

# Granülomatöz Enfeksiyonlara Karşı Bağışıklamada Yeni Gelişmeler: Tüberküloz Modeli

## RECENT DEVELOPMENTS IN IMMUNIZATION AGAINST GRANULOMATOUS INFECTIONS: TUBERCULOSIS MODEL

Dr. Canan EVÇİ,<sup>a</sup> Dr. H. Barbaros ORAL<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları AD, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, BURSA

### Özet

Dünya nüfusunun 1/3'ü tüberkülozla enfektedir. Her yıl 8 milyon kişide hastalık gelişmekte, bunların 2 milyonu hastalık nedeniyle ölmektedir. Tedavinin uzun süreli, kombine, kompleks ve pahalı olması, çoğu kez hasta uyumunun sağlanamaması ve çoklu ilaca dirençli suşların giderek artması hastalığın kontrolünü güçleştirmektedir. Günümüzde tüberküloza karşı mevcut olan tek aşı, *Mycobacterium bovis*'in canlı, atenüe formu olan *Bacillus Calmette Guerin* (BCG)'dir. Dünyanın farklı bölgelerinde değişken olmakla beraber, çocukluk çağıının meningeal ve milier tüberkülozunda etkin olan aşı, hastalığın en sık görülen formu olan yetişkin pulmoner tüberkülozunda yeterli düzeyde etkin değildir. Canlı bir aşı olduğundan HIV ile enfekte bireylerde uygulanması kontrendikedir. Etkinliğinin düşük olması, purified protein derivative (PPD) testinin yorumunu güçleştirmesi nedeniyle Amerika Birleşik Devletleri ve bazı kuzey Avrupa ülkelerinde rutin aşılama programında yer almamaktadır. Tüberkülozun etkin bir şekilde kontrolü ve gelecekte eradikasyonu, etkin aşıların ve spesifik tanı için uygun reaktiflerin bulunması ile mümkün olacaktır. Bu yazıda, aşılamanın immünolojisi ve granülomatöz enfeksiyonların bir prototipi olarak tüberküloza karşı geliştirilen yeni aşı adaylarından söz edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Granülomatöz enfeksiyon, tüberküloz, bağışıklama

**Türkiye Klinikleri J Microbiol-Infec 2004, 3:97-106**

### Abstract

One-third of the world population is infected with tuberculosis, approximately 8 million people developing the active disease and 2 million dying of tuberculosis each year. The control of the disease is being difficult because of complicated treatment requirements with combine, long period, expensive and patient compliance and getting more multidrug-resistant strains. *Bacillus Calmette Guerin* (BCG), a live attenuated strain of *Mycobacterium bovis* is the only currently available antituberculosis vaccine for use in humans. Although protective efficacy is variable in different parts of the world, BCG has been shown to protect against disseminated and meningeal tuberculosis in young children, but its efficacy in preventing adult pulmonary tuberculosis, which is commonly presenting form of tuberculosis, is not sufficient. BCG being a live vaccine is contraindicated in HIV infected individuals. BCG vaccine is not recommended for use in the US and some northern European countries because of its low efficacy and its interference with purified protein derivative (PPD) skin test screening. The effective control and future eradication of tuberculosis is dependent upon the availability of effective vaccines and reagents for specific diagnosis. In this review, immunology of vaccination and new developing vaccine candidates against tuberculosis which is the prototype of granulomatous infections is discussed.

**Key Words:** Granulomatous infection, tuberculosis, vaccination

Granülomatöz reaksiyon, genellikle hücre içi mikroorganizmaların oluşturduğu kronik enfeksiyonlarda, etkeninin ortadan kaldırmadığı, durumlarda meydana gelir.<sup>1</sup> Dolayısıyla enfeksiyöz ajanın oluşturduğu kronik antijenik uyarı; konakta makrofaj aktivasyonu, fagositik ve mikrobisidal

aktivitede artış, T hücre aktivasyonu ve lenfokin salınımına yol açar. Lenfosit ve makrofajlar, inflamasyon alanına yığılır. Merkezde makrofajlardan türemiş epitelioid hücreler ile dev hücreler ve bunların dış kısmında aktif olarak çoğalan lenfositlerin yer aldığı, fibroblastlarla çevrili granülomatöz lezyonlar gelişir.<sup>1</sup> Çoğu kez etkeni bulunduğu yerde sınırlayıp zararsız hale getirerek konak immün yanıtına katkıda bulunan granülomlar, bazen de yer tutan lezyonlar olarak buldukları dokularda zararlı etkiler yapabilirler.

**Yazışma Adresi/Correspondence:** Dr. Canan EVÇİ  
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları AD,  
16059 Görükle, BURSA  
canan\_evci@yahoo.com

Copyright © 2004 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Microbiol-Infec 2004, 3

97

Granülomatöz reaksiyon, enfeksiyöz ya da enfeksiyöz olmayan birçok nedenle oluşabilir. Tüberküloz, lepra, bruselloz, salmonelloz, sifiliz, tularemi, histoplazmoz, blastomikoz, koksidomikoz, şistozomoz gibi enfeksiyöz hastalıklar, granülomatöz reaksiyonla seyredebilir.<sup>2</sup>

Birçok enfeksiyon hastalığı için hastalığı geçirmeden önce aşılama ile özgül bağışıklığın sağlanması arzu edilir. Aşılamada; enfeksiyonu tamamen önlemek, yalnızca replikasyonu baskılamak, daha duyarlı bireylere bulaşı önlemek, enfeksiyonun yanı sıra patolojiyi de önlemek gibi farklı amaçlar hedeflenebilir.

İdeal bir aşı, konağa zararlı etki yapmaksızın, doğal enfeksiyonun oluşturduğu immünolojik uyarıyı aynen taklit edebilmeli, kolay üretilebilmeli, yan etkilerden arındırılmış, stabil, ucuz ve kolay uygulanabilir olmalıdır.<sup>3</sup> Ancak günümüzde bu özelliklere sahip çok az sayıda aşı vardır. Çünkü mikroorganizmaların çoğuna karşı hangi tipte immün yanıtın etkin şekilde koruyuculuk sağladığı çok net değildir.

İmmün yanıtın oluşumunda anahtar evre, enfeksiyonun başlangıç dönemidir. Mikroorganizmaların içerdiği bakteriyel polisakkarit ve lipopolisakkaritler, fungal polisakkaritler, flagellin ve bakteriyel DNA ya da viral RNA gibi birçok farklı makromolekül, ortak bir paterne sahip moleküller olup, "tehlike sinyalleri" olarak adlandırılırlar.<sup>4</sup> İmmün yanıt tehlike sinyalinin varlığında oluşabilir.

