

# Calmette-vaccinen mod tuberkulose træner det medfødte immunsystem

**Af Kristoffer Jarlov Jensen,**

cand.scient., ph.d., post.doc,  
Forskningscenter for Vitaminer og Vacciner,  
Bandim Health Project, Statens Serum Institut,  
Institut for Bioteknologi og Biomedicin,  
Danmarks Tekniske Universitet

**Mens vacciner typisk** udvikles til og administreres mod en enkelt sygdom via antigen-specifik genkendelse, er der efterhånden stærk evidens for, at en række hyppigt anvendte vacciner også kan påvirke modtageligheden mod et bredere spektrum af sygdomme. Dette fænomen kaldes uspecifikke effekter af vacciner (sometider også omtalt som *off-target* effekter eller heterologe effekter).<sup>1</sup>

Tuberkulose-vaccinen *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), som skal behandles her, er en af de mest studerede tilfælde af uspecifikke effekter, idet en række epidemiologiske studier i meget forskellige befolkninger har fundet en sammenhæng mellem BCG vaccination og lavere generel dødelighed i et omfang, der ikke sandsynligt kan tilskrives beskyttelse mod tuberkulose. Senest har tre randomiserede kliniske studier hos spædbørn i Vestafrika alle vist en markant reduktion i neonatal (første 28 dage) dødelighed efter tidlig BCG vaccination, primært som følge af reduceret sepsis og respiratorisk infektionsdødelighed (meta-estimatet for de tre studier var en dødelighedsreduktion på 38% (95% CI: 17-54%).<sup>2,3</sup>

## Det medfødte immunsystem trænes

Meget bemærkelsesværdigt har den dødelighedsreducerende effekt kunnet observeres allerede få dage efter vaccination i de randomiserede studier.<sup>4</sup> Dette indikerer, at vaccins uspecifikke effekter i hvert fald delvist går via det medfødte (engelsk: *innate*) immunforsvar fremfor adaptive (antigen-specifikke) mekanismer, som tager længere tid at ud-

vikles. Dyrestudier og in vitro studier understøtter denne antagelse.

Den potente immun-stimulerende egenskab ved BCG og andre mykobakterier er velkendt og har været rigt anvendt i form af vaccine-adjuvans, blandt andet i Friends komplette adjuvans, mens talrige musemodelforsøg over de seneste 60 år har vist, at BCG beskytter mod dødelighed af en række forskellige efterfølgende heterologe infektioner, herunder virale, bakterielle og fungale infektioner.<sup>5,6</sup> Et banebrydende studie i 2012 fra Nijmegen i Holland viste, at denne beskyttende effekt afhænger af et funktionelt medfødt immunforsvar, mens det i mindre grad afhænger af et adaptivt immunsystem, idet BCG modulerer de medfødte immunforsvars-celler monocytter og NK celler til at respondere kraftigere på efterfølgende anden stimulation af det medfødte immunforsvar.<sup>7,8</sup>

De medfødte immunceller siges således at blive trænet af BCG, og mekanismen kaldes derfor '*trained immunity*' og har medført et reelt paradigme-skifte indenfor immunologien, idet *trained immunity* gør op med den hidtidige immunologiske forståelse af det medfødte immunsystem som statisk og ikke beiddende læringsegenskaber (modsat det adaptive immunsystem).<sup>9</sup> Læringen af det medfødte immunforsvar er vist at indlejres via epigenetiske modifikationer af monocytters og NK cellers DNA i form af acetyleringer og metyleringer af promoter- og enhancer-regioner til relevante immunologiske og

metaboliske gener. Disse modifikationer (H3K27ac og H3K4me3) fører typisk til øget eller hurtigere transkription af de associerede gener.<sup>10</sup>

### **BCG beskytter mod virusinfektion i human model**

Til trods for at den biologiske mekanisme bag de observerede gavnlige effekter af BCG langt fra er fuldstændigt kortlagt, synes trained immunity hypotesen at have en betydelig forklaringskraft. Den direkte kliniske oversættelse til de observerede slående dødelighedsreducerende effekter af BCG fra de humane studier har dog manglet, da sådanne eksperimenter ofte vil indebære invasive og muligvis skadende indgreb.

Imidlertid har samme hollandske forskningsgruppe, der fremsatte 'trained immunity'-hypotesen for BCG, nu i samarbejde med danske forskere fra Bandim Health Project ved Statens Serum Institut og Syddansk Universitet publiceret et robust proof-of-concept studie, der på snedig vis anvender en godkendt, levende svækket virusvaccine, gul feber vaccinen, som human infektionsmodel til at studere BCGs beskyttende immunologiske effekter.

