

# Využití atenuovaných virů

**Atenuované viry** se využívají jako **očkovací látky**. Jde o nejstarší a velmi účinný způsob vakcinace. I jejich objevení souvisí s hledáním účinné prevence proti dříve velmi rozšířeným a smrtelným onemocněním, z nichž některá v dnešní době byla již zcela eradikována celosvětově, vymýcena ve vyspělých zemích nebo alespoň byl snížen jejich výskyt a úmrtnost.

Používání živých, byť oslabených, virů s sebou přináší určitá **rizika**. Největším z nich je možnost *reverze*, tj. návrat k virulenci a vznik onemocnění. Zároveň jsou i vyšší nároky na skladování očkovacích látek, neboť porušení chladového řetězce může vést ke ztrátě antigenních vlastností. V dnešní době probíhá několik vědeckých studií, které se snaží pomocí kontroly replikace a virulence navrhnout způsob výroby bezpečnějších vakcín, které by mohly například pomoci v eradikaci viru poliomyelitidy.

## Historie použití

První vakcinace atenuovaným virem rodu *Vaccinia*, původce kravských **neštovic**, byla provedena v roce 1796 Edwardem Jennerem jako obrana proti viru varioly, původci pravých neštovic. Díky agresivní očkovací kampani se podařilo v roce 1980 pravé neštovice eradikovat. Dnes se již proti neštovicím rutinně neočkuje. Virus pravých neštovic však zůstává dostupný v některých laboratořích, což vzbuzuje obavy z možného využití k bioterorismu.

Dalším úspěchem ve válce proti virovým onemocněním bylo použití **Sabinovy vakcíny** proti **poliomyelitidě**. Vakcína obsahuje 3 oslabené kmeny označované 1, 2, 3 a podává se orálně (OPV, *oral polio vaccine*). Kromě této živé atenuované vakcíny existuje i **Salkova vakcína** obsahující usmrcené viry, která se podává injekčně (IPV); ta však nevyvolává slizniční střevní imunitu. Dítě očkované IPV je sice chráněno před onemocněním, může však virus poliomyelitidy předávat dál, přijde-li s ním do styku.

Výhodou **OPV** je navození silnější imunitní reakce již po první dávce. Očkovaný také vylučuje oslabené viry ve stolici, což může vyvolat imunitní odpověď u neočkovaných osob, které se s ním setkávají. Použití OPV s sebou ovšem nese riziko mutace a reverze atenuovaného viru, a tedy rozvoj nemoci u očkovaných. Podle WHO onemocní v důsledku očkování kolem 60 dětí ročně<sup>[1]</sup>, které mohou šířit mutovaný virus dále na neočkované. Největší výskyt poliomyelitidy způsobené vakcinačním kmenem se vyskytl v roce 2005 v Nigerii a virus stále koluje. I přes tyto ojedinělé případy se ve vyspělých zemích povedlo poliomyelitidu eradikovat a zůstávají jen tři endemické oblasti výskytu – Afghánistán, Nigérie a Pákistán. Celosvětově bylo evidováno 650 nakažených za rok 2011 a 223 nakažených v roce 2012<sup>[2]</sup>.

Globální kampaň pod záštitou **WHO** na eradikaci viru poliomyelitidy začala v roce 1988, její ukončení se původně plánovalo do r. 2000. Cíle však stále nebylo dosaženo. Podařilo se vymýtit divoký virus typu 2, problémem ale zůstávají infekce virem odvozeným od očkování (VDPV, *vaccine-derived poliovirus*). V 90 % jde o reverzí vzniklý virus typu 2. Možným řešením je vyřazení typu 2 z orální vakcíny a zavedení současné vakcinace Salkovou vakcínou, která chrání proti všem třem typům, jde však o finančně nákladný postup. Ve vyspělých zemích se přechází na očkování neživými viry (IPV), které se používá u nás od roku 2007, v USA od roku 2000.

## Výhledy do budoucna

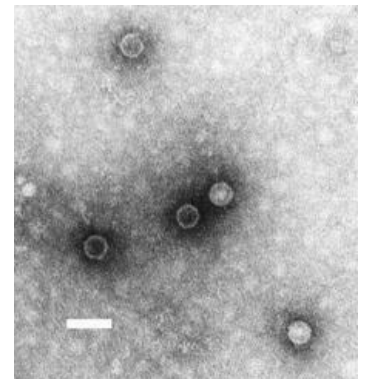
Tradiční způsob atenuace virů opakovaným pasážováním na buněčných kulturách za suboptimálních podmínek s sebou přináší určitá rizika a vědecké týmy se pokouší nalézt způsoby, jak získat nepatogenní kmen se zachovanou imunogenitou racionálním způsobem. Díky hlubšímu porozumění molekulární podstaty virů, zejména objevem genů asociovaných s patogenitou a imunogenitou, se rysují možné cesty pro získání bezpečnějších vakcín. Výzkumy jsou však stále prováděny na zvířecích modelech a možné použití v humánní medicíně zatím nemá bližší časový horizont.

