

YENİ TÜBERKÜLOZ AŞILARI

Doç. Dr. İbrahim Halil ÖZEROL

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı - Malatya

Tüberküloz basili (*M. tuberculosis*), 1882 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmıştır. Akciğer TB'lu, hastaların öksürüğü ile havaya atılır. Solunum yolu ile akciğerlere ulaşan canlı basiller, duyarlı kişilerde enfeksiyona neden olur. Enfeksiyon başladıktan sonra, hücre içinde çoğalan basiller, lenfatik ve hematojen yollarla vücuda yayılır. Basili soluyan kişilerin küçük bir kısmında, aktif klinik hastalık (primer TB) ortaya çıkarken, büyük kısmında klinik hastalık gelişmeden, *M. tuberculosis* yıllarca latent kalabilir. Latent olarak infekte kişilerin yaklaşık %10'unda, ilk bulaştan yıllarca sonra enfeksiyon aktifleşebilir (reaktivasyon). Reaktivasyon TB'u için risk faktörleri olarak; ileri yaş, ilaç bağımlılığı, immünsüpresyon (HIV) ve malnutrisyon önde gelen nedenlerdir. Risk faktörüne sahip kişilerde, akciğer TB'u dışında; lenf bezi, böbrek, kemik, eklem, meninks veya yaygın (miliyer) TB formlarına da daha sık rastlanmaktadır.

Tüberkülozun global etkileri

TB, etkeni 123 yıl önce tanımlanmasına rağmen, günümüzde de eski önemini korumaktadır. Dünyada, her yıl 8 milyon yeni TB olgusu (insidens 100.000'de 140) ve 2 milyon TB'a bağlı ölüm (28/100.000) tespit edilmektedir. Dünya nüfusunun üçte biri (~ 2 milyar kişi) TB'la infektidir. Erişkin ölümlerinin %20'sinin nedenidir. Olgularının çoğu gelişmekte olan ülkelerde görülür ve önemli ekonomik kayıplara neden olur. TB'lu bir hastanın tedavisi, 2005 yılında 150–300 dolara mal olmaktadır(1).

TB kemoterapisinin geliştirildiği 1950 yılından sonra, BCG (*Bacille Calmette Guérin*) aşısı ve anti-TB ilaçların kullanılması ile TB'ın eradike edilebileceği düşünülmüş ancak hastalığın birkaç yıl kontrol altına alınmasından sonra, özellikle son 20 yılda birçok ülkede çoğul ilaçlara dirençli (MDR, en az isoniazid ve rifampine karşı oluşan direnç) TB'da artma olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 2000 yılında bakteriyolojik olarak doğrulanmış TB olgularının %10'unun MDR-TB suşları ile infekte olduğunu ve bu olguların tedavi masrafının, 2004 ve 2005 yılında hasta başına 3500 dolara ve toplamda 400 milyon dolara ulaştığını tahmin

etmektedir. Gelecek 10 yılda 20 milyon kişinin TB'dan dolayı ölmesi beklenmektedir(1).

TB'un dünyada artmasının önemli bir nedeni HIV epidemisi'dir. HIV ile ilişkili TB olguları, 1980'lerden sonra başta Afrika olmak üzere birçok ülkede artmıştır. HIV enfeksiyonundan dolayı immün sistemi baskılanmış kişilerde önceki TB enfeksiyonu kolayca reaktif olmaktadır. *M. tuberculosis* ile enfekte, immün kompetan bireylerde, hayatın herhangi bir döneminde TB'un gelişme riski %10 iken HIV enfeksiyonlularda hayattaki her yıl için %10'a yükselmektedir. DSÖ'ne göre, 2003 yılında HIV ile enfekte hastalarda 674.000 (11/100.000) yeni TB olgusu saptanmıştır (1). HIV pozitif kişilerin sayısının artmasıyla, MDR *M. tuberculosis* suşlarının ve akciğer TB'u insidensinin artması birlikte gitmektedir. TB basili'nin keşfedilmesinden bu yana TB'un tanısı, ilaca dirençli *M. tuberculosis* suşlarının tespiti ve daha etkin yeni TB aşılarının geliştirilmesi konusunda çok önemli ilerlemeler olmasına rağmen TB kontrol altına alınamamaktadır.

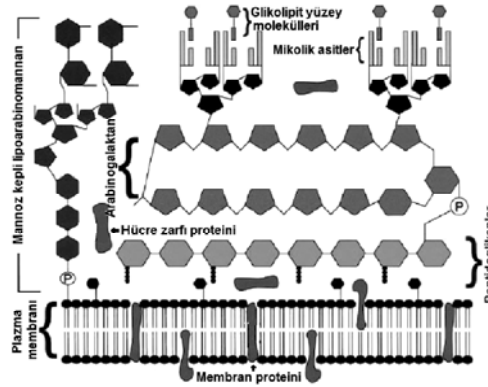
Mikobakterilerin önemli özellikleri

İnsanlık tarihi boyunca tanınan en önemli mikobakteri hastalıkları, TB ve lepradır. *M. tuberculosis* kompleksi, TB'a ve *M. leprae* ise lepraya neden olmaktadır. *M. tuberculosis* kompleksinde: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG ve *M. microti* bulunur. Bu kompleksteki ilk üç patojen insan TB'una neden olur. *M. leprae* ile birlikte, insandan insana bulaşabilen mikobakterileri oluştururlar. Son yıllarda, non-TB mikobakteri (NTM) suşlarından, *M. avium* kompleksi ve çevrede (toprak ve su) bulunan diğer mikobakterilerin klinik önemi artmıştır. Bu mikobakteriler AIDS'li hastalarda diseminan enfeksiyonlara yol açarlar. Ayrıca, NTM suşları BCG aşısı ile etkileşime girebilir ve aşılanacak kişiler NTM suşları ile önceden duyarlılaşmış ise immün yanıtları maskeleyebilirler.

M. tuberculosis'in hücre duvarı bileşenleri ve fonksiyonları

Çok sayıda çalışmada, farklı mikobakterilerin kompleks hücre duvarı yapısı incelenmiş, hücre duvarı kısımları tanımlanmış, özellikleri belirlenmiş ve saf halde elde edilmiştir (2,3). TB basili'nin dış hücre duvarı; uzun zincirli yağ asitleri, glikolipitler, polisakkaritler, proteinler, balmumu (wax) ve lipitten zengin kısımlar içerir (Şekil 1). Hücre membranının üstünde bulunan peptidoglikan, kovalan

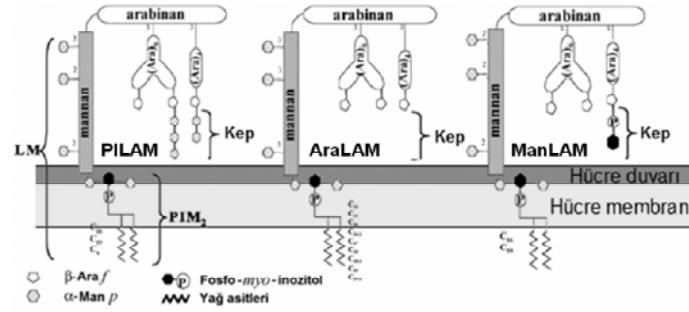
bağlarla arabinogalaktan (AG)'a ve AG aracılığıyla mikolik asitlere bağlanır. Hücre duvarında en bol bulunan mikolik asitler, uzun meromikolat ve kısa •'5f-zincirlerinden oluşur. Hücre duvarının bu çekirdek yapısına, mikolil-arabinogalaktan-peptidoglikan (mAGP) kompleksi denir. Hücre duvarının en üst kısmında, serbest lipitler ve uzun veya kısa zincirli yağ asitleri bulunurken iç kısımlarda, gelişigüzel serpilmiş halde hücre duvarı proteinleri, fosfatidil inozitol mannozid (PIM), fitioserol dimikoserat (PDIM), lipomannan (LM) ve lipoarabinomannan (LAM) bulunur. Hücre duvarı çeşitli çözücülerle parçalanırsa; serbest lipitler, proteinler, LAM ve PIM'ler çözünürken mAGP kompleksi çözünmeden kalır. Lipit, protein, kord faktörü (dimikoliltrehaloz), sülfolipit (SL) ve lipoglikanların sinyal fonksiyonları vardır. Hastalık sürecinde efektör moleküllerdir. M. tuberculosis LAM'ı, makrofaj ve TLR (Tool-like receptor)'lere bağlanarak hücre membranına entegre olur ve sinyal olaylarını başlatır. Kord faktörü, konak NADaz'ını aktive eder ve NAD'a bağımlı mikrozomal enzimlerin aktivitesini bozarak toksisiteye (kord faktörü intoksikasyonu) neden olur. PDIM virülansta rol alır. PIM transportu (mmL7) ve sentezini (msl7, pks10, pks7) sağlayan genlerde mutasyon olan basiller, farelerde yeterince çoğalamamaktadır. Çözünmeyen çekirdek kısım ise hücrenin bütünlüğünün korunmasını sağlar ve virülans/patojenitede rol alır. Yeni ilaç geliştirme deneylerinde kullanılır. Peptidoglikan, mikolik asit ve mikolik asit türevlerinden biri olan trehaloz dimikolat (TDM)'in, hem doğal hem de kazanılmış bağışıklıkta çeşitli immün modülatör etkileri vardır (3). Mikolik asit, mikobakterilerden başka, Nocardia, Corynebacterium ve Rhodococcus türlerinde de bulunur. Bakteriye hidrofob özellik kazandırır. Kuvvetli adjuvandır. Enfeksiyonlara non spesifik direnç sağlar. Anti tümör ve proanjiojenik aktiviteleri vardır ve bazı ilaçlara dirençten sorumludur. Mikobakterilerin hücre duvarı komponentlerinden elde edilen farklı antijenler, subünit aşı adaylarında kullanılır (4).



Şekil 1. *M. tuberculosis* hücre duvarının şematik gösterimi (3).

LAM'ın kimyasal yapısı ve biyolojik fonksiyonları

LAM, tüm mikobakterilerin dış hücre duvarında bulunan glikolipit komponentinin yapı olarak büyük kısmını oluşturur (Şekil 2). Önemli bir karbohidrat antijendir. Dallanmalar yapan oligoarabinozil yan zincirler eklenmiş bir mannan polisakkarit (LM) omurgasından oluşur. Bu oluşum, fosfatidil inozitol (PI) lipitkalıntılarına kovalan olarak bağlanır (3). Mikobakteri LAM'ları, arabinozil yan zincirleri motifine göre, üç sınıfa ayrılır. Patojen *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. kansasii* ve BCG suşlarının arabinan ucunda bir mannoz bulunur (ManLAM). Hızlı üreyen non patojen *M. smegmatis*, *M. fortuitum* suşlarında ise inozitol fosfat kepi bulunur (PILAM). Üçüncü LAM ailesinin arabinan ucu kepsizdir (AraLAM) ve *M. chelonae*'de bulunur. ManLAM; fagozom olgunlaşması, apoptoz, makrofajlarda IFN- γ sinyali ve dendritik hücre (DC)'lerde IL-12 sekresyonuna neden olur. PILAM, non patojen mikobakterilerde bulunur. ManLAM'ın aksine, makrofajlarda proinflamatuvar yanıtları artırır. LM de, PILAM gibi proinflamatuvar etki gösterir. İkisi de TLR-2 üzerinden etkili olmaktadır. Atenué *M. tuberculosis* suşlarından LAM biyosentezine katılan genler uzaklaştırılarak yeni aşılardan geliştirilmesine çalışılmaktadır (3,5).



Şekil 2. Mikobakteri lipoarabinomannanları (5,6).