Gul feber vaccine virus skaber en inflammatorisk tilstand og replicerer i kroppen efter immunisering, og ligner på denne måde en naturlig viral infektion, dog uden at forårsage alvorlig sygdom. Studiet, der er publiceret i Cell Host & Microbe i år, viser, at forudgående BCG vaccination reducerer infektionsgraden efter gul feber vaccination i form af reduceret viræmi og inflammation, mens dannelsen af den specifikke immunitet mod gul feber ikke hæmmes.<sup>11</sup>

### **Træningen formidles af cytokinet IL-1beta**

Som tidligere vist medfører BCG vaccination udbredte epigenetiske forandringer af monocytterne, og et øget cytokin-svar fra medfødte immunforsvarsceller ved *ex vivo* stimulation (for eksempel mod typiske patogene mikroorganismer), dog med en høj grad af spredning, således at der ikke i alle BCG vaccinerede individer ses en trænings-effekt. Når forfatterne sammenligner dette mål for træning af det medfødte immunforsvar, finder de yderst bemærkelsesværdigt, at IL-1beta cytokin-svaret på stimulation en måned efter BCG vaccination er stærkt korreleret med reduceret viræmi (fem dage) efter gul feber vaccine. Denne sammenhæng findes ikke for andre cytokiner såsom TNF-alpha eller IL-6. Samtidig er der

ikke korrelation mellem det specifikke vaccine-svar (antistofdannelse eller cellulært adaptivt svar) og den akutte viræmi.

Parallelt i et større kohortestudie finder forfatterne evidens for, at bærere af en bestemt genetisk polymorfi i IL-1betas promotorregion har reduceret evne til at udtrykke IL-1beta ved direkte *in vitro* stimulation samt, at deres monocytter har reduceret evne til at blive trænet af BCG *in vitro* (målt som øget cytokin-svar på sekundær stimulation af det medfødte immunforsvar). Den reducerede træningseffekt er stærkere i homozygote bærere af varianten end i heterozygote bærere, det vil sige, at der er en dosis-respons effekt af polymorfien.

Samlet indikerer resultaterne, at BCG træningen går via IL-1beta signalering, hvilket forfatterne slutteligt elegant efterviser ved at dyrke humane monocytter med kunstig IL-1beta *in vitro*, og derefter påvise træning i form af kraftigere cytokin-svar på sekundær stimulation af det medfødte immunforsvar. Forfatterne foreslår samlet, at BCG træningen af monocytterne er medieret af IL-1beta.<sup>11</sup>

Studiet er yderst interessant, idet det både etablerer et proof-of-concept i mennesker af den beskyttende effekt af BCG mod heterolog infektion, samt foreslår en nærmere virkningsvej af BCG vaccinen på det medfødte immunforsvar via IL-1beta signalering.

### **Vaccine-effekten foregår i knoglemarven**

I nærværende studie blev BCG administreret fire uger før gul-feber vaccinen, og tidligere er træningseffekten af de perifære monocytter påvist helt op til 12 måneder efter BCG.<sup>12</sup> Da monocytter i blodbanen har en levetid på få dage, kan den langvarige påvirkning efter BCG immunisering næppe forklares med den direkte træningseffekt af monocytterne i mødet med BCG i periferien.

Derimod har et nyligt studie i mus vist, at BCG kan transporteres fra blodet til knoglemarven via fagocyterende celler, hvilket medfører en ekspansion af hæmatopoietiske stamceller dirigeret mod den myeloide cellelinje. De resulterende makrofager har en ændret epigenetisk og genekspression-profil og besidder øgede anti-mykobakterielle egenskaber. Denne påvirkning af de hæmatopoietiske stamceller kunne observeres i musene helt op til fem måneder efter BCG immunisering.<sup>13</sup>



## BCGs uspecifikke effekter og komplicerede interaktioner

Mens de kliniske studier fra Guinea-Bissau tydeligt viser en stærk uspecifik beskyttende effekt af BCG mod neonatal dødelighed i denne population, er det ikke alle studier, der har kunnet påvise gavnlige uspecifikke effekter på dødelighed eller sygelighed. De tilsyneladende modstridende data kan dog vise sig delvist forenelige, når vigtige baggrundsfaktorer tages med i ligningen, idet disse kan interagere med BCG vaccine-effekterne (det vil sige effekt-modifikatorer).