Mikroorganizmalar; konağın "patern tanıyıcı reseptörleri" ile yabancı olarak tanınırlar, endositoz ile fagositik hücre içine alınırlar, lizozomal vesiküller ile birleşirler. Açığa çıkan peptidler, MHC klas II moleküllerince hücre yüzeyine taşınırlar (ekzojen antijenin işlemden geçişi). İntrasellüler patojenlerin hücre içinde sentezlediği antijenler ise, sitoplazmada proteazomlar içinde peptidlere ayrılır, MHC klas I molekülleri ile hücre yüzeyine taşınarak CD8<sup>+</sup> T lenfositlerine sunulurlar.<sup>4</sup>

Dendritik hücreler, antijeni aldıktan sonra kemotaktik sinyaller ile enfeksiyon bölgesinden bölgesel lenf nodlarına göç ederler. Bu göç sırasın-

da antijeni yakalama yeteneklerini kaybederler ancak naif T hücrelerini aktive etme yeteneğini kazanarak olgunlaşırlar. Başlıca kostimülator moleküller olmak üzere önemli yüzey moleküllerinin ekspresyonlarının artması, birbirleriyle etkileşen efektör T hücrelerinin aktivasyonuna sebep olur.

Hücrel immünite, çok sayıda T hücre alt gruplarının etkileşimiyle gerçekleşir ve tüberküloza karşı bağışıklığın oluşmasında anahtar rolü oynar. Hayvan modellerinde interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) sekrete eden CD4<sup>+</sup> T lenfositlerinin rolü gösterilmiştir. CD4<sup>+</sup> T hücre sayısı azalmış olan AIDS'li hastalarda tüberküloza karşı duyarlılıkta artış saptanmıştır.<sup>5</sup> Son zamanlarda CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin konak savunmasındaki, özellikle de latent faz tüberkülozundaki önemi daha da netleşmiştir. CD8<sup>+</sup> T hücreleri tüberküloza karşı immünitede üç farklı mekanizma ile etkili olurlar;

1-Enfekte hücrelerin sitolizi

2-Antimikrobiyal aktivite yoluyla mikobakterilerin doğrudan ekstrasellüler olarak öldürülmesi

3-IFN- $\gamma$  salınımı

İnsanlar üzerinde yapılan bazı çalışmalarda, mikobakteri ile enfekte makrofajları lizise uğratabildikleri, böylece de aynı anda granulizin ve perforin içeren granüllerin salınımı ile bakterinin eradikasyonunu sağladıkları gösterilmiştir. Bunu destekleyecek şekilde rekombinant granulizin perforin ile birlikte etki ederek hücre içi bakterinin yıkımını sağladığı ve ayrıca ekstrasellüler M. tuberculosis'in doğrudan lizisine neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca fare modelinde akciğerlerde, enfekte konak hücrelerini lizise uğratma yeteneğinde sitotoksik CD8<sup>+</sup> T hücreleri izole edilmiştir. Ancak perforin ya da granulizin aracılı sitotoksik yolları eksprese edemeyen knock-out fareler, diğer farelerle aynı düzeyde tüberküloza karşı duyarlılık göstermişlerdir. Bu nedenle CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin sağladığı mikobakteriyel klirens, IFN- $\gamma$ 'ya bağlı fonksiyonlarla ilişkili olabilir.<sup>5</sup>

Yakın zamanda yapılan birkaç çalışma, CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücre alt gruplarının fonksiyonları üzerine odaklanmıştır.<sup>6,7</sup> CD1-restricted  $\alpha\beta$  T hücreleri ve  $\gamma\delta$  T hücrelerinin sırasıyla IFN- $\gamma$  üretecek ve sitolitik aktivite gösterecek şekilde mikobakteriyel

lipidler ve ufak fosforile metabolitler ile aktive edildikleri gösterilmiştir.<sup>8</sup> Yine son zamanlarda CD4<sup>+</sup> T hücrelerin CD4<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> fenotipi gösteren farklı bir T hücre alt grubunun IFN- $\gamma$  üretmenin yanı sıra perforin ve granzim B sekrete ederek (CD4<sup>+</sup> sitotoksik T lenfositler) *M. tuberculosis*'e karşı defansta rol aldıkları ortaya konmuştur.<sup>9</sup> Ancak bu alt grupların fonksiyonları henüz tam olarak çözülememiştir.<sup>5</sup>

İmmünolojik bellek sayesinde, aynı antijenle yeniden karşılaşıldığında, immün yanıtın daha hızlı ve daha güçlü biçimde ortaya çıkması sağlanır.<sup>10</sup> Bellek T hücreleri, daha kolay aktive olmaları, daha düşük antijen dozlarına cevap vermeleri ve antijenle tekrar karşılaşma durumunda, IFN- $\gamma$ , tümör nekrozis faktör- $\alpha$ , interlökin-2 (IL-2), interlökin-4 (IL-4) gibi sitokinleri hızla üretebilmeleri gibi özellikleri ile naif T hücrelerinden farklı, fonksiyonlar kazanmış genişlemiş lenfosit klonlarıdır.<sup>4,10</sup> Aşılama stratejileri açısından, T hücre belleğinin nasıl doğduğu ve nasıl sürdüğünün, bunun için sürekli antijen temasının gerekli olmadığına anlaşılması büyük önem taşır.<sup>10</sup>

Bellek hücrelerinin naif hücrelerden farklı olarak, MHC klas I ve MHC klas II'den bağımsız bir yaşam biçimi kazandıklarına, antijenik stimülasyona gerek olmaksızın proliferere olabildiklerine ve antijenle yeniden karşılaştıklarında bilinen hızlı ve güçlü anamnestik immün cevabı bu suretle oluşturduklarına inanılmaktadır.<sup>10</sup>

Ancak yeni çalışmalar, bellek CD4<sup>+</sup>T hücrelerinin MHC klas II temasından (yani T hücre reseptörü tetiklemesinden) yoksun yaşamalarının bu hücrelerde immünolojik belleği bozduğunu; dendritik hücrelerde işlem gören antijenleri tanıyarak cevap verme yeteneklerini azalttığını göstermiştir. Bellek T hücre havuzunun büyüklüğü antijenin devamlılığı ile sağlanır. Tekrarlayan asemptomatik enfeksiyonların veya organizmadaki antijen kalıntılarının veya çapraz antijenik etkileşimlerin spesifik belleği sürekli canlı tuttuğu varsayılabilir.<sup>10</sup>

Bellek havuzundaki yer sınırlıdır. Zaman içinde yeni bir antijenle karşılaşılması, yeni bir klon setinin genişlemesi ve bellek havuzuna girmesi,

eski hücrelerin ölmesini gerektirebilir. Bu yaşam mücadelesinde, bir hücre ya da klona hangi faktörlerin destek olduğu bilinmemektedir. Ancak başlangıçtaki klonal genişleme ne kadar büyükse, belleğin o kadar uzun süre devam ettiği gösterilmiştir.<sup>4</sup>

Özet olarak, belleğin devamlılığının sağlanmasında, iki strateji ileri sürülmüştür. İlki aşılardan, uygun dozda antijen ve uygun adjuvan ile en fazla klonal genişlemeyi sağlamak üzere tasarlanması, diğeri de antijenik uyarının uzun süreli devamının sağlanması için uygun vektörlerin seçilmesidir.<sup>4</sup>

İmmün yanıtın T yardımcı 1 (Th1) ya da Th2 yönünde gelişmesinde, konağın genetik yapısı, antijenin şekli, dozu, uygulanma yolu, adjuvan kullanımı son derece önemlidir.

