

Masarykova univerzita v Brně

Lékařská fakulta

**PŘÍČINY VYSOKÉ MORTALITY MALÁRIE
V NEENDEMICKÝCH OBLASTECH**

Bakalářská práce

v oboru zdravotní laborant

Vedoucí bakalářské práce:

Doc. MUDr. Rastislav Maďar, Ph.D.

Autor:

Gabriela Dutková

Brno, duben 2010

Jméno a příjmení autora: Gabriela Dutková

Název bakalářské práce: Příčiny vysoké mortality malárie v neendemických oblastech

Pracoviště: Očkovací centrum Ostrava- Hrabůvka

Vedoucí bakalářské práce: Doc. MUDr. Rastislav Maďar, Ph.D.

Rok obhajoby bakalářské práce: 2010

Souhrn: Malárie představuje smrtelné nebezpečí pro lidi pocházející z endemických i neendemických oblastí. Onemocnění způsobuje krevní parazit plasmodium, jehož přenašečem je komár rodu *Anopheles*. Malarický parazit prochází několika vývojovými stádii a imunitní systém člověka není schopen na variabilitu parazita reagovat. Existují velmi účinná profylaktická opatření. Řešením v ochraně proti malárii by mohla být vakcína. Několik kandidátních vakcín se nachází v různých stádiích klinických zkoušek. Praktická část je věnována konkrétně vývoji třech vakcín: RTS,S, ICGEB PvRII a Sanaria PfSPZ. Největší naděje jsou do budoucna vkládány do vakcíny RTS,S. V závěrečné diskusi se autorka snaží objasnit příčiny vysoké mortality malárie v neendemických oblastech a hodnotí možný přínos jednotlivých kandidátních vakcín pro budoucnost.

Klíčová slova: Plasmodium, malárie, vakcína, profylaxe

Souhlasím, aby práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. MUDr. Rastislava Maďara, Ph.D. a uvedla v seznamu literatury všechny použité literární a odborné zdroje.

V Brně dne.....

.....

(vlastnoruční podpis autora)

Autorka by velmi ráda touto cestou poděkovala Doc. MUDr. Rastislavu Maďarovi, Ph.D. za vedení této bakalářské práce. Jeho cenné rady, připomínky, znalosti a bohaté zkušenosti byly pro práci obrovským přínosem. Díky ochotě pana docenta vést tuto práci, bylo autorce umožněno zpracovávat malarické téma, které je nevšední, ale velmi zajímavé.

Obsah

1. Úvod	9
2. Materiály a metody k praktické části	10
2.1. Úvod do praktické části	10
2.2. Materiály a metody	10
3. Teoretická část	11
3.1. Historie poznávání nemoci	11
3.2. Výskyt malárie	12
3.2.1. Zóna A	12
3.2.2. Zóna B	12
3.2.3. Zóna C	13
3.3. Riziko malárie pro cestovatele	13
3.4. Letištní malárie	14
3.5. Malarický parazit	14
3.5.1. Obecná charakteristika parazita	14
3.5.2. Erytrocyt jako hostitelská buňka	15
3.5.3. Vývojová stádia parazita	16
3.5.3.1. Exoerytrocytární stádium	16
3.5.3.2. Erytrocytární stádium	17
3.5.3.2.1. Nepohlavní stádium	17
3.5.3.2.2. Pohlavní stádium	18
3.5.4. Přenašeči plasmodií	18
3.5.5. Komár rodu <i>Anopheles</i>	19
3.5.6. Obranné mechanismy komára	20
3.5.7. Mechanismus sání komára	20
3.5.8. Původci onemocnění	21
3.5.8.1. <i>Plasmodium falciparum</i>	21

3.5.8.2. <i>Plasmodium vivax</i>	22
3.5.8.3. <i>Plasmodium ovale</i>	22
3.5.8.4. <i>Plasmodium malariae</i>	22
3.5.9. Změny v genetické výbavě komára	23
3.6. Klinický obraz onemocnění	24
3.7. Inkubační doba.....	24
3.8. Vnímavost hostitele	25
3.9. Rezistence na malárii	25
3.9.1. Rezistence na léky	25
3.9.2. Rezistence a krevní poruchy	26
3.9.2.1. Hereditární eliptocytóza.....	26
3.9.2.2. Deficit glukozo-6-fosfátdehydrogenázy	27
3.9.2.3. Srpkovitá anémie	27
3.9.2.4. Hemoglobinopatie C	27
3.9.2.5. Talasémie	28
3.10. Laboratorní diagnostika	28
3.10.1. Mikroskopické vyšetření krve	28
3.10.2. Další možnosti detekce parazita	30
3.11. Antimalarická profylaxe	31
3.11.1. Dezinsekční látky.....	31
3.11.2. Moskytiéry	32
3.11.3. Antimalarika	32
3.11.3.1. Chlorochin	33
3.11.3.2. Atovaquon/proguanil	33
3.11.3.3. Doxycyklin.....	34
3.11.3.4. Meflochin.....	34
3.11.3.5. Primaquin.....	35
3.11.4. Fyzická bariéra.....	35

3.11.5. Alternativní boj proti malárii	36
4. Praktická část.....	37
4.1. Úvod do problematiky antimalarických vakcín.....	37
4.2. Překážky ve vývoji vakcín.....	37
4.3. Požadavky na ideální vakcínu.....	38
4.4. Fáze klinických studií	38
4.4.1. Klinické pokusy- fáze 1	39
4.4.2. Klinické pokusy- fáze 2	39
4.4.3. Klinické pokusy- fáze 3	39
4.4.4. Klinické pokusy- fáze 4	40
4.5. Typy antimalarických vakcín.....	40
4.5.1. Pre-erytrocytární vakcína.....	40
4.5.1.1. Vakcíny odvozené z CSP, fúzované s povrchovým antigenem hepatitidy B.....	41
4.5.1.2. Vakcíny odvozené z CSP, formulované s Montanide ISA 720.....	41
4.5.1.3. Alternativní přístup k syntetickým vakcínám.....	41
4.5.1.4. Živé rekombinantní vakcíny	42
4.5.1.5. Vakcíny zahrnující jaterní antigeny.....	42
4.5.1.6. SPf66 kandidátní vakcína	42
4.5.2. Erytrocytární vakcína.....	42
4.5.2.1. Vakcíny užívající komplex uplatňující se při invazi erytrocytů.....	43
4.5.2.2. Vakcíny využívající MSP-1.....	43
4.5.2.3. Bi-alelová kombinace AMA-1.....	43
4.5.2.4. Vakcína užívající MSP-1/AMA-1 fúzní antigen	44
4.5.2.5. LSP vakcína založená na GLURP	44
4.5.3. Vakcíny blokující přenos a MSP-3	44
4.5.3.1. Vakcíny indukující tvorbu protilátek.....	44
4.5.3.2. Vakcíny užívající oslabených organismů	45
4.5.3.3. Kombinované vakcíny	45

4.5.3.4. Vakcíny využívající glycosyl phosphatidyl inositol.....	45
4.6. Adjuvancia.....	46
4.7. Kandidátní vakcíny ve vývoji.....	46
4.7.1. RTS,S AS01/AS02.....	46
4.7.2. ICGEB PvRII.....	49
4.7.3. Sanaria PfSPZ.....	51
5. Diskuze.....	53
6. Seznam zkratek.....	56
7. Seznam použité literatury.....	59

1. Úvod

Malárie patří mezi nejzávažnější infekce, které se nedaří úspěšně zvládnout a v současnosti malárie ohrožuje 40% světové populace. Nejvíce postiženi jsou především lidé v nejchudších oblastech tropů a subtropů, kdy devadesát procent úmrtí připadne na subsaharskou Afriku. Každým rokem onemocní přibližně 300-500 milionů osob a z toho asi 2,5 až 3,5 milionů lidí umírá. Přesto, že se malárie nevyskytuje v Evropě endemicky, každoročně se nakazí přibližně 12 000 lidí, z nichž asi 1-3% umírá. Malárie v Evropě je téměř výhradně onemocněním importovaným a patří mezi nejzávažnější importované horečnaté onemocnění v Evropě. Z celosvětové populace patří mezi nejohroženější skupiny těhotné ženy, prvorodičky a zejména děti mladší pěti let, kdy každých 40 vteřin zemře podle odhadů 1 dítě (Nohýnková E., Stejskal F., 2005).

Všechny tyto skutečnosti autorku přivedly k myšlence, věnovat se tomuto tématu trochu podrobněji. Práce je koncipována do dvou hlavních částí. V teoretické části představuje autorka malarického parazita ve všech jeho ohledech, dále se věnuje průběhu onemocnění a dalším charakteristikám. V praktické části se autorka věnuje vývoji antimalarických vakcín. Cílem práce je zhodnotit stav vývoje antimalarických vakcín a zhodnotit priority jednotlivých typů vakcín.

2. Materiály a metody k praktické části

2.1 Úvod do praktické části

Momentálně patří mezi nejjistější formu ochrany proti malárii chemoprofylaxe. Preventivní užívání tablet však velké množství lidí z obav před vedlejšími účinky odmítá, proto malárie ročně usmrtí stovky Evropanů. Vývoj účinné a bezpečné vakcíny by zachránil životy mnoha lidí i v neendemických oblastech. Cena antimalarické profylaxe (Lariam, Malarone) je navíc vysoká a možnost užívání časově omezená.

2.2 Materiály a metody

V praktické části je shrnuto vše o typických klinických fázích výzkumu antimalarických vakcín, výzkum a preklinický vývoj zahrnuje identifikaci relevantních antigenů, vytvoření konceptu vakcíny, vedení preklinického cenového ohodnocení a vyrábění vakcíny ve výrobním procesu.

Práce je analýzou odborných materiálů ze zdrojů uvedených v seznamu použité literatury č.5, 8, 15, 17, 19, 22, 25-31.

3. Teoretická část

3.1. Historie poznávání nemoci

Kolem 8000 př. n. l. - toto období je podle antropologů označováno jako počátek vzniku agresivního typu malárie.

Kolem 2000 př. n. l. – v kostech obyvatel východního Středomoří byly nalezeny důkazy o onemocnění srpkovité anémie, jejímiž příznaky jsou rozšířené dutiny dlouhých kostí. Tyto nálezy velkého množství poruch v populaci ukazují na předchozí značný výskyt malárie.

Kolem 400 př. n. l. – Hypokrates popsal malárii a rozdělil ji na denní, třídenní a čtyřdenní.

Kolem 1500 n. l. – Evropští osadníci a otroci zavlekli malárii na americký kontinent.

Kolem r. 1630 – přivezli do Evropy středoameričtí indiáni kůru chininovníku, kterou domorodci léčili různé nemoci a používali ji jako antimalarikum.

Druhá polovina 17. Století – Giovanni Maria Lancisi pojmenoval malárii a toto pojmenování vycházelo ze složení italských výrazů „mal“ a „aire“, tedy „špatný vzduch“. Domníval se, že malárie vzniká působením jedovatých plynů z tropických močálů, proto jméno malárie.

R. 1880 – Charles Louis Alphonse Laveran objevil původce malárie, kterým je krevní parazit plasmodium.

Asi r. 1882 – poprvé byla oficiálně vyslovena hypotéza o přenosu malárie moskytem.

R. 1898 – Giovanni Batista Grassi prokázal, že malárii přenášejí moskyti z rodu *Anopheles*.

R. 1907 – Charles Louis Alphonse Laveran získal za svůj objev původce malárie Nobelovu cenu za medicínu

Kolem r. 1950 – počátek cíleného decimování moskytů intenzivními postřiky DDT.

R. 1970 – z důvodu negativního dopadu na životní prostředí i obyvatele v místě použití, bylo DDT zakázáno.

www.czechnationalteam.cz/rservice.php?akce=tisk&cisloclanku=2006120001).

3.2. Výskyt malárie

Malárie se vyskytuje v rozsáhlých oblastech Centrální a Jižní Ameriky, v Dominikánské republice, Haiti, subsaharské Africe, Asii (včetně Jižní, Jihovýchodní Asie a na Středním Východě) a Jižním Pacifiku. Odhad rizika pro cestovatele se podstatně liší v závislosti na oblasti. Tato variabilita je dána intenzitou přenosu malárie v různých regionech a trasou, časem a typem cestování (Arguin P. M., Kozarsky P. E., Reed Ch., 2008). WHO rozděluje malarické oblasti do 3 zón:

3.2.1. Zóna A

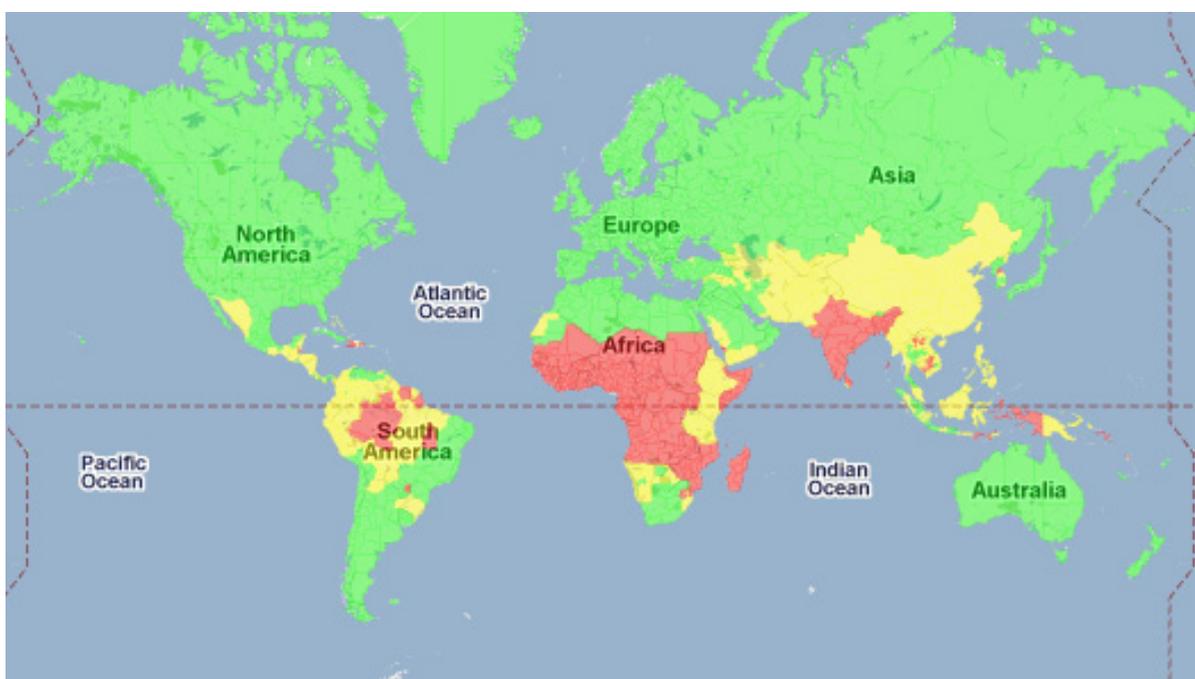
Zde patří oblasti výskytu malárie, kde je riziko infekce nízké nebo sezónní a *P. falciparum* se buď nevyskytuje (severní Afrika, Turecko, Irák, západní Írán, Korejský poloostrov a severní Čína, hraniční oblasti Argentiny, Paraguaye a Bolívie), nebo si zachovává citlivost k chlorochinu (střední Amerika na sever od Panamského průplavu, Haiti a Dominikánská republika). Po tuto zónu je k chemoprophylaxi chlorochin (Delagil) doporučován. Tam, kde je riziko příliš nízké, se profylaxe ani nedoporučuje. Cestovatele je možné vybavit antimalariky k pohotovostní léčbě.