LAM, mikobakteri infeksiyonlarının patogeneğinde önemli bir immün modülatör bileşiktir. İnfekte kişilerde immün sistem üzerinde çeşitli etkileri saptanmıştır; TB ve lepralı hastalarda T hücre proliferasyonunu baskılar (5,7). Gama interferon aracılığıyla olan makrofaj aktivasyonu ile etkileşir. Serbest toksik oksijen radikallerinin süpürülmesine katılır, protein kinaz aktivitesini inhibe eder. İnsan T lenfositlerinde interlökin-2 (IL-2), IL-5 ve granülosit-makrofaj koloni stimülan faktör (GM-CSF)'ünü kodlayan mRNA sentezini inhibe eder. Makrofajlarda, erken genlerin ekspresyonunu indükler. Mononükleer hücreler tarafından tümör nekroz faktörünün (TNF- α) üretimini artırır ve kompleman aktivasyonunu sağlar (5). Bu tür çeşitli biyolojik etkilerinden dolayı, LAM'ın mikobakterilerin hücre içinde yaşamasını artırıcı ve TB'da gözlenen patolojilerden çoğunun indükleyicisi olduğu düşünülmektedir (2).

TB'da hücresel immünitenin rolü

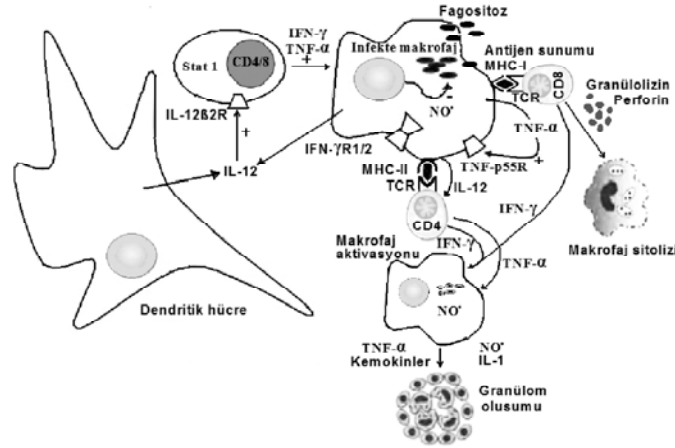
Mikobakteri infeksiyonlarına dirençte hücresel bağışıklığın (CMI) hayati bir rol oynadığı; özellikle HIV pozitif bireylerde olmak üzere, mikobakteri infeksiyonlarına duyarlı immün yetmezlikli hastalarda yapılan klinik çalışmalarda ve çok sayıda hayvan çalışmasında gösterilmiştir. HIV pozitif hastalarda, latent TB infeksiyonunun reaktivasyonu 50 kat daha fazladır.

Mikobakterilere karşı oluşan immün yanıtlara katılan mekanizmaların anlaşılmasında, son yıllarda özellikle farklı "knock out" fare türlerinin kullanılmasıyla önemli veriler elde edilmiştir. Deneyel verilere göre, infeksiyonun kontrolüne, hem CD4+ hem de CD8+ T lenfositleri katılır. CD8+ T lenfositleri akut

TB'a aktif olarak katılmazken, latent TB'un reaktivasyonunda önemli rol oynarlar. Her bir T lenfosit klonunun rolü ve katıldığı mekanizmaların detayları halen araştırılmaktadır. Genel olarak, M. tuberculosis enfeksiyonunun kontrolünde esas rolü, T lenfositleri tarafından üretilen sitokinler oynamaktadır. Enfeksiyonun erken dönemlerinde, özellikle IL-12 ve IL-18 ile etkisi sinerjik olarak artan, IL-27 aracılığıyla naif (duyarlılaşmamış) T lenfositleri proliferasyon eder ve IFN- γ üretimi indüklenir. IFN- γ ve TNF- γ gibi sitokinler, hücre içi mikobakterilerin öldürülmesi için makrofajları aktive ederler. Th1/NK hücrelerinde IFN- γ üretimini, IL-12 ve IL-23 indükler. IFN- γ , mononükleer fagositlerin yüzeyindeki IFN- γ R1/R2 reseptörlerine (T lenfositleri ve fagositlerden salınan TNF- γ 'nın yardımıyla) bağlanır. Hücre içine, Janus kinaz (jak 1 ve jak 2) ve stat (stat-1) aracılığıyla gönderilen sinyaller fagositlerde antimikrobiyal mekanizmaları aktive eder. İnsanlarda ve Farelerde, IFN- γ 'nın aracılık ettiği yollarda etkili olan genlerin mutasyonundan sonra, TB'a duyarlı fenotipler ortaya çıkar. IFN- γ sinyali oluşmayan "knock out" fareler, mikobakteri enfeksiyonlarına erken olarak yakalanırlar. Aynı şekilde, insan çalışmalarında da IFN- γ , IL-12 ve IL-23 reseptör defekti olan kişilerde mikobakteri enfeksiyonlarının ağırlaşmaya meyilli olduğu gösterilmiştir. Buna göre, IFN- γ aracılığıyla makrofajların aktivasyonu mikobakteri üremesini kontrolde önemli rol oynamaktadır (8,9).

TB'da immünite üç basamaklıdır. Akciğerlerde enfeksiyonun yerleşmesiyle başlar, CMI'in kazanılmasıyla devam eder ve daha sonra yıllarca devam eden kronik latent faz başlar. Son olarak, reaktivasyon fazı meydana gelir ve TB basilinein çoğalması kontrol dışına çıkar, TB'un klinik belirtilerine neden olur. TB'da immün yanıtlar Şekil 3'te görülmektedir. Bakteriler, enfeksiyonun erken dönemlerinde, dendritik (DC) ve alveoler makrofajlar tipinde özelleşmiş fagositik hücrelerin üzerindeki TLR (Toll-like reseptörler), DC-SIGN (DC-Specific Intracellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) ve mannoz reseptörleri ile etkileşerek immün yanıtları tetiklerler. M. tuberculosis'in, TLR2 veya TLR4 reseptörlerine bağlanarak hücreye girmesinden sonra, IL-12 ve TNF- γ üretimi indüklenir. IL-12, daha sonra NK hücrelerinden IFN- γ üretimini başlatır ve antijene özgül T helper 1 (Th1) hücrelerinin aktivasyon ve diferansiyasyonunda anahtar rol oynar. IFN- γ üretiminine katılan diğer sitokinler; IL-27, IL-15 ve IL-18'dir. Dendritik hücreler ve alveoler makrofajlardan salgılanan TNF- γ ve kemokinler,

infeksiyonun erken dönemlerinde bakterisit özellik gösteren granülom oluşumuna neden olur (8,10).



Şekil 3. Tüberkülozda hücrel immün yanıtlar (9,11).

İnfeksiyondan 2–3 hafta sonra, IFN- γ üreten CD4+ fenotipinde mikobakterilere özgül T helper hücrelerinin çoğalmasıyla adaptif immün yanıt gelişir. Bu T hücreleri aracılığıyla, IFN- γ makrofajlarda anti-bakteriyel savunma mekanizmalarını aktive ederek basillerin hücre içinde öldürülmesine veya en azından baskılanmasına ve mikobakteri çoğalmasının durmasına neden olur. Daha sonraki dönemde, CD8+ fenotipindeki sitotoksik T hücreleri olaya katılır. Mikobakterilerin lipid antijenleri, CD1 aracılığıyla CD8 T lenfositlerine sunulur. CD8 T lenfositlerinde üretilen granülizin, perforinin makrofajlarda açtığı kanallardan içeri girer ve mikobakteriler üzerinde direkt toksik etki yapar. CD8 T hücreleri, kapasitesinden fazla basille dolu makrofajların parçalanması, enzimler aracılığıyla öldürülen basillerin ve sitoplazma granüllerinden bakterisit bileşiklerin salınması ile anti-TB yanıtların artmasını sağlar (4,10).

TB’da, hücrel yanıtlarla eş zamanlı olarak, geç tip immün yanıtlar (DTH) da tetiklenir. DTH, monosit ve lenfositlerin infekte dokuya geçmesine ve aktive lenfosit mantosu ile çevrili infekte makrofajlardan oluşan granülom oluşumuna neden olur. Granülomlar, akciğerde bulunan mikroorganizmaları çevreleyerek infeksiyonun yayılmasını engeller.

IFN- γ ve TNF- γ , birlikte mikobakterilere karşı sinerjik etkilidir. Tek başına, IFN- γ etkisiz iken TNF- γ 'nın etkili olduğu gözlenmiştir. IFN- γ , fagolizozom füzyonunu da artırır. Farelerde TB'un kontrolünde, majör efektör mekanizma olan IFN- γ ve TNF- γ 'nın antimikobakteriyel aktivitesi için; olaya, indüklenebilen nitrik oksit sentaz (NOS2) etkisiyle makrofajlar tarafından üretilen nitrik oksit (NO) ve diğer reaktif nitrojen ürünleri (RNI)'nin de katılması gerekir. NOS2 aktivitesi eksik olan fareler, normal farelere göre akut ve kronik M. tuberculosis infeksiyonlarına daha duyarlıdır. NO'in insan TB'unda da koruyucu etkisi vardır (8,10).

Tüberkülozda antikorların rolü

TB gelişmesine karşı korunmada, hücresel bağışıklık daha önemli olmasına rağmen M. tuberculosis ile infekte konakta humoral immün yanıtlar da gelişir. B lenfositleri; antikor yanıtları, kemokin ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunu düzenler. Bu moleküllerin ekspresyonu; erken M. tuberculosis infeksiyonu sırasında nötrofil, makrofaj ve CD8+ T lenfositlerinin olaya katılmasına neden olur. Bu yanıtların uyarılması, yeni TB aşılarının dizaynında önemli amaçlardan biridir. DeneySEL M. tuberculosis infeksiyonları, monoklonal antikor (moAb)'ların pasif nakli ile önlenabilmektedir. İntratekal yoldan M. tuberculosis'le infekte edilen hayvanlara, LAM'a özgül moAb verilerek, bakteri sayısında azalma olmasa da yaşama süresinde uzama elde edilmiş ve antikorların koruyucu rol oynadıklarını bildirilmiştir. M. bovis'in MPB83 yüzey antijenine karşı hazırlanan moAb'lar, farelerde yaşam süresini artırmıştır. IgA eksik fare (IgA-/-)'lerde, BCG infeksiyonuna duyarlılık artmasına paralel olarak akciğerlerde IFN- γ ve TNF- γ üretiminin azaldığı gösterilmiş ve IgA antikorlarının hücreSEL immün yanıtlarda da regülâtör rol oynayabileceği bildirilmiştir. M. tuberculosis'in γ -kristalin antijenine karşı oluşturulan IgA tipi moAb'lar verilerek deney hayvanlarının akciğerlerinde oluşan bakteri koloni sayısı (CFU) anlamlı oranda azaltılmıştır. M. bovis'in yüzeyine bağlanan IgG2b izotipi moAb'lar, infekte farelerde granülomların morfolojisini değiştirir ve yaşam süresini uzatır. IFN- γ ve MHC klâs II eksik farelere, LAM'a özgül moAb'larla kaplanan basiller verilince kontrollere göre yaşam süresi uzamaktadır. Pasif korunma deneylerinde, iv yoldan M. tuberculosis Harlingen suşu ile infekte edilen farelere, bakteri ile birlikte veya yalnız başına iv olarak SMITB14 moAb'unun verilerek, hayvanların akciğer ve dalaklarında bakteri

yükünün azaldığı, kilo kaybının durduğu ve en önemlisi yaşam süresinin uzadığı gösterilmiş ve bu antikorların *M. tuberculosis* infeksiyonuna karşı, doza bağımlı olarak koruma sağladığı gösterilmiştir. Son olarak, *M. tuberculosis*'in anti-HBHA moAb ile kaplandıktan sonra intranasal infeksiyon oluşturulan deney hayvanlarının dalağında CFU sayısının azalması, bu antikorların *M. tuberculosis*'in yayılmasını önlediğini göstermektedir (11,12).