Eksempelvis er det blevet foreslået, at vaccine-immunitet overført fra forældrene interagerer positivt med BCG effekten. En nylig klinisk afprøvning af BCG vaccination af spædbørn på tre danske fødegange med indlæggelse som primært effektmål (Calmette-studiet 2012-2015) viste overordnet ingen gavnlige effekter af BCG,<sup>14</sup> men i undergruppen af spædbørn, hvis mødre rapporterede at være tidligere BCG-vaccineret, var BCG associeret med signifikant reduktion i infektionshospitalisering samt antallet af besøg i almen praksis.<sup>15,16</sup>

Mens Calmette-studiet således ikke gav belæg for en genintroduktion af BCG i det danske sundhedsprogram, bibragte studiet vigtige nye data til en bedre forståelse af BCGs komplekse immun-træning, hvilket kalder på en efterprøvning. Den nærmere for-

ståelse af hvorledes overført maternal (måske også paternal) immunitet kan forstærke den gavnlige immun-trænende effekt af BCG er ukendt. Epigenetisk programmering kan overføres horisontalt til afkommet,<sup>17</sup> selv om det endnu ikke er vist for præcis træning af det medfødte immunforsvar, mens placentale overførsel af antistoffer har været kendt længe.<sup>18</sup> Hvis internalisering af BCG i antigen-præsenterende celler og transport til knoglemarven er afgørende for den varige træningstilstand, kan den maternale immunitetskomponent muligvis bidrage i form af anti-mykobakterielle antistoffer, der fremmer opsonisering af BCG-bakterier.<sup>19</sup> Dette må dog siges at være en ganske langvarig effekt af BCG vaccination, som oftest er foretaget i barndommen.

Af andre interessante identificerede effekt-modifikatorer kan i denne sammenhæng kort nævnes

- **Køn:** I de guineanske kliniske forsøg oplevede drengbørn en markant hurtigere reduktion i dødeligheden efter vaccination end pigebørn.<sup>4</sup>
- **Andre rutine-vacciner:** BCGs gavnlige effekter synes mest udtalt inden børnene gives inaktiverede vacciner, hvorefter effekten kan annulleres eller direkte blive negativ.<sup>16,20</sup> Således er evalueringstidspunktet efter BCG kritisk.
- **BCG typen:** BCG forekommer i en række undertyper, såkaldte stammer, der er genetisk forskellige og tillige fremstillet af forskellige vaccinefirmaer med forskelle i produktionsteknik og kolonitæl.

## Referencer

1. Aaby P, Kollmann TR, Benn CS. Nonspecific effects of neonatal and infant vaccination: public-health, immunological and conceptual challenges. *Nature immunology* 2014;19:895-899.
2. Biering-Sorensen S, Aaby P, Lund N, Monteiro I, Jensen KJ, Eriksen HB, Scholtz-Buchholzer F, Jørgensen ASP, Rodrigues A, Fisker AB, Benn CS. Early BCG-Denmark and Neonatal Mortality Among Infants Weighing <2500 g: A Randomized Controlled Trial. *Clinical Infectious Diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 2017;65:1183-1190.
3. Aaby P, Roth A, Ravn H, Napirna BM, Rodrigues A, Lisse IM, Stensballe L, Diness BR, Lausch KR, Lund N, Biering-Sorensen S, Whittle H, Benn CS. Randomized trial of BCG vaccination at birth to low-birth-weight children: beneficial nonspecific effects in the neonatal period? *The Journal of Infectious Diseases* 2011;16:245-252.
4. Biering-Sorensen S, Jensen KJ, Monterio I, Ravn H, Aaby P, Benn CS. Rapid Protective Effects of Early BCG on Neonatal Mortality Among Low Birth Weight Boys: Observations From Randomized Trials. *J Infect Dis* 2018;217:759-766.
5. Freyne B, Marchant A, Curtis L. BCG-associated heterologous immunity, a historical perspective: intervention studies in animal models of infectious diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2015;15:287.
6. Freyne B, Marchant A, Curtis N. BCG-associated heterologous immunity, a historical perspective: experimental models and immunological mechanisms. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2015;13:46-51.
7. Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Joosten LA, Jacobs C, Xavier RJ, van der Meer JW, van CR, Netea MG. BCG-induced trained immunity in NK cells: Role for non-specific protection to infection. *Clin Immunol* 2014;155:213-219.
8. Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Joosten LA, Iffrim DC, Saeed S, Jacobs C, van Loenhout J, de Jong D, Stunnenberg HG, Xavier RJ, van der Meer JW, van Crevel R, Netea MG. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012;19:17537-17542.
9. Netea MG, Quintin J, van der Meer JW. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host & Microbe* 2011;9:355-361.
10. Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, O'Neill LA, Xavier RJ. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* 2016;352:1098.
11. Arts RJW, Moorlag SJCF, Novakovic B, Li Y, Wang SY, Oosting M, Kumar V, Xavier RJ, Wijmenga C, Joosten LAB, Reusken CBEM, Benn CS, Aaby P, Koopmans MP, Stunnenberg HG, van CR, Netea MG. BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. *Cell Host Microbe* 2018;23:89-100.
12. Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Benn CS, Joosten LA, Jacobs C, van Loenhout J, Xavier RJ, Aaby P, van der Meer JW, van Crevel R, Netea MG. Long-Lasting Effects of BCG Vaccination on Both Heterologous Th1/Th17 Responses and Innate Trained Immunity. *Journal of Innate Immunity* 2014;7:152-158.
13. Kaufmann E, Sanz J, Dunn JL, Khan N, Mendonca LE, Pacis A, Tzelepis F, Pernet E, Dumaine A, Grenier JC, Mailhot-Leonard F, Ahmed E, Belle J, Besla R, Mazer B, King IL, Nijnik A, Robbins CS, Barreiro LB, Divangahi M. BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell* 2018;172:176-190.
14. Stensballe LG, Sorup S, Aaby P, Benn CS, Greisen G, Jeppesen DL, Birk NM, Kjaergaard J, Nissen TN, Pihl GT, Thostesen LM, Kofoed PE, Pryds O, Ravn H. BCG vaccination at birth and early childhood hospitalisation: a randomised clinical multicentre trial. *Arch Dis Child* 2017;102:224-231.
15. Stensballe LG, Ravn H, Birk NM, Kjaergaard J, Nissen TN, Pihl GT, Thostesen LM, Greisen G, Jeppesen DL, Kofoed PE, Pryds O, Sorup S, Aaby P, Benn CS. BCG Vaccination at Birth and Rate of Hospitalization for Infection Until 15 Months of Age in Danish Children: A Randomized Clinical Multicenter Trial. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2018.