Nejslibnější se jeví 4 nové metody:

- zvýšení přesnosti replikace,
- deoptimizace kodonů,
- využití miRNA,
- použití nukleáz s motivy zinkových prstů.

Vysoká frekvence mutací u RNA virů je způsobena z velké části velkou chybovostí virové RNA polymerázy, která je přibližně **0,1-10 mutací/replikaci genomu** o cca 10 000 nukleotidů, což je o několik řádů více než u DNA virů. Tato skutečnost umožňuje velmi rychlou evoluci a adaptaci a díky tomu snížení chybovosti polymerázy sníží diversitu populace a vede ve zvířecím modelu k atenuaci.

Tým z Kalifornské Univerzity v San Francisku pod vedením M. Vignuzzi<sup>[3]</sup> prováděl testy na polymeráze viru poliomyelitidy a pomocí *ribavirinu*, analogu nukleotidových bazí. Bylo zjištěno, že varianty polymerázy s mutacemi v 64. aminokyselině v řetězci, která hraje klíčovou roli v kontrole zařazených aminokyselin během přepisu, jsou



Poliovirus (negativně barvený preparát z buněčné kultury; transmisivní elektronová mikroskopie; měřítko má délku 50 nm)

rezistentní i k vysokým koncentracím tohoto analogu. Nízkou chybovost, korelující s rezistencí k ribavirinu, vykazují varianty s 6 možnými aminokyselinami na pozici 64 – glycin, valin, alanin, serin, threonin a leucin.

Při testování vykazovaly varianty se změnou v pozici 64 snížený výskyt mutací během přepisu (wild type – 5,32/genom, pozice 64 – podle AK 2,15–2,96) a i po delším pasážování vykazovaly virové kmeny s mutací **sníženou diversitu populace**. Mutace v pozici 64 jsou tedy stabilní. Snížená diversita populace viru výrazně snižuje patogenitu a varianty se sníženou chybovostí jsou silně atenuované a nedovolí rozvoj infekce v centrálním nervovém systému myši, ale neovlivní replikaci v jiných tkáních a tím umožní rozvoj imunitní reakce<sup>[4]</sup>.

Výše popsany postup by bylo možné aplikovat na další *picornaviry*, ale u dalších RNA virů je potřeba nejdříve určit klíčové aminokyselinové zbytky, jejichž nahrazení by vedlo ke snížení chybovosti polymerázy. V září roku 2011 byla publikována studie vědců z Institut Pasteur v Paříži pod vedením Lark L. Coffey<sup>[5]</sup>, ve které popisují úspěšnou atenuaci arboviru *viru chikungunya* (CHIKV) díky záměně jedné AK v řetězci polymerázy, která vede ke snížení chybovosti, procentuálně srovnatelné se studií na polioviru. Experiment byl proveden na **přirozeném modelu infekce** – přenos z komára na obratlovce, myš, která přirozeně exprimuje receptory pro tento virus. Autoři dále předpokládají, že obdobných výsledků by šlo dosáhnout i u jiných arbovirů a mohly by vést k vývoji geneticky stabilních vakcín a u CHIKV tak zabránit milionům infekcí lidí ročně.

Další nové metody umožňují získání atenuovaných kmenů díky vložení **synonymních kodonů** do genomu, které jsou však hostitelskou buňkou méně preferované, čímž se prodlouží doba translace a vznikne menší množství virových potomků – virus je silně atenuovaný bez dopadu na imunogenicitu a geneticky stabilní.

Vložení sekvenční vázající specifickou miRNA do genomu viru lze zastavit translaci určitého genu nebo celého genomu díky navázání komplementární miRNA exprimované hostitelskou buňkou. Tento princip je **normální regulační cestou**, kterou buňka reguluje genovou produkci, ale v jeho využití k atenuaci naráží na problémy, že inzertovaná miRNA sekvenční je přepisována jen v určitých tkáních a může akumulovat mutace.

Jiná metoda využívá *zinkové prsty*, specifické domény vážící se na DNA, které mohou sloužit jako negativní transkripční faktory nebo fúzí s nukleázou mohou štěpit specifický úsek virové DNA. Jejich využití je omezeno na neintegrující se DNA viry, jelikož excize integrované virové DNA by mohla vést k chromozomovým zlomům hostitelské DNA.

## Použití atenuovaných vakcín v ČR

V naší zemi je podle platné legislativy **povinné očkování**, využívající živé oslabené viry, proti spalničkám, zarděnkám a příušnicím, dříve i proti dětské obrně. Doporučené, ale nepovinné jsou vakcíny proti planým neštovicím a průjemovým onemocněním způsobených rotaviry.

Od roku 2006 je u nás dostupná vakcína proti viru Herpes zoster, doporučená pro jedince starší 50 let, která snižuje incidenci pásového oparu o 50 % oproti skupině, které bylo podáno placebo.

Vakcína proti žluté zimnici je povinná při cestování do endemických oblastí, zemí vyžadujících mezinárodní očkovací průkaz a pro osoby manipulující s infekčním materiálem.