Farklı bakteri karbohidratlarına karşı oluşan antikor yanıtlarının, birçok bakteri infeksiyonlarında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Aktif TB'da, mikobakteri LAM'larına karşı yüksek titrede antikorlar oluşmasına rağmen bu antikorların koruyucu rolü bilinmemektedir. Anti-LAM monoklonal antikorlar ve bu antikorların F(ab') kısımları verilerek *M. tuberculosis* infeksiyonuna karşı koruyucu etkileri araştırılmıştır. İmmün flüoresan çalışmalarda, SMITB14 monoklonal antikorunun, *M. tuberculosis* H37Rv ve *M. tuberculosis* Harlingen suşlarının hücrelerine bağlanabildiği gösterilmiştir. Arabinomannan (AM) ve AM'dan derive edilen oligosakkaritlerin (5.2 kDa), SMITB14 moAb'unun LAM'a bağlanmasını inhibe etmesi, bu moAb'un özgül olarak LAM'ın AM karbohidrat kısmına bağlandığını göstermektedir. Antikorların infeksiyonu iyileştirici etkilerini açıklayan olası bir mekanizma olarak, basilin reseptör aracılığıyla fagositozunu ve böylece makrofaj hücresi içine ulaşma yolunu değiştirerek etkili oldukları söylenmektedir. *M. tuberculosis*'in hücreye giriş yollarındaki farklılıklar, hastalığın seyrinde önemli rol oynar. AM/LAM'a özgül antikorların çözünen veya salınan LAM'ın süpürücüleri olduğu ve bu nedenle güçlü immün regülâtör aktivitelere (sitokin düzeyini ve regülasyonunu etkileyebilir, T hücresi ve makrofajlar üzerine etki ederler) sahip oldukları ve ayrıca TB basilinin, dendritik veya monosit-makrofaj hücreleri ile etkileşmesine ve farklı dokulara yerleşmesine sebep olabilecekleri bildirilmiştir.

M. tuberculosis, çok farklı özgüllük ve izotipte antikorlar üretebilmektedir. Bu antikorların bir kısmının, koruyucu rolü olabilir. Bu nedenle, TB'da koruyucu antikorların olduğunu söyleyen veya olmadığını bildiren farklı çalışma sonuçları bulunmaktadır. Pasif olarak transfer edilen özgül antikorlar, koruyucu etki gösterdiklerine göre, yeni TB aşı adaylarında gözlenen ve korunmaya katkıda bulunan olası mekanizmalardan en az birisinin antikor aracılığıyla gelişen koruma olduğu söylenebilir (13,14)

M. tuberculosis infeksiyonlarında immün patoloji ve latentleşme

İnsanlarda M. tuberculosis infeksiyonuna karşı oluşan immün yanıtlar, ya korunmaya yol açan yararlı ya da immün patolojik olaylara yol açan zararlı tipte olabilir. Patojenin yok edilmesine katılan koruyucu ve hastalıkla ilgili immün patolojiye yol açan mekanizmaların ikisi de tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Diğer mikroorganizmalarla karşılaştırılınca, konak immün sistemi için M. tuberculosis çok değişken bir patojendir. M. tuberculosis'in, konağın immün savunmasından başarıyla kaçmasının temel nedeni, hücre içi çevre ve çoğalma odağı olarak monosit/makrofaj hattı hücreleri seçmesidir. Bakterinin, makrofajlar tarafından öldürülmekten nasıl kaçtığı hakkındaki bilgiler azdır. Mikobakteri LAM'ları, fagozomun olgunlaşmasını durdurur, M. tuberculosis'in; infekte makrofajlarda, bakterisit ve antijen işleme organellerinden kaçmasını ve vakuollerde uzun süre kalmasını sağlar. Mikobakteri lizatlarından elde edilen iki lipoprotein, insan makrofajlarında majör doku uygunluk sınıf II (MHC-II) antijen işlemlerini inhibe ettiği de gösterilmiştir. Bu olay, CD4+ T hücreleri tarafından infekte makrofajların tanınmasını azaltan ve M. tuberculosis persistansına neden olan önemli bir mekanizmadır. Bu tür mekanizmalar TB basili, sessiz formda granülom içinde sarılı olarak hapsedilmesine ve konakta latent kalmasına izin verir (13).

TB'un birçok klinik semptomu, TB basili ile infeksiyon boyunca tetiklenen geç tipte aşırı duyarlılık (DTH) gibi immün-patolojik olaylarla ilişkilidir. TB basilinin saf kültürünün ekstraktını ilk kez tanımlayan, Koch buna "tüberkülin" adını vermiş ve daha sonra kobayın deri altına enjekte edince, infekte hayvanda önemli immün-patolojik yanıtları indüklediğini göstermiştir. Enjeksiyondan 24-48 saat sonra, konakta ya lokal ve/veya ağır sistemik yanıtlar oluşmuştur. Reaksiyonun şiddetini, enjekte edilen materyalin miktarı ve konağın immün yanıtı belirler. Bu reaksiyon, TB tedavisi alan hastaların kliniğinin kötüleşmesi ile ilişkilidir (Koch fenomeni). Konak TB basili ile hiç karşılaşmamış ise tüberkülin'e yanıt oluşmaz veya çok hafiftir.

Tüberkülozun hayvan modelleri

Yeni TB aşılarının denendiği M. tuberculosis infeksiyonu hayvan modellerinde, en sık; fareler, kobaylar, insan dışı primatlar, tavşanlar ve sığırlar kullanılır. TB basili ile infeksiyondan sonra farelerde gelişen patolojiler, insanlardakinden farklı

olmasına rağmen yakın akraba (inbred) ve "knock out" türlerinin bulunması ve düşük maliyetinden dolayı, ilk dönem aşı taramalarında sıklıkla fareler kullanılmaktadır. Fareler ucuz olması yanında, etkili olarak BCG ile aşılabilirler, anti TB ilaçlarla tedavi edilebilirler ve ayrıca fare çalışmalarında kullanılmak üzere çok fazla immün reaktifler hazırlanmıştır. C57BL/6, BALB/C ve B6D2/F1 inbred fareler, M. tuberculosis enfeksiyonuna nispeten dirençlidirler. Aerosol ve intranazal yoldan düşük dozda virülan M. tuberculosis verilmesinden sonra, bir yıldan daha uzun süre yaşayabilirler. Kronik hastalıkları, akciğerlerde geniş granülom oluşumu takip eder. Hastalığın seyri sırasında, farelerde güçlü Th1 yanıtı yanında nispeten güçlü DTH yanıtı oluşur. Enfekte hayvanlarda bakteri yükü, akciğerlerde ve dalakta yaklaşık 200 gün sabit kalır. Fareler yaşlanınca, hastalığın şiddeti artar, bakteri yükündeki artış enfekte dokuların progresif dejenerasyonuna paralellik gösterir ve enfeksiyondan 300–350 gün sonra farelerin ölmesine neden olur. Fare deneylerinde, genellikle, bir ay aralıklarla, tek veya birden fazla sayıda, aerosol halinde, virülan M. tuberculosis H37Rv veya Erdman suşu kullanılır. Sonuçlar bakteriyolojik ve immünolojik olarak değerlendirilir. Anahtar test bakteri yüküdür, akciğerdeki bakteri sayısının 0.7 log veya daha fazla azalması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir (power 0.8, $p < 0.05$, $n = 5$ fare). Akciğerlerde aktif efektör (CD44^{hi}CD62L^{lo}CD69⁺) T lenfositlerinin artması ve daha fazla IFN- γ üretilmesi beklenir. Histolojik olarak, lezyonlar daha küçük olabilir, fakat granülom dokusu daha uzun sürede geliştiği için kısa süreli değerlendirme sonuçları güvenilir değildir (15-17).

Diğer hayvan modeli kobaydır. Bu hayvanlar daha pahalı olmasına rağmen farelere göre bazı avantajları vardır. Birinci avantajı, kobaylarda kuvvetli deri testi (DTH) sonucu oluşur. İkinci avantajı, enfekte kobaylarda progresif akciğer patolojilerinin gelişmesi ve solunum sıkıntısının insan TB'unda görülene benzemesidir. Enfeksiyondan 10-15 hafta sonra kobayların akciğerlerinde granülom gelişir, nekrotik hale geçer ve sonuçta akciğer dokusunda yoğun hasar meydana gelir (15,16).

Çeşitli çalışmalarda, insan dışı primatların M. tuberculosis ile enfekte edilince insan TB'una benzer klinik semptomlar geliştiği bildirilmiştir. Trakea içine verilen virülan M. tuberculosis suşu; yüksek dozda insandakine benzer patolojik bulgularla

akut ve hızlı gelişen hastalığa yol açarken düşük dozları kronik ve yavaş ilerleyen TB formuna neden olmaktadır. Özellikle, rhesus (*Macaca mulatta*) ve cynomolgus (*Macaca fascicularis*) türleri gibi insan dışındaki primatlar, TB'a oldukça duyarlıdır. Bu iki türde BCG aşısının etkinliği incelenince, sadece *Macaca fascicularis* primatlarında koruyucudur. *Macaca mulatta* BCG aşısına düşük yanıt verir. Ancak, günümüzde büyük sayıda insan topluluklarının BCG ile korunamadığını açıklama yönünden halen değerli hayvan modelleridir.

Tüberküloz aşıları

İnfeksiyon hastalıklarından korunmada en ekonomik yol, koruyucu aşılamaadır. En ölümcül hastalıklardan biri olan çiçek, etkin aşılama ile yeryüzünden eradike edilmiş, polio eradikasyonu ise gündemdedir. TB'un da 2050 yılında eradike edilmesi planlanmaktadır. TB'dan korunmak amacıyla BCG aşısının kullanılmasına, yaklaşık seksen yıl önce (1921'den sonra) başlanmıştır. BCG aşısı, çocuklarda TB'ü önlerken bağışıklık yaşla birlikte azalır ve erişkinlerde akciğer TB'una karşı korunmada yetersiz kalır. TB, günümüzde, majör ve artan bir global problem olmaya devam etmektedir. Bu nedenle, TB araştırmalarında öncelikli olan çalışmalardan biri, mevcut BCG aşısından daha etkili TB aşılarının geliştirilmesidir. BCG aşısının halen yaygın olarak kullanılmasının en önemli nedenlerinden biri, çocukluk çağında dissemine TB'a karşı koruyucu etkisinin iyi olması ve lepraya karşı çapraz koruyuculuğunun bulunduğu bildirilmesidir. Bu sebeple, DSÖ'nün genişletilmiş aşılama programı (EPI)'nin bir parçası olarak her yıl yaklaşık 100 milyon yenidoğan çocuk BCG ile aşılanmaktadır.

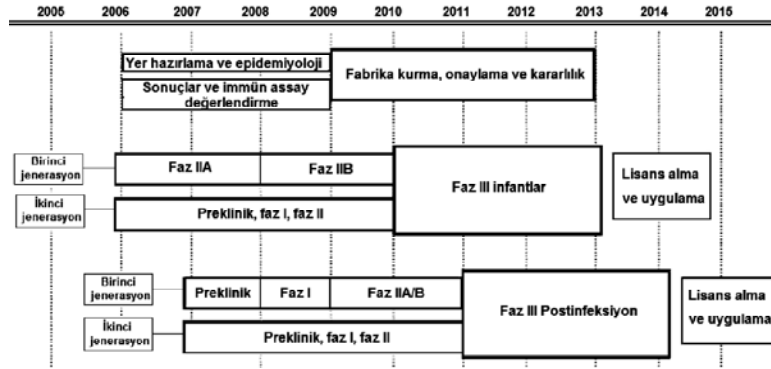
Son 5 yılda, *M. tuberculosis*'in tam genomu ve insan genom projesinin bir kısmı tamamlanmıştır. 2000 yılında, mikobakterilerde genetik manipülasyonu gerçekleştiren tekniklerin bulunması ve *M. tuberculosis*'in genom baz dizilerinin tamamlanmasından sonra yeni TB aşılarının geliştirilmesi için tarihi bir fırsat yakalanmıştır. Yeni analitik tekniklerle, farklı koşullarda çoğalan basillerin tam genomu, transkriptomları ve proteomlarının karşılaştırılması yapılmıştır. Model sistemlerde; rekombinant suşlar, mikrobiyolojik özellikleri ve aşı olarak kullanılabilirlik özellikleri belirlenmiştir. Bu gelişmeler, canlı rekombinant mikobakteri içeren veya çeşitli immünojen formunda mikobakteri genlerini eksprese eden yeni aşı adaylarının üretimini hızlandırmıştır. Buna paralel olarak,

deney hayvanları ve insanlarda koruyucu bağışıklığın altında yatan hücresel ve moleküler mekanizmaların detayları araştırılmıştır. TB aşısının geliştirilmesinde önemli bir olay, ümit veren aşı adaylarının ilk kez insanlarda yapılan klinik çalışmalarda kullanılmasıdır. Yeni bir aşı geliştirmek amacıyla hedef ve planlar (Tablo 1, Şekil 4) belirlenmiş ve 2005 yılında biri adenovirus vektör, 2 rekombinant BCG ve 2 adjuvanlı füzyon proteini aşısından oluşan 5 aşı adayının faz I çalışmaları başlatılmıştır (18).