Disse vaccine-genetiske og fremstillingstekniske faktorer kan også have indflydelse på både specifikke og uspecifikke immunologiske og kliniske effekter.<sup>21,22</sup>

De her nævnte interagerende og modulerende parametre øger naturligvis kompleksiteten af indsatsen for en kortlægning af BCGs virkningsmekanismer.

Mens indsatsen for at forstå BCGs effekter på det medfødte immunforsvar er delvist drevet af den hidtidige manglende forklaring på, hvorledes en tuberkulose-vaccine dog skulle kunne medføre markant reduceret sepsis- og respiratorisk-relateret infektionsdødelighed hos spædbørn, skal det også bemærkes, at end ikke den specifikke tuberkulose-beskyttende mekanisme af BCG er erkendt. BCG vaccinen er således fortsærende den eneste godkendte vaccine mod tuberkulose. Det er ikke utænkeligt, at virkningen i høj grad netop er formidlet via medfødte immun-mekanismer.<sup>23</sup> En række kliniske forsøg med nye kandidat-vacciner mod tuberkulose forsøger da også at tage ved lære af BCGs gode stimulerende egenskaber af det medfødte immunsystem.<sup>24,25</sup>

### De uspecifikke effekter og vaccinationsprogrammerne

Mens BCGs tuberkulose-specifikke beskyttelse langt fra er optimal, understreger vores epidemiologiske og kliniske studier fra forskningsstationen i Gui-

nea-Bissau, at det også er vigtigt at vurdere vacciners samlede sundhedseffekter. Andre rutine-vacciner, der er på vej til at blive eller allerede er blevet udfaset, har vist gavnlige uspecifikke effekter i vores befolkningsstudier, herunder oral polio vaccine,<sup>26,27</sup> mæslinge virus vaccine<sup>28,29</sup> samt koppevaccinen.<sup>30,31</sup> De her omtalte kliniske og immunologiske studier har været afgørende for, at WHO har erkendt og vist interesse for uspecifikke effekter af vacciner,<sup>32</sup> mens diskussionen nu i højere grad omhandler, i hvilket omfang og under hvilke omstændigheder uspecifikke effekter har betydning og bør tages i betragtning i sundhedsprogrammerne. ■

## KONKLUSION

Det ovenfor behandlede studie "BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity" har slået fast i mennesker, at BCG kan træne immunsystemet til øget beredskab mod en viral infektion, og samtidig givet stærk indikation på, at denne træning er medieret af BCG vaccins stimulation af det centrale cytokin IL-1beta.