## Odkazy

### Související články

- Poliomyelitis anterior acuta
- Pravidelné očkování v Česku
- Členění očkování v Česku
- Aktivní imunizace

### Reference

1. The Global Polio Eradication Initiative. *Circulating vaccine-derived poliovirus (cVDPV) 2000-2013* [online]. ©2010. Poslední revize 2013-02-26, [cit. 2013-03-06]. <<http://polioeradication.org/Dataandmonitoring/Poliothisweek/Circulatingvaccinederivedpoliovirus.aspx>>.
2. The Global Polio Eradication Initiative. *Polio this week - As of 24 April 2013* [online]. ©2010. [cit. 2013-04-30]. <<http://polioeradication.org/polio-today/polio-now/>>.
3. VIGNUZZI, Marco, Emily WENDT a Raul ANDINO. Engineering attenuated virus vaccines by controlling replication fidelity. *Nature Medicine* [online]. 2/2008, roč. 14, s. 154-16, dostupné také z <<http://www.nature.com/articles/doi:10.1038/nm1726>>. ISSN 1078-8956.
4. LAURING, Adam S., Jeremy O. JONES a Raul ANDINO. Rationalizing the development of live attenuated virus vaccines. *Nature Biotechnology* [online]. 6/2010, roč. 28, s. 573-579, dostupné také z <<http://www.nature.com/articles/doi:10.1038/nbt.1635>>. ISSN 1087-0156.
5. COFFEY, L. L., Y. BEEHARRY a A. V. BORDERIA. Arbovirus high fidelity variant loses fitness in mosquitoes and mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 38/2011, roč. 108, s. 16038-16043, dostupné také z <<http://www.pnas.org/content/108/38/16038>>. ISSN 0027-8424.

### Použitá literatura

- BERAN, Jiří a Jiří HAVLÍK. *Lexikon očkování*. 1. vydání. Praha : Maxdorf, 2008. 352 s. ISBN 978-80-7345-164-6.
- BRANSWELL, Helen. Polio's Last Act. *Scientific American* [online]. 4/2012, roč. 306, s. 60-65, dostupné také z <<http://www.nature.com/articles/doi:10.1038/scientificamerican0412-60>>. ISSN 0036-8733.
- COFFEY, L. L., Y. BEEHARRY a A. V. BORDERIA. Arbovirus high fidelity variant loses fitness in mosquitoes and mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 38/2011, roč. 108, s. 16038-16043, dostupné také z <<http://www.pnas.org/content/108/38/16038>>. ISSN 0027-8424.
- LAURING, Adam S., Jeremy O. JONES a Raul ANDINO. Rationalizing the development of live attenuated virus vaccines. *Nature Biotechnology* [online]. 6/2010, roč. 28, s. 573-579, dostupné také z <<http://www.nature.com/articles/doi:10.1038/nbt.1635>>. ISSN 1087-0156.
- VIGNUZZI, Marco, Emily WENDT a Raul ANDINO. Engineering attenuated virus vaccines by controlling replication fidelity. *Nature Medicine* [online]. 2/2008, roč. 14, s. 154-16, dostupné také z <<http://www.nature.com/articles/doi:10.1038/nm1726>>. ISSN 1078-8956.
- BIO Ventures for Global Health. *Live attenuated vaccines* [online]. [cit. 2013-04-30]. <<https://bvgh.org/Biopharmaceutical-Solutions/Global-Health-Primer/Targets/cid/ViewDetails/ItemID/6.aspx>>.
- Centers for Disease Control and Prevention. *Vaccinia Virus Infections in Martial Arts Gym, Maryland, USA, 2008* [online]. [cit. 2013-04-30]. <[https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/4/10-1010\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/4/10-1010_article)>.
- Centers for Disease Control and Prevention. *Polio Disease - Questions and Answers* [online]. [cit. 2013-04-30]. <<https://www.cdc.gov/vaccines/vpd-vac/polio/dis-faqs.htm>>.
- Irish Pharmaceutical Healthcare Association. *Vaccines History* [online]. [cit. 2013-04-30]. <<https://www.ipha.ie/alist/vaccines-historical-timeline.aspx>>.
- olecich.cz. *Očkovací kalendář* [online]. [cit. 2013-04-30]. <[http://www.olecich.cz/modules/vaccine/vaccine.php?tab=def\\_age&category=childhood](http://www.olecich.cz/modules/vaccine/vaccine.php?tab=def_age&category=childhood)>.
- The Global Polio Eradication Initiative. *Polio this week - As of 24 April 2013* [online]. [cit. 2013-04-30]. <<http://polioeradication.org/polio-today/polio-now/>>.
- The Global Polio Eradication Initiative. *Circulating vaccine-derived poliovirus* [online]. [cit. 2013-04-30]. <<http://polioeradication.org/Dataandmonitoring/Poliothisweek/Circulatingvaccinederivedpoliovirus.aspx>>.
- Bulletin of the World Health Organization. *Ending polio, one type at a time* [online]. [cit. 2013-04-30]. <<http://www.who.int/bulletin/volumes/90/7/12-020712/en/>>.