DNA aşıları ile koruyucu bağışıklık geliştiği gösterilen ilk hastalıklardan biri, TB'dur. Yeni tanımlanan, mikobakteri infeksiyonlarına immün yetmezlik için predispozisyon oluşturan ve oldukça nadir rastlanan bazı insan hastalıklarının analizinde, M. tuberculosis'e karşı insanlarda oluşan immün yanıtlar, büyük oranda açıklığa kavuşturulmuştur. Son olarak, HIV infeksiyonunu tedavi etmek için düzenlenen yüksek derecede aktif multidrog rejimlerinin evrimine katkı yapabilecek yeni terapötik TB aşıları geliştirilebilirse, HIV virüsü ile %8 oranında infekte olan TB hastalarının ve sayısı milyonlara ulaşan HIV ile infekte latent TB'lu hastaların tedavisinde, büyük bir adım atılmış olacaktır.

Tablo 1. 2006 – 2015 yıllarında, TB'a karşı yeni aşılarda geliştirilmesinde hedef ve planlar(18).

Hedef	Amaçlar
1	2006-2015 yılları için hedefler ve zaman çizelgesi (Şekil 4) hazırlanacak ve 2015 yılına kadar 20 aşı adayının faz I klinik deneylerine girmesi sağlanacaktır. Klinik deneyler, birden fazla aşı ile devam edecek, başarılı sonuç alınmayanların yerine yenileri eklenerek çalışmalara devam edilecektir. ilk aşı adaylarından, faz II deneylerine geçmeler 2006 yılında belli olacaktır. ilk faz II deneyleri, 3 yıl sürecektir. Uygun deney protokolleri ve immünolojik testler geliştirilirse bu süre 2 yıla çekilebilecektir.
2	Faz II deneylerinde, 9 aday aşı değerlendirilecek ve 2008 yılına kadar 2 aday aşı faz IIb veya PoC (Proof of Concept) deneylerine geçecektir. Bu deneyler, aşının etkinliğine dair erken bilgiler verir ve faz III aşamasında, aşının yetersizlik riskini azaltır. ilk faz III deneyi, 2010 yılında başlayacak, bu fazda aday aşılarda basille karşılaşmadan önce (pre-exposure) kullanılması halinde etkinliği test edilecek ve yaklaşık 4 yılda tamamlanacaktır. infeksiyondan sonra kullanılacak aşılarda deney protokolleri 2011 yılında hazırlanacak ve tamamlanması 3 yıl sürecektir.
3	Global plan, toplam 4 faz III etkinlik deneyi içerecektir. Lisans amaçlı işlemi, yaklaşık 4 yılda tamamlanacak ve başarılı bulunan aşının dağıtımına başlanacaktır.
4	2015 yılına kadar; güvenli, etkin, lisanslı ve makul fiyatlı bir aşı hazırlanacaktır.



Şekil 4. 2006-2015 TB aşısı hedefleri ve zaman çizelgesi (18).

Yeni TB aşıları için hedef topluluklar ve aşılama stratejileri

TB insidensinin yüksek olduğu endemik ülkelerde, halk arasında TB durumunda büyük varyasyon vardır. Bir kısım insan naif ve infekte değilken bazıları ya aktif TB'lu, ya *M. tuberculosis* ile latent olarak infekte, ya TB geçirmiş ve iyileşmiş ya da *M. tuberculosis* ve HIV ile ko-infekte veya HIV taşıyıcısıdır. TB ile ilgili özellikler göz önünde tutularak, epidemiyolojik ve halk sağlığı açısından TB'un sınıflandırılmasında, TB tanı evreleme sistemi kullanılır (Tablo 2). HIV enfeksiyonu, latent TB'un reaktivasyonu veya yeni enfeksiyonların oluşmasını kolaylaştırır. Popülasyondaki bireylerin çoğu BCG ile aşılanmıştır ve ne yazık ki bir tek aşı ile bu grupların hepsi etkili olarak korunamamaktadır. Bu nedenle, yeni TB aşıları ile yapılan klinik çalışmalar; değişen immün durumu, latent enfeksiyonu ve hastalık halini de göz önünde bulundurarak farklı grupların bir veya birden fazlasını korumak amacıyla profilaktik, booster veya terapötik aşılama şeklinde düzenlenmelidir (Şekil 5).

TB aşıları için genel olarak iki aşılama stratejisi vardır. BCG aşısında olduğu gibi mikobakterilerle karşılaşmamış ve enfeksiyon tespit edilemeyen kişilerde yapılan aşılama, karşılaşma öncesi (pre-exposure) aşılama denir. Amaç, oluşturulan immün yanıtlar aracılığıyla mikroorganizmanın vücuttan tamamen uzaklaştırılması veya enfeksiyonu yaşam boyunca subklinik düzeyde tutmaktır. Karşılaşma sonrası (post-exposure) aşılama ise, önceden *M. tuberculosis* enfeksiyonu geçirerek iyileşen veya BCG ile aşılanarak bağışıklık kazanan kişilerde immünitenin artırılması amacıyla yapılmaktadır.

Tablo 2. TB'un sınıflandırılması.

Sınıf	Tanımı
TB0	<i>M. tuberculosis</i> ile karşılaşmamış, infeksiyon yok
TB1	<i>M. tuberculosis</i> ile karşılaşmış, infeksiyon durumu bilinmiyor
TB2	Latent infeksiyon, hasta değil (PPD pozitif)
TB3	Aktif TB
TB4	Inaktif TB, iyileşmiş veya yeterli tedavi almış
TB5	TB olabilir, durumu bilinmiyor (kural dışı TB)

Profilaktik aşılar

İnsanlarda, akciğer TB'u *M. tuberculosis*'in inhalasyonundan sonra gelişir. Bu nedenle, akciğerlerde koruyucu bağışıklık geliştirmek amacıyla profilaktik aşılama yapılır. TB aşıları, nazal mukoza yoluyla verilirse, diğer bağışıklama yollarına göre infeksiyon yerinde daha iyi koruyucu bağışıklık oluşur. Hayvan deneylerinde non toksik olan L3 adjuvanı ile birleştirilen aşılar, burun yolundan verilerek doğrudan mukoza yüzeylerine uygulanabilir. L3 adjuvanı içinde verilen, AM-Ag85B konjuge aşısı ve ısı ile öldürülmüş BCG suşunun (H-kBCG) profilaktik aşılama modunda testleri tamamlanmıştır. Bu iki aşı, klasik BCG aşısında elde edilene eşdeğerde koruma sağlamıştır (19).

Booster aşılar

BCG aşısının geniş kullanım alanına rağmen, çalışma popülasyonlarına bağlı olarak, aşı etkinliğinde geniş varyasyonlar elde edilmiştir. Aşı etkinlik çalışmalarının sonuçlarına göre, BCG aşısı çocukluk çağı TB formlarına karşı koruyucudur. Koruyuculuğu, ilerleyen yaşla birlikte azalır. Erişkin TB'una karşı koruyuculuğu yok veya yetersizdir. Bu nedenle, BCG ile aşılanmış kişilerde booster dozlarla bağışıklık artırılarak TB'un reaktif olması önlenmelidir.

Yeni TB aşıları geliştirilirken, aşının naif ve sağlıklı bireylerde koruyucu yanıt oluşturmaya yanında, dünya nüfusunun büyük kısmını (%80) içeren çocukken BCG ile aşılanan erişkin kişilerde de booster doz verilerek akciğer TB'unun önlenmesi amaçlanmaktadır. Bu yöntem, bağışıklığın kuvvetlendirilmesi (prime-boost) stratejisi olarak bilinir (20). Son çalışmalarda, BCG ve Mtb72F proteini

kombinasyonunun prime-boost formatında uygulanması ile dokudaki bakteri yükü azalmış, histolojik lezyonlar iyileşmiş ve yaşam süresinde iki katına ulaşan sonuçlar elde edilmiştir. Mtb72F proteinini kodlayan DNA aşıları da benzer sonuçlar verir. Hayvanlardaki, daha büyük lezyonlar fibrotikleşmeye meyillidir. Hava yollarında anlamlı iyileşme ve rejenerasyon olayları oluşur 17. Oxford üniversitesinde geliştirilen Mycobacterium tuberculosis'in salgıladığı Ag85A antijenini taşıyan vaccinia virus Ankara vektörlü subünit aşının, 2004 yılında faz 1 klinik değerlendirmesi tamamlanmıştır. Yıllarca önce de verilmiş olsa, BCG aşıllara, booster olarak verilen Ag85A aşısının güvenlik ve immünojenliğinin mükemmel olduğu bildirilmiştir. Önce BCG ve booster olarak Ag85A kullanılan heterolog prime-boost deney sonuçları, aynı aşıyla yapılan homolog prime-boost sonuçlarından daha iyi koruma sağlar. Ayrıca, heterolog aşılama vektöre karşı immün yanıt oluşmaması veya daha az oluşması sağlanır (20).

Terapötik aşılar

Terapötik amaçla, aktif TB'lu erişkin hastaların aşılanması, anti TB tedaviye yardım edecektir. Özellikle, TB'un endemik olduğu ülkelerde, hastalığın yayılmasını kontrol altında tutabilmek amacıyla DOTS programlarına eklenebilen yeni ve etkin terapötik aşılar ihtiyaç vardır. Tedavi amacıyla aşılama stratejisi ilk kez, 1890 yılında old tüberkülin kullanılarak Robert Koch tarafından incelenmiştir. Ne yazık ki, tüberkülin immünoterapisi, semptomları hafif olan TB'lu hastalarda şiddetli sistemik reaksiyonlara neden olmuştur. Tedavi sonucunda, ileri kaviteyonlu hastalardan yaklaşık %10'u kaybedilmiştir. Terapötik aşılamayı yeniden değerlendirmek için yapılan çalışmalarda, düşük dozda virulan M. tuberculosis ile infekte edilen farelere, bazı aşılar verilerek terapötik etkileri incelenmiştir. Bu çalışmalarda aşı olarak; hsp60-DNA aşısı, AS02 adjuvanında Mtb72F füzyon aşısı, BCG, L3 adjuvanında ısıda öldürülmüş BCG (H-kBCG), BCG+diğer antijenler, sitokin sekrete eden rekombinant BCG ve ısı ile öldürülen M. tuberculosis verilmiş, fakat bu tedavilerin hiçbirinde infekte farelerin akciğer dokusunda CFU azalması sağlanamamıştır. Mtb72F aşısı, akciğer dokusunda bakteri sayısını azaltmasa da, daha küçük patolojik lezyonlara ve farelerin yaşam süresinde uzamaya neden olduğundan terapötik etkilidir (17). En kuvvetli terapötik etki, M. leprae'nın hsp60 ısı şok proteininde gözlenmiştir. Bu DNA aşısı uygulanan farelerde, vektör aşılarından farklı olarak TNF- α üreten CD4/CD8 hücrelerinde ve granzim pozitif

CD8 hücre sayısında artma ve akciğerlerde IL-10 seviyesinde yükselme gözlenmiştir. Ancak, bu aşı da sadece aşılama öncesinde anti-TB ilaçlarla tedavi edilen hayvanlarda etkilidir. Kemoterapi sırasında mikobakteri Hsp65'ini kodlayan plazmid DNA aşısı ile immünoterapi, MDR-TB tedavi süresini kısaltmaktadır (21). Terapötik aşılarla Koch reaksiyonu görülme ihtimali yüksektir. İnfeksiyondan önce, aşı olarak, aynı sitokinlerin salınmasını sağlayan BCG suşları ve H-kBCG kullanıldığında iyi sayılabilecek düzeyde korunma sağlanmıştır. Cesaret kırıcı benzer sonuçlar, subünit aşılarla yapılan immünoterapi sırasında da elde edilmiştir (19). TB'lu hastalarda tek başına kullanılabilecek terapötik aşıların geliştirilmesi zordur. Mevcut aşı adaylarının TB basili ile karşılaşmadan önce verildiğinde etkili iken mevcut infeksiyonu azaltamamaları artan ve zararlı hale gelen immün aktivasyonla ilişkilidir. Aşının, lokal mukoza düzeyinde olduğu gibi sistemik düzeyde de hem hücresel hem de humoral immüniteyi uyarak koruyucu bağışıklığı dengeli bir şekilde kuvvetlendirmesi gerekir. Terapötik etkili aşılar geliştirilebilirse, yeni TB aşısı için en büyük hedef olan BCG aşısıyla duyarlılaşmış grupta agresif DOTS kemoterapisine önemli katkı sağlayacaktır.