**Interessekonflikter:** Forfatteren har ingen interessekonflikter.

16. Kjaergaard J, Birk NM, Nissen TN, Thostesen LM, Pihl GT, Benn CS, Jeppesen DL, Pryds O, Kofoed PE, Aaby P, Greisen G, Stensballe LG. Nonspecific effect of BCG vaccination at birth on early childhood infections: a randomized, clinical multicenter trial. *Pediatr Res* 2016;80:681-685. 17. Triantaphyllopoulos KA, Ikononopoulos I, Bannister AJ. Epigenetics and inheritance of phenotype variation in livestock. *Epigenetics Chromatin* 2016;9:31. 18. Hanson LA, Korotkova M, Lundin S, Haversen L, Silfverdal SA, Mattsby-Baltzer I, Strandvik B, Telemo E. The transfer of immunity from mother to child. *Ann N Y Acad Sci* 2003;987:199-206. 19. de Valliere S, Abate G, Blazevic A, Heuertz RM, Hoft DF. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infection and Immunity* 2005;73:6711-6720. 20. Haahr S, Michelsen SW, Andersson M, Bjorn-Mortensen K, Soborg B, Wohlfahrt J, Melbye M, Koch A. Non-specific effects of BCG vaccination on morbidity among children in Greenland: a population-based cohort study. *Int J Epidemiol* 2016;45:2122-2130. 21. Favorov M, Ali M, Tursunbayeva A, Aitmagambetova I, Kilgore P, Ismailov S, Chorba T. Comparative tuberculosis (TB) prevention effectiveness in children of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccines from different sources, Kazakhstan. *PloS one* 2012;20:e32567. 22. Biering-Sorensen S, Jensen KJ, Aamand SH, Blok B, Andersen A, Monteiro I, Netea MG, Aaby P, Benn CS, Haslov KR (2015) Variation of growth in the production of the BCG vaccine and the association with the immune response. An observational study within a randomised trial. *Vaccine* 2015;15:2056-2065. 23. Eisenhut M. Reduction of Mycobacterium tuberculosis infection in Bacillus Calmette-Guerin immunized people is due to training of innate immunity. *Med Hypotheses* 2015;84:189-193. 24. Lerm M, Netea MG. Trained immunity: a new avenue for tuberculosis vaccine development. *J Intern Med* 2016;279:337-346. 25. Nieuwenhuizen NE, Kaufmann SHE. Next-Generation Vaccines Based on Bacille Calmette-Guerin. *Front Immunol* 2018;9:121. 26. Andersen A, Fisker AB, Rodrigues A, Martins C, Ravn H, Lund N, Biering-Sorensen S, Benn CS, Aaby P. National Immunization Campaigns with Oral Polio Vaccine Reduce All-Cause Mortality: A Natural Experiment within Seven Randomized Trials. *Front Public Health* 2018;6:13. 27. Lund N, Andersen A, Hansen AS, Jepsen FS, Barbosa A, Biering-Sorensen S, Rodrigues A, Ravn H, Aaby P, Benn CS. The Effect of Oral Polio Vaccine at Birth on Infant Mortality: A Randomized Trial. *Clin Infect Dis* 2015;61:1504-1511. 28. Aaby P, Martins CL, Garly ML, Bale C, Andersen A, Rodrigues A, Ravn H, Lisse IM, Benn CS, Whittle HC. Non-specific effects of standard measles vaccine at 4.5 and 9 months of age on childhood mortality: randomised controlled trial. *BMJ (Clinical research ed)* 2010;2:6495. 29. Sorup S, Benn CS, Poulsen A, Krause TG, Aaby P, Ravn H. Live vaccine against measles, mumps, and rubella and the risk of hospital admissions for nontargeted infections. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2014;27:826-835. 30. Aaby P, Gustafson P, Roth A, Rodrigues A, Fernandes M, Sodemann M, Holmgren B, Benn CS, Garly ML, Lisse IM, Jensen H. Vaccinia scars associated with better survival for adults. An observational study from Guinea-Bissau. *Vaccine* 2006;24:5718-5725. 31. Rieckmann A, Villumsen M, Jensen ML, Ravn H, da Silva ZJ, Sorup S, Baker JL, Rodrigues A, Benn CS, Roth AE, Aaby P. The Effect of Smallpox and Bacillus Calmette-Guerin Vaccination on the Risk of Human Immunodeficiency Virus-1 Infection in Guinea-Bissau and Denmark. *Open Forum Infect Dis* 2017;4:130. 32. WHO - Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization, April 2014 - conclusions and recommendations. *Weekly Epidemiological Record* 2014;89:221-236.