Aşıların çoğunluğu, Th2 adjuvan olan alum ile birlikte uygulanır ve prensip olarak antikorların yüksek titrede oluşturulması amaçlanır. Ancak özellikle intrasellüler organizmaların birçoğuna karşı doğal koruma, genellikle Th1 yapısındadır. Güçlü bir hücreyel yanıt oluşturulduğunda, subklinik düzeyde bir baskılama sağlanabilecek veya enfeksiyon önlenilecektir.<sup>11,12</sup> Ancak hücreyel immünitinin koruyuculuğu konusunda somut bir kanıt olmadığından, pek çok yeni aşı, güçlü bir Th1 ve CD8<sup>+</sup> sitotoksik T lenfosit yanıtını artırmak için tasarlanmaktadır. Sitotoksik T lenfositin yanıtının indüksiyonu için antijenin MHC klas I tarafından sunulması gerekir ve bunu oluşturmanın en etkin yolu, hücreleri enfekte eden canlı vektörlerin kullanılması ve antijenlerin sitoplazma içinde tanınmasıdır. DNA canlı vektörler gibi bu antijenleri hücre içinde oluşturma avantajına sahiptir. Ayrıca adjuvan etkisi olan ve arzu edilen yönde yanıt oluşturabilen sitokin genlerini de kodlayabilir.<sup>13-15</sup>

İmmün sistemin antijenleri en iyi şekilde tanınması için, adjuvan seçimi, kritik bir öneme sahiptir. İdeal bir adjuvan, gereken antijen miktarını ve uygulama sıklığını azaltabilmeli ve azalmış immün yanıtı hastalarda aşı etkinliğini artırabilmelidir.<sup>16</sup>

## Tüberküloz Aşıları

Dünya nüfusunun 1/3'ü tüberkülozla enfektedir ve her yıl 2 milyon kişi hastalık nede-

niyle ölmektedir.<sup>17,18</sup> Çoklu ilaca dirençli suşların giderek artması, HIV ile koenfeksiyon gibi faktörlerin yanı sıra, uzun süreli, kombine, kompleks, pahalı bir tedavi rejimini gerektirmesi, yeterli hasta uyumunun sağlanamaması hastalığın kontrolünü güçleştirmektedir.<sup>16-18</sup>

Tüberkülozun etkin bir şekilde kontrolü ve gelecekte eradikasyonu, etkin aşuların ve spesifik tanı için uygun reaktiflerin bulunması ile mümkün olacaktır. Günümüzde mevcut olan *Bacillus Calmette Guerin* (BCG) aşısı, Fransız bilim adamı Calmette ve Guerin tarafından geliştirilmiş, *M. bovis*'den derive edilen canlı, atenüe bir suştur. 1921 yılından bu yana, 3 milyardan fazla kişi üzerinde uygulanmıştır.<sup>16</sup> Aşının çocukluk çağı meningeal ve milier tüberküloza karşı koruyucu olduğu kabul edilmektedir. Ancak en yaygın form olan yetişkin pulmoner tüberkülozdan koruyuculuk oranı, İngiltere'de %80 ile Güney Hindistan'da %0 arasında değişkenlik göstermektedir.<sup>18</sup> Bunun gerçek sebepleri bilinmemektedir. Öne sürülen teoriler, oluşan doğal çapraz koruma ya da tropikal ve ılıman iklimlerde çevresel mikobakterilerle temas sonucu BCG aşısının etkinliğini bozan ya da maskeleyen bir süpresyon, aşılanan kişilerin genetik farklılıkları, beslenme durumları, *M. tuberculosis* suşları arasındaki değişen virulans farklılıkları, helmintler gibi diğer patojenlerle koenfeksiyon ve BCG aşısının değişen genotipik ve fenotipik özellikleri olarak özetlenebilir.<sup>16,18</sup>

BCG aşısının koruyuculuğu, farklı coğrafi bölgelerde değişkenlik göstermektedir. Isı ve ultraviyole radyasyonu gibi enlemlle ilişkili birkaç ekolojik faktör olsa da, asıl olarak tropikal bölgelerde çevresel mikobakteri prevalansının daha yüksek olması, bu bölgelerdeki BCG aşı etkinliğinin daha düşük olmasını açıklamaktadır.<sup>19</sup> Brandt ve arkadaşları, tüberküloza karşı BCG aşısının koruyucu olmadığı Karonga ve Malawi toprak örneklerinden izole edilen mikobakterileri, farelere inoküle ettiklerinde, BCG aşılama takiben farelerde yalnızca geçici bir immün yanıt oluştuğunu göstermişlerdir. Çevresel mikobakterilerle duyarlılaşma BCG aşısının etkinliğini önlemekte ancak subünit aşuların oluşturduğu T hücre yanıtında önemli bir farklılık oluşturmamaktadır.<sup>20</sup>

BCG aşısı, günümüzde koruyuculukta önemli olduğu düşünülen bazı antijenleri içermemektedir. Virulan mikobakterilerde mevcut olan ancak BCG aşısında gösterilemeyen bu genlerin, atenüasyon ve tekrarlayan pasajlar esnasında silindiği düşünülmektedir. 1996 yılında Mahairas ve arkadaşları, "region of deletion-1, 2, 3" RD1, RD2 ve RD3 olarak belirlenen, üç farklı genomik bölge tanımlanmıştır. Bu bölgelerin sayısı bugün itibarıyla 16'ya kadar çıkmış (RD1-RD16) olup en iyi karakterize edilmiş olan RD1 gen bölgesidir. RD1 bölgesindeki genlerin BCG aşı suşlarında olmayıp *M. bovis* ve *M. tuberculosis*'in tüm test edilen virulan laboratuvar ve klinik izolatlarında mevcut olması, bu spesifik proteinlerin, patogeneze rol alabileceği ve spesifik tanıda faydalı olabileceği görüşünü ortaya atmıştır.<sup>21</sup> Ayrıca *M. tuberculosis*'in iki önemli major T hücre antijeni olan culture filtrate protein 10 (CFP10) ve early secretory antigenic target 6 (ESAT-6); sırasıyla, RD1'in open reading frames-6 (ORF6) ve ORF7 bölgelerinde kodlanmaktadır.<sup>22-24</sup> BCG suşlarında ve çevresel mikobakterilerde olmayan bu gen segmentinin, *M. tuberculosis* complex'in tüm suşlarında mevcut olduğu gösterilmiştir.<sup>8</sup>

BCG aşısının etkinliğinin az olması, purified protein derivative (PPD) testinin yorumunu güçleştirmesi nedeniyle, aşı ABD'de ve bazı kuzey Avrupa ülkelerinde tavsiye edilmemektedir. Canlı bir aşı olduğundan, HIV ile enfekte bireylere uygulanması da kontrendikedir.<sup>17-18</sup>