Şekil 5. Tüberkülozda aşılama stratejileri (deneysel karar verme mantığı)

Yeni TB aşlarıyla yapılan klinik deneyler

İlk global TB aşısı geliştirme planının amaçlarının başarıyla tamamlanması, Avrupa topluluğu ve Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) tarafından yapılan yatırımlara dayanmaktadır. Ayrılan fonlarla, aşı araştırma birimi kurulmuş ve klinik deneylere başlamak için optimal aşı adayların seçimi ve karşılaştırmalı testlerinin yapılmasını sağlayan prelinik değerlendirmeler başlatılmıştır. Ayrıca, kâr amacı olmayan ve TB aşısı geliştirmeyi amaçlayan Aeras global aşı vakfı (Aeras Global TB Vaccine Foundation)'nı destekleyen Bill ve Melinda Gates vakfı (Bill &

Melinda Gates Foundation)'ndan büyük bağışlar alınmasıyla klinik deneylere doğru ilerleme sağlanmıştır (18). Klinik öncesi çalışmalarda, yeni aşı adaylarının immünojenliğinden önce koruyucu etkinliği ve güvenilirliği belirlenmektedir. Uygun üretim pratiği (GMP) prosedürlerine göre hazırlanan aşılarda faz I, II ve III klinik çalışmalarında denetlenmektedir (Tablo 3). Klinik çalışmalara başlamak için, deney alanının tanımlanması (coğrafik bölge ve latent enfeksiyon ve aktif TB'un prevalansı dâhil spesifik topluluklar), standart protokollerin geliştirilmesi, etik konular ve aşı etkinliğinin uç sınır noktalarının tespiti gibi konular tamamlanmalıdır. Deney alanı, yeterli alt yapıya sahip olmalıdır. Basit tanı testleri ve immünolojik analizlerin yapılabileceği laboratuvarlar bulunmalı ve aşı adayının değerlendirilmesi için halk ve özel kuruluşların işbirliği sağlanmalıdır. Ümit veren aşı adaylarının güvenlik çalışmaları; ilaç şirketleri ile iş birliği halinde çalışan Aeras Global TB aşı vakfı (Aeras Global TB Vaccine Foundation), Avrupa ve gelişmekte olan ülkeler klinik deney işbirliği (European & Developing Countries Clinical Trials Partnership, EDCTP) ve Ulusal Sağlık Enstitüsü (The National Institutes of Health, NIH) tarafından yapılmaktadır (22,23).

Tablo 3. Aşı geliştirme fazları ¹⁸.

Faz I deneyleri	Yaklaşık 30 sağlıklı erişkin grubunda, aşının güvenilirliğini inceleme.
Faz II deneyleri	Belirli hedef popülasyonlar (önceden <i>M. tuberculosis</i> ile karşılaşmış HIV ile ko-infekte, adolesan, çocuk ve infantlar) seçilerek daha büyük bir grupta güvenlik çalışmaları tekrarlanır. Farklı aşı dozları ve veriliş yolları incelenir. Faz II deneylerinde immünojenlik ölçümleri, plana devam edilmesine karar verdiren önemli bir kriterdir.
Faz IIB deneyleri	Faz II'nin genişletilmiş şeklidir. Faz III etkinlik deneylerine geçebilmek için, aşı adayının performans kriterlerini karşılayıp karşılamadığı incelenir.
Faz III deneyleri	Aşının etkinliği, çok büyük bir grupta ve yoğun kaynaklar kullanılarak incelenir. Faz III deneylerine geçmeye karar verdiren kriterler: hedef popülasyona ulaşmak için uygun bir yerin bulunması, aşı üretme tesisinin kurulmuş olması, deneyler başarılı olursa lisans alımını garantileyen klinik gelişme planı, immünitenin deneyden elde edilenle korelasyon göstermesi, aşıya lisans vermeye gönüllü olan bir ülke, aşının lisans alması için kanuni düzenlemeler, deneylerle tanı araçları ve TB ilaçlarıyla bütünleştirilmesi için lokal TB kontrol programları ile yapılan görüşmeler.
Faz IV deneyleri	Epidemiyolojik çalışmalar aracılığıyla aşının etkinliği ve güvenliğini izlemek için ülkenin alt yapı sistemi kullanılarak, lisans alımından sonraki çalışmalardır.

Aşı uygulama yolları: oral ve nazal aşılama

İnsan patojenlerinin çoğunda olduğu gibi, *M. tuberculosis* de mukoza yüzeyini kullanarak vücuda girer. En sık, üst solunum yollarında kolonize olduktan sonra vücuda girer ve primer olarak akciğerlerde infeksiyona neden olur. Yeni TB aşısının, mukozaya verilmesi ile lokal immünitenin uyarılacağı ve TB basilinin primer kolonizasyonunun önleneyeceği düşünülmektedir.

Oral ve nazal aşılama, patojenin giriş yeri olan akciğerlerde güçlü immün yanıtlar oluşturur. Mukozal immüniteyi açığa çıkarmak için, nazal aşılama yolu daha sık kullanılır. Ancak, bu güne kadar, sadece birkaç çalışmada TB'a karşı nazal aşılama uygulanmıştır. Bu çalışmalara göre; canlı BCG, subünit ve rekombinant adenovirus veya vaccinia Ankara (MVA) bazlı aşılardan intranazal yoldan verilmesiyle *M. tuberculosis*'e karşı korunma sağlanmıştır (24,25). Avrupa birliğinde, yeni geliştirilen TB aşılarında adjuvan ve taşıyıcı sistemi olarak lipitler (Eurocine™ L3) test edilmektedir. L3 adjuvanı, toksik değildir ve intranazal yoldan kullanılmaktadır (19,26). Geçmiş yıllarda, oral yolla canlı BCG aşısı verilerek yapılan çalışmalarda, etkin aşılama için çok büyük sayıda basil gerekmesi ve lenfadenit gelişmiş ve bu yolun kullanılmasından vazgeçilmiştir. Günümüzde ise, lipitlerle mikro kapsülasyon yapılarak oral yoldan hayvanlara verilen BCG aşısının, çok az basille yeterli bağışıklık oluşturduğu bildirilmiştir. Ağızdan verilen lipit kapsüllü canlı BCG suşunun, ince barsak lenf dolaşımına ve torasik kanal aracılığıyla dalak ve karaciğer gibi santral lenfoid organlara, sayıca fazla miktarda ulaşması ve çoğalması sağlanmıştır. Oral BCG aşısı, dalakta mikobakterilere özgül IFN- γ salgılayan hücrelerde artışa neden olur. Bu hücreler, önceki çalışmalarda, virülen mikobakterilerin aerosol halinde verildiklerinde akciğerlerde gözlenen koruyucu bağışıklığa benzer yanıtların oluşmasını sağlar (27).

Adjuvanlar

Adjuvanlar, birlikte verildiği antijene karşı immün yanıtları artıran maddelerdir. Doğada bulunan farklı virüs, bakteri, mikroorganizma toksinleri ve bazı kimyasal maddelerin doğal adjuvan özelliği vardır. Adjuvanlar, güçlü Th1 immün yanıt oluşumuna neden olur. Intercell tarafından oligodeoksinükleotit ve polianyonik katyonlardan hazırlanan IC31 ve katyonik lipozomlar, pozitif yüklü veziküllerdir. Negatif yüklü membran yapılarına bağlandıkları için makrofajlar tarafından

kolayca fagosite edilerek MHC I ve II molekülüne daha kolay ulaşırlar. Mikroorganizmalar; DC'ler aracılığıyla TLR reseptörlerini aktive etme, proinflamatuvar sitokinleri indükleme ve eksprese etme ve intrasellüler MHC işleme kompartımanlarını hedef alma kabiliyetindedirler. Enterik bakterilerden elde edilen toksinlerin etki mekanizmalarını inceleme sırasında, bakteri ekzotoksin/toksoidlerinin mukoza yolundan verildiğinde adjuvan özellikte olduğu bulunmuştur. Adjuvan olarak, kolera toksini (CT) ve E. coli'nin sıya dayanıksız toksini (LT) en sık kullanılan bakteri toksinleridir. Mtb72F aşılarında bulunan poliproteinlerin immünojenliği, AS02 adjuvanı içinde verilirse artmaktadır (17). AS02 adjuvanı, GSK (GlaxoSmithKlein) tarafından geliştirilmiştir. Bakterilerin LPS endotoksinlerinin toksin özelliğinin giderilmesiyle oluşan monofosforil lipit A ve TLR4 ligandının monofosforil lipit A yapısında bulunan Quil A (saf Quillaria saponaria)'nın sudaki yağlı emülsiyonundan hazırlanmıştır. 2005'te klinik çalışmaları başlatılan Ag85B+ESAT-6 füzyon aşısında, IC31 adjuvanından başka E. coli'nin ısıya dayanıksız enterotoksini modifiye edilerek elde edilen LKT63 adjuvanı kullanılmaktadır (4,18) . Adjuvanların tümü klasik adjuvan değildir, çoğu doğrudan proksimal mediatör olduğundan dolayı, denemeler rekombinant sitokinler (1L-6,1L-12) ile birlikte yapılır. Günümüzde, insanlarda kullanılması onaylanan tek adjuvan, alüminyum tuzlarıdır. Ancak, alüminyum tuzları temel olarak Th2 tipinde yanıtlar oluşturmakta, TB'a karşı korunmada ise güçlü Th1 yanıtlarının oluşması gerekmektedir. Alüminyum tuzları dışında, bazı lipitlerin (Eurocine™ L3) insanlarda toksik olmadığı tespit edilmiş ve insan kullanımı için lisans verilmiştir. L3 adjuvanı, Avrupa Birliğinde, yeni geliştirilen TB aşılarında kullanılmaktadır. Bu yeni adjuvan, özellikle intranazal yol olmak üzere mukozal immünizasyon için uygundur. Ayrıca, şu anda insanlarda kullanılan doğal yağ bazlı lipitlerle karşılaştırıldığında, toksik olmayan tek adjuvan olma özelliğine sahiptir (19,26).

Faz I ve II insan çalışmalarında; bakteri LPS'lerinin toksin özelliğinin giderilmesiyle hazırlanan monofosforil lipit A (AS02), influenza aşılarında kullanım için lisans alan mikro sulandırılmış yağ emülsiyonu ve sürfaktanlar (MF59), mikobakterilerin hücre duvarında bulunan muramil dipeptidin yağlı emülsiyonu ve non-iyonik blok kopolimerler (SAF-1), katyonik lipozomlar (SSI'nin LipoVac ailesi adjuvanları), yeni-ikinci jenerasyon katyonik lipitler (Vaxfectin), saponin deriveleri (QS21) ve polifosfazen gibi polimerler olmak üzere çok sayıda adjuvanlar denenmektedir (4).