3.2.2. Zóna B

Zde patří Jemen, jih Saudské Arábie, východ Íránu, Afgánistán, Pákistán, Indie (mimo severovýchodní oblasti), Malajsie, Filipíny a většina ostrovů Indonésie (kromě Papua Nová Guinea), zahrnuje oblasti s celoročním výskytem malárie, ale s převahou nálezů *P. vivax*. Profylakticky se kombinuje chlorochin jedenkrát týdně s proguanilem, který se bere denně. Vzhledem k narůstající resistenci se ale i do těchto oblastí stále častěji doporučuje Malarone či meflochin (Lariam).

3.2.3. Zóna C

Tyto oblasti jsou pro cestovatele nejrizikovější. Zahrnuje subsaharskou Afriku (včetně severu Jihoafrické republiky, Namibie a Zimbabwe), většinu malarických oblastí Jižní Ameriky, zvláště Amazonii, jihovýchodní Asii Papua Novou Guineu, pacifické Šalamounovy ostrovy a Vanuatu. K profylaxi lze doporučit Lariam či Malarone, jež má méně nežadoucích účinků. Při cestě do hraničních oblastí severovýchodního Thajska, Myanmaru (Barma), Kambodži a Laosu, kde se vyskytuje multirezistentní *P. falciparum* bývá doporučován doxycyklin nebo Malarone (Nohýnková E., Stejskal F., 2005).



Obr. č.1: červená- malárie na celém území, žlutá- variabilní přítomnost malárie

zelená- oblasti prosté malárie

zdroj: <http://cdc-malaria.ncsa.uiuc.edu/>

3.3. Riziko malárie pro cestovatele

Odhad rizika nákazy pro různé cestovatele je obtížný. Riziko se dokonce může podstatně lišit, u osob, které cestují nebo dočasně pobývají ve stejných oblastech země. Například cestovatelé ubytováni v klimatizovaných hotelích mohou být vystaveni menšímu riziku, než

dobrodružní cestovatelé. Obdobně rezidenti dlouhodobě žijící v zastíněných a klimatizovaných domech jsou méně často exponováni, než osoby žijící bez takového komfortu, například pracovníci Červeného kříže, dobrovolníci. Cestovatelé by si také měli uvědomit, že i když dříve prodělali malárii, mohou jí opět onemocnět, a proto jsou preventivní opatření stále nutná (Arguin P. M., Kozarsky P. E., Reed Ch., 2008).

3.4. Letištní malárie

K přenosu malárie může dojít také v oblasti velkých mezinárodních letišť a mohou se nakazit lidé, kteří nikdy malarickou oblast nenavštívili. Jde o to, že komár, který se dostane do prostoru letadla, například do míst pro zasunutí podvozku, je schopen přežít i velmi nízké teploty a zachovává si svou schopnost nakazit člověka. Pokud opustí cestující během mezipřistání prostory letadla, mohou být vystaveni komářímu bodnutí a infikování. Komáři jsou schopni za příznivých teplých podmínek nakazit také obyvatele v přilehlých oblastech letiště. Z tohoto důvodu je nařízená povinná dezinfekce všech letadel, která přiletí z malarické oblasti (Mađar R., 2008).

3.5. Malarický parazit

3.5.1. Obecná charakteristika parazita

Malárii způsobující paraziti patřící do rodu *Plasmodium spp.*, jsou největšími zabijáky a nesou odpovědnost za více než milion úmrtí ročně. Podařilo se zjistit úplnou sekvenci genomu malarického parazita a zjistilo se, že nemá žádnou podobnost s geny ostatních eukaryont. Jeho genom je extrémně bohatý na AT (adenin, thymin) nukleotidy a obsahuje 5 300 genů, přičemž asi u 60 % není známa jejich funkce. Zvláštností tohoto parazita je mimořádně vyvinutá schopnost směřovat své proteiny na různé „adresy“. Všechny proteiny plní v buňce svou funkci a po syntéze v cytoplazmě jsou adresovány do jednotlivých částí buněk, kde plní své poslání. Přes membránu ohraničující vakuoly je parazit schopen proteiny vypouštět také do hostitelské krvinky. Díky svým proteinům je například parazit schopen

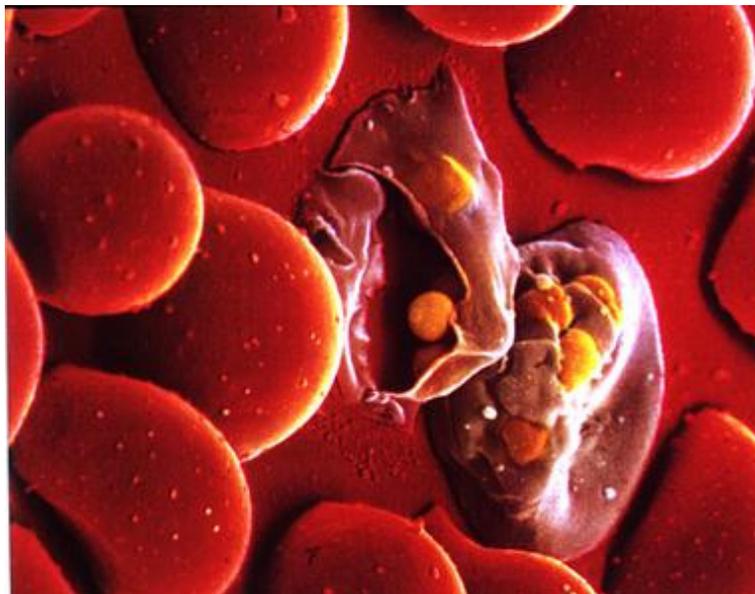
vychytávat z krve železo, které potřebuje pro svůj vývoj. Všechny pokroky ve znalostech genomu, imunologických aspektů, životního cyklu parazita a mnoho dalšího je velmi důležité a žádoucí pro vytvoření účinné léčby (Volf P. a kol., 2007).

3.5.2. Erytrocyt jako hostitelská buňka

Červené krvinky, které si parazit vybírá pro svůj život v lidském těle, jsou všeobecně ne příliš pohostinným místem a nemají v podstatě co nabídnout. Červené krvinky nejsou v pravém slova smyslu buňky, jsou to bezjaderná tělíska. Vznikají z kmenových buněk v kostní dřeni postupným vyžíváním a diferenciací přes mnoho vývojových stádií. Protože jsou červené krvinky bezjaderné, neobsahují žádnou DNA. Úkolem červených krvinek je zachytit v plicích kyslík do molekuly hemoglobinu a jakmile opustí plíce, roznáší kyslík do jednotlivých tkání. Většina hemoglobinu v buňce je pohlcena plasmodiem, které si tímto zajistí dostatečné množství energie pro rozdělení na šestnáct nových kopií. Červené krvinky plní svou funkci, nejsou náročné na přísun energie, proto jim stačí omezené množství proteinů. Nemají ani mnoho odpadních produktů. Jiné buňky mají mnohem větší nároky na energii a také se musejí zbavovat většího množství odpadních produktů. Mají pro tento účel mnoho odpadních váčků a kanálek, zatímco červené krvinky, nemají téměř žádné takové vybavení. Mají jen pár kanálek pro nezbytně důležité látky, poněvadž kyslík a oxid uhličitý volně difundují membránou. Červená krvinka má bikonkávní tvar, díky kterému se může protahovat i velmi úzkými kapilárami, cestují jedna za druhou krevním řečištěm, mění svůj tvar a po průchodu cévou se vrací do své původní podoby. Během života červených krvinek dojde k jejich stárnutí, ztuhne jejich membrána a vyvstává úkol pro slezinu, která tyto staré erytrocyty vychytá a projdou pouze mladé erytrocyty.

Plasmodium, které tato jednoduchá tělíska vyhledává, má na svém povrchu háčky, kterými se přichytávají ke stěnám cév. Parazit je schopen rozpoznat mladé červené krvinky, a to pomocí čidla, které má ve své přední části. Je zde uložena sada váčků, které dokážou vystříknout velké množství molekul pomáhajících rozhrnout proteinovou síť membrány erytrocytů a pomáhají mu proniknout do lumen erytrocytu. Při tomto aktu parazit uvolňuje další množství molekul vytvářejících kolem něj váček. Asi po patnácti sekundách mizí parazit uvnitř buňky a zacelí se po něm otvor v buněčné membráně. Parazit pohlcující hemoglobin, má na jedné straně něco jako ústa, která pohlcují molekuly z okolí a v tomto čase

je umožněn kontakt parazita s vnitřním obsahem erythrocytu. Pohlcený hemoglobin se nyní stává součástí parazita, přestože hemoglobin obsahuje iont železa a silně nabitě jádro, které jsou pro parazita nežádoucí. I na toto je plasmodium připraveno a dovede tyto molekuly neutralizovat. Pro svou další existenci a schopnost se dělit na další jedince, potřebuje parazit přísun dalších proteinů a aminokyselin. K tomuto účelu si vytvoří hustou síť kanálků, které směřují k zevní membráně erythrocytů. Tímto aparátem nasává potřebné živiny a zbavuje se odpadu vzniklého při svém metabolismu. Buněčným dělením vzniklí potomci parazita zcela naplní erythrocyt a vyrážejí hledat další mladé erythrocyty, ve kterých se opět pomnoží (Zimmer C., 2000).



Obr. č.2: Erythrocyt napadený plasmodiem

Zdroj: <http://nilna.wordpress.com/2009/02/08/malaria-karena-parasit-darah/>

3.5.3. Vývojová stádia parazita

3.5.3.1. *Exoerytrocytární (jaterní) stádium*

Při komářím bodnutí, jsou infekční stádia plasmodií- sporozoiti, inokulováni se slinami komára do krevního oběhu. Během asi půl hodiny se parazit dostává do jater, takže imunitní systém ani nestačí na jeho přítomnost v krvi zareagovat. Dostane se do jaterní buňky a organismus si ho začne všimnout. Plasmodium začne produkovat proteiny, ty jsou jaterní

buňkou zpracovány a vystaveny na molekulách hlavního histokompatibilního komplexu. Imunitní systém začne na tuto skutečnost reagovat, ale protože mu útok proti napadeným jaterním buňkám trvá asi týden, stihne se parazit pomnožit (Zimmer C., 2000). Sporozoit se mění v meront a zhruba po týdenním množení je z něj velké množství merozoitů (2,5 x 1,5 mikrometrů). Ty se mohou ihned uvolnit do krve, nebo se dále pomnoží a teprve potom nastane invaze do dalších erytrocytů (Volf P. a kol., 2007).

3.5.3.2. *Erytrocytární stádium*

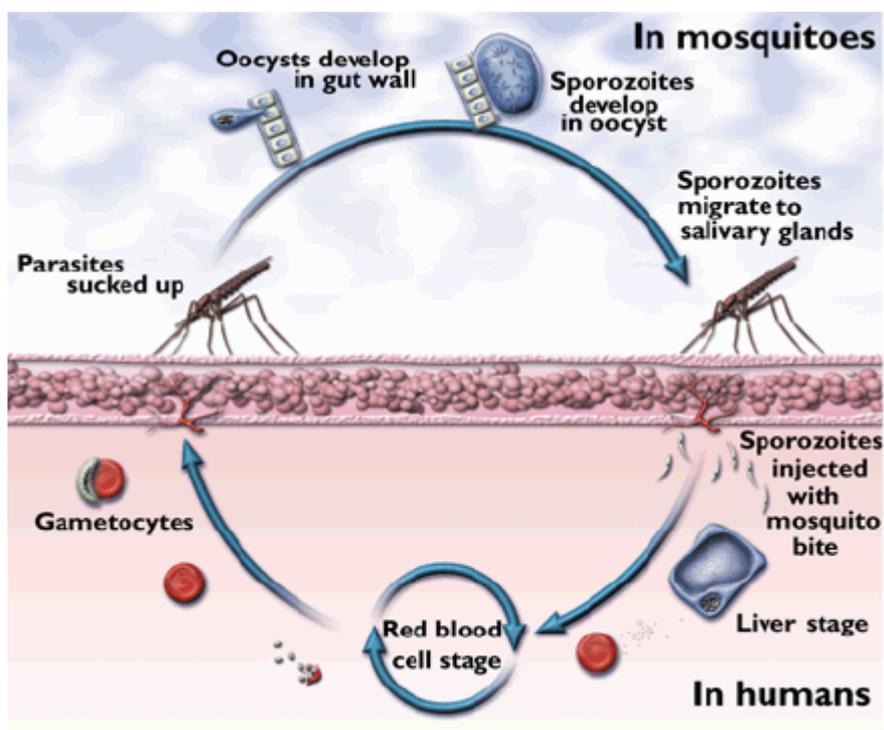
Parazit se po vniknutí do červené krvinky začne dělit a začne provádět opatření, aby nebyla červená krvinka plná nových parazitů, pohlcena slezinou. Vytváří na povrchu krvinky úchytky, kterými se přidrží stěny cévy. Tyto úchytky by mohly být rozpoznány imunitním systémem člověka, a proto by představovaly jisté riziko pro přežití parazita. Bylo ovšem zjištěno, že i tady má parazit své trumfy v ruce. Každá úchytky je tvořena pouze jedním genem, ovšem genů, které mohou tvořit jeden typ úchytky je více než sto.

3.5.3.2.1. *Nepohlavní stádium*

Po vniknutí do erytrocytu se merozoiti mění na meronty, kteří jsou uvnitř erytrocytu obaleni parazitoformní vakuolou. Meronti, kteří pohlcují hemoglobin prostřednictvím cytostomu, musejí produkovat i odpadní produkty, které tvoří hemozoin. Jedná se o žlutohnědý pigment, který se ukládá v cytoplazmě s vakuolami. Mladý meront má totiž podobu prstýnku, kde dutinu prstýnku tvoří právě tato cytoplazma s uloženým hemozoinem, kamínek prstýnku tvoří jádro a obroučku tvoří cytoplazma s ribozomy. Meront stále roste a dostává se do stádia schizontu, jeho jádro se několikrát dělí a vzniká tzv. rozeta. Podle jednotlivých druhů plasmodií dochází ke vzniku určitého počtu jader a meront se rozpadne na merozoity, které opouští červenou krvinku a napadají další krvinky. Když dojde k prasknutí erytrocytu a uvolnění nových merozoitů, dochází ke vzniku horečnatého malarického záchvatu. U některých prstýnků nedojde ke množení, ale mění se uvnitř erytrocytu v gametocyty- předpohlavní buňky. Barvení podle Giemsy nám může pomoci při určení jejich pohlaví.

3.5.3.2.2. Pohlavní stádium

Má-li člověk ve svých krvinkách gametocyty a dojde k nasátí této krve komárem, proběhne v jeho střevě přeměna gametocyt na gamety, které kopulují. Z mikrogametocytu vzniká asi osm mikrogamet. Vzniká pohyblivý ookinet, který se dostává pod vazivovou vrstvu oddělující střevo od hemocoelu komára. Mění se v oocystu, kde vzniká velké množství sporozoitů. Ti migrují po prasknutí oocysty do slinných žláz komára. Když komár bodne člověka, inokuluje do jeho oběhu sporozoity a dojde ke vzniku malárie u dalšího jedince (Volf P. a kol., 2007).



