

Praktická úloha č. 1

Príprava a charakterizácia vakcíny proti baktérii *Haemophilus influenzae*

Potrebné pomôcky : pero, kalkulačka, papier na pomocné výpočty, odpovedný hárak

Teoretický úvod

Hemofily (*Haemophilus influenzae*) sú gram-negatívne fakultatívne anaeróbne patogénne baktérie. Sú jedným z najčastejších pôvodcov infekcií horných a dolných dýchacích ciest u ľudí. Najrizikovejšou skupinou postihnutou týmito ochoreniami sú malé deti do 5 rokov ako aj staršia populácia nad 65 rokov. Ochorenia spôsobené touto baktériou rozdeľujeme do dvoch základných skupín na základe závažnosti priebehu – neinvazívne a invazívne hemofilové infekcie. Kým neinvazívne sú menej závažné bez výrazných komplikácií (najčastejšie zápaly stredného ucha - otitídy, spojiviek - konjunktivitídy alebo prínosových dutín -sinusitídy), invazívne ochorenia sú spojené s priamym ohrozením života a potenciálnymi doživotnými komplikáciami po prekonaní infekcie (ide najčastejšie o bakteriémie, sepsy, pneumónie a meningitídy).

Keďže tieto baktérie predstavujú vážne ohrozenie života najmä u malých detí, hľadanie vhodnej liečby a prevencie je dôležitým aspektom ochrany pred týmito patogénmi. Jednou z potenciálnych ciest je antibiotická liečba. V súvislosti s narastajúcim využívaním antibiotík však dochádza aj k enormnému nárastu rezistencie na tieto liečivá a tie už neposkytujú dostatočnú kauzálnu liečbu. Preto sa najvhodnejšou cestou zdá byť prevencia a to práve pomocou vakcinácie.

Vašou dnešnou úlohou bude v teoretickej rovine postupovať krok po kroku celým procesom vývoja a charakterizácie vakcíny proti hemofilom presne tak ako by pri jej výskume postupovali vedecké tímy – prejdete si procesom nájdenia vhodného antigénu, pomocných látok, dávkovacích schém ako aj bezpečnostných a účinnostných štúdií. Držíme Vám prsty pri tejto neľahkej úlohe.

Svoje odpovede po vypracovaní teoreticko-praktickej časti zaznačte do odpovedového hárku, ktorý odovzdáte po skončení.

Teoreticko-praktické úlohy

Na základe prítomnosti puzdra rozdeľujeme hemofily na neopuzdrené a opuzdrené typy. Neopuzdrené typy sú vo všeobecnosti menej invazívne, s menej závažným priebehom ochorenia. Opuzdrené typy spôsobujú invazívnejšie ochorenia a častokrát sú schopné infikovať aj krvné riečisko (bakteriémia),

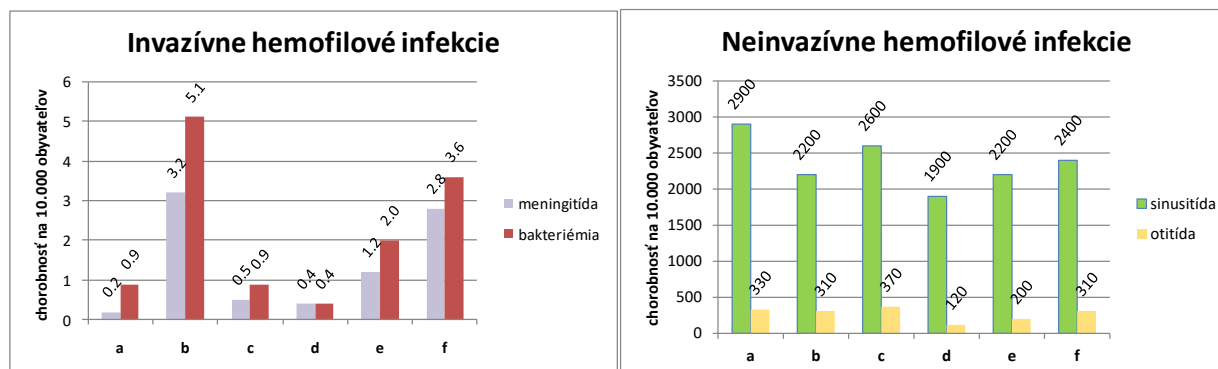
prípadne mozgovomiešnú tekutinu a mozgové obaly (meningitída), čoho výsledkom je život ohrozujúci stav a v mnohých prípadoch aj smrť.