Taşıyıcı sistemler

Genetik mühendislikle, genetik yapısı değiştirilebilen *M. bovis* BCG, *Salmonella* ve *Listeria* gibi intrasellüler bakteriler, vaccinia ve smallpox (çiçek) gibi virüsler antijen için taşıyıcı sistem olarak araştırılmaktadırlar. Replikasyon yeteneği bulunmayan Ankara tipi rekombinant vaccinia virüsü (MVA)'ne mikobakteri antijeni genleri aktarıldıktan sonra, TB aşısı olarak etkinlik testleri yapılmış ve güçlü immün yanıtlar oluşturduğu tespit edilmiştir. BCG aşısının koruyucu etkisi, booster olarak verilen MVA ve fowlpox karışımından sonra sinerjistik artar 28. Bu aşılardan önemli bir handikapı, önceden mikobakterilerle karşılaşan veya BCG ile aşılanan kişilerde etkisiz olmalarıdır. Bu kişilerde oluşan nötralizan antikorlar, vaccinia vektörlerle etkileşime girer ve yeterince çoğalmadan hızla nötralize olmalarına sebep olurlar. Sonuç olarak, vektörün kodladığı *M. tuberculosis* antijeni oluşmadığı için immün yanıt da oluşmaz. Ayrıca, konakta vektöre karşı immün yanıtlar oluşabilmektedir. Bu nedenle, prime-boost aşılama stratejilerinde farklı virüs vektörler incelenmektedir. Heterolog (vaccinia + fowlpox gibi) prime-boost aşılama stratejisinde farklı virüs aşılardan, homolog stratejilere göre immün yanıtları daha fazla artırdığı bulunmuştur (28).

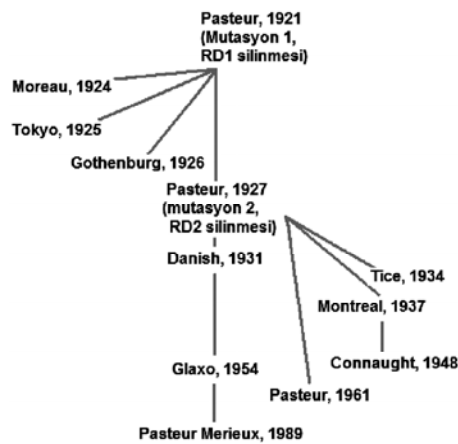
BCG aşısı yanıtlarını etkileyen faktörler

Robert Koch, TB basilinin insanda TB hastalığına neden olduğunu gösterdikten sonra, öküz ve koyun serumunu 65°C'de koagüle ederek *M. tuberculosis* kültürünü yaptı ve "old tüberkülin" ismi verilen ölü TB basilinin gliserolde hazırlanan ekstraktlarını terapötik aşı olarak kullanmayı denedi. Ancak, kısa zamanda, tüberkülinin terapötik etkisinin olmadığı fakat tüberkülin deri testinin, latent olarak infekte kişileri tanımlamada erken ve çok önemli bir tanı aracı olduğu anlaşıldı.

Koch'un tüberkülin tedavisinin başarısız olduğunun saptanmasından 20 yıl sonra, yeniden TB'a karşı aşı geliştirme çalışmalarına başlandı. Nocard tarafından, mastitli bir düve sütünde virülen bir *M. bovis* suşu izole edildi. Pasteur enstitüsünde, 13 yıl süre ile in vitro 230 pasajdan sonra virülansı azaltıldı. 1921 yılında, Calmette ve Guérin tarafından, BCG adında yeni bir canlı zayıflatılmış (atenüe) aşı geliştirilerek, çocuklarda iyi bir korunma sağladığı gösterildi. BCG aşısı, 1923'ten beri birçok ülkede ve günümüzde ise DSÖ'nün genişletilmiş aşılama programı (EPI)'nda en yaygın kullanılan aşıdır. BCG kültürleri, 1927 yılında çoğaltılmak

üzere dünyadaki birçok laboratuvara gönderilmiştir. Kullanılmaya başlanmasından bu yana, tüm dünyada 3 milyar dozdan daha fazla kullanılmış ve halen her yıl 100 milyon yenidoğan çocuk BCG ile aşılanmaktadır. Günümüzde, gelişmiş ülkelerde çocukların BCG ile aşılanması durdurulmuş ve sadece göçmen çocukları, hastane ve laboratuvar personeli ve diğer yüksek riskli gruplar BCG ile rutin olarak aşılanmaktadır (29).

A. BCG suşu varyasyonları ve çalışma popülasyonunda farklılıklar BCG aşısının ilk kez kullanılmasından bu yana, orijinal aşı suşu sürekli olarak dünya üzerinde birçok laboratuvarında üretilmiş ve farklı alt suşlar ortaya çıkmıştır (29). En yaygın kullanılan BCG aşısı alt suşları; Connaught, Danish, Glaxo, Moreau, Pasteur ve Tokyo suşlarıdır (Şekil 6). Birçok klinik deneylerde, BCG aşılarının etkinliği farklı ülke ve toplumlarda büyük değişimler gösterir; bildirilen korunma oranları %0-80 arasında olup bu sonuçların nedenini araştırmak için çeşitli araştırmalar yapılmıştır. BCG aşısının etkinliğine dair yapılan en geniş kontrollü çalışmalardan biri Güney Hindistan'da yapılmıştır. Bu çalışma, 250.000'den fazla kişi ile yapılmış ve BCG aşısının genç yaş grubunda korunma sağladığı ancak orta ve daha ileri yaş grubunda korunma sağlamadığı, hatta BCG ile aşılanan genç erişkinlerde hastalık riskinin arttığı bildirilmiştir (30). Amerika yerlileri ve Alaska'lı kişilerde yapılan 6 yıllık bir çalışmada BCG aşısının etkinliği %52 olarak bildirilmiştir (13,31). BCG aşı, aktif TB'suz kişilerde PPD deri testi pozitifliği 15 yıla kadar uzayabilir. On beş mm'nin üstündeki PPD sonuçları, BCG aşılamadan çok TB enfeksiyonu olarak düşünülmelidir (32).



Şekil 6. BCG suşlarının soy ağacı (29).

Mikroarray teknolojisi ile farklı BCG suşlarının genomu incelenmiş ve BCG'nin koruyucu bağışıklıkta önemli olan bazı genlerini kaybettiği gösterilmiştir. Gen kaybının, liyofilizasyonun ilk kez kullanıldığı 1960 yılından önce, orijinal suşun atenüasyonu veya çoğaltılması sırasında meydana geldiği sanılmaktadır. Bazı BCG aşılarında; ebeveyn suşta bulunan majör protein antijenler yanında ya bulunmayan (ESAT-6 ve CFP-10, MPT64) ya da eksprese olmayan (MPB70 ve MPB83) antijenlerin bulunduğu gösterilmiştir (4,33). Günümüzdeki BCG suşlarının immünojen özellikleri farklıdır. Pasteur ve Danish suşları Glaxo ve Tokyo suşlarından daha immünojendir 28. Bu bulgular önemli olmakla birlikte, bu suş varyasyonlarının aşı etkinliğinde gözlenen değişikliklerden sorumlu tek faktör olup olmadığının açıklanması gerekmektedir (29). İki BCG suşuna (Glaxo ve Danish suşu) ait epidemiyolojik verilerin karşılaştırılmasında, her iki suş İngiltere'de iyi bir koruma sağlarken Güney Hindistanda'ki Malawi ve Chingleput'da zayıf koruma sağladığı tespit edilmiştir. Bu gözlemlere göre, BCG aşısının etkinliğinde, suşlar arası farklılıklar minör önemde iken coğrafik ve/veya popülasyonla ilgili faktörlerin daha önemli olduğu anlaşılmaktadır. BCG aşısının cinse göre ortalama etkinliği, son 60 yılda yapılan çalışmaların meta analizinde, kadınlarda %70 ve erkeklerde %29 olarak bulunmuştur (31).

B. Çevredeki mikobakterilerle karşılaşma ve kronik infeksiyon Tropikal bölgede yaşayan erişkinlerde BCG aşısının etkinliğinin düşük olarak gözlenmesi, BCG aşısından önce çevredeki mikobakterilerle duyarlılaşmaya bağlı olabilir. Bazı coğrafik alanlarda atipik mikobakteriler bol olduğundan, erken yaşta immün yanıtları indükleyebilen bu tür mikroorganizmalarla aşılama öncesinde karşılaşma, BCG aşısına yanıtları maskeleyebilir veya konakta bulunan aşı suşu ile etkileşerek BCG tarafından indüklenen immüniteyi inhibe edebilir. Bu hipotezin denenmesi amacıyla, fareler, tropikal bölgelerde sık bulunan çevresel mikobakterilerle duyarlılaştırılmış ve daha sonra BCG ile aşılanmıştır. Aşıdan önce duyarlılaştırılan bu farelerde, kontrol grubuna göre M. tuberculosis infeksiyonu daha sık gözlenmiştir. Sığırlarda yapılan çalışmalarda da, BCG aşısından önce çevresel M. avium suşundan elde edilen antijenlere karşı yüksek IFN- γ yanıtının olduğu ve BCG aşısının, sığırları virülan M. bovis ile karşılaşmaya karşı daha az koruyucu olduğu gösterilmiştir. Klasik BCG aşısına tezat olarak, subünit aşılar

veya atenüe M. bovis mutantlarından oluşan yeni bazı aşı adaylarının koruyucu etkisi, çevresel mikobakterilerle önceden duyarlılaşmadan etkilenmemektedir (34). Bu bulgulara göre, çevresel mikobakterilerle karşılaşarak indüklenen immün yanıtların geriye doğru modülasyonundan kaçınmak için yeni aşı geliştirme çalışmaları desteklenmelidir. Son çalışmalarda, Th2 tipi immün yanıt oluşan helmint infeksiyonlarında BCG aşısının koruyucu etkisinin azaldığı ve helmintlerle karşılaşmış BCG aşıllı kişilerde antihelmintik tedavinin PPD'ye özgül yanıtları düzeltebileceği gösterilmiştir.

C. Suboptimal aşı verilışı

Erişkinlerde pulmoner TB'un canlı BCG aşısı ile önlenememesinin bir nedeni, optimal olmayan parenteral yolla bağışıklanma yapılmasıdır. Bağışıklamada kullanılan aşının, M. tuberculosis'in giriş yolu olan akciğerler ve üst solunum yollarında korunma sağlaması yanında, sistemik immün yanıtları da oluşturmaları istenir. Güncel olarak, yeni aşı geliştirme çalışmalarında, aşının mukoza yolundan verilecek şekilde dizayn edilmesi ve adjuvan veya taşıyıcı sistemler kullanılarak etkinliğinin optimize edilmesi araştırılmaktadır (35).

BCG ile duyarlılaşmış erişkinlerde bağışıklığı nasıl arttırabiliriz? TB aşılama öncelikli hedef, BCG ile aşıllı genç erişkinlerde bağışıklığın güçlendirilmesidir. Bu amaçla, booster (güçlendirme) aşılama yapılır. Ancak, BCG ile duyarlılaşmış kişilerde, BCG'nin hızla eliminasyonuna bağlı olarak, primer aşının koruyucu etkinliğini tekrarlanan BCG aşısının artırmadığına dair deliller bulunmaktadır. Özellikle subünit tipte yeni aşı çalışmalarının temeli, BCG ile indüklenen primer immün yanıtların etkin olarak güçlendirilmesinde yararlı olabilecekleri hipotezine dayanmaktadır. Bu yüzden, yeni aşı adayları, klinik öncesinde hayvan modellerinde incelenirken, BCG ile duyarlılaşmadan sonra yeni aşı ile immün yanıtların güçlendirilmesini kapsamalıdır. Bağışıklığı artıran (prime-boost) aşılama deneylerinde, BCG'den sonra mikobakteriyel antijenleri eksprese eden rekombinant virüs aşılıları kullanılarak hücresel immün yanıtlar güçlendirilmiştir (20).