Obr. č.3: Vývojový cyklus plasmodia

Zdroj: <http://post.queensu.ca/~forsdyke/pfalcip01.htm>

3.5.4. Přenašeči plasmodií

Přenašečem plasmodií je výhradně komár. Rod *Plasmodium spp.* zahrnuje asi padesát parazitujících druhů v savcích, více než čtyřicet druhů v ptácích a kolem šedesáti druhů

v plazech. Komáři především rodu *Culex* jsou přenašeči ptačích a plazích plasmodií a komáři rodu *Anopheles* jsou přenašeči výhradně savčích plasmodií. Objevu lidské malárie předcházela objev ptačích plasmodií. Význam mají také plasmodia drobných savců, která byla izolována z lesních hlodavců a byla jimi infikována laboratorní zvířata pro účely experimentu. Jedná se např. o *P.berghei*, *P.chabaudi*, *P. yoelii* (Volf P. a kol., 2007). K přenosu malárie může dojít také podáním kontaminované krevní transfúze, po poranění kontaminovanými jehlami a stříkačkami, velmi vzácný je přenos kongenitální (Göpfertová D., Pazdiora P., Dáňová J., 2006).

3.5.5. Komár rodu *Anopheles*

Anofelové se zapsali do povědomí lidstva jako přenašeči jedné z nejnebezpečnější a nejrozšířenější choroby, kterou je malárie. Malárii přenášejí samičky těchto komárů, které se poznají dosti snadno podle dlouhých makadel, dosahujících až ke konci jejich sosáků. Samičky podčeledi Culicinae mají makadla krátká, další odlišností je postoj samic při sání, sedí s hlavou šikmo skloněnou k podložce, někdy je i kolmo- hlava, hrud' i zadeček jsou v jedné přímce. Další odlišnosti jsou také při utváření 8. zadečkového článku larev, kdy larvy Anofelů musejí být během dýchání vzdušného kyslíku uloženy rovnoběžně s vodní hladinou. Vajíčka Anofelů připomínají tvarem loďku, dále mají plovací lišty po svých bocích a vzdušné komůrky plováku. Nejvýznamnějšími přenašeči malárie jsou *An. gambiae*, u kterého byl jako u jednoho z prvních organismů osekvenován celý genom. Dále zde patří *An. stephensi* přenášející malárii v tropické Asii. Druh komára *An. maculipennis* se uplatňuje jako přenašeč v mírném pásmu Evropy a Asie. Tento Anofeles je ve skutečnosti komplexem několika druhů, z nichž se někteří vyskytují také na našem území. Ve střední Evropě ovšem sají zejména na hospodářských zvířatech a jen vyjimečně sají na lidech. Samičky lze snadno rozpoznat, a to podle skvrnitých křídel a dlouhých maxilárních palp (Volf P. a kol., 2007).



Obr. č.4: *Anopheles stephensi*

Zdroj: http://abertusko.files.wordpress.com/2009/02/anopheles_stephensi1.jpg

3.5.6. Obranné mechanismy komára

Členovci mají proti patogenním organismům vyvinuty bariéry. První mechanickou bariérou je peritrofická matrix. Touto matrix je vystlán mesentron a matrix obaluje přijatou potravu. Tím je chráněn epitel střeva před přímým kontaktem s krví a tvoří bariéru vůči mikroorganismům. Malarické plasmodium, které je přizpůsobeno vývoji ve střevě dokáže tuto bariéru narušit. Slouží mu k tomu chitináza, ale ještě je důležitá rychlost, za jak dlouho dojde k vytvoření peritrofické matrix. Členovci, kteří tvoří matrix rychleji jsou více rezistentní, což není případ komárů, u kterých se matrix tvoří pomaleji. U *An. stephensi* se peritrofická matrix tvoří více než 24 hodin. *An. atroparvus* tvoří matrix rychleji, proto je vnímavé pouze na *P. berghei*, kde dozrání ookinet trvá asi 18 hodin. Předchozí Anofel je vnímavý jak k *P. berghei*, tak k *P. falciparum*, u něhož ookinet zraje asi 24 hodin.

3.5.7. Mechanismus sání komára

Celý proces začíná tím, že komár musí protlačit svůj sosák přes kůži a začne hledat krevní cévu. Jakmile narazí na krev, začne se v místě bodnutí srážet krev a krevní destičky se shlukují kolem komářího sosáku. Trombocyty vypouštějí řadu látek, kterými způsobí adhezi dalších destiček. Komár do slin vypouští látky, které na jistý čas adhezi destiček zastaví. Například apyráza je schopna štěpit lepidlo produkované destičkami, jiné látky rozšiřují

krevní cévy, aby jimi mohlo protékat větší množství krve. Malárie způsobuje, že se krevní destičky špatně shlukují, a proto je pro komára sání infikované krve snadnější. Pokud je hostitel nakažen malárií, plasmodium je schopno zařít, že je pro komára přitažlivější. Nasáté plasmodium cestuje do slinných žláz komára a usadí se na laloku, kde se tvoří apyrázy-antikoagulační molekuly. Plasmodium je pravděpodobně schopno dávat komárovi pocit, že je stále hladový a potom musí pít krev více a více. Z toho důvodu bodne několik hostitelů a roznáší malárii dále. Pokud trvá komárovi sání delší dobu, zvyšuje se riziko, že bude hostitelem zabít. Proto se na hostitele nijak neváže, a když je sání komplikované, přemístí se na jiné místo na kůži (Zimmer C., 2005). Riziko nákazy malárií závisí na procentech obsahu sporozoitů ve slinných žlázách komára. (Konradsen F., a kol., 2000).

3.5.8. Původci onemocnění

Malárii vyvolávají čtyři druhy malarických plasmodií:

3.5.8.1. *Plasmodium falciparum*

Tento druh parazita způsobuje tropickou malárii, která je charakteristická malarickými záchvaty s nepravidelnou periodicitou. Mohou být jednodenní až třídní, tzv. „maligní terciána“. Tento druh parazita patří mezi nejvíce rozšířené v tropických oblastech Afriky, Asie a Ameriky a způsobuje nejčastěji smrtelnou nákazu. K nákaze prostřednictvím *P. falciparum* dochází jen během jejich jedné generace a nezůstávají v játrech po skončení jaterní fáze vývoje žádní paraziti. U další infekce se může jednat buď o rekrudescenci, což je znovuzplanutí infekce z krevních stádií, která přežijí, nebo se jedná o reinfekci. V periferní krvi se nacházejí erytrocyty s mladými prstýnky nebo se srpkovitými gametocyty. Od toho se také odvíjí druhové jméno parazita, kdy „falx“ znamená latinsky srp. Velikost červených krvinek se nemění a jsou napadány krvinky nejrůznějšího stáří. Tyto napadené krvinky přilnou ke stěnám kapilár a k sobě navzájem a zhoršují jejich prokrvení. Může dojít k místním obstrukcím kapilár s těžkými následky pro orgány jimi zásobovanými, zejména mozek a ledviny. V mírném pásmu se malárie způsobená *P. falciparum* dnes vyskytuje jen ojediněle jako importovaná infekce. V 2. polovině 20. století se dokonce vyskytla také na východním Slovensku.

3.5.8.2. *Plasmodium vivax*

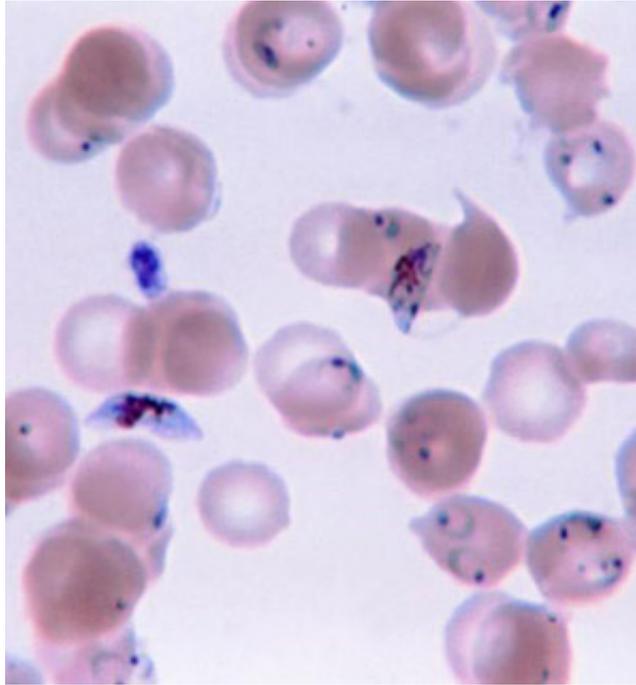
Tento druh parazita se vyskytuje v subtropickém a tropickém pásmu a místy zasahuje i do mírného pásma. V minulosti se toto plasmodium vyskytovalo endemicky i u nás, a to v blízkosti jihočeských rybníků a v povodí Labe, Vltavy, Berounky, Jizery a Dyje. Jeho meronti mají nepravidelný amébovitý vzhled, podle něhož je odvozeno jeho jméno. Parazit je původcem tzv. „benigní terciány“, kdy se opakují malrické záchvaty co 48 hodin. U tohoto druhu infekce může docházet k relapsům, což je vzplanutí infekce po měsících i letech. Může mít i několik jaterních generací, kdy sporozoiti nebo merozoiti mohou po dlouhou dobu přežívat v játrech v podobě hypnozoitů. Parazit napadá zejména mladé erythrocyty-retikulocyty. Parazitémie způsobené tímto plasmodiem jsou poměrně v malém počtu, poněvadž právě retikulocyty tvoří v periferní krvi asi jen dvě procenta. Dále jsou napadány pouze červené krvinky nesoucí antigen Duffy, který je nezbytně nutný pro invazi parazita do erythrocytu.

3.5.8.3. *Plasmodium ovale*

Tento druh parazita je rozšířen především v oblastech, kde se nevyskytuje *P. vivax*, což je na pobřeží západní Afriky, ale vlastně v celé tropické Africe. Dále se vyskytuje v Asii a Jižní Americe. Způsobuje onemocnění jako *P. vivax*, což je „benigní terciána“. *P. ovale* může v jaterním parenchymu po ukončení jaterní fáze přetrvat.

3.5.8.4. *Plasmodium malariae*

Tento druh parazita je rozšířený v subtropích a tropech Afriky a Jižní Ameriky. Napadá pouze starší erythrocyty, které jsou před koncem svého života. Působí malarické záchvaty každých 72 hodin, tzv. kvartánu. Stejně jako u *P. falciparum* nezůstávají po ukončení jaterní fáze v jaterním parenchymu žádní paraziti, ale jsou významní tím, že i při velmi nízké parazitémii přežívají v krevním oběhu svého hostitele po velmi dlouhou dobu (až 52 let) a po této době vyvolat znova onemocnění (Volf P. a kol., 2007).



Obr. č.5 : plasmodium přítomné v krevním nátěru

Zdroj:

http://www.labspaces.net/98777/Vaccine_blocks_malaria_transmission_in_lab_experiments

3.5.9. Změny v genetické výbavě komára

V roce 2003 vytvořil americký tým vědců prvního geneticky modifikovaného komára. Vytvořili umělý gen, který blokoval vývoj parazita v těle komára a byl vnesen do dědičné komáří informace. Hlavní myšlenkou bylo vypuštění těchto pozměněných komárů do přírody za účelem jejich rozmnožení a rozšíření tohoto pozměněného genomu do mnoha dalších jedinců. Když po určité době další týmy vědců sledovaly, jak se těmto zmutovaným komárům daří, zjistili, že tito komáři zcela vyhnuli. Došlo k jejich ztroskotání, coby sexuálních partnerů. K dalším genetickým úpravám došlo v roce 2006, kdy tým britských vědců vložil do neinfikovaného komára gen, který navodí v komářích slinách tvorbu sloučeniny s protimalarickými účinky. Účinky tohoto genetického pokusu mají také nevelké úspěchy (Babůrková E., 2009).

3.6. Klinický obraz onemocnění

Závažná malarická infekce způsobená *P. falciparum* obvykle prezentuje klinický obraz zahrnující jedno či více z následujících: horečka, třesavka, pocení, anorexie, nauzea, únava, bolest hlavy, svalová a kloubní bolest, kašel a průjem. Po pár dnech se často vyvíjí anémie a/nebo splenomegalie. Jestliže není nemoc adekvátně léčená, může progradovat do těžké malárie s hodně těžkými projevy: akutní encefalopatie (mozková malárie), těžká anémie, žloutenka, renální selhání, hypoglykemie, velmi vzácné koagulační defekty a také šok. Těžká malárie je možnou příčinou komatu a dalších příznaků CNS onemocnění u imunodeficientních osob vracějících se z tropických oblastí. Okamžité ošetření osob s malárií způsobenou *P. falciparum* je nezbytné, v některých případech se mohou vyskytnout ireverzibilní komplikace. Fatální případy mezi neléčenými dětmi a imunodeficientními dospělými mohou dosáhnout 10-40 % nebo i více. Další lidské malárie- *vivax*, *malariae* a *ovale* nejsou obvykle život ohrožující. Nemoc může začít malátností a pomalu stoupající horečkou několikadenního trvání, následuje třesavka a rapidně zvýšená horečka obvykle doprovázená bolestí hlavy, nauzeou a končící hojným pocením. Po bezhorečkovém intervalu se opakuje cyklus třesavky, horečky a pocení, a to vracějící se denně, obden, nebo každý třetí den. Neléčená primární příhoda může trvat od týdne po měsíce, ale i déle a je doprovázená zhroucením, anémií a splenomegalií. V následujícím období bez parazitémie (infekce *ovale* a *vivax*) může docházet k relapsům v nepravidelných intervalech po více jak pět let. Infekce *malariae* může trvat během života s nebo bez opakujících se horečnatých epizod (Heymann D. L., 2004).

3.7. Inkubační doba

Čas mezi kousnutím infikovaným komárem a objevením se klinických symptomů je přibližně 9-14 dní pro *P.falciparum*, 12-18 dní pro *P.vivax* a *P.ovale* a 18-40 dní pro *P.malariae*. Některé druhy *P.vivax*, většinou v oblastech s mírným podnebím, mohou mít inkubační dobu 8-10 měsíců i delší. Při infekci způsobené podáním infikované krevní

transfúze, závisí délka inkubační doby na množství parazitů infundovaných do organismu, většinou jsou krátké, ale mohou dosahovat i více než 2 měsíců (Heymann D. L., 2004).

3.8. Vnímavost hostitele

Vnímavost je univerzální, kromě lidí se specifickými genetickými odchylkami. Odolnost nebo vzdorování klinické chorobě je přítomna v dospělosti ve vysoce endemických komunitách, kde je expozice komářími infekcím nepřetržitá po mnoho let. Většina domorodé populace Afriky vykazuje přirozenou rezistenci k infekci *P.vivax*, která je spojena s absencí antigenu Duffy na jejich erytrocytech. Osoby se srpkovitou anémií (heterozygoti) vykazují relativně nízkou parazitémií, když je infikuje plasmodium a jsou chráněny před těžkou nemocí. V homozygotní formě jsou pacienti se srpkovitou anémií ve zvýšeném riziku těžké falciparum malárie, speciálně anémie. Osoby infikované HIV jsou ve zvýšeném riziku symptomatické falciparum anémie a její těžké manifestace (Heymann D. L., 2004). Může se vyvinout také imunita proti malárii, a to opakovanou a dlouholetou expozicí tomuto onemocnění. Než se vytvoří částečná imunita, tzv. semiimunita, díky které se nerozvine onemocnění s klinickými příznaky, dochází k největší úmrtnosti u dětí mezi 1. až 5. rokem života. Kojenci jsou chráněni mateřskými protilátkami. Pokud se osoby s přirozeně vytvořenými protilátkami dlouhodobě vyskytují mimo endemické oblasti, protilátky postupně vymizí (Nohýnková E., 2005). Těhotné ženy jsou více náchylné k infekci způsobené plasmodiem, než ostatní osoby. Plasmodium může infikovat placentu a zapříčinit nízkou porodní hmotnost plodu, potrat, narození mrtvého plodu a je zde riziko smrti matky, či těžké anémie. Těhotné ženy by se měly cestování do malarických oblastí vyvarovat, v případě nutnosti navštívit tyto oblasti je velmi důležitá chemoprofylaxe (Heymann D. L., 2004).