1) Aký je hlavný význam bakteriálneho puzdra u patogénnych baktérií? Označte jednu správnu odpoveď.

- a) Mechanická podpora bunkovej steny
- b) Ochrana pred pôsobením hypotonického prostredia telových tekutín
- c) Ochrana pred pôsobením zložiek imunitného systému
- d) Zníženie priepustnosti oxidačných činidiel hostiteľského organizmu, ktoré poškadzujú bunkové štruktúry

Keďže opuzdrené typy spôsobujú vo všeobecnosti závažnejšie infekcie, rozhodli ste sa pripraviť vakcínu práve proti týmto hemofilom, ktorá bude podávaná najrizikovejšej skupine – novonarodeným deťom. Opuzdrené typy majú na povrchu puzdro zložené z polysacharidov rôzneho chemického zloženia, na základe čoho ich rozdeľujeme na 6 typov – a, b, c, d, e, f. V nasledujúcom grafe máte incidencie (výskyt) invazívnych a neinvazívnych hemofilových infekcií spôsobených jednotlivými opuzdrenými typmi.

2) Proti ktorému typu by bolo najvhodnejšie pripraviť vakcínu vzhľadom na dopad na ľudské zdravie a život?



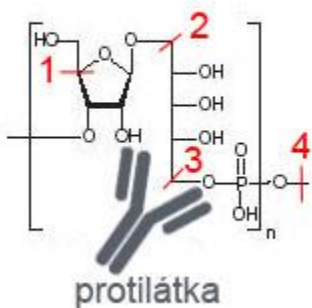
Potenciálne najnebezpečnejší typ určený na prípravu vakcíny je

Keďže opuzdrené typy majú na povrchu polysacharidové puzdro, cieľom pre aktiváciu imunitného systému by mali byť práve tieto antigény (antigén – molekula, ktorá je rozpoznávaná zložkami imunitného systému, v prípade vakcín najmä protilátkami). Na rozdiel od proteínových antigénov, však polysacharidové antigény (ako sú aj polysacharidy puzdra baktérií) nie sú schopné navodiť imunitnú odpoveď u malých detí do 2 rokov, preto by takéto priame použitie malo len malý alebo žiadny efekt u tejto rizikovej skupiny.

3) Ako by bolo možné obísť problém neimunogenity polysacharidov u malých detí (ide o spôsob bežne sa využívajúci vo vakcinologickej praxi)? Označte jednu správnu odpoveď.

- a) Spojenie polysacharidového antigénu s tzv. proteínovým nosičom, čo zabezpečí rozpoznanie bunkami imunitného systému
- b) Použitie vakcíny až u detí starších ako 2 roky
- c) Spojenie viacerých rovnakých kópií polysacharidových antigénov, čo vytvorí viac miest, ktoré môžu byť rozpoznané B-lymfocyty
- d) Pridanie molekulárnych stabilizátorov, ktoré zakonzervujú štruktúru polysacharidu, takže nemôže byť degradovaná pomocou amyláz

V nasledujúcom obrázku je zobrazená monomérna jednotka polysacharidu puzdra, proti ktorej bude vakcína stimulovať tvorbu protilátok. Ide o polyribosilribitolfosfát (PRP), ktorý sa v puzdre vyskytuje v polymérnej forme. Keďže pre prípravu vakcíny nám stačí len jeho monomérna forma, potrebujeme PRP izolovaný z baktérií naštiepiť na kratšie formy. Na obrázku vidíte v akom mieste budú zložky imunitného systému (B-lymfocyt pri vakcinácii a následne aj samotné produkované protilátky) rozpoznávať antigén puzdra baktérie. Sivou farbou je zobrazená protilátka, ktorá rozpoznáva antigén na dvoch miestach molekuly, ktoré sú vďaka priestorovej štruktúre monoméru vo vzdialenosti, ktorá je ideálna pre jej rozpoznanie. Obidve miesta sú nevyhnutné pre rozpoznanie antigénu.