PPD'nin, tanısal amaçlı yaygın bir kullanımı vardır. Ancak içerisindeki antijenik komponentler standardize değildir. Farklı kaynaklı ticari preparatlarda farklı antijenik içerikler nedeniyle PPD yanıtında farklılıklar oluşabilir. Bu nedenle, yeni aşı adaylarının geliştirilmesi ve tüberkülozun spesifik tanısı için standardize preparasyonlara sahip olmak için, *M. tuberculosis*'in major antijenlerinin ve epitoplarının tanımlanması gerekmektedir.<sup>17</sup>

Başarılı bir aşılama stratejisi, immünolojik belleğin indüksiyonuna dayanır. Doğal enfeksiyonun optimal immüniteyi indüklemesi ve ilk karşılaşmada patojenin başarılı şekilde eradikasyonunu takiben aynı patojenle gelecekteki karşılaşmalar

dan konak korunmalıdır. Tüberküloz için bu immünite tam değildir.<sup>16</sup> Güney Afrika'da yapılan geniş çaplı bir çalışmada, tüberkülozun başarılı şekilde tedavisi sonrası ekzojen enfeksiyonun oluşabildiği gösterilmiştir.<sup>25</sup>

Enfeksiyon çoğu kez yaşamın erken bir döneminde alınır, olguların %90'ında latent olarak kalır ve özellikle immünsüpresyon durumu olmak üzere, herhangi bir zamanda reaktive olabilir. Dünya nüfusunun 1/3'ünün latent olarak enfekte olduğu tahmin edilirse, hem temas öncesi hem de enfeksiyon sonrası etkili olabilecek bir aşı ya da bu amaçla iki ayrı aşı uygulaması düşünülebilir.

Tüberküloz aşı çalışmaları geçtiğimiz 10 yıl boyunca, büyük bir ivme kazanmıştır. Rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmeler, *M. tuberculosis*'in birçok major antijeninin identifikasyonunu sağlamıştır.

1998 yılında *M. tuberculosis*'in virülan bir laboratuvar suşunun (H37Rv) ve virülan bir klinik izolatının (CDC1551) tam genom sekansları elde edilmiş, *M. leprae* genomu, yakın zamanda belirlenmiş, *M. bovis*, *M. avium*, *M. smegmatis*'in genom sekansları ise belirlenmek üzeredir. Patojen olan ve olmayan çeşitli mikobakterilerin karşılaştırmalı fonksiyonel analizi için zengin bir sekans veri ve bulguları oluşmuştur. Hastalığın farklı evrelerinde in vivo olarak eksprese edilen spesifik gen ürünlerinin analizleri ile yeni antijenler identifiye edilmiş ve çok sayıda aşı adayı hayvan modellerinde taranmıştır. Persistan ya da latent faz *M. tuberculosis* enfeksiyonu, çevresel mikobakterilere temas, BCG aşılmasını taklit eden modeller geliştirilmiştir.<sup>18</sup>

### Rekombinant BCG aşıları

BCG aşısının immünojenitesini artırmaya yönelik olarak, orijinal derivasyonu esnasında kaybolan antijenlerinin ya da konak sitokinlerinin ekspresyonu sağlamak üzere, *M. tuberculosis*'in immünodominant antijenlerini eksprese ve sekrete eden rekombinant BCG aşıları oluşturulmuştur. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda, bunların konvensiyonel BCG aşısına göre koruyuculuğunun daha fazla olduğu gösterilmiştir.<sup>5</sup>

*M. tuberculosis*'in major sekretuar proteinlerini (kristallin ve Ag85A/B/C kompleksi) devamlı eksprese ve sekrete eden rekombinant BCG suşlarının; kobay modelinde, parenteral BCG aşısından daha fazla koruyuculuk sağladığı gösterilmiştir.<sup>26</sup>

BCG aşılarının en önemli eksikliklerinden biri de CD8<sup>+</sup> T hücrelerini uyarma yeteneğinin az olmasıdır. BCG aşısından elde edilen antijenlerle karşılaştırıldığında, *M. tuberculosis* antijenlerinin konak hücre sitoplazması içine daha kolay girdiği ve CD8<sup>+</sup> T hücre yanıtını daha kuvvetle uyardığı ileri sürülmüştür.<sup>27</sup> *M. tuberculosis* enfeksiyonunun, BCG enfeksiyonuna göre, ovalbuminin MHC klas I ile sunulmasını daha fazla artırdığı gösterilmiştir.<sup>28</sup> Bloom ve arkadaşları ise, β<sub>2</sub> mikroglobulin geni olmayan farelerde *M. tuberculosis* enfeksiyonunun ciddi, BCG enfeksiyonunun ise kontrol edilebilir bir seyir gösterdiğini saptamışlar ve MHC klas I yanıtının *M. tuberculosis* için daha önemli olduğunu vurgulamışlardır.<sup>29</sup> Bu nedenle BCG aşılarının geliştirilmesinde, etkin antijen salınım sistemleri ile MHC klas I sınırlı immün yanıtının artırılması da amaçlanmıştır.

Hess ve ark., *Listeria monocytogenes*'in listeriolysin'ini sekrete eden bir rekombinant BCG suşu ile BCG'nin içerdiği antijenlerin MHC klas I yoluna girişini ve CD8<sup>+</sup> T hücrelerine etkin bir biçimde sunulmasını sağlayabilmişlerdir.<sup>30</sup>

Son zamanlarda Marcus Horwitz ve arkadaşları, BCG aşısını genetik olarak modifiye ederek rBCG adındaki aşığı geliştirmişlerdir. rBCG 30, hücre duvarı sentezi için gerekli olan 30 kDa'luk bir mycolyl transferase enzimini *M. tuberculosis*'den 5-6 kat daha fazla sentezleme özelliğine sahiptir. Ancak BCG aşısında bu özellik yoktur. Bu aşının hayvan modellerinde BCG aşısından daha etkin bir immün yanıt oluşturduğu gösterilmiştir. Bu aşı, BCG'den daha etkin olduğu gösterilen ilk aşıdır. Güney Afrika'da faz IV bir çalışma başlatılmış, Peru ve Hindistan'da ise faz III çalışmalar planlanmıştır.<sup>31</sup>

### Canlı atenüe tüberküloz aşıları

Tam tersi bir yaklaşım, koruyucu özellikteki antijenleri korunan ancak virülan genleri uzaklaştı-

rılan mutant atenüe canlı tüberküloz aşılarının oluşturulması olmuştur. Bu yaklaşım oldukça ilgi görmüştür. Ancak genetik olarak modifiye edilen bu canlı aşılar, güvenlik açısından halen önemli bir problem oluştururlar. Bu suşların çoğu ileriki aşamalarda çok daha virulan suşlara dönüşmüşlerdir. BCG aşıları ile karşılaştırıldıklarında daha üstün olmadıkları görülmüştür.