3.9. Rezistence na malárii

3.9.1. Rezistence na léky

Před odletem do malarických oblastí, by měli cestovatelé řádně zvážit způsob chemické profylaxe, poněvadž existují oblasti na některá antimalarika rezistentní. Jestliže je daná oblast

riziková, měli by cestovatelé pátrat po případné rezistenci na antimalarika v této lokalitě. Tato rezistence se rozvíjí v mnoha regionech světa. Rezistence *P. falciparum* na chlorochinon byla potvrzena ve všech oblastech, kde se malárie způsobená tímto parazitem vyskytuje, kromě Dominikánské republiky, Haiti, Centrální Ameriky severně od Panamského kanálu, Egypta a některých zemí Středního Východu. Dále rezistence na sulfadoxin-pyrimethamin je rozšířená v povodí Amazonky, v Jižní Americe, Jihovýchodní Asii a v dalších částech Afriky. Rezistence na meflochin byla popsána v pohraničí Thajska, Barmy a Kambodži, v Západní provincii Kambodže, ve východních státech Barmy, na pobřeží Laosu a také ve Vietnamu (Arguin P. M. a kol., 2008).

3.9.2. Rezistence a krevní poruchy

Existují jednotlivá vrozená krevní onemocnění, kdy jsou krvinky tak pozměněny, že zhoršují podmínky pro přežívání parazita. Existuje možnost, že také působí jako přirozené očkování dětí. Když dojde k prvnímu kontaktu dítěte s infikovaným komárem, ukáže se, zda parazit dítě usmrtí, nebo zpomalí svůj vývoj a rozpozná ho imunitní systém. Zpomalení růstu parazita nastává v důsledku právě vrozených krevních chorob a imunitní systém má více času onemocnění identifikovat (Zimmer C., 2005).

3.9.2.1. Hereditární eliptocytóza

Jedná se o onemocnění spojené s poruchami membrány erytrocytů, charakterizované přítomností eliptocytů v periferní krvi. Tomuto onemocnění je blízká také jihovýchodní asijská ovalocytóza (SAO- Southeast Asian ovalocystosis) a hereditární pyropoikilocytóza (morfologické změny krvinek vznikající po popálení). Hereditární eliptocytóza (dále jen HE) se vyskytuje na celém světě, ale její nejčastější výskyt je právě v malarických oblastech. Incidence onemocnění je 1 :2000 až 1 :4000 obyvatel. V Malajsii, Papua Nová Guinea a na Filipínách, popřípadě v dalších oblastech endemických na malárii, se vyskytuje SAO. HE je vrozené onemocnění s autozomálně dominantní dědičností a jedná se o molekulární poruchu spektrinu, deficit proteinu 4.1, ale také o deficit glykoforinu. Dochází k reorganizaci cytoskeletu buňky v důsledku poruchy vazby heterodimerů spektrinu. Když erytrocyt opakovaně prochází cévami s malým průsvitem, dochází k jeho trvalé změně tvaru a stává se z něj eliptocyt.

3.9.2.2. Deficit glukózo-6-fosfátdehydrogenázy

Onemocnění je pohlavně vázáno, gen pro glukózo-6-fosfátdehydrogenázu (dále jen G-6-PDH) je lokalizován na chromozomu X. K projevům onemocnění tedy dochází u mužů a homozygotních žen. Onemocnění má za následek snížení aktivity G-6-PDH a dojde k poruše přeměny glukózo-6-fosfátu na 6-fosfoglukonát za současného vzniku NADPH. Vzniká malé množství redukováného NADPH a také glutationu. Ten je potřebný pro ochranu hemoglobinu před oxidací, aby nedocházelo k precipitaci oxidovaného hemoglobinu v erythrocytech ve formě Heinzových tělísek. Dojde k narušení membrány krvinek v důsledku oxidace lipidů. Deficit G-6-PDH se na světě nachází u více než 300 milionů nosičů variantní mutace genu pro tento enzym. Vyskytuje se zejména u černošské populace, ve Středomoří, v Asii, v Evropě je výskyt poměrně vzácný. Porucha funkce G-6-PDH může být dalším z ochranných faktorů proti malárii, zejména proti časným stádiím malarického parazita. Z jednotlivých variant enzymů např. G-6-PDH A varianta je spojená s polékovou hemolýzou, po požití antimalarik. Je přítomna zejména u černošské populace (10-15 % Afroameričanů a v západní a střední Africe).

3.9.2.3. Srpkovitá anémie

Toto onemocnění je charakterizováno přítomností abnormálního hemoglobinu S (dále jen HbS). Dochází k tomu, že v beta řetězci je na pozici 6 nahrazen zbytek kyseliny glutamové za valin a tím se pozmění vlastnosti hemoglobinu. Kyselina glutamová je hydrofilní a polární, vázající na svůj postranní řetězec vodu, valin je hydrofobní a nepolární. HbS se tak stává méně rozpustný než hemoglobin A. Po deoxygenaci dochází k polymerizaci molekul HbS a krvinky získávají srpkovitý tvar. Hemoglobin S obsahuje u heterozygotů asi 40 % HbS a 60 % HbA a k srpkovatění krvinek nedochází. Tito jedinci jsou chráněni před napadením *P. falciparum*, způsobujícím tropickou malárii.

3.9.2.4. Hemoglobinopatie C

Toto onemocnění se dědí autozomálně recesivně. V molekule hemoglobinu dochází k přeměně na stejném místě, jako u HbS. Jedná se o 6. pozici, kdy je zbytek kyseliny

glutamové zaměněn, tentokrát za lyzin. Opět dochází k deoxygenaci a tento hemoglobin tvoří krystaly. Hemoglobin C hraje důležitou roli v obraně proti malárii, kdy díky jeho schopnosti nevolňovat merozoita malarického parazita, se rozšiřuje tato alela v endemických malarických oblastech. Alela hemoglobinu C je proto rozšířená především v západní Africe a mezi Afroameričany.

3.9.2.5. *Talasemie*

Toto onemocnění patří mezi nejrozšířenější geneticky zakódované onemocnění na celém světě. Rozlišujeme dva typy talasemie. Pokud se jedná o mutaci ovlivňující expresi nebo regulaci globinového řetězce beta, jedná se o talasemii beta, jestliže se mutace týká řetězce alfa, jedná se o talasemii alfa (Penka M., 2009). Lidé, kteří jsou postiženi těžkou-homozygotní formou trpí orgánovými poškozeními, retardacemi růstu a obvykle umírají. V heterozygotní formě není talasemie smrtelná, jedinci většinou trpí anémií. Tito jedinci se snaží obnovovat poškozené krvinky, což má za následek zvětšení objemu kostní dřevě a její manifestaci i do zbylé části kosti. To má za následek typické deformace kostí. Parazit uvnitř erytrocytu má nesnadnou pozici, kdy defektní hemoglobin způsobí, že jeho uvolněné řetězce zachytávají kyslík, který se potom vysmekne a může parazita poškodit. Ten má potom problémy s růstem, erytrocyt opustí, ale je natolik oslabený, že není schopen napadnout novou buňku. U jedinců s talasemií bývá proto průběh malarického onemocnění mírnější (Zimmer C., 2005).

3.10. Laboratorní diagnostika

3.10.1. Mikroskopické vyšetření krve

U pacientů, kteří se vrátili z rizikových oblastí a je možnost, že se nakazili malárií, je požadováno vyšetření z periferní krve. Jedná se o mikroskopické vyšetření z krevního nátěru, kde je možno zhodnotit jak druh malarických parazitů, tak jejich hustotu (WHO, 2009). Krevní nátěr je možno zhotovit tak, že se napíchne bříško prstu, ušní lalůček, či jiná místa s hustou kapilární sítí a krevní kapka se rovnou přenesse na sklíčko. Tato místa jsou vhodná z toho důvodu, že se zde nacházejí větší procenta jednotlivých vývojových stádií parazita. Je

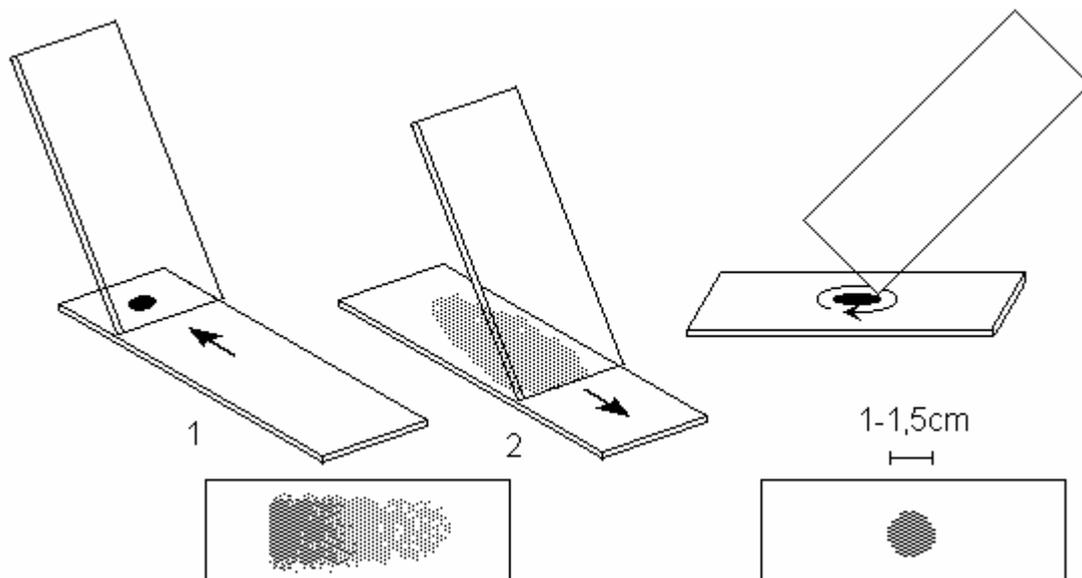
možno nátěr zhotovit také z krve odebrané do heparinu, nebo EDTA. V žilní krvi je ovšem parazitémie v nižším procentu. Vzorek krve by měl být dopraven do laboratoře co nejrychleji, aby nedošlo k morfologickým změnám plasmodií (Nohýnková E., Stejskal F., 2005). Zhotoví se tenký a tlustý nátěr („tlustá kapka“) a nabarví se Giemsou. Pro vyšetření by se měly zhotovit 3 nátěry: dvě tlusté krevní kapky a jedna tenká. Sklíčko se musí označit jménem nebo číslem pacienta na okraj nátěru nebo sklíčko, a to tužkou či pérem. První tlustá kapka se obarví rychle (10 % Giemsa na 10-15 min) pro počáteční skrínig, další dva nátěry se budou barvit déle (2,5-3 % Giemsa na 45-60 min). Pro zahájení skríníngu se použije rychle barvená tlustá kapka, a to pro počítání nepohlavních parazitů na určitý počet bílých krvinek. Parazitémie při nálezů jednoho parazita na každé tři bílé krvinky, koresponduje přibližně s 2000 nepohlavních parazitů na mikrolitr pro oblasti s vysokým přenosem, nebo jeden parazit na každých šest bílých krvinek, korespondující asi s 1000 nepohlavními parazity na mikrolitr pro oblasti s nízkým přenosem. Druhá tlustá kapka se použije pro výpočet hustoty parazitů, a to počítáním pohlavních parazitů na určitý počet bílých krvinek (nejčastěji 200). Jestliže je napočítáno více než 500 parazitů před dosažením počtu 200 bílých krvinek, počítání se zastaví. Hustota parazitů vyjádřená počtem pohlavních parazitů na mikrolitr krve se vypočítá dělením počtu pohlavních parazitů počtem prohlédnutých bílých krvinek a násobí se to počtem bílých krvinek v periférii (většinou 6000-8000 na mikrolitr).

Počet spočítaných parazitů

Hustota parazitů (na mikrolitr) = ----- x 6000-8000

Počet prohlédnutých leukocytů

Krevní nátěr je považován za negativní, když není při prohlédnutých 1000 bílých krvinkách nalezeno žádné nepohlavní stádium. Nátěry hodnotí dva kvalifikovaní pracovníci nezávisle na sobě a výsledná hustota se poté zprůměruje. V případě nesouhlasných výsledků jsou nátěry zhodnoceny třetím pracovníkem a zprůměrují se dvě nejbližší hodnoty (WHO, 2009).

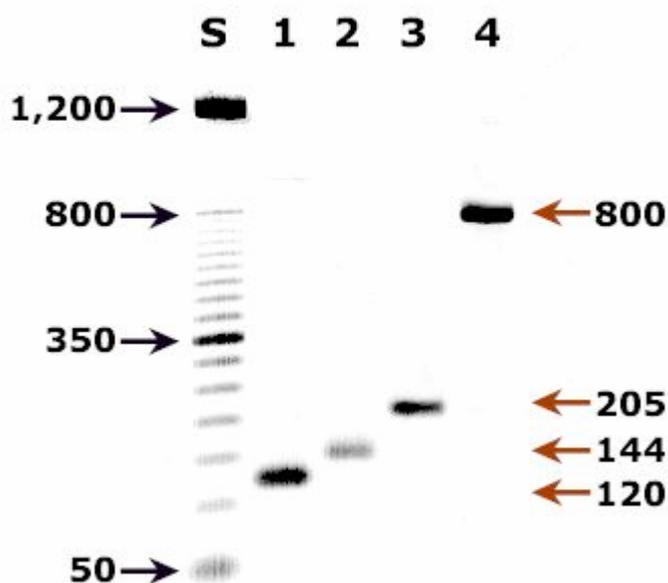


Obr. č.5: Provedení tenkého nátěru a tlusté kapky

Zdroj: <http://lab-turnov.ic.cz/index.php?page=odbery/odbery7>

3.10.2. Další možnosti detekce parazita

Další testy, které mohou detekovat malárii jsou např. testy prokazující protilátky, které jsou poměrně levnou záležitostí. Problémy ovšem nastanou v případě testování velkého množství lidí v nejchudších oblastech světa, kde je i cena jeden dolar za jedno vyšetření obrovský problém. Existují i další možnosti vyšetření, jako je např. metoda založená na hmotové spektrometrii, kdy je možno identifikovat jednotlivé molekuly podle jejich atomové hmotnosti. Na John Hopkins University byl dokonce zkonstruován přenosný hmotový spektrometr pro „polní“ využití. Tato metoda je levnější, než detekce protilátek, ale pro každodenní mnohonásobnou detekci parazita na celém světě je stále nejpoužívanější a nejlevnější metodou mikroskopie. Mezi velmi užitečné moderní metody detekce DNA plasmodia patří nesporně PCR.



Obr. č.5: Znáznornění výsledků testování PCR pro detekci DNA Plasmodia:

S - znázorňuje standartní výsledky bez nákazy.

1 - znázorňuje nákazu Plasmodium Vivax.

