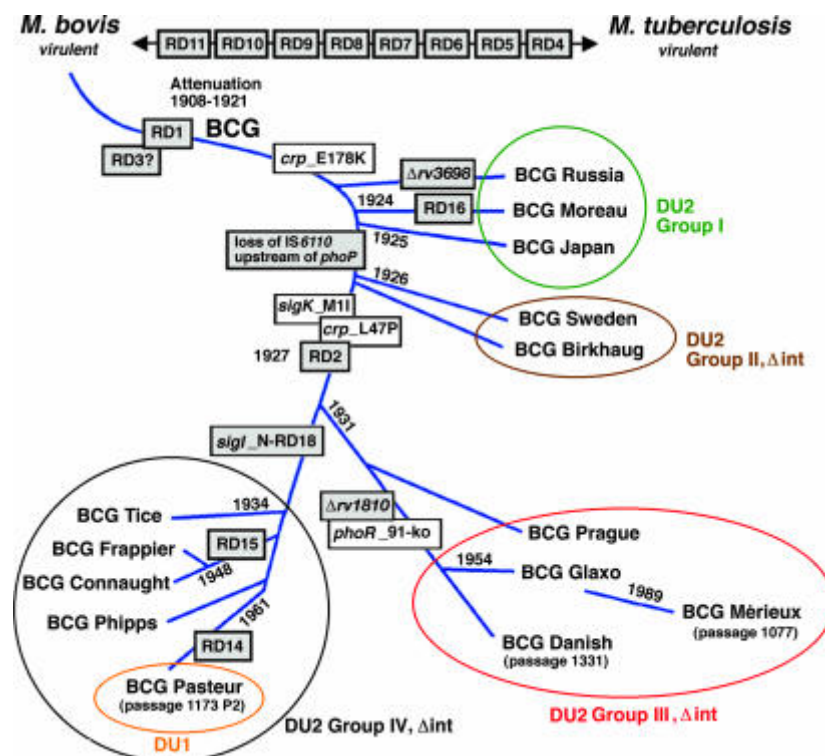
POLIMORFIZM POJEDYNCZEGO NUKLEOTYDU (SNPs – SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS)

Różnice w genomie *Mycobacterium* mogą być również powodowane zmiennością na poziomie polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNPs – *single nucleotide polymorphisms*). Jedną z metod badania zmienności na poziomie SNPs jest metoda MIRU (*Mycobacterial interspersed repetitive unit*). Jak wynika z badań przeprowadzonych przez *Filliol* i in. (17) wszystkie szczepy *M. bovis* należą do jednego klasteru filogenetycznego, przy czym wśród klinicznych izolatów *M. tuberculosis* wyróżniono ich sześć w zależności od miejsca pochodzenia i źródła transmisji. Mutacje zachodzące wśród szczepów *M. bovis* są znacznie rzadsze i zachodzą w znacznie dłuższych okresach czasu

aniżeli mutacje w genomie *M. tuberculosis*. Należy zaznaczyć, że szczepy *M. bovis* należące do jednego klasteru pochodziły z różnych regionów świata (18). Poza tym genom szczepów *M. bovis* (nie BCG) oraz *M. bovis* BCG na poziomie SNPs nie wykazuje znacznych różnic, co może świadczyć o niewielkiej roli tej zmienności podczas atenuacji prątków (19). Analiza całego genomu BCG-Pasteur oraz genomu *M. tuberculosis* H37Rv ujawniała 2223 różnice (zmienności) na poziomie tzw SNPs oraz 736 różnic między szczepami BCG-Pasteur oraz *M. bovis* AF 2122/97. Badania *Liu* i in. (19) ujawniły dwa typy polimorfizmu na poziomie SNPs. Większość tych różni występuje u wszystkich znanych szczepów BCG, natomiast niektóre z nich są charakterystyczne tylko dla poszczególnych szczepów BCG (20, 21).