Mc Kinney ve arkadaşları, enfeksiyonun erken fazında vahşi tipte suşlar gibi çoğalan, fakat enfeksiyonun kronik fazında hızlıca elimine edilen bir "isocitrate lyase knockout" suşu oluşturmuşlardır. Bu tip "knockout" suşlar, daha sonra canlı aşı adayını prototipi olarak ele alınabileceklerdir.<sup>32</sup>

Mikobakterilerin genetik modifikasyonu için gerekli tekniklerdeki gelişmeler ile, olası virulans faktörlerini kodlayan genlerin delesyonu mümkün olmuştur. Bu şekilde oluşturulan mutantlar, güvenlik açısından ve PPD yorumunda karışıklıklara yol açmadıkları için, vahşi tipte BCG aşısından daha avantajlı bulunmuşlardır.<sup>33</sup>

### Subunit aşılar

Aşılar genelde mikroorganizmaların bütünü ile hazırlandıkları gibi sadece bazı antijenik parçacıkların kullanılması ile de hazırlanabilirler (subunit aşılar). Yine son zamanlarda "sentetik peptid aşıları" üzerinde yoğun bir çalışma başlatılmıştır.

Subunit aşılarında, immün yanıt, seçilmiş antijenik determinantlara karşı oluşturulur. Canlı aşılara göre, güvenlik ve kalite kontrolü açısından önemli avantajları vardır.

Enfeksiyonun erken bir evresinde aktif olarak, kısa sürede, çok miktarda kültür filtratına sekrete edilen antijenik proteinlerin T hücreleri tarafından güçlü bir biçimde tanındıkları anlaşılmıştır. Bu antijenik proteinler identifikasyon için parçalara ayrılmış ve T hücre reaktiviteleri test edildikten sonra subunit aşı adayları olarak kullanılmışlardır.

Isı şoku proteinleri ile karşılaştırıldığında, sekrete edilen antijenlerin (ESAT-6, Ag85B, MPT64 ve MPB70), T hücrelerini daha iyi stimüle ettikleri ve IFN- $\gamma$  üretimlerinin daha fazla olduğu gösterilmiştir.<sup>34</sup> *M. tuberculosis*'in yapısında var olan ancak BCG aşı suşunda olmayan ESAT-6,

immünojenitesi az olduğu için adjuvanlarla birlikte uygulanmıştır.<sup>17</sup>

Yine aditif ya da sinerjik etkileri olan ESAT-6 sentetik peptid ve spesifik uygun antijen karışımlarının, tüberküloza karşı duyarlı bir tanimsal reaktif olarak faydalı olabileceği gösterilmiştir.<sup>17</sup>

Fare modelinde Ag85B ve ESAT-6'ya kısa ve uzun süreli maruziyet ile BCG aşılmasına eşdeğer bir koruma sağlanmıştır.<sup>16</sup>

BCG aşısı, çevresel mikobakterilerle duyarlılık oluşmadan önce uygulandığında, çocukluk çağı tüberkülozuna karşı koruyucu olmaktadır. 10-12 yıl içinde azalan bellek immünesitesi ile birlikte, adolesan dönemde birey reenfeksiyona açık hale gelir, akciğer tüberkülozu insidansı artar. İnsanlarda BCG ile rapel aşılama, PPD pozitif bireylerde abartılı bir reaksiyon oluşumuna yol açabilmesi nedeniyle tavsiye edilmemektedir. Subunit aşılarının BCG aşılmasını takiben rapel olarak uygulanması ise bir başka yaklaşımdır.

Ag85A'yı içeren bir subunit aşısı, BCG aşılama sonrasında rapel doz olarak farelerde uygulandığında başarılı olarak rapor edilmiştir.<sup>20,35</sup> Böylece BCG aşısı ile çocukluk çağında oluşan fakat adolesan dönemde azalan immünesiteyi artırma amacıyla, seçilen belli antijenleri içeren bir subunit aşısının rapel olarak uygulanması, çevresel mikobakterilerle temastan etkilenmeksizin koruyucu immünesiteyi tekrar sağlayabilecektir. Özellikle BCG aşı çalışmalarının başarısız olduğu 3. dünya ülkelerinde global tüberküloz epidemisini kontrol altına almaya yönelik olarak bu rapel aşılama ile mortalite ve morbiditede ciddi bir azalma olabilecektir.

Subunit ve peptid aşıları, immünkompromize bireylerde güvenli olmaları nedeniyle oldukça ilgi çekmişlerdir. Ancak bu aşılar, güçlü ve uzun süreli koruyucu immünesiteyi indüklemek için uygun adjuvanlarla sağlanan etkin bir salınım sistemini gerektirirler.

En büyük problemlerden biri, adjuvan seçimidir. Monophosphoryl lipid A (MPL) ve dimetyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA) gibi sentetik adjuvanların yanı sıra ilgi, konak proteinleri ve hücrelerinin kullanımı üzerine odaklanmıştır. En

ümit verici yaklaşımlardan biri, dendritik hücrelerin kullanımı olmuştur. Bu hücreler kolayca *M. tuberculosis* ile enfekte olabilirler ve antijen sunumu ve interlökin-12 (IL-12) üretimi aracılığıyla primer T hücre yanıtını başlatabilirler. Ancak bu yaklaşımda önemli bir problem, MHC uygun dendritik hücreleri gerektirmesidir. Bu strateji, bu nedenle her ne kadar potansiyel antijenlerin taranmasında faydalı bir metod ise de, tüberküloza karşı aşı olarak kullanılması imkansız gibi görülmektedir.<sup>16</sup>

### Diğer mikrobiyal vektörler

Daha iyi bir T hücre yanıtının elde edilmesi için antijen taşıyıcısı olarak mikobakteri antijenlerini eksprese eden *Salmonella* ve *Vaccinia* virus kullanılmıştır. Bu stratejide, taşıyıcı mikroorganizma ile adjuvan etkisi sağlanmıştır.<sup>16</sup>

Fare modelinde, ESAT-6 ve mycobacterial protein tuberculosis 63 (MPT 63) antijenlerini eksprese eden DNA aşısı ile aşılanmanın ardından, aynı antijenleri taşıyan modifiye *vaccinia* virus Ankara aracılığıyla rapel dozu yapılmıştır. BCG aşısı ile eşdeğer düzeyde bir koruyucu yanıt oluşturduğu görülmüştür.<sup>36</sup>