Yeni TB aşılı

BCG aşısı, erişkinleri akciğer TB'una karşı koruyamaz. Aşıllı erişkinlerde de etkili yeni aşı geliştirilmesi çalışmaları hızlanmış ve günümüzde kullanılan modern

tekniklerle 200'den fazla TB aşısı geliştirilmiştir. Son 10 yılda, NIH tarafından, yeni adjuvanlarla birlikte 130'dan fazla materyal incelenmiştir (Tablo 4). Bu materyaller; DNA aşıları, canlı atenüe aşılar, rekombinant virüs ve bakteri vektörlü aşılar (BCG vektör aşısı dâhil), subünit aşıları (ölü BCG gibi füzyon proteinleri dâhil) ve yeni adjuvan ve taşıyıcı sistemlerle birleştirilmiş *M. bovis* aşılarıdır (17).

Tablo 4. Aşı adayları (18).

Araştırılan aşılar	Bileşimi	Gelişim evresi/Fazı	Araştırmacılar/Destekleyenler
Mtb peptitler	5 Mtb peptidi (sentetik)	Terk edildi	Intercell
Hsp65	DNA aşısı/safleştirilmiş protein	?	Lowrie, Silva /Immunobiologics
LAM-TT konjuge	Lipoarabinomannan-tetanoz toksoidi konjuge aşısı	?	Svensson, Pawlow Karolinska Institute
85B/10.4	Füzyon proteinini	Preklinik	SSI/Aeras
AF112	per1 ve Ag85A, B, Y eklenmiş rBCG	Preklinik	Aeras
BCG::RD1	BCG Pasteur genlerine <i>M. tuberculosis</i> 'in RD-1 lokusu eklenmiştir	Preklinik ?	Cole, Institut Pasteur/Eurovac
<i>M. tuberculosis</i> PhoP	<i>M. tuberculosis</i> genomundan virülansla ilişkili PhoP geni çıkarılmıştır	Preklinik çalışmalar devam ediyor ve GLP sonucu üretilimi	Martin, Gicquel Eurovac
<i>M. tuberculosis</i> mc ² 6020	<i>M. tuberculosis</i> genomundan <i>LysA</i> ve <i>panCD</i> çıkarılmıştır (çoğaltamaz)	GMP sonucu üretildi ve FDA'ya başvuruldu	Jacobs, Albert Einstein CoM
<i>M. tuberculosis</i> mc ² 6030	<i>M. tuberculosis</i> genomundan <i>panCD</i> ve RD-1 lokusu çıkarılmıştır (çoğaltılabilir)	GMP sonucu üretildi ve FDA'ya başvuruldu	Jacobs, Albert Einstein CoM
AdVac85A, B, Y	Adenovirüs vektörlü Ag85A	Faz 1, 2006 başında başlatılacak	Crucell/Aeras
rBCGΔUreCHly	<i>L. monocytogenes</i> ino üreaz geni eksik, listeriolizin salan BCG Pasteur suşu	Faz 1, 2005'de başlatıldı	Kaufmann, MPI / VPM
Ag85B/ESAT-6	Füzyon proteinini	Faz 1, 2005'de başlatıldı	P. Andersen, SSI

Mtb72f	Füzyon proteini	Faz 1 çalışmaları, Amerika'da tamamlandı, Avrupa'da başlatıldı	Corixa, GSKBio
rBCG30	BCG Tice plazmid tarafından kodlanan Ag85Bhin aşırı ekspresyonu	Amerika'da faz 1 sonuçları analiz ediliyor	Horwitz, UCLA
MVA-85A (Ag85A)	Vaccinia vektörlü Ag85A	Faz 1, ingiltere'de tamamlandı, Gambia'da devam ediyor	Hill/McShane, Oxford University
<i>M. vaccae</i>	Isı ile öldürülmüş	Tanzanya'da faz III başlayacak	Von Reyn/NIH

GLP: "Good Laboratory Practice". GMP: "Good Manufacturing Practice / Quality Systems".

UCLA: "University of California, Los Angeles". SSI: "Statens Serum Institute"

TB aşıları basit olarak, tam hücre ve subünit aşıları olarak iki sınıfta toplanabilir. Tam hücre aşıları, canlı veya ölü mikobakteri olarak alt gruplara ayrılır. Canlı aşılar; canlı modifiye BCG, genetik olarak atenüe edilmiş *M. tuberculosis*, virüs vektörlü ve bakteri vektörlü aşılara ayrılabilir. Subünit aşılar ise; hücre duvarı, protein ve diğer antijen aşılara ayrılabilir. Bu grupta, genellikle yeterli immün yanıt alabilmek için adjuvan kullanılması gerekir. Subünit aşılar; rekombinant protein antijenler, sentetik peptitler ve DNA aşılarını da içerir (23).

A. Ölü BCG ve *M. bovis* tam hücre aşıları

Ölü TB basillerinden hazırlanan aşılarla 19.ncu yüzyılın başlarında yapılan ilk çalışmalarda koruyuculuğun olmadığı veya zayıf olduğu tespit edilmiştir. Bu deneyler, yüzyıl boyunca defalarca tekrarlanmasına rağmen benzer sonuçlar elde edilmiştir. Böylece, TB'a karşı etkili herhangi bir aşının, koruyucu bağışıklık oluşuncaya kadar konakta çoğalma veya en azından yaşama kabiliyetine sahip olan BCG gibi canlı bir aşı olması gerektiği şeklinde bir dogma ortaya çıkmıştır. Buna rağmen, son kanıtlara göre, uygun adjuvan (Eurocine L3) içinde verilen ısı

ile öldürölmüş BCG'nin, geleneksel canlı atenüe BCG aşısıyla aynı derecede koruyucu immün yanıtlar oluşturduğu gösterilmiştir (13,19). Formalinle öldürölmüş *M. bovis* ile de benzer sonuçlar alınmıştır (36). Bu sonuçlar, koruyucu immün yanıtlar için uygun adjuvan seçiminin önemini göstermektedir.

B. Canlı, atenüe mikobakteri aşıları

BCG'nin genetik olarak modifiye edilerek koruyucu antijen ya da sitokinler eksprese eden suşları, *M. tuberculosis*'in genetik mühendislikle oluşturulan mutantları ve diğ er non-patojen mikobakteriler veya vaccinia virüs gibi canlı vektörlerden hazırlanan aşılardır.

TB aş ı adayı olarak canlı atenüe oksotrof *M. tuberculosis* suşları ve daha az virölan *M. vaccae*, *M. smegmatis* ve *M. microti* önerilmiş, ancak hayvan deneylerinde koruyucu etkinliklerinde büyük değ işkenlikler görölmüştür. Canlı, atenüe, oksotrof *M. tuberculosis* suşu olarak, Pastör Enstitüsünde PhoP ve New York'taki Albert Einstein Kolejinde çift oksotrof mutant suşlar geliştirilmiştir. Oksotrof suşlar, hayvan deneylerinde güvenli oldukları halde insanlarda güvenlik ve stabilite problemlerine sahiptir. Kobay deneylerinde, çift oksotrof suşlarla BCG'dekine eşdeğ erde korunma sağlanmış tır. Son zamanlarda, mikobakteri lipitlerinde defekt olan bir *M. tuberculosis* mutant suşunun (*M. tuberculosis* drrC), fareye verince BCG'den daha koruyucu olduğu gösterilmiştir (37).

BCG30 aş ısı: Canlı BCG Tice aş ı suşuna, genetik mühendislikle; immün yanıt oluşturan antijenler veya immün sistemi uyaran sitokinleri kodlayan genlerin eklenmesiyle hazırlanır. Bu suş, 30 kDa majör sekretuar proteini (Ag85B) eksprese eder. Faz I deneyleri Amerika'da tamamlanmıştır.

M. tuberculosis ve *M. bovis* suşlarının genomunda bulunan RD1 segmenti, mikobakteriye virölans özelliğ i kazandırır. BCG'nin atenüasyonu sırasında RD1 segmenti kaybolur 4. Pastör Enstitüsünde, BCG suşlarında kaybolan RD1 genom segmentinin tekrar eklenmesiyle rBCG::RD1 suşu geliştirilmiştir. Bu suş, ESAT-6 ile birlikte Ag85A proteinlerini de eksprese eder. ESAT-6/Ag85A aş ısı, virölan *M. tuberculosis* ile infekte edilen farelerde, standart BCG'ye göre daha iyi korunma

sağlamıştır.

Max Planck Enstitüsünde hazırlanan rBCGΔUreCHly aşısında; BCG suşundan, fagozom içindeki asit pH'ı nötrlememesi için üreaz geni çıkarılmış ve MHC klas I tarafından sunulmasını artırmak için listeriolizin geni eklenmiştir. Bu aşının, ağır kombine immün yetmezlikli (SCID) farelerde güvenli olduğu gösterilmesine rağmen virülen duruma geçip geçmeyeceği bilinmemektedir (38).

C. Konjuge aşılar

Taşıyıcı proteinlere konjuge edilen polisakkaritler, immün sistemi stimüle ederek özgül antikorların üretimine neden olurlar. Tavşanlarda zayıf immünojen olan *S. pneumoniae* tip 3 polisakkaritinin immünojenliği, bir haptene proteine konjuge edilerek artırılmıştır. Bu gözlem, modern insan karbohidrat-protein konjuge aşılarının geliştirilmesini sağlamış ve sonraki yıllarda, *Salmonella* O antijenine özgül oligosakkaritleri proteinlere konjuge ederek koruyucu tipte *Salmonella* aşıları hazırlanmıştır. Günümüzde, karbohidrat-protein konjuge aşılardan pnömokok, meningokok ve *Shigella* infeksiyonlarında etkili olduğu gösterilmiştir.

İnsanlarda kullanılmak üzere lisans alan ilk gliko-konjugat aşısı, *Haemophilus influenzae* tip b (Hib) konjuge aşısıdır. Bu aşısı ulusal çocuk aşılama programında kullanılmış ve küçük çocuklarda yapılan çalışmalarda, konjuge Hib kapsüler polisakkarit poliribitol fosfat (PRP) aşısının immünojenliği doğrulanmıştır. Tetanoz toksoidi (TT), difteri toksoidi (DT), mutant difteri toksini (CRM197) ve dış membran proteini (OMP) preparasyonları ile Hib konjuge aşıları geliştirilmiş ve pediatrik Hib infeksiyonlarında dramatik düşme elde edilmiştir. Çocuklarda Hib infeksiyonlarının azaltılmasında Hib konjuge aşısıyla elde edilen başarı, diğer bakterileri hedef alan konjuge aşılarda geliştirilmesine ilgiyi artırmış ve Avrupa'da, L3 adjuvanı içinde AM-Ag85B konjuge aşısı geliştirilmiştir.

D. Rekombinant BCG (rBCG)

Bu çalışmalarda, vektör olarak BCG kullanılmaktadır. Uzun süre in vitro atenuasyon işlemi sırasında BCG suşunda kaybolan bazı genlerin yeniden nakledilmesi, mevcut genlerin ek kopyalarının oluşturulması ve sitokin salınımı yapan genlerin eklenmesi ile BCG'nin etkinliği artırılmaya çalışılmaktadır. Son yıllarda, bu tür aşılardan en az 25 adedi NIH kontratı altında incelenmiştir. Hayvan modellerinde, M.

tuberculosis'in 30 kDa majör sekretuar proteinini aşırı eksprese eden rekombinant BCG (rBCG30) aşısının koruyuculuğunun biraz daha fazla olduğu gösterilmiştir. Kobaylara, aerosol halinde verilen bu aşı ile parenteral yoldan verilen geleneksel BCG aşısı karşılaştırılınca, akciğer ve dalakta basil CFU'sunda azalma bulunmuştur. 2004 yılında rBCG30 aşısı ile faz I çalışmalarına başlanmıştır. BCG'de eksik olan ESAT-6 ile BCG aşısı birleştirilerek farelere verildiğinde aşının koruyuculuk oranı artmıştır (39). Hayvan modellerinde etkili olduğu bildirilen diğer rBCG aşıları, listeriolizin veya sitokinler sekrete eden ya da Ag85A ve Ag85B eksprese eden aşılardır (38,40). Sitokin geni aktarılan rBCG'nin virölansı artar ancak konaktan hızla temizlendiği için koruyuculuğu azdır. Listeriolizin sekrete eden BCG suşları, CD8 T lenfositleri tarafından daha iyi tanınmaktadır. Berlin'de "Max-Planck-Institute"de üreaz geni çıkarılıp listeriolizin geni eklenerek listeriolizin geni taşıyan BCG aşısı hazırlanmış ve 2005 yılında ikinci yarıdan sonra faz I deneylerine başlanmıştır (18). Son yıllarda, UCLA (University of California, Los Angeles)'da, aşırı Ag85A eksprese eden rekombinant BCG suşu (Ag85A aşısı) geliştirilmiş ve Amerika'da faz I çalışmaları tamamlanmıştır (18). Rekombinant BCG aşılarının, konvansiyonel BCG aşılarına üstünlüğü henüz gösterilmemiş olmasına rağmen çevredeki mikobakterilerle duyarlılaşmaya bağlı olarak pozitif etkilerinin baskılandığı düşünülmektedir.