DUPLIKACJE

Bardzo ważne oprócz występujących w genomie *M. bovis* BCG delecji są występujące duplikacje. Na podstawie badań przeprowadzonych przez *Broscha* i in. (21) stwierdzono, że w szczepie *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 występują tandemowo powtórzone duplikacje DU1 oraz DU2. Duplikacja DU1 jest konserwatywna tylko dla szczepu BCG Pasteur i nie występuje w żadnych innych szczepach BCG. Duplikacja DU2 występuje



Ryc. 1 Mutacje zachodzące w szczepach BCG na przestrzeni lat (wg: *Brosch R*, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 5596-601) (21)

Fig. 1 Mutations developing in BCG strains within the space of the years (according: *Brosch R*, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 5596-601) (21)

je w 4 formach: DU2-I (BCG Japan) oraz DU2-II (BCG Sweden) charakterystycznych dla szczepów, które otrzymano przed rokiem 1930, oraz (DU2-III oraz DU2-IV) charakterystycznych dla szczepów otrzymanych po roku 1930 (np. BCG Prague czy BCG Tice). Wiadomo, że duplikacja DU2 koduje geny odpowiedzialne za syntezę dehydrogenazy 3-fosfo-glicerolowej, która warunkuje lepszy wzrost na podłożach zawierających glicerol. Szczepy *M. bovis* BCG syntetyzują 3-krotnie więcej w/w enzymu, aniżeli szczepy *M. bovis* (nie BCG). Dlatego też do podłoża stosowanego do namnażania prątków w procesie wytwarzania szczepionek wprowadzono jako jeden ze składników glicerol. Jest to potwierdzenie nabywania mutacji przez szczepy BCG podczas kolejnych pasażów (21) (ryc. 1.).

Jak przedstawiono na rycinie 1 prątki BCG nabyły w/w mutacje podczas dwóch faz atenuacji. Niektóre regiony zostały utracone już we „wczesnych latach” tj. podczas 230 pasażów prowadzonych przez *Calmette'a i Gueriną*. Pozostałe podczas dalszych lat, kiedy to w 1924 r. zostały przekazane do różnych laboratoriów na całym świecie, w celu produkcji szczepionek. Część z nich nabyła dodatkowych mutacji specyficznych tylko dla danego szczepu. Zmienność ta wynika głównie z różnych sposobów hodowli prątków BCG, jakie prowadzili różni wytwórcy szczepionek.

Istnieją dowody, że liofilizacja prątków może także przyczyniać się do utraty pewnych regionów przez szczepy BCG. *MA Behr* sugeruje, że powstałe w ten sposób delekcje mogą powodować lepszy wzrost atenuowanych prątków w warunkach *in-vitro*, i jednocześnie osłabiać ich namnażanie w komórkach gospodarza (22).

Omawiane badania sugerują, że zarówno utrata regionów RD, jak również nagromadzenie mutacji związanych z SNP mają ścisły związek z atenuacją prątków. Zmiany te nagromadziły się jeszcze podczas pasażowania szczepu *M. bovis* przez *Calmett'a i Gueriną*. Instytut Pasteura w latach 1924-1926 przekazał szczep BCG 34 krajom. Mimo niewielkich różnic w stosowanych do 1950 roku podłożach do pasażowania prątków, liczni producenci szczepionek otrzymali zróżnicowane szczepy pod względem morfologicznym, biochemicznym i immunologicznym.

Delekcja regionu RD2 występowała u szczepów otrzymanych po 1927 roku, z kolei region nRD18 nie występował u szczepów przekazywanych po 1933 r. Różnice biochemiczne, jakie obserwowano, tłumaczono zmiennością na poziomie molekularnym. Dla przykładu; geny produkujące białka będące antygenami takie jak MPB64, MPB70 czy MPB83 wykazywały wysoki poziom ekspresji u szczepów otrzymanych przed 1927 rokiem, natomiast u szczepów „późniejszych” nie było ich wcale, bądź występowały w śladowych ilościach (3). Wszystkie te zmiany były wynikiem mutacji na poziomie genu *sigK*.

Z kolei punktowa mutacja na poziomie genu *mmaA3* tłumaczy, dlaczego atenuowane szczepy BCG są defektywne w produkcji podklas kwasów mykoloowych-składników ich ściany komórkowej. Analiza dwóch kwasów mykoloowych (PDIMs oraz PGLs) ujawniła, że trzy spośród wielu szczepów BCG nie produkują w/w kwasów. Są to BCG-Japan, BCG-Moreau oraz BCG-Glaxo. Udowodniono, że w szczepie BCG-Moreau brak syntez kwasów PDIMs oraz PGLs jest wynikiem delekcji fragmentu 975 par zasad, który jest regionem odpowiedzialnym za biosyntezę wymienionych kwasów. Region ten w dwóch pozostałych szczepach (BCG-Glaxo i BCG-Japan) jest jednak nienaruszony.