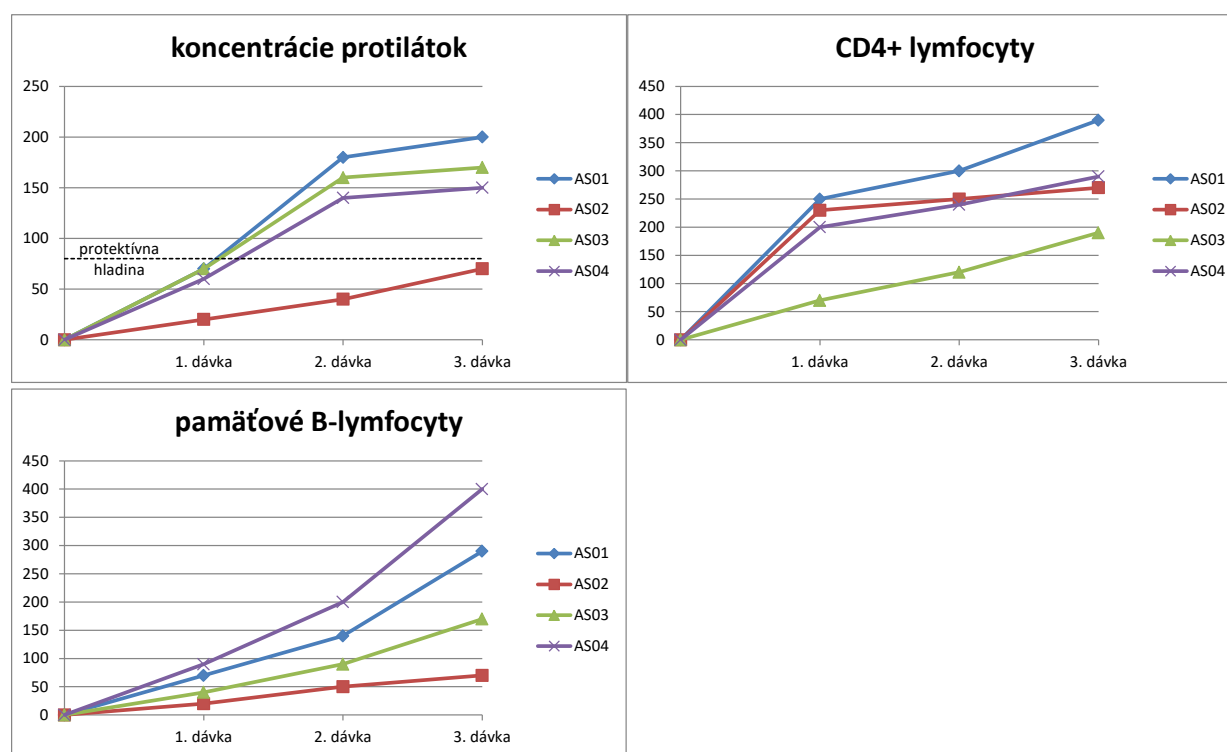
4) V akom mieste/miestach (miesta 1-4 na molekule monoméru zobrazené červenou farbou) by sme nemali štiepiť PRP, aby takéto štiepenie nemalo vplyv na rozpoznanie antigénu?

.....

Pri prvom strete imunitného systému s antigénom (či už obsiahnutým vo vakcíne alebo pri prirodzenej infekcii) dochádza k jeho spracovaniu pomocou antigén-prezentujúcej bunky (APC). APC bunka sa následne presúva do najbližšej lymfatickej uzliny, kde ho prezentuje na svojom povrchu pomocou špecifických receptorov, čo umožní aktiváciu CD4+ pomocných T-lymfocytov. V lymfatickej uzline sa nachádzajú aj neaktivované B-lymfocyty, ktoré po aktivácii produkujú protilátky rozpoznávajúce daný antigén. Aktivácia prebieha rozpoznaním antigénu pomocou receptorov na B-lymfocyte. Ak sa aktivácie zúčastňuje aj CD4+ T-lymfocyt, dochádza nielen k aktivácii samotného B-lymfocytu a produkcii

protilátok, ale ich produkcia pretrváva dlhodobo a vytvára sa tzv. imunitná pamäť, ktorá je zabezpečená vzniknutými pamäťovými B-lymfocyty. Aktivácia B-lymfocytu pomocou CD4+ buniek je teda nevyhnutným predpokladom pretrvávania imunity po vakcinácii vďaka pamäťovým B-lymfocytom, ktoré dlhodobo zabezpečujú ochranu pred daným patogénom. Množstvo pamäťových B-lymfocytov je teda dôležitým parametrom zachovania dlhodobej profylaxie (ochrany).