2 - nákaza Plasmodium Malariae

3 - nákaza Plasmodium Falciparum

4 - nákaza Plasmodium Ovale

Zdroj: <http://www.czechnationalteam.cz/rservice.php?akce=tisk&cislocclanku=2006120001>

3.11. Antimalarická profylaxe

3.11.1. Dezinsekční látky

Dezinsekce se provádí za účelem ničení hmyzu a ostatních členovců, kteří přenášejí různá infekční onemocnění, obtěžují lidi i domácí zvířata a působí škody na domácích produktech (Bakoss P., 2008). Mezi nejužívanější insekticidy patřilo DDT, které má ovšem prokázané velké množství vedlejších účinků. V souladu se Stockholmskou konvencí na persistentní organické prostředky jsou vyvinuty programy pro zastavení jeho používání. Jako alternativy DDT jsou používány pyretroidové insekticidy. Na okolní prostředí mívají menší vedlejší účinky a působí kratší dobu, než DDT (Heymann D. L., 2004). Syntetické pyretroidy jsou

chemicky připravené insekticidní látky, jejichž součástí je pyretrum. Pyretrum je nervový jed pocházející z květů *Chrysanthemum cinerariifolium*. Pyretriny, které obsahuje mají rychlý účinek proti létajícímu hmyzu, je nestabilní na světle a vzduchu. Má poměrně nízkou toxicitu pro savce. Nevýhodou syntetických pyretroidů je vznikající rezistence na ně. Mají větší účinnost při nižších teplotách a jejich poločas rozpadu je několik týdnů. Dále je možno použít organické sloučeniny fosforu, které patří mezi velmi účinné insekticidy s rychlým účinkem proti hmyzu. Do organismu vnikají perorálně, inhalačně, nebo kontaktem a působí jako inhibitory cholinesterázy, napadený hmyz začne mít křeče a neuromuskulární poruchy. Při manipulaci s nimi je třeba dbát velké opatrnosti, může dojít k akutní otravě (Bakoss P., 2008). Při přímém kontaktu chemických postřiků s lidským tělem, může dojít k podráždění kůže, sliznic a ke vzniku alergických projevů. Mohou způsobit také neurologické poruchy. Kombinace použitých insekticidů na oděv a okolí s použitím repelentů používaných na tělo, zvyšuje před komáry ochranný účinek (Petraš M., 2008). K nejúčinnějším repelentům patří DEET (N, N-diethylmetatoluamide). Tato formulace dosahující až 50 % je doporučována jak pro dospělé, tak děti starší 2 let, u menších dětí se používá formulace do 30%, v prvních dvou měsících života se nesmí používat vůbec. (Arguin P. M., Kozarsky P. E., Reed Ch., 2008).

3.11.2. Moskytiéry

Až do nedávna bylo užívání moskytiér neobvyklé, či zcela absentovalo, ale mezi většinou obyvatel zasažených malarickými parazity, se začaly moskytiéry používat. Přispěla k tomu intenzivní propagace, ale stále může být velkým problémem cena výrobku. Většina sítí je vyrobena z polyesteru nebo dalších syntetických materiálů s pevným vláknem a velikostí oka nejméně 25 děr/cm čtverečný. Síť musejí být pečlivě zastrčeny pod matrace nebo rohože. Síť mohou být také insekticidně ošetřeny, a to pyretrinoidy, kdy se ošetření může opakovat jednou až dvakrát ročně. Je to závislé na sezónnosti přenosu, typu insekticidu, také praní impregnovaných sítí se musí pečlivě zvážit. Ve fázi vývoje jsou nyní síť impregnované dvěma insekticidy pro prevenci vzniku rezistence.

3.11.3. Antimalarika

Chemoprophylaxe by měla pokračovat během cesty v malarické oblasti a po odjezdu z rizikové oblasti (4 týdny po návratu platí pro chlorochinon, meflochinon, doxycyklin; a 7

dnů po návratu pro atovaquon/proguanil a primaquin). Léky s dlouhodobým účinkem, které se užívají jednou týdně, jsou výhodnější oproti lékům s krátkodobým účinkem (užívají se denně) v případě, že cestovatel zapomene dávku užít. Jestliže se např. cestovatel opozdí s užitím dávky u dlouhodobě působícího léčiva o 1-2 dny, pak profylaktická hladina léku v krvi zůstává na protektivní úrovni, zatímco u léku s krátkodobým účinkem by jeho hladina v krvi nebyla dostačující.

3.11.3.1. Chlorochin

V oblastech, kde není hlášen výskyt rezistentního *P. falciparum* na chlorochin se doporučuje užívat chlorochin 1x týdně. Bývá lépe snášen po jídle, může se tak předejít vedlejším účinkům nebo jako alternativu lze užívat hydroxychlorochinon sulfát s lepší snášenlivostí. Pro ty, kteří nemohou užívat tato dvě léčiva, jsou k dispozici atovaquone/proproguanil, doxycyklin nebo meflochin. Profylaxe chlorochinu by měla začít 1-2 týdny před cestou do malarické oblasti, měla by pokračovat užíváním 1x týdně vždy ve stejný den při pobytu v malarické oblasti a 4 týdny po návratu. Jako vedlejší účinky se mohou projevit poruchy GIT, bolest hlavy, závratě, neostré vidění, nespavost. Všeobecně tyto nežádoucí účinky nevyžadují přerušování léčby. Vysoké dávky chlorochinu, např. u léčby revmatoidní artritidy, jsou spojovány s retinopatií, ovšem v rámci malarické profylaxe je výskyt těchto vážných vedlejších účinků nepravděpodobný. Chlorochin a obdobné sloučeniny by mohly zhoršit průběh svrabu.

3.11.3.2. Atovaquon/proguanil

Jedná se o kombinaci dvou léků a profylaxe by měla začít 1-2 dny před cestou, v užívání pokračovat během cesty a dále po návratu užívat lék 7 dní. Užívá se 1x denně, vždy ve stejnou hodinu. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří bolest břicha, nauzea, zvracení a bolest hlavy. Lék by neměly užívat děti s hmotností menší než 5 kg a dále těhotné ženy a pacienti s renální insuficiencí.

3.11.3.3. Doxycyklin

Profylaxe by měla začít 1-2 dny před cestou, pokračovat v užívání během cesty a dále 4 týdny po návratu z malarické oblasti. Užívá se 1krát denně vždy ve stejnou hodinu. Zatím nejsou k dispozici dostačující informace o profylaktické účinnosti srovnatelné látky minocyklin (běžně předepisované na léčbu akné). Pacienti s dlouhodobou léčbou minocyklinem by měli přestat s užíváním 1-2 dny před cestou a začít s profylaxí doxycyklinu. Opětovné užívání minocyklinu by mělo začít po kompletní léčbě doxycyklinem. Doxycyklin nebo atovaquon/proguanil by měli užívat cestovatelé do Jihovýchodní Asie s rezistentním *P. falciparum* na meflochin. Doxycyklin může způsobovat fotosenzitivitu, obvykle se manifestující jako přehnaná reakce na sluneční opálení. Tyto účinky lze minimalizovat zkrácením pobytu na přímém slunci a používáním ochranných krémů s UV faktorem. Užívání doxycyklinu je dále spojováno se zvýšeným výskytem vaginálních mykóz. Nausee a zvracení lze předejít užíváním doxycyklinu s jídlem. Riziko vzniku ezofagitidy lze minimalizovat užíváním léku dříve než před spaním. Doxycyklin je kontraindikován u osob alergických na tetracykliny, v těhotenství, u dětí mladších 8 let. Orální vakcína proti břišnímu tyfu Ty21 by měla být užitá nejméně 24 hodin po užití dávky doxycyklinu.

3.11.3.4. Meflochin

Profylaxe by měla začít 1-2 týdny před cestou, pokračovat během cesty a dále 4 týdny po návratu z malarické oblasti. Užívá se 1x týdně, vždy ve stejný den v týdnu. Meflochin je v rámci profylaxe spojován s ojedinělými vážnými vedlejšími účinky jako je psychóza a záchvaty. Tyto účinky jsou však častější u vyšších léčebných dávek. Mezi další vedlejší účinky u chemoprofylaxe patří poruchy GIT, bolesti hlavy, nespavost, nadměrné snění, poruchy vidění, deprese, úzkostné poruchy, závratě. Mezi další ojedinělé vážnější účinky patří neuropsychické poruchy včetně senzorní a motorické neuropatie, neklid, nervozita, změny nálad, záchvat paniky, zapomnětlivost, zmatenost, halucinace, agrese, paranoia a encefalopatie. Příležitostně se popsané psychiatrické symptomy mohou vyskytnout i po skončení užívání meflochinu. Jestliže se během profylaxe objeví psychiatrické symptomy jako akutní úzkost, deprese, nervozita nebo zmatenost, lék musí být vysazen a nahrazen jiným léčivem. Měl by být také s opatrností užíván u osob s psychiatrickými poruchami nebo depresemi v anamnéze. Meflochin mohou užívat osoby současně léčené beta blokátory,

netrpí-li srdeční arytmií. Meflochin není doporučován osobám s abnormalitami v převodním systému srdečním.

3.11.3.5. Primaquin

Toto antimalarikum mohou užívat cestovatelé směřující do oblastí s výskytem *P. falciparum* s nebo bez rezistence na chlorochin. Všeobecně by měl být užíván pouze v případech, kdy cestovatelé nemohou užívat jiné doporučené léčivo pro danou oblast. Takoví cestovatelé musejí mít normální hladinu G-6-PDH! U cestovatelů s deficitem G-6-PDH by mohlo po užití primaquinu dojít k hemolýze s fatálním průběhem! Primaquin se užívá 1-2 dny před cestou 1x denně vždy ve stejnou hodinu, pokračuje se v užívání během cesty a dále 7 dnů po návratu z malarické oblasti. Paraziti *P. vivax* a *P. ovale* mohou perzistovat v játrech a způsobovat relapsy i 4 nebo více let po návratu z malarické oblasti. Proto by cestovatelé se symptomy malárie i po návratu z rizikové oblasti měli navštívit lékaře. Primaquin snižuje riziko relapsu působením proti jaternímu stadiu *P. vivax* nebo *P. ovale*. Vzhledem k tomu, že většina malarických oblastí světa (vyjma Haiti a Dominikánské republiky) má nejméně jeden druh způsobující relaps malárie, existuje riziko nákazy *P. vivax* nebo *P. ovale*, ačkoli aktuální riziko pro jednotlivce je obtížně definovatelné. Předpokládaná terminální terapie primaquinem v rámci prevence relapsu je všeobecně indikována pouze osobám, které strávili delší čas v malarické oblasti (například misionáři a pracovníci červeného kříže). Většina osob lépe snáší užívání primaquinu s jídlem. Před profylaxí primaquinem musí být laboratorními testy vyloučen deficit G-6-PDH. (Arguin P. M. Kozarsky P. E., Reed Ch., 2008)

3.11.4. Fyzická bariéra

Mezi základní ochranu před komáry patří oblečení, kdy by se měly nosit dlouhé rukávy a nohavice a doporučuje se oděv světlé barvy. Pro ošetření oděvu lze použít insekticidy. Další možností ochrany před malárií je vyvarování se cesty do malarické oblasti během období dešťů, trávit čas na spaní v uzavřených místnostech, nejlépe vybavených klimatizací. Vhodná je možnost prudkého větrání a zajištění oken a dveří proti vniknutí komárů. Není vhodné trávit odpočinek v místech komářích líhní, za které se považují stojaté vody rybníků, dešťová voda z okapů, či zakryté cisterny s vodou (Petráš M., 2008).

3.11.5. Alternativní boj proti malárii

Vědci objevili druh plísně, kterou když se parazit nakazí, přestane se žít krví. To znamená, že by nemohlo docházet k nakažení člověka malárií. Pokus byl proveden s bavlněnými pokrývkami potaženými touto plísní a došlo asi ze 76% ke snížení přenosu malárie a zkrátila se také délka života komárů. Plíseň napadá více genů komára, takže existuje malá pravděpodobnost vzniku rezistence. Další možností, jak zahubit komára je druh houby *Beauveria bssiana*, o kterou když se komár otře, vnikne do jeho těla a během 14-ti dnů ho zabije. Vědci by rádi této houbě využili pro výrobu rozprašovače. Vědcům se také podařilo objevit strukturu proteinu DHFR, který způsobuje odolnost parazita vůči většině antimalarik. Tento protein může zmutovat tak, aby na něj nepůsobila hlavní složka antimalarik, pyrimethamin. Pokud se tato struktura DHFR změní, má parazit malou šanci přežít. V neposlední řadě objevili jihokorejští rybáři rybu (*Misgurnus mizolepsis*), která požere, samozřejmě v dostatečném množství, v rýžovém poli všechny larvy moskytů. Také v Indii se vodní plochy s komářími vajíčky osidlují rybami (především pavími očky), které zničí vyvinuté larvy komárů

(<http://www.czechnationalteam.cz/rservice.php?akce=tisk&cislocclanku=2006120001>).

4. Praktická část

4.1. Úvod do problematiky malarických vakcín

Malárie zabije jeden milion lidí každý rok, většina z nich jsou děti v sub-Saharské Africe. Malarická vakcína je viděna jako kritický úsek v dlouhodobé strategii malarické kontroly, zejména v Africe, kde klima a zevní prostředí přejí přenosu malárie. Dětské imunizační programy, které většinou efektivně zasahují do zdraví, již chrání životy milionů dětí každým rokem. Bezpečná, efektivní a cenově dostupná malarická vakcína by měla potenciálně chránit mnohem více životů. Vědci zabývající se vývojem malarických vakcín hodnotí různé vakcíny a formulace, které jsou navrženy pro stimulaci imunitního systému, s cílem zničit a zastavit malarické parazity. Po malarické vakcíně se požaduje chování, které se uplatní v několika bodech během životního cyklu parazita. Většinou jsou vědci postaveni před výzvou, dostatečně pochopit specifické imunitní odpovědi asociované s ochranou proti parazitární nemoci.

4.2. Překážky ve vývoji vakcín

- a) Nedostatek bezpečných korelátů ochrany
- b) Nedostatek prediktivních zvířecích modelů
- c) Nedostatečné in vitro imunoanalýzy a funkční testy
- d) Antigenní rozmanitost parazita
- e) Specifita stádií indukujících imunitní odpověď
- f) Různé variace antigenů, např.: 8 variant má MSP-1, 10 variant má MSP-2 a 6 variant má CSP

4.3. Požadavky na ideální vakcínu

- a) Měla by obsahovat jak B-buněčné, tak T-buněčné (CD 4+ i CD8+) epitopy, ale problémem je heterozygocita
- b) T-buněčné epitopy by měly být rozpoznatelné imunitním systémem každého jedince, bez ohledu na genetickou výbavu. Tím by nemělo dojít k problémům s navozením imunitní odpovědi asociované s HLA haplotypy
- c) Nemělo by dojít ke vzniku mutace ve vakcínových terčích
- d) Měly by navodit přirozený zesilující („booster“) efekt
- e) Měly by obsahovat co možná nejmenší počet T-supresorových epitopů
- f) Měla by být formulovaná tak, aby indukovala přiměřenou imunitní odpověď s optimálním množstvím dávky, nosiče, adjuvans.
- g) Měla by fungovat v různých klimatických prostředích a za různých epidemiologických okolností
- h) Měla by být levná a dostupná v celé populaci

4.4. Fáze klinických studií

Klinické zkoušky jsou rozhodujícím zdrojem dat pro rozhodování se okolo výroby vakcín. Tyto zkoušky hodnotí bezpečí a účinnost nových produktů, tak , jako jejich schopnost vyvolat imunitní odpověď. Zkoušky mohou také vyšetřovat, jak dobře produkty korelují s existujícím systémem ochrany zdraví, tak jako s národním očkovacím programem. Klinické studie jsou vedeny ve fázích, které jsou navzájem překrývány a výrobci podávají informace o jednotlivých krocích testování a výroby a otázkách ve výzkumu. Znalosti získané skrz výsledků pokusů často dále informují o možnosti postupu do další fáze, nebo odmítnutí vakcíny. V následujícím je shrnuto vše o typických klinických fázích výzkumu antimalarických vakcín. Výzkum a preklinický vývoj zahrnuje identifikaci relevantních

antigenů, vytvoření konceptu vakcíny, vedení preklinického cenového ohodnocení a vyrábění vakcíny ve výrobním procesu.