Stąd wniosek, że za produkcję ww. kwasów mykoloowych odpowiedzialne są prawdopodobnie również inne regiony.

System PhoP-PhoR jest jednym z 11 systemów białkowych znalezionych w genomie *M. tuberculosis*. PhoR jest kinazą histydynową przekazującą sygnał do wnętrza komórki. Autofosforylacja kinazy uzależniona jest od ekspresji wielu genów, włączając w to geny odpowiedzialne za biosyntezę trehalozy, jak również geny systemu sekrecyjnego ESX-1 (19, 21). Badania ujawniły, że mutanty *phoP* Mycobacterii były mniej wirulentne dla myszy niż szczep BCG-Pasteur. Laboratoryjny awirulentny szczep H37Ra *M. tuberculosis* wykazuje punktową mutację w regionie wiążącym DNA PhoP. Należy się więc spodziewać, że również szczepy BCG charakteryzujące się różną wirulencją będą wykazywały genetyczny polimorfizm na poziomie locus *phoP-phoR* (21). Dla przykładu BCG-Prague pozbawiony jest C-terminalnej domeny wiążącej DNA, czyniąc go naturalnym mutantem *phoP*; BCG-Russia, -Japan i Moreau posiadają mutację genu polegającą na wstawieniu krótkiej sekwencji DNA IS6110 w obrębie genu *phoP*. BCG – Sweden i Birkhaug zawierają delekcję w obrębie regionu kodującego C-terminalną domenę tego genu. Szczepy te w odróżnieniu od innych szczepów BCG zawierają również delekcję genów *whiB3* oraz *trcR*.

Zarówno *M. tuberculosis* jak i *M. bovis* zawierają siedem genów *whiB* (*whiB1-whiB7*). Badania sugerują, że białka *WhiB* są czynnikami transkrypcyjnymi, włączonymi w regulację najważniejszych procesów komórkowych prątka, takich jak podział komórki, patogeneza, odpowiedź na stres oksydacyjny, regulacja gospodarki węglowej oraz odporność na antybiotyki. Jednakże delekcja genu *whiB3* z genomu *M. bovis* nie pozbawia prątków zdolności do namnażania się *in-vivo* w organizmie świnki morskiej. Ponadto mutanty *whiB7* są wrażliwe na antybiotyki.

Inną delekcją, która występuje w genomie *M. BCG-Frappier* jest utrata genów *mce4C* oraz *mce4D* należących do czterech operonów *mce*, każdy zawierający od 9-12 genów kodujących permeazę, białko transportowe

przenoszące określone metabolity przez błony komórkowe bakterii na drodze transportu aktywnego. Ostatnio odkryto, że operon *mce* występujący w genomie *M. tuberculosis* odpowiada za import cholesterolu, co jest niezmiernie ważne w rozwoju przewlekłej infekcji. We wszystkich tzw. „późnych szczepach BCG”, a więc otrzymanych po 1933 roku (m.in. BCG-Tice, -Frappier, -Phipps oraz -Pasteur) również notowana jest delecja genu *sigI* kodującego alternatywny czynnik sigma polimerazy RNA niezbędny do transkrypcji RNA na matrycy DNA. Jego rola w zjadliwości szczepów *Mycobacterium* nie jest do końca poznana, wiadomo, że jest obecny tylko w szczepach *M. tuberculosis* oraz *M. bovis*, nie występuje natomiast w szczepach *M. marinum* oraz *M. avium*, pomimo iż są one patogenami (21).

Jak wynika z przedstawionych wyżej badań, BCG Japan, Moreau, Glaxo nie produkują PDIMs oraz PGLs (23, 24). Natomiast BCG -Prague jest mutantem *phoP*. Jeśli rzeczywiście PDIM/PGL oraz *phoP* mają wpływ na zjadliwość szczepów, nie ma wątpliwości, dlaczego szczepy te są mniej reaktogenne.