### DNA aşıları

Bir patojene ait spesifik antijenleri kodlayan genlerin, bir bakteri plazmidine klonlandıktan sonra plazmid DNA'sının alıcı konağa deri içi veya kas yolundan verilmesi ile yapılan aşılama "DNA immünizasyonu" veya "gen tedavisi" denmektedir. Aşılamayı takiben plazmid, konak hücrelerine girer, nükleusa geçer ve bir epizom (kromozomla birleşebilen plazmid) olarak kalır. Epizomdaki plazmid DNA'sı, konak metabolik mekanizmalarını kullanarak kodladığı antijenin sentezini doğrudan yönetir. Ekzojen DNA'nın kodladığı bu şifreye göre hücrede sentezlenen endojen protein, hücrede antijen sunumu için gereken işlemlerden geçirilip MHC klas I molekülleri ile CD8<sup>+</sup> T hücrelerine sunulur ve hücre immüniteyi indükler. Ayrıca bu proteinler ekstrasellüler olarak salındıklarında ekzojen protein antijen sunan hücreler tarafından alınıp işlemde geçirilir; MHC klas II molekülleri ile CD4<sup>+</sup> T hü-

relerine sunulurlar ve hücre immüniteyi indüklerler. Konakta güçlü bir sitotoksik T lenfosit indüksiyonu ve Th1 cevabı oluşur. DNA aşıları ile gerçek bir enfeksiyon hastalık riski olmaksızın taklit edilebilir ve rapel doza gerek yoktur.<sup>3</sup> Ancak insanlarda aşırı bir sitotoksik cevap ile konakta hasar oluşturma, çok sayıda hücreyi öldürerek immünizan antijen oluşumu, otoimmünite veya konak genomuna entegre olup maliniteyi indüklemeye olasılıkları nedeniyle güvenli olup olmadıkları henüz net olarak bilinmemektedir.

DNA aşıları, latent tüberkülozlu bir fare modelinde endojen reaktivasyonun önlenmesi için, ilaçla tedavi edilen farelerde ekzojen reeneksiyonun önlenmesi için ya da kronik olarak enfekte hayvanlarda hastalığın seyrinin değiştirilmesi amacıyla çalışmalarda kullanılmıştır.<sup>37</sup>

*M. tuberculosis* antijenlerini (DNA-Ag85A ve DNA-Ag85B) içeren plazmid DNA'sı ile fareler immünize edildiğinde, antijene spesifik Th1 hücrelerin baskın olduğu hücre immün yanıt sağlanmış ve *M. tuberculosis* ile karşılaşma sonrasında da koruyucu olduğu gösterilmiştir.<sup>38-40</sup>

*M. leprae*'nin Hsp60 proteinini kodlayan bir DNA aşısı, fare modelindeki enfeksiyonda BCG'den önemli ölçüde daha iyi bir koruma sağlamıştır.<sup>41</sup>

DNA-85B ile aşılamaı takiben BCG ile rapel aşılamaya yapıldığında, bu kombinasyonun, tek başına BCG aşılamasından daha üstün olduğu gösterilmiştir.<sup>42</sup>

Hayvan modellerinde, plazmid DNA'sı ile ESAT-6 ve MPT64 gibi sekrete edilen antijenlerin genlerinin uygulandığı aşılama da koruyuculuk sağlanmıştır. Karşılaştırmalı bir çalışmada, DNA-Ag85B ile DNA-ESAT-6 ve DNA-MPT64'den daha iyi bir koruma sağlanmıştır.<sup>43</sup> Ayrıca, DNA-Ag85B, DNA-ESAT-6 ve DNA-MPT64 ile koimmünizasyonun tek bir DNA aşısının sağladığından daha iyi bir koruma sağladığı gözlenmiştir.<sup>44</sup> Bir başka çalışmada, DNA aşılarının multivalan kombinasyonu ile (ESAT-6, MPT-64, MPT-63 ve KatG kodlayan genleri içeren plazmid) immünizasyon, antijenik yarışmanın olmadığı ve güçlü bir koruyucu etkinliği indükleyen bir immün yanıt oluşturmuştur.<sup>45</sup>

Sekrete edilemeyen proteinlerden oluşan DNA aşılı arasında, DNA-38 kDA antijeni ve DNA-hsp65 ile immünizasyon tüberküloz fare modelinde koruyucu etkinlik göstermiştir.<sup>17,46-48</sup> Ek olarak DNA-hsp65 ile *M. tuberculosis* ile enfekte farelerin aşılınması, immünoterapötik etkinlik sağlamış ve persistansı ortadan kaldırmıştır.<sup>49</sup>

### Tüberküloz Aşı Çalışmalarında Hayvan Modelleri

Robert Koch'un zamanından bu yana tüberküloz, fare, kobay, tavşan, ve insan olmayan primatlar gibi birçok hayvan modeli üzerinde çalışılmıştır.<sup>50</sup> Ancak bunların her biri için bazı sınırlamalar söz konusudur ve tüberküloz için ideal bir model yoktur.

Kobaylar ve tavşanlar, tüberküloz patogenezi çalışmalarında kullanılan modellerdir. Ancak enfeksiyona son derece duyarlıdır. Düşük dozda virulan *M. bovis* ile karşılaştıklarında, ciddi ilerleyici bir hastalık tablosu oluşmaktadır. Aşı çalışmalarında, yaşam süresinin uzaması ve patolojinin hafiflemesi aşının etkinliğini gösterebilecek tahmini parametreler olabilir. Halbuki fareler immünitinin temel parametrelerinin çalışılması için kusursuz bir modeldirler. Tüberküloza doğal olarak direnç gösterirler, granüloamatöz patoloji oluşturmazlar.<sup>51</sup>

Kobay modeli, cilt testine duyarlı olmasıyla avantajlıdır. Tavşanlarda ise latent periyot olmaksızın, insanlardaki postprimer tüberküloza benzer kronik formda hastalık oluşur. Tavşanlar, primat olmayan türler içinde kaviter lezyonların geliştiği tek türdür. Kaviter lezyonlar akciğerlerin dorsal/kaudal bölgesinde lokalize olur. Bu nedenle tavşanlar apikal yerleşimli postprimer tüberküloz modeli olarak önerilmişlerdir.<sup>52</sup>

Kobay ve tavşan modellerinin bu avantajlarına rağmen, maliyetlerinin fazla olması, genellikle outbred hayvanların kullanılmasıyla geniş varyasyonlar görülmesi, immün yanıtın değerlendirilmesinde mevcut belirteçlerin sınırlı olması, transgenik ve gen knock-out hayvanların oluşturulması için teknolojinin yetersiz olması gibi nedenlerden ötürü kullanımları sınırlıdır.<sup>52</sup>