Aby bola imunitná odpoveď na vakcínu dostatočná, pridávajú sa k nim adjuvantné systémy, ktoré zabezpečujú dostatočné koncentrácie protilátok nad protektívnymi hladinami (protektívna hladina - minimálna koncentrácia protilátok poskytujúca ochranu pred daným ochorením), ale aj dlhodobú ochranu vďaka imunitnej pamäti. Nasledujúce grafy zobrazujú imunitnú odpoveď (koncentrácie protilátok, CD4+ aktivované lymfocyty a pamäťové B-lymfocyty) po 1., 2. a 3. dávke vakcíny proti hemofilom za použitia štyroch rozdielnych adjuvantných systémov (AS01-AS04).



5) Ktorý adjuvantný systém optimálne modifikuje imunitnú odpoveď po vakcinácii z hľadiska ochrany pred daným ochorením ako aj pretrvávania tejto ochrany, ktorá je esenciálna pre dlhodobú profylaxiu? Vyberte jeden.

Adjuvantný systém

Miesto aplikácie vakcíny výrazne ovplyvňuje typ imunitnej odpovede ako aj vznikajúcich protilátok. Kým aktivácia B-lymfocytov v lymfatických uzlinách drénujúcich lymfu prichádzajúcu zo slizníc spôsobuje preferenčne vznik slizničnej imunity a slizničných IgA protilátok, aktivácia B-lymfocytov v slezine alebo

lymfatických uzlinách kostrových svalov zabezpečuje vznik systémovej imunitnej odpovede a IgG protilátok.

6) Aké miesto a typ aplikácie by ste zvolili s ohľadom na ochranu pred najzávažnejšími hemofilovými infekciami? Označte jednu správnu odpoveď.

- a) Perorálne podanie – vakcína by sa podávala cez ústa v podobe kvapiek
- b) Pernasálne podanie – vakcína by sa podávala cez sliznicu nosa v podobe spreju
- c) Intramuskulárne podanie – vakcína by sa podávala injekčne do svalu
- d) Inhalačné podanie – vakcína by sa vdychovala a imunizovala cez respiračný epitel

Po stanovení zloženia a aplikácie vakcíny je nevyhnutným krokom dokázať jej bezpečnosť pre pacientov pomocou bezpečnostnej štúdie. Do štúdie ste zahrnuli 1000 novorodencov v každej sledovanej skupine, ktorým boli podané tri dávky. Sledujete výskyt jednotlivých typov nežiaducich účinkov po aplikácii s rôznymi imunogénnymi množstvami antigénu – 10, 20 a 30 µg. V nasledujúcej tabuľke je uvedený počet závažných nežiaducich účinkov v každej skupine ako aj incidenciu pre referenčnú (bežne používanú a dobre overenú) vakcínu. Vyššie množstvá antigénu sú vhodnejšie pre lepšiu imunitnú odpoveď organizmu, avšak môžu viesť k zvýšenému výskytu nežiaducich účinkov.

(Anafylaktická reakcia je hypersenzitívna reakcia organizmu na antigén alebo zložku vakcíny. Guillain-Barrého syndróm je väčšinou prechodná autoimunitná reakcia, kedy protilátky generované po vakcinácii spôsobujú poškodenie myelínovej pošvy neurónov)

	10 µg (n=1000)	20 µg (n=1000)	30 µg (n=1000)	Incidencia ref. vakcína
Teplota	457	475	584	1 : 2
Začervenanie	332	320	340	1 : 3
Opuch	105	109	139	1 : 10
Zápal kĺbového puzdra	0	0	1	1 : 1 500
Anafylaktická reakcia	1	2	1	1 : 2 500
Guillain-Barrého syndróm	0	1	2	1 : 10 000

7) Aké množstvo antigénu je ideálnejšie použiť vo vakcíne, aby nedochádzalo k zvýšeniu nežiaducich účinkov?

.....µg antigénu

Ďalším nevyhnutným krokom po stanovení zloženia vakcíny je určenie jej dopadu na výskyt ochorení, teda stanovenie jej účinnosti (schopnosti redukovať výskyt infekcií) pomocou klinickej štúdie. Nasledujúca tabuľka zobrazuje výskyt hemofilových infekcií pri troch rozdielnych očkovacích schémach (očkovacia schéma označuje odstup jednotlivých dávok v mesiacoch) ako aj kontrolnú skupinu, ktorá dostala irelevantnú trojdávkovú očkovaciu látku (bez hemofilového antigénu). V každej skupine bolo zahrnutých 3000 novorodencov.