Innym potwierdzeniem bezpośrednich relacji pomiędzy zaobserwowanymi zmianami genetycznymi a fenotypową charakterystyką prątków jest związek pomiędzy występowaniem pewnych białek a reakcją skórną na tuberkulinę. Szczep BCG Tice posiadający duplikację regionu DU-Tice charakteryzuje się znacznie większą zdolnością do indukcji reakcji skórnej na tuberkulinę u myszy, aniżeli pozostałe szczepy BCG nie posiadające tej mutacji. Region ten zawiera geny odpowiadające za system sekrecyjny ESX-5, który jest jednym z pięciu systemów sekrecyjnych, jakie można znaleźć w genomie szczepów z rodziny *M. tuberculosis* complex. Do genów wchodzących w skład tego regionu należą m.in. geny kodujące transportery błonowe t.j. *Rv1782* czy *Rv1797*; geny kodujące białka błonowe o właściwościach ATPaz (*Rv1784*), czy wreszcie geny kodujące białka z rodziny ESAT-6 oraz CFP-10. System ten jest konserwatywny dla wielu patogennych prątków i ma związek z zakażaniem sąsiadujących ze sobą komórek (np. makrofagów), jak to ma miejsce w przypadku *M. marinum* (25).

PODSUMOWANIE

Odpowiedź immunologiczna wywołana zakażeniem z *M. tuberculosis* różni się od odpowiedzi immunologicznej po szczepieniu *M. bovis* BCG. Niektóre białka wydzielane przez szczepy *M. tuberculosis* nie są syntetyzowane przez *M. bovis* BCG. Wiąże się to z różnicami na poziomie genetycznym, jakie opisano powyżej. Szczepienie BCG nie zapobiega zakażeniu *Mycobacterium tuberculosis*, ale powoduje zahamowanie wzrostu mikroorganizmów w miejscu pierwot-

nego zakażenia i chroni przed masywnym rozsiewem prątków poprzez węzły limfatyczne i krew. Odpowiedź wywołana szczepionką BCG ma głównie charakter odporności komórkowej typu Th1. Podwyższenie aktywności komórek T CD4+ i CD8+ zachodzi poprzez aktywację INF- γ . Powstające podczas odpowiedzi immunologicznej przeciwciała nie odgrywają istotnej roli w powstawaniu odporności przeciwgruźliczej. Obserwacja różnic w immunomodulacji szczepami *M. bovis* BCG w stosunku do *M. tuberculosis* jest powodem, dla którego ciągła potrzeba udoskonalania szczepionek już istniejących jest zasadna, zwłaszcza że gruźlica nadal jest ogromnym problemem zdrowia publicznego, chociażby ze względu na stale rosnącą lekooporność prątków.

Jedną ze stosowanych strategii jest ulepszenie szczepionek już istniejących przez wykorzystanie rekombinowanych szczepów *M. bovis* BCG. Wprowadza się do genomów tych podszczepów geny odpowiadające za ekspresję immunogennych białek *M. tuberculosis* w celu otrzymania skutecznej odpowiedzi immunologicznej przeciw gruźlicy. Drugą strategią jest użycie szczepionek, w których substancją czynną są atenuowane, genetycznie modyfikowane szczepy *M. tuberculosis*, które powodowałyby odpowiedź ochronną bez objawów choroby.

W fazie badań przedklinicznych i klinicznych jest obecnie pięć szczepionek. Dwie z nich zawierają rekombinowane podszczepy BCG. Jedną to szczepionka rBCG30 przygotowana z podszczepu BCG Tice, w którego genom włączono geny odpowiadające za produkcję antygeny 85B - białka wydzielniczego obficie produkowanego przez szczepy *M. tuberculosis*. Szczepionka ta jest obecnie w I fazie badań klinicznych. Badania przedkliniczne przeprowadzone na świnkach morskich wykazały wysoki poziom ochrony (26, 27).

Drugą rekombinowaną szczepionką jest szczepionka VPM1002 zawierająca szczep *M. bovis* BCG Prague. Szczepionka ta charakteryzuje się wzmocnioną prezentacją antygenów poprzez dodatkową ekspresję genów kodujących listeriolizynę (Hly). Listeriolizyna trawiąc błony fagosomów poprawia prezentację antygenów, dzięki czemu odpowiedź limfocytów T jest znacznie silniejsza (26).