4.4.1. Klinické pokusy- fáze 1:

Zhodnocení bezpečnosti produktů na člověka a jeho schopnosti vyvolat imunitní odpověď. Tyto časné zkoušky obvykle zahrnují méně než 100 dobrovolníků a po dobu 1 roku se doplňují počáteční data analýzy. Pro malárii jsou bezpečné zkoušky vedeny v neendemických zemích obvykle ve fázi 1a. Bezpečí a imunogenicita jsou demonstrovány zkouškami vedenými mezi populací exponovanou malárii v endemických zemích a jsou klasifikovány jako fáze 1b. Jestli je výrobek zhodnocen jako bezpečný, dostane se do fáze 2.

4.4.2. Klinické pokusy-fáze 2:

Monitorovat bezpečí a potenciální vedlejší účinky, imunitní odpověď, předběžný efekt proti infekci a onemocnění a určit optimální dávku. Fáze 2 může zahrnovat několik set až pár tisíc dobrovolníků ve dvou nebo více letech. Ve fázi zkoušek 2a, jsou dobrovolníci prostí malarické nákazy v neendemických zemích očkováni a poté vystaveni komárům infikovaným malárií, pro zjištění, jak dlouhá bude doba, než začnou být dobrovolníci infekční. Při prvních známkách onemocnění, jsou dobrovolníci léčeni malarickými léky. Fáze 2a podává předběžné údaje o účinnosti vakcíny před přestupem vakcíny do fáze 2b v endemických zemích. Když se vakcína chová dobře v sériích pokusů fáze 2, může přestoupit do fáze 3.

4.4.3. Klinické pokusy-fáze 3:

Monitoruje bezpečí a potenciální vedlejší účinky a hodnotí efektivitu ve velkém rozsahu. Tyto pokusy musejí být dostatečné pro zajištění rozmanitých podmínek výroby vakcíny a pro rozdílné vzorce přenosu malárie. Fáze 3 může trvat 3-5 let pro další pokračování. Jestliže výsledky fáze 3 představují bezpečnost a dostatečnou účinnost, výrobce žádá o povolení proniknout na trh a předložit plán monitorování bezpečí v době po udělení licence.

Předložení regulačním úřadům: aplikace vakcíny je předložena řídicím úřadům pro schválení dostat vakcínu na trh. Dále to zahrnuje vyrobit vakcíny použitelné pro užití.

4.4.4. Klinické pokusy- fáze 4:

Zahrnuje bezpečné a účinné monitorování a měření délky ochrany. Dostatečný monitoring zajistí, že některé vzácné, vážné, nepříznivé účinky, zahrnující výskyt zpožděných vedlejších účinků, jsou včas detekovány. Fáze 4 také sleduje délku ochrany a účinnost vakcíny, zvláště u sekundárních nežádoucích účinků, jako je například anémie. Tyto pokusy mohou trvat od 4 do 6 let.

Celková délka klinických pokusů pro úspěšné uvedení vakcíny je 10 až 12 let, zahrnující 50 000 až 100 000 dobrovolníků a cena se pohybuje kolem 500 milionů dolarů i více. Málo vakcín projde těmito náročnými postupy, které jsou pro farmaceutický výzkum a vývoj tak drahé. Vyvinutí vakcíny proti malárii pro mladé lidi a těhotné ženy, která je jednou z nejdůležitějších vakcín, je dnes pro výrobce velkou výzvou. Výrobci malarické vakcíny plně věří svému záměru pro dosažení slibných výsledků.

4.5. Typy malarických vakcín

Výroba brzké malarické vakcíny je zaměřená zejména na parazitárním pre- erytrocytární stádium, což je doba, během které organismus v podobě sporozoitů vstupuje do krevního řečiště a míří do jater, kde dozrává a začíná jeho hojné množení. V dnešní době ovšem vývojáři zkoušejí vyrobit 3 typy vakcín:

4.5.1. Pre-erytrocytární vakcína

Pre-erytrocytární vakcína je namířena pro ochranu proti časnému stádiu malarické infekce- stádium, ve kterém parazit vstupuje nebo dozrává v jaterních buňkách infikované osoby. Strategie pre-erytrocytární vakcíny míří k vytvoření protilátkou indukované odpovědi, která bude neutralizovat sporozoity a předcházet napadání hepatocytu a/nebo navodit buňkami zprostředkovanou imunitní odpověď, která by inhibovala intrahepatální parazitismus. Tento typ vakcíny by byl ideální pro cestovatele, protože může být prevencí pro příchod klinické

choroby, když bude vakcína zcela účinná. Částečně efektivní pre-erytrocytární vakcína může být použita pro snížení výskytu nových krevních stádií infekcí. Může to také redukovat výskyt smrtelných příhod. V následujících kapitolách autorka uvede některé z možností ve vývoji vakcín.

4.5.1.1. Vakcíny odvozené z CSP fúzované s povrchovým antigenem hepatitidy B

Většina pokročilých a dobře zdokumentovaných pre-erytrocytárních vakcín je odvozena z circumsporozoitového proteinu (CSP), který se nachází na povrchu sporozoitů a infekčních hepatocytů. Tato vakcína RTS, S/AS01, vyráběná GSK ve spolupráci s WRAIR, zahrnuje antigenní C-terminál (aminokyseliny 207-395) CSP z *P. falciparum* fúzovaný s povrchovým antigenem hepatitidy B a vyjádřený ve formě VLP v *Sacharomyces cerevisiae*.

4.5.1.2. Vakcíny odvozené z CSP, formulované s Montanide ISA 720

Další na CSP založené kandidátní vakcíny zahrnují 102- aminokyselin syntetický peptid reprezentující C- terminál CSP antigenu formulovaný s Montanide ISA 720. Formulace se ukázala být bezpečná u lidských dobrovolníků a vyvolává obě, protilátkovou a buněčnou imunitní odpověď zahrnující sekreci IFN- gama. Vakcína má podstoupenou fázi 1 klinických studií.

4.5.1.3. Alternativní přístup k syntetickým vakcínám

Alternativní přístup k syntetickým vakcínám byl začleněn dalšími kopiemi ochrany CSP epitopu do mnohonásobného antigenního peptidu (MAP-multiple antigenic peptide). Podle očekávání bylo zjištěno vyvolání imunitní odpovědi jen u dobrovolníků s příbuzným HLA holotypem. Ve snaze obejít MHC překážku, byl peptid spojený do „univerzálního“ T-buněčného epitopu. Při tomto modelu dojde k vyvolání robustní imunitní odpovědi u lidí s různými genetickými „backgroundy“. B a T buněčné epitopy z MAP zkoušek byly připojeny do rekombinantního VLP založeného na jaderných částicích hepatitidy B. Tato CSP-HBc částicová vakcína, známá jako ICC-1132, má výsledky fáze 2 klinických studií neuspokojivé.

4.5.1.4. Živé rekombinantní vakcíny

Další vakcíny založené na CSP antigenu obsahují živé rekombinantní vakcíny, které užívají MVA, virus drůbežích neštovic, různé druhy adenovirů, vektory alfavirů nebo na chlad adaptované oslabené viry influenza.

4.5.1.5. Vakcíny zahrnující jaterní antigeny

Doplňkové antigeny, které byly cíleny pro pre-erytrocytární vakcíny zahrnují antigen jaterního stádia 1 a 3 (LSA-1 a -3), sporozoity a antigen jaterního stádia (SALSA) a sporozoit na treonin a asparagin bohatý protein (STARP). LSA-3, vysoce zachovaný pre-erytrocytární antigen, byl demonstrován pro navození ochranné imunity proti *Plasmodium falciparum* sporozoitům v šimpanzech a *Aotus opicích*.

4.5.1.6. SPf66 kandidátní vakcína

SPf66 kandidátní vakcína, která byla vyrobena v Kolumbii, byla syntetický multiepitop, multipeptidová vakcína, formovaná s ledkem jako adjuvans. Vakcína byla testována ve 3. fázi klinických zkoušek, ale její účinnost je nízká a variabilní pro záruku další výroby.

4.5.2. Erytrocytární vakcína

Cílem této vakcíny proti malarickému parazitu, je jeho destruktivní stádium- rychlá replikace organismu v lidských červených krvinkách. Vakcína krevního stádia nemá za cíl blokovat všechny infekce. Očekává se snížení počtu parazitů v krvi, a tak redukovat krutost onemocnění. Naskýtá se možnost, že lidé, kteří přežili vystavení malárii, si časem vytvoří přirozenou imunitu. Cílem vakcíny, která obsahuje antigeny nebo proteiny z povrchu merozoitu, by mohlo být poskytnutí šance pro tělo, vytvořit přirozenou imunitu s velmi malým rizikem onemocnět. V dalších kapitolách budou uvedeny některé z možností ve vývoji vakcín.

4.5.2.1. Vakcíny užívající komplex uplatňující se při invazi erytrocytů

Většina pokročilých vakcín, působících v nepohlavním erytrocytárním stádiu, jsou založeny na užití merozoit povrchového proteinu 1 (MSP-merozoit surface protein 1), který je částí komplexu zahrnujícího v erytrocytech invazi, MSP-2, MSP-3, apikální membránový antigen 1 (AMA-apical membráně antigen 1) a typ 1 integrální membránový protein a na glutamát bohatý protein (GLURP- glutamate rich protein). Protilátka proti MSP-1 ukázala blok invaze do erytrocytů in vitro. AMA-1 je přirozeně cílený pro obrannou odpověď in vivo. Oba, AMA-1 a MSP-1, mají 3-D struktury stabilizované intramolekulárními disulfidovými pouty, které jsou rozhodující pro optimální imunogenicitu molekuly.

4.5.2.2. Vakcíny využívající MSP-1

P. falciparum merozoit povrchový antigen-1 (MSP-1) byl podrobně prostudován u vakcín uplatňujících se v krevním stádiu, ve většině prací zaměřený na 19kDa a 42kDa C-terminální region (bloky 16-17) a hypervariabilní N-terminální, opakující se region (blok 2). Nicméně, nedávná genotypová studie naznačuje, že další regiony MSP-1 mohou být pod selektivním tlakem, zahrnující lokus intragenové rekombinace, určené jako blok 4. MSP-1 *Plasmodium species* je dlouhý polypeptid 200 kDa a je jeden z hlavních součástí nepohlavních krevních kandidátních vakcín. V *P. falciparum* MSP-1 byl objeven polymorfismus genu skrze různé geografické oblasti. Založeno na střídání sekvencí, byl gen PfMSP-1 rozdělen do bloků. PfMSP-1 genové sekvence byly klasifikovány do dvou alelických rodin, a to „Welcome“ a PNG-MAD 20. Mezi těmito dvěma mateřskými alelami jsou zjištěny rekombinace, vyplývající v polymorfismus mezi různými izoláty na celém světě. Celkově, 32-44 % jednotlivců produkovalo IgM protilátku proti jednomu či více epitopům, reagující s oběma mateřskými a rekombinantními formami. Oproti tomu IgG seropozitivní proti bloku 4 jsou mezi populací rozmanité. IgG odpověď proti bloku 4 byla významně nižší, než proti bloku 16-17. IgG podtřída směřovaná proti bloku 4 jde směrem k IgG3 a proti bloku 16-17 směřuje k IgG1.

4.5.2.3. Bi-alelová kombinace AMA-1

Bi-alelová kombinace AMA-1 vakcíny vyvinuté the Malaria Vaccine Development Branch of the NIH a formulována s Alhydrogelem byla testována ve fázi 2 v Mali

s přijatelnou bezpečnostní ochranou, ale jen s mírnou imunogenicitou a malým důkazem klinické efektivity.

4.5.2.4. Vakcína užívaná MSP-1/AMA-1 fúzní antigen

MSP-1/AMA-1 fúzní antigen užívaný *Pichia pastoris* byl vyroben v Šanghaji a byl formulován s ISA 720 adjuvans, ukazující dobrou imunogenicitu u králíků a non-lidských primátů. WHO pracovalo ve spolupráci s MVI při prvním klinickém testování této vakcíny společně ve spolupráci s the Second military Medical University v Šanghaji.

4.5.2.5. LSP vakcína založená na GLURP a MSP-3

LSP vakcína založená na GLURP a MSP-3 vstoupila do klinických vyhodnocení. GLURP formulovaný s ledkem a Montanide ISA 720 je testován ve fázi 1a. MSP-3/GLURP fúzní protein vyjádřený na *Lactococcus lactis*, známý jako GMZ2, nyní směřuje k vyhodnocení fáze 2 v sub-Saharské Africe .

4.5.3. Vakcína blokující přenos

Tato vakcína hledá přerušení životního cyklu parazita navozením protilátek, které přeruší vyzrávání parazita v komáři, po té, co nasaje krev z očkované osoby. Tyto vakcíny by nebyly prevencí před onemocněním, ani by nesnížily symptomy onemocnění. Nicméně by limitovaly šíření infekce komáři, kteří nasají krev z infikované osoby, na nového hostitele. Od úspěšného blokování přenosu by se očekávalo zredukování onemocnění a počtu úmrtí majících vztah k rizikovým společnostem. V následujících kapitolách uvede autorka některé z možností ve vývoji vakcín.

4.5.3.1. Vakcíny indukující tvorbu protilátek

Tyto vakcíny jsou zaměřeny pro navození protilátek proti pohlavnímu stádiu parazita, nebo komářímu antigenu jako prevence vývoje infekčních sporozoitů ve slinných žlázách

Anophela. Hlavní kandidátní vakcína obsahuje povrchový *P. Falciparum* protein Pfs 25 (*P. falciparum* surface) a Pfs 28, nebo jejich homogenní Pvs 25 (*P. vivax* surface) a Pvs 28. Tyto vakcíny jsou aktuálně ve vývoji v NIH, jako rekombinantní kvasinky sekretované proteiny (*S. cerevisiae*). Iniciovaná lidská fáze 1, byla vedena pro Pfs 25 a Pvs 25 formulovaná s ledkem a ISA 51 adjuvans. Další pohlavní vakcíny blokující přenos, které jsou ve vývoji, jsou Pfs 48/45 a Pfs 230.

4.5.3.2. Vakcíny užívající oslabených organismů

Koncept celých oslabených parazitů pro vyvolání imunity, je ve výzkumu. Podnět pro výrobu a komerční užívání vakcíny s oslabenými sporozoity, je v procesu skrze Sanaria Inc., s podporou Bill and Melinda Gates Foundation a NIH. Toto společenství financuje také identifikaci geneticky oslabených kandidátů. V květnu 2009 odstartovala fáze 1 užitím ozářených sporozoitů *P. falciparum* s podporou US FDA. Bude vyžadována vysoká klinická efektivita, klinické vyhodnocení a výzkum pro zlepšení vakcínové prezentace. Aktuálně se využívá tekutého dusíku pro kryozpracování, vhodného pro imunizaci v sub-Saharské Africe.