	Schéma 0-1-2	Schéma 0-2-4	Schéma 0-3-6	Kontrolná skupina
Neinvazívne infekcie				
Sinusitídy	566	499	423	911
Otitídy	64	51	47	89
Invazívne infekcie				
Bakteriémie	2	1	1	7
Meningitídy	0	0	0	3

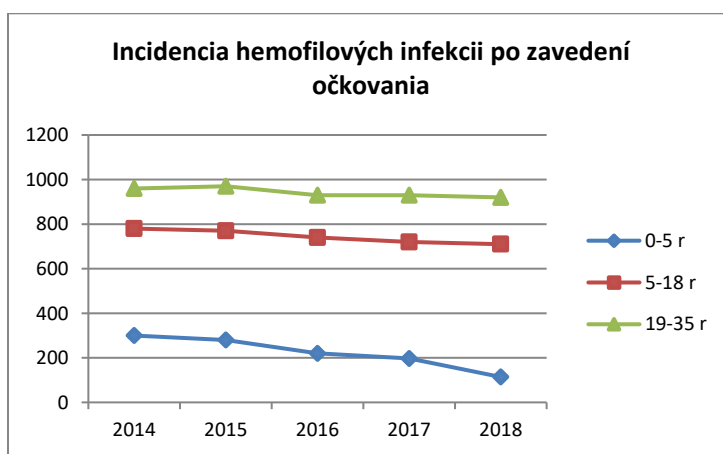
8) Vypočítajte celkovú účinnosť vakcíny (v percentách) pri jednotlivých očkovacích schémach pre invazívne aj neinvazívne hemofilové infekcie.

Určte, ktorá očkovacia schéma má najlepšiu účinnosť vzhľadom na dopad na ľudské zdravie a život.

	Schéma 0-1-2	Schéma 0-2-4	Schéma 0-3-6
Účinnosť na neinvazívne inf.			
Účinnosť na invazívne inf.			

Najlepšiu účinnosť má schéma

V nasledujúcom grafe vidíme zmenu incidencie hemofilových infekcií po zavedení očkovania u novorodencov vami stanovenou vakcínou a trojdávkovou očkovacou schémou. Očkovacia schéma bola prvý krát zavedená v rámci rutinného očkovania novorodencov v roku 2014. Graf zachytáva incidencie hemofilových infekcií v troch rozdielnych vekových skupinách.



Na grafe vidíme postupný pokles incidencie po zavedení očkovania od roku 2014 (kedy boli zaočkované prvé novonarodené deti) ako aj koreláciu medzi narastajúcou zaočkovanou kohortou a redukciou výskytu hemofilových infekcií vo vekovej skupine 0-5 ročných detí.

9) Ako je možné, že k redukcii hemofilových infekcií došlo aj vo vekových skupinách, ktoré neboli imunizované proti hemofilom (5-18 rokov a 19-35 rokov)?

.....

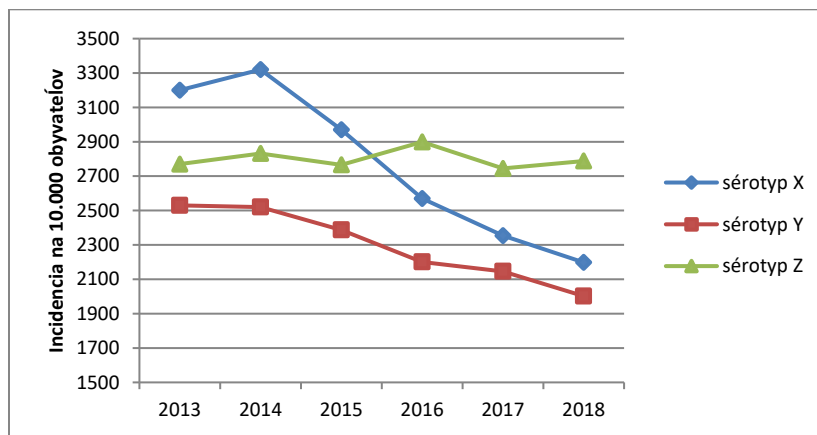
.....

.....

.....