Do nowych szczepionek, których substancją czynną są atenuowane prątki *M. tuberculosis* należą: MTBVAC01, MC²6020, MC²6030. Pierwsza z nich zawiera szczep *M. tuberculosis*, pozbawiony genu *phoP*, który jest regulatorem transkrypcji kluczowych antygenów zjadliwości *M. tuberculosis*, jakie opisano powyżej. W ostatnich badaniach przedklinicznych żywych szczepionek przygotowanych ze szczepów z delecją genów *phoP* (Δ PhoP) stwierdzono, że dają one między innymi wysoki stopień ochrony przed gruźlicą w badaniach na zwierzętach. Do produkcji dwóch pozost-

stałych szczepionek użyty został laboratoryjny mutant *M. tuberculosis* H37Rv, który jest auktrofem kwasu pantotenowego, co jest spowodowane delecją genu panCD (Δ panCD). Mutant szczepionkowy w pierwszej szczepionce pozbawiony jest również genu odpowiedzialnego za syntezę lizyny, w związku z tym jest on mutantem auktroficznym zarówno dla kwasu pantotenowego, jak i lizyny. Mutant szczepionkowy w drugiej szczepionce oprócz delecji genów odpowiedzialnych za syntezę kwasu pantotenowego pozbawiony jest regionu RD1 (Δ RD1). Wstępne badania immunogenności oraz bezpieczeństwa w/w szczepionek wykazują ich wysoką skuteczność oraz dają nadzieję na wdrożenie ich do rutynowego uodporniania populacji (27).

Genetyczne modyfikacje rekombinowanych szczepów *Mycobacterium*, stanowiące potencjalne szczepy szczepionkowe nie wykazują pełnej replikacji w modelach *in-vivo*, dlatego uważane są za znacznie bardziej bezpieczne niż szczepy BCG używane aktualnie do standardowego uodporniania. Badania na zwierzętach potwierdziły całkowite bezpieczeństwo proponowanych szczepionek oraz indukowanie długotrwałej odpowiedzi odpornościowej (28).

Pomimo, że w badaniach eksperymentalnych pozostaje aktualnie wiele szczepionek DNA zawierających geny kodujące antygeny prątków oraz szczepionek podjednostkowych zawierających wybrane, oczyszczone antygeny prątków, żywe atenuowane szczepionki wciąż wydają się najlepszą bronią w walce z gruźlicą, ponieważ indukują znacznie lepszą długotrwałą odporność, niż szczepionki zabite.

Mimo iż szczepy *M. bovis* mają genom silnie homologiczny ze szczepami *M. tuberculosis*, jest ponad 120 ORFs (otwartych ramek odczytu) nieobecnych w genomach *M. bovis*. W związku z tym profil antygenowy w/w szczepów różni się znacznie, a co za tym idzie indukcja odpowiedzi immunologicznej również wykazuje różnice. Dodatkowe różnice w profilu antygenowym szczepów BCG w stosunku do dzikich szczepów gruźlicy, spowodowała ogromna zmienność tych szczepów, jaka zaszła podczas atenuacji prątków na początku XX wieku. Dlatego też, pomimo ponad 100-letniego doświadczenia ze szczepionkami wyprodukowanymi ze szczepów *M. bovis* BCG ciągle trwają prace nad zastąpieniem podszczepów BCG szczepami *M. tuberculosis*.