Fareler tüberküloz modeli olarak en sık kullanılan hayvan modelidirler. Ancak farelerde tüberküloz patogenezi, insanlardakine daha az oranda benzerlik gösterir. Genellikle kazeifikasyon nekrozu ve likefaksiyon gelişmez, lezyonlar kalsifiye olmaz. Hastalığın ileri evrelerinde bile kavitasyon oluşmaz. Tüberküloza kısmi bir direnç gösterirler, solunum yolu ile az sayıda basile maruz kaldıklarında enfeksiyon gelişir ancak neredeyse normal yaşam süreleri kadar yaşarlar.<sup>52</sup> Maliyetleri daha azdır. Grup içinde ufak varyasyonlar gösteren suşları vardır. BCG ile immünize edilebilir ve anti-tüberküloz ilaçlarla başarılı bir şekilde tedavi edilebilirler ve immünolojik belirteçleri geniş bir çeşitlilik gösterir.<sup>16</sup> Farelerde tüberküloza karşı gelişen immünitede, makrofajlar, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>,  $\gamma/\delta$  T hücreleri, NK hücreleri rol oynamaktadır. Aşılama sonrası oluşan sitokin profilinin saptanması immünitinin değerlendirilmesinde değerlidir.<sup>51</sup> Th1 alt yolu ve Toll-like reseptör sistemi gibi çok sayıda mekanizma, insanlardaki mekanizmalarla benzerdir. Ancak oluşan immünolojik bulgularla korunma arasında doğrudan ilişki kurmak güçtür. Çünkü farelerde deneysel maruziyeti izleyerek oluşan immünopatolojik yanıtta benzer elementler oluşsa da farklı şekilde eksprese olurlar.<sup>51,53</sup>

Fare modelinde koruyucu olduğu gösterilen aşılarda, daha sonra kobaylarda test edilir. İnsanlarda test öncesi son basamak, genellikle insan olmayan primat modelinin kullanılmasıdır.<sup>16</sup> Hastalığın patogenezi, patoloji ve immünolojisinin insanlardakine benzer olması, immünolojik ve diğer birçok belirtecin varlığı, cilt testine duyarlı olmaları, simian immunodeficiency virus (SIV) ile koenfeksiyon ile AIDS'li hastalardakine benzer modellerin oluşturulabilmesi yönünden avantajlıdır. İnsanlarda görülen hızlı ilerleyici enfeksiyon, aktif ve kronik enfeksiyon, latent enfeksiyon gibi farklı formlarda hastalık oluşturabilirler.<sup>50</sup> Rhesus maymunlarında fulminan seyir, cynomolgus maymunlarında ise insandaki yetişkin tipte tüberküloza benzer kronik bir seyir gözlenir.<sup>52</sup> İnsanlarda denenmesi güç hatta imkansız olan birçok çalışma için uygun tek hayvan modelidir. Ancak yüksek maliyet, etik sorunlar, çalışmaların uzun süreli olmasının yarattığı güçlükler nedeniyle



kullanımları sınırlıdır.<sup>50,52</sup> Temin edilmeleri güçtür ve heterojen olduklarından varyasyonlar fazladır.<sup>16</sup>

BCG aşısının etkinliği konusunda, insanlar üzerinde olmasa da, çoğu hayvan modeli üzerinde yoğun şekilde çalışılmıştır. Yeni aşıların değerlendirilmesi için, BCG aşısının gerçekten etkisiz olduğu, gerçek yaşam koşullarına benzeyen hayvan modelleri üzerinde çalışılması gereklidir. İki farklı hayvan modelinde BCG aşısının etkisinin olmadığını gösterilmesi, yeni aşıların geliştirme ve değerlendirme aşamasında önemli bir basamak oluşturmuştur.<sup>5</sup>

Yeni aşı adaylarının değerlendirilmesinde, hayvan modellerinin standardize edilmesi önemlidir. Aşılama protokolü, aşı suşu, dozu, uygulama yolu, ilk ve rapel aşılama ve arasındaki süre, aşılama ile temas arasındaki süre, karşılaşılan mikroorganizmanın virulansı, temas dozu, değerlendirme zamanı, test hayvanının türü gibi değişken faktörler standardize edilmelidir.<sup>16,51,54</sup> Aşılanmış insanlarda ya da hayvan modellerinde, şu an için aşının oluşturduğu koruyuculuk düzeyini gösterecek yeterli ve güvenilir bir immünolojik parametre yoktur. Bu nedenle de yeni bir aşı ile kazanılmış direnç göstermenin tek yolu, aşılanmış hayvanların çok düşük dozda bakteri inhalasyonu yolu ile virulan *M. tuberculosis* ile karşılaştırılmasıdır. Dokulardaki bakteriyel yük, akciğerlerdeki histopatolojik değişiklikler ve/veya hastalığın semptom ve bulgularının başlangıcı ve ciddiyeti gibi bulgular göz önüne alınarak değerlendirme yapılır.<sup>37,51</sup>

### Sonuçlar

Tüberküloz aşı adaylarına yönelik yayınlanan bu çalışmalar, buzdüğünün sadece görünen yüzünü oluşturur. Benzer şekilde test edilmiş ancak yayınlanmamış birçok aşı adayı, belki de yüzlercesi, suyun altında kalan kısımdadır. İleride bunların arasından da ümit verici aşı adayları çıkabilir.

Uygun adjuvanlar ile hayvan modellerinde denenmiş aşı adaylarının, insanlarda güvenlik ve etkinlik açısından, geniş çaplı ve çift kör çalışmalarla değerlendirilmesi aşamasına gelmiştir. İnsanlarda aşı adaylarına yönelik klinik çalışmalar dikkatlice tasarlanmalıdır. Temas öncesi aşılama çalışmaları, çok sayıda insanın çalışmaya dahil

edilmesi ve en az 10 yıl gibi uzun süreli değerlendirilmeyi gerektirmesi nedeniyle dezavantajlıdır. Ancak en büyük hedef popülasyon, enfekte olmayan bireylerdir. Yüksek risk gruplarının postenfeksiyöz aşılması ise, az sayıda insanın dahil edilmesi ve 3 yıl gibi kısa bir sürede sonuçlanabilmesi yönünden avantajlıdır.

Tüberküloza karşı aşı çalışmalarındaki son durum, eski bir sözü çağrıştırır "Bütün yollar ROMA'ya çıkar". Günümüzde yeni bir aşı geliştirilmesi için uzun süre gerektiği yönünde bir eğilim varsa da, bu sürenin daha kısa olması da mümkündür.

### KAYNAKLAR

1. Kılıçturgay K. İmmünoloji: Aşırıduyarlık (Hipersensitivite). 3. baskı. İstanbul: Nobel & Güneş Kitabevi; 2003. p.339-57.
2. Memiş L. İnflamasyon oluşumu. In: Ustaçelebi Ş, ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı, Ankara: Güneş Kitabevi;1999. p. 236-43.
3. Kılıçturgay K: İmmünoloji: Aktif ve passif immünizasyon). 3. baskı. İstanbul: Nobel & Güneş Kitabevi; 2003. p. 299-315.
4. Beverley PCL. Immunology of vaccination. British Medical Bulletin 2002;62:15-28.
5. Agger EM, Andersen P. A novel TB vaccine; towards a strategy based on our understanding of BCG failure. Vaccine 2002; 21:7-14.
6. Behar SM, Dascher CC, Grusby MJ, Chung-Ru W, Brenner MB. Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with Mycobacterium tuberculosis. J Exp Med 1999; 189: 1973-80.
7. Moggles T, Goodrich ME, Ryan L, LaCourse R, North RJ. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice. J Exp Med 2001;193: 271-80.
8. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis. J Bacteriol 1996; 178: 1274-82.
9. Lyadova IV, Oberdorf S, Kapina MA, Apt AS, Swain SL, Sayles PC. CD4 T cells producing IFN-γ in the lungs of mice challenged with mycobacteria express a CD27-negative phenotype. Clin Exp Med 2004; 138: 21-9.
10. Kılıçturgay K: İmmünoloji: Kazanılmış (adaptive) immünitinin doğuşu. 3. baskı. İstanbul: Nobel & Güneş Kitabevi; 2003. p. 261-97.
11. Kaul R, Rowland-Jones SL, Kimani J, et al. New insights into HIV-1 specific cytotoxic T-lymphocyte responses in exposed, persistently seronegative Kenyan sex workers. Immunol Today 2000; 21:249-50.
12. McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. Nature 2001; 410:980-7.
13. Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM et al. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. Eur J Immunol 1998; 28: 2045-54.
14. Wolff JA, Malone RW, Williams P et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science 1990; 247: 1465-8.
15. Boyle JS, Barr IG, Lew AM. Strategies for improving responses to DNA vaccines. Mol Med 1999; 5: 1-8.