4.5.3.3. Kombinované vakcíny

Různé skupiny, jako je the US Military Malaria Vaccine Program, Pevion a Oxford University vyvíjejí multiantigen a koncept vakcíny multi stádia. Výhody kombinované vakcíny zahrnují potenciál adresovaný problému antigenního střídání pro navazující imunitu v geneticky heterogenní populaci a adresovaný také možnému imunnímu úniku parazita. Nicméně, riziko interference mezi složkami vakcíny a zvýšenou reakcí této formulace, musí být vzato v potaz.

4.5.3.4. Vakcíny využívající glycosylphosphatidyl inositol (GPI)

GPI ukotvení, které dosahuje několika Plasmodium antigeny do membrány, se ukazuje být vysoce toxické u myších modelů. Důkaz principu studie testující syntetický GPI jako vakcínu na hlodavcích, ukazuje, že kandidátní vakcína byla imunogenní a ochránila zvířata od významné patologické malárie a mortality. Zda bude dále vývoj neutralizujícího malarického toxinu pokračovat, není jisté

4.6. Adjuvancia

Adjuvancia jsou látky, kterých je potřeba k navození optimálního imunogenního účinku. Tyto látky napomáhají pohlcení antigenu antigen prezentujícími buňkami, popřípadě napomáhají nespecifické stimulaci v počátečních fázích imunitní odpovědi. V experimentální medicíně se jako adjuvancia používají emulze minerálních olejů, případně v kombinaci s usmrčenými mykobakteriemi. Antigen prezentující buňky dobře pohlcují malé kapičky oleje s emulgovaným antigenem, látky mykobakteriálních stěn zase stimulují zánětlivou reakci a produkci cytokinů. V humánní medicíně je nejvíce používaný hydroxid hlinitý, na jehož částice se antigeny adsorbují a jsou pohlcovány antigen prezentujícími buňkami.

4.7. Kandidátní vakcíny ve vývoji

Iniciativa pro výrobu malarické vakcíny (MVI- malaria vaccine initiative) se aktuálně zabývá těmato vakcínama:

4.7.1. GSK RTS,S AS01/AS02

Název: GlaxoSmithKline Biologicals (GSK) RTS,S AS01/AS02.

Stádium vývoje: vstoupila do 3. fáze klinických studií

Program: RTS,S antigen produkovaný v *Sacharomyces cerevisiae* obsahuje dva proteiny RTS a S, které se intracelulárně a spontánně shromažďují ve smíšené polymerní částice, ve kterých je navzájem odhadováno průměrně 100 polypeptidů.

Antigen: RTS,S (obsahuje sekvence circumsporozoite- CS proteinu a povrchový antigen hepatitidy B- HBsAg).

Adjuvans: AS02D/AS01E

AS02: patentovaná emulze olej ve vodě formulovaný MPL a Stimulon QS21 imunostimulancia. Zvláště výhodné adjuvans obsahuje QS21, netoxickou frakci čištěnou

HPLC odvozenou z kůry *Quillaja Saponaria Molina* a 3 De-O-acylovaný monofosforyllipid A, popřípadě společně v emulzi typu olej ve vodě.

AS01: liposom formulovaný MPL a QS21 imunostimulancia

Začátek projektu: říjen 2005

Biologický princip: výroba malarické vakcíny, která má za cíl pre-erytrocytární stádium plasmodia je založena na předpokladu, že vakcína vyvolá silnou neutralizující protilátkovou imunitní odpověď řízenou proti exponovaným povrchům proteinů sporozoitu. Tato protilátkami zprostředkovaná ochrana může být zprostředkovaná buď skrz ozonizaci a destrukci napadajícího parazita makrofágy, skrz inhibiči funkce, která je nezbytná pro invazi sporozoitů v játrech, nebo obojí.

Protože většina volných sporozoitů zůstává v krevním řečišti méně než 30 minut a je pravděpodobné, že někteří paraziti napadnou jaterní buňky v několika málo minutách následujících po infekčním kousnutí, může účinná pre-erytrocytární vakcína vyvolat buňkami zprostředkovanou imunitní odpověď prostřednictvím Th1 lymfocytů CD 4+ a CD 8+. Úloha těchto T lymfocytů je rozpoznat infikované jaterní buňky skrz parazitární peptidy vystavené na povrchu infikovaných hepatocytů ve spojení s MHC I. a II. třídy. Tyto komplexy mohou buď lyzovat infikované jaterní buňky, nebo bránit dalším intracelulárním parazitům ve vývoji skrz příslušných cytokinů. V zásadě, oba dva typy imunní odpovědi, protilátkovou i buněčnou, by mohlo navodit další očkování nebo by k ní došlo na základě pozdější přirozené infekce. Vakcína by byla schopná navodit příslušnou skupinu paměťových T i B lymfocytů, specifických pro epitopy odvozené z parazitárního proteinu.

Stadium sporozoitů *P.falciparum* bylo identifikováno jako potenciální cíl vakcíny proti malárii. Hlavní povrchový protein sporozoita je znám jako cirkumsporozoitální protein. Tento protein z kmene 7GB byl klonován, exprimován a sekvenován. Forma proteinu kmene 7GB je charakterizována přítomností centrální imunodominantní opakující se oblasti obsahující tetrapeptid Asn-Ala-Asn-Pro opakovaný po 37 krát, ale přerušovaný čtyřmi menšími opakujícími se úseky Asn-Val-Asp-Pro. U jiných kmenů se počet hlavních a vedlejších opakujících se úseků liší stejně, jako jejich relativní poloha. Tato centrální část je obklopena N a C-koncovou částí složenou z neopakujících neaminokyselinových sekvencí označovaných jako část „repeatless“ proteinu CS.

Mezinárodní patentová přihláška WO 93/10 152 popisuje a má nárok na hybridní protein obsahující v podstatě veškerou C-koncovou část proteinu CS, čtyři nebo více tandemových opakujících se sekvencí imunodominantní oblasti a povrchový antigen viru hepatitidy B, neboli HBsAg. Hybridní protein obsahuje sekvenci, která má alespoň 160 aminokyselin a která je v podstatě homologní s C-koncovou částí proteinu CS. WO 93/10152 dále popisuje expresi hybridního proteinu obsaženého v hostitelském kvasinkovém kmenu, který již měl ve svém genomu několik integrovaných kopií expresní kazety hepatitidy B. Získaný kmen tvoří dva polypeptidy- S a RTS, které vytvoří směs lipoproteinových částic. Tyto částice na svém povrchu výhodně prezentují sekvence CSP hybridu.

Množství antigenu, které je přítomno v každé dávce vakcíny, je zvoleno jako množství, které indukuje imunoprotektivní odpověď, aniž by došlo k významným nepříznivým vedlejším účinkům. Toto množství bude kolísat podle toho, kterých specifických imunogenů se použije. Obecně se předpokládá, že každá dávka bude obsahovat celkem 1 až 1000 mikrogramů proteinu, nejlépe 10 až 100 mikrogramů. Po provedení standardních studií zahrnujících pozorování imunitních odpovědí u pacientů, je možno určit optimální množství proteinu pro konkrétní vakcínu. Po počáteční vakcinaci budou dostávat pacienti zesilující dávku přibližně po čtyřech týdnech, po níž budou následovat opakované zesilující dávky každých šest měsíců, dokud trvá riziko infekce.

Během prvních terénních zkoušek provedených v Gambii, bylo očkováno 250 mužů. Detailní sledování účinků vakcíny, při její asi třetinové úspěšnosti, prokázalo, že její účinnost je vcelku dobrá, ovšem její účinek je krátkodobý. Asi sedmdesát procentní účinnost vakcíny se týkala prvních sedmi týdnů po podání RTS,S vakcíny, později její schopnost čelit malárii klesla na nulu.

Další zkoušky podstoupily děti v Mozambiku, které následovaly zkoušky v Keni a Tanzánii. Mozambická studie zahrnovala 2022 dětí ve věku 1-4 let a byla testována vakcína RTS,S/AS02. Byly sestaveny dvě skupiny dětí: a) 1. skupina- testování proti klinické malárii

b) 2. skupina- testování proti infekci

Ve skupině č. 2 byla úspěšnost vakcíny 35,4 % během prvních šesti měsíců, s poklesem na 9,0 % v následujících dvanácti měsících. Ve skupině č.1 byly hladiny úspěšnosti podobné, a to 29,9 %. Velký rozdíl je ovšem patrný po odstupe doby, kdy ve skupině č.1 zůstal účinek vakcíny stabilní a dosahoval během následujících 21 měsíců až 35,3 %.

Studie vakcín RTS,S/AS01 a RTS,S/AS02 proběhla také na dětech v Ghaně. Bylo to v období mezi srpnem 2006 a květnem 2008 na skupině dětí ve věku do 7 let. U obou vakcín byly nepatrné vedlejší účinky srovnatelné, a to například ve formě slabých febrilních křečí, či menších lokálních reakcí. Obě vakcíny jsou vysoce imunogenní a po vakcinaci dochází k tvorbě protilátek proti circumsporozoit proteinu a proti povrchovému antigenu hepatitidy B. Větší imunitní odpověď byla registrována u vakcíny RTS,S/AS01.

Do roku 2025 by měla být vyvinuta vakcína s 80% účinností a přesto, že je ve vývoji mnoho dalších vakcín, do vakcíny RTS,S jsou vkládány největší naděje. Mimo jiné tato vakcína také spolehlivě působí jako očkování proti žloutence typu B.

4.7.2. ICGEB PvRII

Název: International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology *Plasmodium vivax*, Region II.

Program: Rekombinantní protein vyjádřený v *E. Coli* a vytažení z obsahu těl.

Antigen: V krevním řečišti je Duffy antigen vázající protein *P. vivax*, povinný ligand pro invazi do erytrocytů. Region II tohoto proteinu zahrnuje funkční receptor vázající oblast PvDBP (PvDuffy Binding Protein). PvRII zahrnuje okolo 350 aminokyselin, obsahujících 12 cysteinů. Hexa histidin volný konec byl vsunutý do C-terminálního rekombinantního PvR II.

Adjuvans: TBD

Začátek projektu: červenec 2001

Stádium vývoje: 1. fáze klinických studií

Biologický princip: Pro *P. vivax*, se ukazuje antigen Duffy na povrchu erytrocytů, jako jediný receptor pro invazi. Interakce je zprostředkovaná skrz PvRII a prostor Duffy vázajícího antigenu na povrchu *P. vivax*. Přirozeně získané protilátky proti PvRII ukazují blok vazby PvDBP na erytrocyty v in vitro vázajících zkouškách a Duffy negativní lidské erytrocyty jsou kompletní resistencí pro invazi *P. vivax*. Navíc, opičí parazit *P. knowlesi* má Duffy Binding Protein (PkDBP), který obsahuje vázající oblast, která je homologní k PvRII. Protilátky vázající domény PkDBP mohou vykazovat blok invaze lidských erytrocytů prostřednictvím

P. knowlesi. Tyto postřehy odpovídají skutečnosti, že jedinci pobývající v endemických oblastech získají protilátky namířené proti vzájemným doménám PvDBP následně po vystavení *P. vivax*, zajišťují silný důvod pro výrobu vakcíny založené na PvRII.

Nedostatek alternativního DBI (Duffy-binding like) genu v *P. vivax* genomu a téměř univerzální závislost *vivax* merozoitů na DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines) pro vstup do erytrocytu dělá DBP velkého, jestli ne největšího favorita pro *vivax* vakcínu v krevním stádiu. Od doby identifikace DBP genu, a zachované na cystein bohaté vzájemné domény (Region II) bylo vše mapováno a funkce a struktura byly vyhodnoceny pro použití *P. knowlesi*. Studie s parazitárním chyběním PkDBP alfa genu, u příslušného kmene i chybění PvDBP ukázalo, že DBP je důležitý pro spojení mezi merozoity a lidskými erytrocyty. PkDBP krystalografická 3-dimensionální struktura ukazuje, že vzájemná doména je strukturálně zachována. Imunologické testy ve spojení s vzájemnými testy jsou mapovány důležitými polymorfními místy, která mohou funkčně působit zvýšení protilátek aktivní imunizací a přirozenou infekcí. Pokračující studie hodnotí PvDBP-RII polymorfismus v jiných geografických lokalitách, v odezvách funkční imunity a efekty polymorfismu na efektní ochranu jsou zaručené pro pokračování podpory jako hlavní součást *P. vivax* kandidátní vakcíny. Region II vzájemná doména DBP složená a vyjádřená v *Escherichia coli*, prochází preklinickým testováním, *E. coli* exprimovaná a složená PvDBP-RII kandidátní vakcína byla použita pro imunizaci *Macaca mulatta*, rhesus opic, které ukazují trvalou protilátkovou odpověď, která je formulovaná s Alum, ASO2A nebo Montanide ISA 720. Dřívější studie ohlásily imunizaci a pokroky malých „New World „ opic, *Aotus griseimembra*, s PvDBP-RII formulované s mocným Freund's Complete Adjuvant. Tyto opice byly infikovány *P. vivax*, a použily Duffy antigen jako receptor pro invazi. Nicméně proces ochrany ukazuje, že výsledky nejsou přesvědčivé pro celkovou obrannou efektivitu.

PvDBP-RII kandidátní vakcína je nyní vyvíjena pro klinické zkoušky, reformulována s vhodným adjuvans a testována v pre-klinických zkouškách. DBP-RII antigen indukuje produkci protilátek u druhů, které v in vitro testech blokují adhezi erytrocytů k DBP a protilátky z imunizovaných malých zvířat a infikovaných lidí mají zřejmě sklon k inhibici invaze merozoitů v in vitro testech. Zda imunizace lidí tímto antigenem bude, či nebude mít nějaký protilátkový výsledek, který bude efektivně inhibovat invazi erytrocytů merozoity in vivo a poškodí množení parazita, se teprve ukáže. Musí být pamatováno na to, že DBP oddělený v mikročásticích a neexponovaný protilátkám pravděpodobně před nebo v době kontaktu s retikulocyty vytváří ireverzibilní pouto s DARC. Toto je krátká doba pro to, aby

protilátky neutralizovaly DBP/Duffy interakci a není známo, zda některé z těchto ligandů, nebo důležitých epitopů jsou exponovány v tomto spojení v prostředí hostitele.

4.7.3. Sanaria PfSPZ

Název: Sanaria Inc. *Plasmodium falciparum* sporozoites.

Program: Živé oslabené sporozoity vytažené ze slinných žláz ozářeného *P. falciparum*-infikovaného komára.

Antigen: Sporozoit a komplex jaterního stádia

Začátek projektu: říjen 2006

Stádium vývoje: 1. fáze klinických studií

Biologický princip: Malárie způsobená *P.falciparum* způsobí každoročně více než 300 milionů klinických případů, jeden milion smrtelných případů a je zodpovědná za ztrátu více než 1 % hrubého domácího produktu v Africe, je velmi závažná pro cestovatele a pracovníky v armádě. Efektivní vakcína by mohla mít dramatický dopad na tuto chorobu. Po 20 let se vědci snažili vyvinout moderní, rekombinantní podjednotkovou malarickou vakcínu. Toto bylo velmi obtížné. Je fakt, že na trhu je málo vakcín s rekombinantním proteinem pro ochranu proti některým nemocem a nejsou vakcíny založené na syntetických peptidech, rekombinantních virech, rekombinantních bakteriích nebo DNA plazminech. Většina vakcín je založena na oslabených nebo inaktivovaných celých patogenech nebo materiálech odvozených přímo z infekčních činitelů. Bylo již spatřeno, že imunizace pomocí metabolicky aktivních, nereplikujících se sporozoitů lidí ochrání. Tyto klinické hypotézy již byly prokázány. Vývoj a komercializace této vakcíny nejsou závislé na větších nových vědeckých zásadních objevech. Úspěch může nastat jako výsledek systematické, organizované znalosti založené na produkci a testování této vakcíny.