PIŚMIENNICTWO

- Liu J, Tran V, Leong A S, i in. BCG vaccines – review. *Human Vaccines* 2009; 5: 70-78.
- Barreto M, Pereira S, Ferreira A. BCG vaccine: efficacy and indications for vaccination and revaccination. *J Pediatr (Rio J)* 2006; 82 : 45-54.
- Oettinger T, Jorgensen M, Ladefoged A, i in. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for genealogical tree. *Tuberc and Lung Dis* 1999; 79: 243-250.
- Harwitz M, Harth G, Dillon B J, i in. Commonly administered BCG strains including an evolutionarily early strain and evolutionarily late strains of disparate genealogy induce comparable protective immunity against tuberculosis. *Vaccine* 2009; 27: 27441-445.
- Aronson N, Santosham M, Comstock G, i in. Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska natives: a 60-year follow-up study. *JAMA* 2004; 291: 2086-2091.
- Szczuka I. Bezpieczeństwo szczepień BCG – niepożądane odczyny poszczepienne. Część I. Postacie powikłań. System nadzorowania. *Przegl Epidemiol* 2002; 56:1-13.
- Szczuka I. Bezpieczeństwo szczepień BCG – niepożądane odczyny poszczepienne. Część II. Przyczyny powstawania niepożądanych odczynów poszczepiennych. Postępowanie kliniczne. *Przegl Epidemiol* 2002; 56:15-28.
- Zwolska Z, Augustynowicz-Kopeć E, Zarost A, i in. Zastosowanie nowoczesnych metod mikrobiologicznych do diagnozowania powikłań po szczepieniu BCG. Opis przypadków. *Pneumonol Alergol Pol* 2004; 72: 505-511.
- Alavi M, Safavi S. The bone scan pattern in disseminated BCG-itis. *Iran J Nucl Med* 2007; 15 : 21-24.
- Ganguly N, Siddiqui I, Sharma P. Role of *M.tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. *Tuberculosis* 2008; 88: 510-517.
- Kaeryn N, Lewis A. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* Mimics Bacille Calmette-Guerin Attenuation. *J Infect Dis* 2003; 1: 117-123.
- Mahairas G, Sabo P, Hickey M, i in. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M.bovis*. *J Bacteriol* 1996; 3: 1274-1282.
- Tan T, Lee WL, Alexander DC, i in. The ESAT-6/CFP-10 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates phagosome maturation. *Cell Microbiol* 2006; 8: 1417-29.
- Kozak R, Behr M.A. Divergence of immunologic and protective responses of different BCG strains in a murine model. *Vaccine* 2011; 29: 1519-1526.
- Gordon SV, Brosch R, Billault A, i in. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol* 1999; 32: 643-55.
- Brodin P. Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and virulence. *Infect Immun* 2006; 74: 88-98.
- Filliol I, Motiwala AS, Cavatore M, i in. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into *tuberculosis* evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J Bacteriol* 2006; 188: 759-72.
- Garcia Pelayo MC. A comprehensive survey of single nucleotide polymorphisms (SNPs) across *Mycobacterium bovis* strains and *M. bovis* BCG vaccine strains

- refines the genealogy and defines a minimal set of SNPs that separate virulent *M. bovis* strains and *M. bovis* BCG strains. *Infect Immun* 2009; 77: 2230-8.
19. Liu J, Tran V, Leung AS. BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Human Vaccines* 2009; 5: 70-8.
 20. Frothingham R. Differentiation of strains in *Mycobacterium tuberculosis* Complex by DNA sequence polymorphisms, including rapid identification of *M. bovis* BCG. *J Clin Microbiol* 1995; 4: 840-844.
 21. Brosch R. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 5596-601.
 22. Behr MA. Comparative genomics of BCG vaccines. *Tuberculosis* 2001; 81:165-8.
 23. Leung AS, Tran V, Wu Z, i in. Novel genome polymorphisms in BCG vaccine strains and impact on efficacy. *BMC Genomics* 2008; 9: 413.
 24. Abdallah AM. Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5: 883-91.
 25. Kamath AT, Fruth U, Brennan MJ, i in. New live mycobacterial vaccines: the Geneva consensus on essentials steps towards clinical development. *Vaccine* 2005; 23: 3753-3761.
 26. Horwitz M, Harth G, Dilon BJ, i in. A novel live recombinant mycobacterial vaccine against bovine tuberculosis more potent than BCG. *Vaccine* 2006; 24: 1593-1600.
 27. Sambandamurphy V, Derrick S, Hsu T, i in. *Mycobacterium tuberculosis* Δ RD1 Δ panCD: A safe and limited replicating mutant strain that protects immunocomponent and immunocompromised mice against experimental tuberculosis. *Vaccine* 2006; 24: 6309-6320.
 28. Davila J, Zhang L, Marrs C, Riza Durmaz R, i in. Assessment of the Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* *esxA*, *esxH*, and *fbpB* Genes among Clinical Isolates and Its Implication for the Future Immunization by new tuberculosis subunit vaccines Ag85B-ESAT and Ag85B-TB10.4. *J Biomed and Biotechnol* 2010; 2010:208371.

Otrzymano: 11.07.2011 r.

Zaakceptowano do druku: 12.09.2011 r.

Adres do korespondencji:

Wiesława Janaszek-Seydlitz
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego –
Państwowy Zakład Higieny
Zakład Badania Surowic i Szczepionek
00-791 Warszawa, Chocimska 24
Tel/fax: 22 54 21 368
e-mail: wjanaszek@pzh.gov.pl