16. Collins HL, Kaufmann HE. Prospects for better tuberculosis vaccines. *The Lancet Infectious Diseases* 2001;1:21-8.
17. Mustafa AS. Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis. *Molecular Immunology* 2002;39:113-9.
18. Tuberculosis Vaccines: State of the Science, Tuberculosis Research Activities, Microbial Research Global Health Division of Microbiology & Infectious Diseases, 2001.
19. Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 1995; 346:1339-45.
20. Brandt L, Cunha JF, Olsen AW et al. Addressing the failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and the induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect Immun* 2002; 70: 672-8.
21. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 1996;178 (5):1274-82.
22. Mustafa AS, Amoudy HA, Wiker HG, et al. Comparison of antigen-specific T-cell responses of tuberculosis patients using complex or single antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 1998; 48 (5):535-43.
23. Arend SM, Andersen P, van Meijgaarden KE, et al. Detection of active tuberculosis infection by T-cell responses to early-secreted antigenic target 6 kDa protein and culture filtrate protein 10. *J Infect Dis* 2000; 181 (5): 1850-4.
24. Arend SM, Geluk A, van Meijgaarden KE, et al. Antigenic equivalence of human T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides. *Infect Immun* 2000; 68(6):3314-21.
25. van Rie A, Warren R, Richardson M, et al. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med* 1999; 341:1174-9.
26. Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S. Recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30 kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13853-8.
27. Hess J, Kaufmann SHE. Live antigen carriers as tools for improved anti-tuberculosis vaccines. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 23: 165-73.
28. Mazzaccaro RJ, Gedde M, Jensen ER, van-Santen HM, Ploegh HL, Rock KL. Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11786-91.
29. Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Koller B, Bloom BR. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 12013-7.
30. Hess J, Miko D, Catic A, Lehmsiek V, Russel DG, Kaufmann SHE. *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin strains secreting listeriolysin of *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5299-304.
31. McCarthy M. Gates grant boosts tuberculosis vaccine research. *The Lancet* 2004; 363: 537.
32. McKinney JD, Honer zu Bentrup K, Munoz-Elias EJ et al. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 2000; 406: 735-8.
33. Young DB, Stewart GR. Tuberculosis vaccines. *British Medical Bulletin* 2002;62:73-86.
34. Madi NM, Al-Attayah R, Shaban FA, et al. Effective chemotherapy restores T-cell responses to *M. tuberculosis* antigens in tuberculosis patients. In Talwar GP, Nath I, Ganguly NK, Rao KVS, editors. *Proceedings of the 10th International Immunology Congress*. Monduzzi Editore, Italy, 1998, p. 439-42.
35. Brooks JV, Frank AA, Keen MA, Belisle JT, Orme IA. Boosting vaccine for tuberculosis. *Infect Immun* 2001; 69: 2714-7.
36. McShane H, Brookes R, Gibert SC, Hill AVS. Enhanced immunogenicity of CD4<sup>+</sup> T-cell responses and protective efficacy of a DNA-modified vaccinia virus Ankara prime-boost vaccination regimen for murine tuberculosis. *Infect. Immun* 2001; 69(2): 681-6.
37. McMurray DN. Recent progress in the development and testing of vaccine against human tuberculosis. *International Journal for Parasitology* 2003;33:547-54.
38. Denis O, Tanghe A, Palfliet K, et al. Vaccination with plasmid DNA encoding mycobacterial antigen 85A stimulates a CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell epitopic repertoire broader than that stimulated by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infection. *Infect. Immun* 1998; 66(4): 1527-33.
39. Huygen K, Content J, Denis O, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat. Med* 1996; 2(8): 893-8.
40. Lozes E, Huygen K, Content J, et al. Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex. *Vaccine* 1997; 15 (8): 830-3.
41. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VLD. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 1999; 400: 269-71.
42. Britton WJ, Palendra U. Improving vaccines against tuberculosis. *Immunol Cell Biol*, 81:34.
43. Kamath AT, Feng CG, Macdonald M, Briscoe H, Britton WJ. Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun* 1999; 67 (4): 1702-7.
44. Kamath AT, Groat NL, Bean AG, Britton WJ. Protective effect of DNA immunization against mycobacterial infection is associated with the early emergence of interferon-gamma (IFN-gamma)-secreted lymphocytes. *Clin. Exp Immunol* 2000; 120(3): 476-82.
45. Morris S, Kelley C, Howard A, Li Z, Collins F. The immunogenicity of single and combination DNA vaccines against tuberculosis. *Vaccine* 2000; 18(20): 2155-63.
46. Bonato VL, Lima VM, Tascon RE, Lowrie DB, Silva CL. Identification and characterization of protective T-cell in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect. Immun* 1998; 66(1): 169-75.
47. Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ, Ragno S, Tascon RE. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine* 1997; 15(8): 834-8.
48. Lowrie DB, Silva CL, Tascon RE. Genetic vaccination against tuberculosis. *Springer Semin. Immunopathol.* 1997; 19(2): 161-73.
49. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 1999; 400(674): 269-71.
50. Flynn JL, Capuano SV, Croix D et al. Non-human primates: a model for tuberculosis research. *Tuberculosis* 2003; 83: 116-8.
51. Griffin JFT, Chinn DN, Rodgers CR, Mackintosh CG. Optimal models to evaluate the protective efficacy of tuberculosis vaccines. *Tuberculosis* 2001; 81(1/2): 133-9.
52. McKinney JN, Bloom BR, Modlin RL. Tuberculosis and leprosy. In: Austen KF, Frank MM, Atkinson JB, Cantor H, editors. *Samter's Immunologic Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001 p.985-1001.
53. Orme IM. The mouse as a useful model of tuberculosis. *Tuberculosis* 2003; 83: 112-5.
54. Smith D, Wiegshaus E, Balasubramanian V. Animal models for experimental tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2000; 31(suppl 3):68-70.