Živí, oslabení paraziti ve formě sporozoitů jsou vytaženi ze slinných žláz ozářeného komára, čištěné a užívané jako základ vakcíny. Myšlenka je taková, že tyto oslabení paraziti dají jednotlivcům schopnost být imunní proti malárii. Evidence, která tento přístup může zpracovat je založena na předchozích studiích, ve kterých byli dobrovolníci vystavení

kousnutí ozářeného komára ukrývajícího oslabené parazity podobné těm v Sanaria vakcíně. Očkování komářím kousnutím s těmito parazity skončilo ve vysoké hladině ochrany proti *P. falciparum*. Zatímco imunizace lidí oslabenými malarickými parazity byla zvažována po 40 let, nebyl tento přístup technicky proveditelný, až do doby, kdy je nyní výrobní technologie Sanaria vakcíny schopná velké produkce oslabených parazitů z ozářených komárů.

Sanaria nyní demonstruje, že je možné vyrobit a registrovat vakcínu s oslabeným *P.falciparum*, která je akceptovatelná pro potravinářský, farmaceutický průmysl a další regulační úřady. Dále demonstruje, že vakcína ochrání přinejmenším 90 % osob vystaveného *P. falciparum* sporozoitům. Vakcína může také být produkována s ekonomickou efektivitou. Vakcína dále ochrání před infekcí 90 % mladých lidí a dětí v Africe a bude prevencí kruté chorobnosti a mortality.

5. Diskuse

Malárie představuje už po dlouhá staletí velký problém pro mnoho generací. Vždyť už jeden z nejvýznamnějších faraonů Tutanchamon zemřel podle amerických badatelů na malárii, když v jeho těle našli původce těžké malárie, *P.falciparum*. Člověka žijícího v našich klimatických podmínkách, kde bojujeme zejména s neinfekčními onemocněními, jako jsou rakovina či kardiovaskulární onemocnění, nenapadne ani při nejmenším, že někde jinde na světě denně umírá velké množství lidí následkem komářího bodnutí. V posledních letech se ve velkém rozmáhá cestování téměř do všech koutů světa, ale ani to není důvod k tomu, aby se malárie stala aktuálním tématem, kterým by se v České republice lidé zabývali. Přesto pro autorku představuje plasmodium naprosto unikátního parazita ve všech svých ohledech a je ohromena jeho variabilitou. Je neskutečné, že ani imunitní systém člověka není schopen adekvátně rychle zareagovat na přítomnost tohoto nezvaného hosta. Vždy dovede být ve správném čase na správném místě a než začne imunitní systém reagovat na určitou formu parazitujícího plasmodia, už se parazit nachází úplně jinde. Obvykle je imunitní systém člověka na infekci schopen zareagovat a má vše pod kontrolou. Intracelulární parazit napadne buňku, aktivuje se imunitní reakce typu Th 1, kdy Th 1 buňky dají napadenému makrofágu signál pro produkci interferonu gama, který intracelulárního parazita zneškodní. Dochází také k produkci tumor nekrotizujícího faktoru (dále jen TNF), kdy právě TNF alfa je předpokládaným mediátorem klinického onemocnění u malárie. Plasmodium si samozřejmě nevybírámakrofág, nýbrž jemu vyhovující erytrocyt. Signifikantně nižší je hladina TNF alfa u endemické populace, což je známkou jisté tolerance vůči malárii (Konradsen F., 2000). Je zjevné, že imunitní systém bojuje, ale zatím malárii, bohužel, není schopen zcela zvládnout. A zde se naskýtá otázka, jak se malárii ubránit. Momentálně největší úspěšnost mají profylaktická opatření, jako je správný oděv, nevycházení ven po setmění, používání repelentů, moskytiér, antimalarika, ale stále chybí to, co by milióny lidí nejen v endemických oblastech uvítaly. Je to očkovací látka. Několik druhů vakcín se právě nachází v různých fázích klinických studií. Autorka obdivuje nadšení mladých amerických vojenských lékařů, kteří v roce 1987 podstoupili rizikovou zkoušku, kdy se nechali poštípat infikovanými komáry. Rok před tím jim byla aplikována experimentální vakcína FSV-1, kterou sami vyvíjeli. Jejich pokus spočíval v připevnění plastických kelímků plných infikovaných komárů na předloktí a vědomě do sebe nechali vstupovat plasmodia.

Z celkového počtu 12 vojáků se naočkovalo jen 6 a výsledek byl nekompromisní. Z celkového počtu jich onemocnělo 11, pouze jeden očkovaný vojenský dobrovolník jménem Daniel Gordon se může pyšnit prvenstvím, že se po klasickém očkování uchránil před malárií. Vakcína FSV-1 byla jedním z předchůdců vakcíny RTS,S, která je s klinickými zkouškami zatím nejdál a jsou do ní vkládány největší naděje (Petr J., 2009). Každá z vakcín působících v různých vývojových stádiích parazita má podle autorky své klady, ale naprosto nejlepší by byla kombinace několika vakcín. Je to zřejmě utopie, když zatím na trhu není ani jedna vakcína s uspokojivě vysokou účinností alespoň v některé fázi vývoje. Filozofie pre-erytrocytární vakcíny zdá se být nejlepší, protože pokud dojde k neutralizaci sporozoitů a nedojde k napadení hepatocytu, můžeme se oprostít zcela od klinických projevů onemocnění. To by bylo samozřejmě fantastické. Erytrocytární vakcíny působí ve fázi, kdy už parazit koluje v krvi, nicméně je zde jistá pravděpodobnost redukce závažnosti onemocnění a šance vytvořit si přirozenou imunitu. Autorka má ovšem o ideální vakcíně jiné představy. Vakcíny blokující přenos by si autorka pocházející z oblasti prosté malárie vybrala až na posledním místě. Když se ovšem vžije do situace obyvatel z endemických oblastí, bylo by zredukování šíření infekce obrovským úspěchem. Vývoj vakcín už tak stojí velké sumy peněz a je otázkou budoucnosti, zda se podaří vytvořit funkční vakcínu. Pokud se toto povede, je nasnadě další otázka, a to, zda bude vakcína natolik finančně dostupná, aby si ji byly schopny pořídit i nejhudší skupiny obyvatel. I kdyby se tohoto úkolu chopily dobročinné organizace, nebylo by zřejmě možné uspokojit všechny. Když existuje profylaktická ochrana před malárií s nemalým procentem úspěšnosti, proč stále umírají milióny lidí? Protože v chudých oblastech je pro tamější obyvatelstvo velkým finančním, ale i sociálním problémem spojeným například s náboženstvím, třeba jen repelent či moskytiéru si pořídit. A tady by autorka viděla také problém ve vysoké mortalitě malárie v neendemických oblastech. Jedná se z velké části o cestovatele pocházející z neendemických oblastí, kteří si antimalarickou profylaxi nepořídí. U těchto cestovatelů většinou nejde ani tak o finance, jde více méně o podcenění profylaxe. Podle autorky se jedná o zcela fatální zanedbání a naprostou hloupost cestovatelů vystavit se účinkům parazita. Autorka je také přesvědčena o tom, že i kdyby vakcíny v budoucnosti slavily úspěchy, překvapí parazit opět svou schopností posunout se někam dál a bude pro lidstvo nadále hrozbou. Vždyť během celé evoluce se příroda chová tak, že nepřezijí všichni. Snahou autorky bylo podat co nejkvalitnější informace o malarickém parazitu a o některých kandidátních vakcínách. Cíl práce, zda se podaří člověku vyvinout a aplikovat účinnou antimalarickou vakcínu do praxe, je stále ve fázi klinických studií, jejichž konečné výsledky nejsou k dispozici. Podle zatím dostupných informací jsou největší naděje vkládány

do vakcíny RTS,S AS01/AS02, která působí v pre-erytrocytárním stádiu plasmodia. Je nutné si uvědomit, že fungující vakcína by mohla pomoci nejen lidem v endemických oblastech, ale pomohla by jednoznačně snížit vysokou mortalitu malárie i v oblastech neendemických. Snad by konečně cestovatelé z těchto oblastí nepodceňovali ochranu a nechali by se očkovat. Příčiny vysoké mortality malárie v neendemických oblastech spatřuje momentálně autorka jednoznačně v zanedbání široce dostupné profylaxe.

6. Seznam zkratek

AMA	apical membrane antigen
CD	cluster of differentiation
CNS	centrální nervová soustava
CSP	circumsporozoite protein
DARC	Duffy antigen receptor for chemokines
DBI	Duffy binding like
DBP	Duffy binding protein
DBP-R II	Duffy binding protein region II
DDT	dichlordifenyltrichlormethylmethan
DEET	N,N-diethylmetatoluamide
DHFR	dihydrofolate reductase
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EIR	entomological inoculation rate
GIT	gastrointestinální trakt
GLURP	glutamate-rich protein
GMZ2	GLURP/MSP-3 fúzní protein
GPI	glycosylphosphatidyl inositol
GSK	Glaxo Smith Kline
G-6-PDH	glukoza-6-fosfátdehydrogenáza

HbA	hemoglobin A
HbS	hemoglobin S
HBsAg	hepatitis B surface antigen
HE	hereditárny eliptocytóza
HIV	human immunodeficiency
HLA	human leukocyte antigen
IFN	interferon
LSA	liver stage antigen
MAP	multiple antigenic peptide
MHC	major histocompatibility complex
MSP	merozoite surface protein
MVA	modified vaccinia virus Ankara
MVI	Malaria Vaccine Initiative
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NIH	Institut of Health
PCR	polymerase chain reaction
PfMSP	<i>Plasmodium falciparum</i> merozoit surface protein
PfS	<i>Plasmodium falciparum</i> surface
PkDBP	<i>Plasmodium knowlesi</i> Duffy binding protein
PvDBP	<i>Plasmodium vivax</i> Duffy binding protein
PvDBP-RII	<i>Plasmodium vivax</i> Duffy binding protein Region II
PvS	<i>Plasmodium vivax</i> surface
SALSA	antigen jaterného stádia

SAO	Southeast Asian ovalocytosis
SPf66	sporozoites <i>Plasmodium falciparum</i>
STARP	sporozoite threonine asparagine rich protein
TNF	tumor nekrotizující faktor
US FDA	United States Food and Drug Administration
UV	ultrafialový
VLP	virus-like particle
WHO	World Health Organization
WRAIR	Walter Reed Army Institute of Research

7. Seznam použité literatury

1. **Arguin P. M., Kozarsky P. E., Reed Ch.** : CDC Health Information for International Travel, Elsevier Inc., Philadelphia., 2008, s. 212-234, ISBN 978-0-323-04885-9
2. **Bakoss P., a kol.** : Epidemiológia, 2. Vydání, Univerzita Komenského, Bratislava, 2008, s. 270-276, ISBN 978-80-223-2417-5
3. **Bobůrková E.** : Malárie: nemoc z bažin, Ekonom, 2009, č. 18, s. 56-57
4. **Galinski M. R., Barnwell J. V.** : *Plasmodium vivax*: who cares?, Malaria Journal, 2008, doi:10.1186/1475-2875-7-S1-S9
5. **Gécz, J., Jalili, N., Mad'ar R.** : Pokroky v oblasti vakcíny, kniha je v tisku, 2010
6. **Göpfertová D., Pazdiora P., Dáňová J.** : Epidemiologie, obecná a speciální epidemiologie infekčních nemocí, Praha, Karolinum, 2006, s. 207, ISBN 80-246-1232-1
7. **Heymann D. L., MD,** Control of Communicable Diseases Manual, Eighteenth Edition, United Book Press, Inc., Baltimore, 2004, s. 324-340, ISBN 0-87553-034-6
8. **Hořejší V., Bartůňková J.** : Základy imunologie, 4. vydání, Praha, Triton, 2009, s. 304, ISBN 978-80-7387-280-9
9. **Chang S. P., Kayatani A. KK, Terrientes Z. I, a kol.** : Shift in epitope dominance of IgM and IgG responses to *Plasmodium falciparum* MSP1 block, Malaria Journal, 2010, doi:10.1186/1475-2875-9-14
10. **Konradsen F. a kol.** : Malaria in Sri Lanka, IWMI, Colombo, Sri Lanka, 2000, s. 190, ISBN 92-9090-406-2
11. **Mad'ar R.** : Ochrana zdraví na cestách, Martin, Osveta, 2008, s. 88, ISBN 978-80-8063-265-6

12. **Maestre A., Sunil S., Ahmad G. a kol.** : Inter-allelic recombination in the Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 gene among Indian and Colombian isolates, Malaria Journal, 2004, doi:10.1186/1475-2875-3-4
13. **Moorthy V. S., Ballou W. R.** : Immunological mechanisms underlying protection mediated by RTS,S: a review of the available data, Malaria Journal, 2009, doi:10.1186/1475-2875-8-312
14. **Nohýnková E., Stejskal F.** : Malárie, Interní medicína pro praxi, 2005, roč. 7, č. 5, s. 256-261
15. **Owusu-Agyei S. a kol.** : Randomized controlled trial of RTS,S/AS02D and RTS,S/AS01E malaria candidate vaccines given according to different schedules in Ghanaian children, PLoS One, 2009, Oct 2;4(10):e730
16. **Penka M. a kol.** : Neonkologická hematologie, 2. vydání, Praha, Grada, 2009, s. 240, ISBN 978-80-247-2299-3
17. **Petr J.** : Nastává začátek konce malárie?, 21. století, 2009, č. 4, s. 36-39
18. **Petráš M.** : Malárie-rizika, léčba a prevence, Sestra, 2008, roč. 18, č. 6, s. 29-30
19. **Sacarlal J. a kol.** : Long-term safety and efficacy of the RTS,S/AS02A malaria vaccine in Mozambican children, J Infect Dis., 2009 Aug 1;200(3):329-36
20. **Volf P. a kol.** : Paraziti a jejich biologie, Praha, Triton, 2007, s. 318, ISBN 978-80-7387-008-9
21. **Zimmer C.** : Vládce parazit, Praha, Fénix Paseka, 2005, s.262, ISBN 80-7185-685-1
22. Patentový spis, CZ 290826 B6, Majitel patentu: SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S. A., Rixensart, BE, původce vynálezu: Cohen Joseph Dr., název vynálezu:Vakcína, udělení patentu 21.08.2002
23. World Health Organization, Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy, WHO Press, Geneva, 2009, s. 27-29, ISBN 978-92-4-159753-1
24. <http://www.czechnationalteam.cz/rservice.php?akce=tisk&cislocclanku=2006120001>
25. http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index4.html
26. <http://www.malariavaccine.org/malvac-approaches.php>

27. <http://www.malariavaccine.org/rd-clinical-trials.php>
28. <http://www.sanaria.com/index.php?s=39>
29. <http://www.sanaria.com/index.php?s=38>
30. <http://www.malariavaccine.org/rd-vaccine-candidates.php>
31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2666156/>