V grafe nižšie vidíme incidenciu jednotlivých sérotypov hemofilových infekcií po zavedení očkovania u novorodencov v roku 2014 (ide o výskyt hemofilových sérotypov, ktoré označíme X, Y a Z, aby nedochádzalo k ovplyvňovaniu predchádzajúcich odpovedí). Vami dizajnovaná vakcína obsahuje antigén puzdra sérotypu X. Na základe týchto údajov označte, či je dané tvrdenie správne (S), nesprávne (N) alebo sa tvrdenie na základe poskytnutých údajov nedá potvrdiť ani vyvrátiť (X).

(Pozn.: v populácii nedochádzalo k vplyvu externých faktorov, ktoré by mohli meniť incidenciu jednotlivých sérotypov)



10) Odpovedzte na nasledujúce otázky S, N alebo X.

- a) Imunitná odpoveď vzniknutá po vakcinácii chráni pred sérotypom X aj Y
- b) Sérotyp Z je od roku 2016 najnebezpečnejším sérotypom v populácii
- c) Účinnosť vakcíny je najvyššia pri sérotype X
- d) Redukcia sérotypu X umožnila zvýšený výskyt sérotypu Z

Rokmi používania vakcíny v praxi sa ukázalo, že vo veľmi zriedkavých prípadoch (1 : 100 000) môže po niekoľkých dňoch po vakcinácii dôjsť k zápalu srdcového svalu. Ak by ste urobili analýzu takto postihnutého tkaniva, zistili by ste v ňom prítomnosť protilátok proti polysacharidovému puzdru hemofilov.

11) Aká je príčina takéhoto zápalu srdcového svalu po vakcinácii? Označte jednu správnu odpoveď.

- a) Protilátky vzniknuté po vakcinácii vo všeobecnosti rozpoznávajú nielen polysacharidové puzdro ale aj tkanivo srdcového svalu
- b) Zápal je spôsobený hypersenzitívnou reakciou, ide o tzv. anafylaktickú reakciu

- c) Enormne zvýšené hladiny C-reaktívneho proteínu (CRP) po imunizácii spôsobujú poškodenie neuro-muskulárnych platničiek srdcového svalu
- d) U pacienta sú prirodzené antigény v srdcovom tkanive rozdielne od tých, ktoré sú bežné u drvivšej väčšiny populácie, v dôsledku čoho majú podobnosť s antigénmi vo vakcíne

Protilátky vznikajúce po imunizácii chránia pred patogénmi spôsobujúcimi dané ochorenie rozpoznaním antigénu a následnou aktiváciou zložiek imunitného systému alebo neutralizáciou antigénov na povrchu patogénov samotným naviazaním na jeho povrch. V závislosti od dôsledku rozpoznania antigénu protilátkami na prežívanie baktérie rozdeľujeme protilátky na bakteristatické a baktericídne. Kým baktericídne spôsobujú elimináciu patogénu, tie bakteristatické len utlmujú ich množenie.

12) Označte či dané tvrdenie platí pre baktericídne (C) alebo bakteristatické protilátky (S).

- a) koncentrácia protilátok nad protektívnu hladinou môže viesť k nosičstvu ochorenia
- b) rozpoznanie antigénu protilátkou aktivuje komplementový systém
- c) protilátka rozpoznáva receptor na povrchu baktérie, ktorý je dôležitý pre vytvorenie biofilmu
- d) protilátka po naviazaní interaguje s receptorom na makrofágoch

ODPOVEDE PREPÍŠTE DO ODPOVEĎOVÉHO HÁRKU, KTORÝ ODOVZDÁTE PO SKONČENÍ.

ODPOVEĎOVÝ HÁROK

otázka 1	a)	b)	c)	d)		
otázka 2	a	b	c	d	e	f
otázka 3	a)	b)	c)	d)		
otázka 4	1	2	3	4		
otázka 5	AS01	AS02	AS03	AS04		
otázka 6	a)	b)	c)	d)		
otázka 7	10 µg	20 µg	30 µg			
otázka 8				0-1-2	0-2-4	0-3-6
	Účinnosť na invazívne inf.					
	Účinnosť na neinvazívne inf.					
	Najlepšiu účinnosť má schéma:					
otázka 9						
otázka 10	a)	b)	c)	d)		
otázka 11	a)	b)	c)	d)		
otázka 12	a)	b)	c)	d)		

Autor: Mgr. Tomáš Augustín

Recenzia: Mgr. Zuzana Dzirbíková, PhD.