E. Oksotrof veya bazı genleri çıkarılmış mutantlardan hazırlanan aşılar

Bu kategoriye ait ilk aşılar, in vitro kültür sırasında oksotrof özellik gösteren basillerin seçilmesi ile hazırlanmıştır. Farelere, oksotrof suşlardan hazırlanan aşılar verildiğinde, immün yanıt oluşturur ve kısa süreli deneylerde koruyucu özellik gösterirler. Ancak, bu aşıların ileri düzey analizlerinde, in vivo koşullarda bakterilerin hızla öldükleri ve indüklenen bağışıklığın bellek özelliği olmadığı için hızla kaybolduğu gözlenmiştir. Bakteri suşlarından belirli genlerin çıkarılmasına olanak veren son teknolojik gelişmelerden yararlanılarak daha yeni oksotrof bakteri mutantları hazırlanmış ve aşılarda denenmiştir. Bu tür mutant bakteri hazırlanırken, genellikle mikolik asit sentezi, demir yokluğuna yanıt ve vitamin B metabolik yolları gibi bakterinin metabolik yollarına etkili genler çıkarılmaktadır. Bu şekilde hazırlanan aşıların daha iyi immün yanıt verdikleri bildirilmiştir. Şu anda yürütülmekte olan bir çalışmada, pantotenat yolu ve RD1 bölgesi mutasyona uğratılan çift "knock out" fare deneyleri yapılmakta ve sonuçları ümitli görünmektedir (17).

F. Vektör aşılar

Replikasyon olmayan rekombinant vaccinia virüs veya rekombinant Salmonella gibi vektörlere M. tuberculosis'un immün dominant genleri aktararak hazırlanan aşı adayları hayvan deneylerinde iyi koruyuculuk gösterir. Bu gruptaki aşılarından biri olan Ag85A aşısı, Oxford Üniversitesinde geliştirilen ve Mycobacterium tuberculosis tarafından sekrete edilen Ag85A antijeni temelinde dayanan, modifiye vaccinia virus Ankara (MVA) vektörlü subunit bir aşıdır (MVA85A aşısı). İngiltere'de, 2004 yılında faz I klinik değerlendirilmesi tamamlanmıştır. Aşıların güvenlik ve immünojenliği, özellikle BCG aşılamasından sonra booster doz olarak verildiğinde, mükemmel olarak bildirilmiştir. İleri faz I güvenlik ve immünojenlik deneyleri, Gambia'da tamamlanmıştır. Faz II deneylerine, Gambia ve Güney Afrika'da başlanmasına ve aşının latent TB'lu kişilerde etkinliğinin incelenmesine karar verilmiştir. 18. Ag85A (MVA85A) ekspres eden rekombinant vaccinia virüs Ankara, farklı aşılama stratejileri (homolog veya heterolog prime-boost) kullanılarak prelinik olarak incelenen ve faz I klinik çalışmalarına geçilen ilk aşı adayı olmuştur. Bu çalışmalar, hem BCG ile karşılaşmayan hem de tek doz MVA85A booster aşısından önce 1 ay, 1-15 yıl ve 10-20 yıl BCG ile aşılanan kişilerde yapılmıştır. Sonuç olarak, sağlıklı aşısız kişilerde ve önceden BCG ile aşılanan gruplarda antijene özgül IFN- γ sekrete eden T lenfositlerinde artma sağlanmıştır. Ancak, bu tip aşılar; canlı virüs aşılarının güvenilirlik sorunları yanında halen çözümlenemeyen ve vektöre karşı ortaya çıkan immün yanıtlar nedeniyle aşılama sayısının kısıtlı tutulmasını gerektiren problemler vardır (24,41,42).

G. DNA aşıları

İnsanlarda TB'a karşı koruyucu immün yanıtlar oluşturan antijenleri kodlayan DNA kısımlarının üretilmesi ve saflaştırılmasıyla hazırlanan aşılar. Mikobakteri antijenlerini kodlayan plazmitlerden hazırlanırlar. Çıplak DNA aşıları olarak da bilinirler. Mikolil transferaz ailesi (Ag85 kompleksi) üyeleri ve ısı-şok proteinleri 60, 65, 70 (Hsp60, 65, 70) gibi mikobakteri antijenlerini kodlayan plazmitler ve aktif füzyon poliproteinlerini kodlayan DNA içeren bu aşıların, TB'a karşı etkinlikleri, laboratuvar hayvan modellerinde yoğun olarak araştırılmaktadır. NIH kontratı altında, bu tür 25'den fazla aşı test edilmektedir. DNA aşılarının gücünü artırmak için, sitokinlerle birlikte bağışıklama veya DNA'nın katyonik lipidler ya da diğer adjuvanlar içinde verilmesi araştırılmaktadır. DNA aşıları, fare modellerinde,

özgül Th1 tipinde T hücre yanıtı yanında M. tuberculosis'e karşı korunmada rol alan CD8+ T hücrel sitotoksik yanıtları da artırmaktadır. Birden fazla yolla ve sitokin kodlayan genlerle birleştirilerek verilebilirler. Ayrıca, birden fazla antijen (Ag85B, MPT-64 ve MPT-83) halinde kombine edilebilir ve biyolojik olarak parçalanabilen mikro küre kapsüller içinde hazırlanabilirler (43). Prime-boost senaryolarında çok etkili aşılardır. Şu ana kadar yapılan çalışmalara göre, DNA aşılarının güçlü koruma sağlaması için booster aşılamlar gerekmektedir. Ancak, DNA aşılarında kullanılan plazmitlerin konak genomuna entegre olmadıklarına dair kesin kanıt bulunamamıştır (17,43-47). Bu nedenle, çok az sayıda insan çalışmaları yapılmıştır (17).

H. Yeni adjuvanlarda formüle subünit ve füzyon proteini aşıları

BCG'nin, subünit aşı hazırlanmasında kullanılan farklı protein antijenleri kodlayan yaklaşık 4000 geni vardır (4). Tam genom taramaları sonucunda, koruyucu tipte immün yanıt oluşturan antijenlerin tanımlanması sağlanmıştır. Bu antijenler tek başına veya kombinasyonlar halinde aşı adayı olarak incelenmektedir. Bazı subünit aşılarda, non-protein antijenler de kullanılmıştır.

M. tuberculosis; sitoplazmik, hücre duvarı ile ilişkili ve salgılanan proteinler olmak üzere 3 grup antijen eksprese eder. ESAT-6, Ag85B, hsp65 ve bunların hibrid proteinleri (ESAT-6 ve Ag85B'in füzyonu) gibi bazı proteinler, günümüzde aşı adayı olarak değerlendirilmektedir. NIH kontratı altında, 40'tan fazla subünit aşısı test edilmektedir. Bu aşılarda, genellikle M. tuberculosis'in kültür filtrat proteinleri (CFP) kullanılmaktadır. CFP'leri, ESAT-6 gibi RD1 gen segmenti tarafından kodlanır ve enfeksiyonun erken dönemlerinde koruyucu antijen özelliği olan yaklaşık 200 proteinden oluşmaktadır (4). Bu sayı, CFP'nin erken veya mid-log fazları arasında kültürden elde edilme zamanına göre değişmektedir. Bu proteinler arasında; Ag85 (mikolil transferaz) ailesi, MPT32, MPT51, MPT64, GroES, ESAT-6, DnaK ve GlnA daha önemlidir. CFP proteinlerinin Ag85 ve ESAT-6 ile birlikte hazırlanan karışım/kokteyllerin koruyuculuğu daha fazladır. Farelere, aerosol halinde verildiklerinde, akciğerlerde lenfositik granülomatöz yanıtı neden olan bakteri yükünü azaltırlar. Ag85B-ESAT6 aşısı, Kopenhag'da Statens Serum Enstitüsü (SSI)'nde geliştirilen adjuvanlı füzyon proteini aşılarının tipik örneklerinden biridir. Bu aşı, 2005/2006 yılında iki klinik deney için seçilmiştir.

Birinci deneyde, adjuvan olarak oligodeoksinükleotitler ve polikasyonik amino asitlerden (IC31) oluşan bir karışımda hazırlanan aşılar kullanılarak, geleneksel parenteral aşılama stratejisi açısından incelenecektir. İkinci deney, birinci deneyle paralel çalışılacak ve adjuvan olarak E. coli'den elde edilen ısıya dayanıksız enterotoksin'in modifiye edilmiş şekli (LKT63) ile birlikte aynı antijen nazal yoldan verilecektir (18). Bazı çalışmalarda, IL-2 ile desteklenen CFP aşılarının kobaylarda bakteri yükünü azaltmasa da yaşam süresinde aşısız kontrollere göre, uzamaya neden olduğu bildirilmiştir. Aşının dozu, verilme yolları, zamanlaması ve multipl adjuvanlarla birlikte kullanılması konuları araştırılmaktadır. Uygun adjuvan ve taşıyıcı sistemler içinde formüle edilen bu proteinlerin, CMI yanıtlar oluşturduğu gösterilmiştir. M. leprae'nin hsp65 ısı şok proteini de hem hümmoral hem de T hümmesal immün yanıtları stimüle edebilmektedir (21). Washington-Seattle'da Corixa tarafından, M. tuberculosis'in 32 (MTB32) ve 39 (MTB39) kDa'lık proteinlerinin füzyonundan oluşan 72-kDa (MTB72F) poliprotein BCG aşısına eklenmesiyle, Mtb72f aşısı geliştirilmiştir (18). Bu aşı, GlaxoSmithKline tarafından geliştirilen bir adjuvan formülasyonu ile birlikte verilir. Fare ve kobaylara verilmesiyle koruyuculuk kapasitesinin arttığı gösterilmiştir. Kobaylarda, BCG'ye benzer tarzda yaşam süresinde uzamaya neden olur. Bu aşı ile 2004 yılında klinik deneylere başlanmış, Amerika'da faz I ve Avrupa'da faz I/II klinik deneyleri tamamlanmış ve 2005 yılında sağlıklı PPD+/TB'la infekte erişkinlerde faz II güvenlik ve immünojenlik çalışmalarına başlanmıştır (13,17,18,48,49). M. tuberculosis genomunun %90'ı, PE (n=99) ve PPE (n=68) gen ailesini kodlar. PE/PPE proteinlerinin fonksiyonu bilinmemekle birlikte, hümmoral yanıt oluşturdukları sanılmaktadır. Virülanstan sorumludurlar. İmmünojen ve yüksek derecede korunmuş olan bu proteinler, aşı dizaynında kullanılmıştır. Aşı denemelerinde, koruyucu olmayan hümmoral yanıt ya da koruyucu hümmesal yanıt alındığına dair farklı sonuçlar yayınlanmıştır. Rv3873'deki antijenik bir epitopun, diğer PPE aile üyelerinde de bulunduğu ve hem TB'lu hem de BCG aşılu bireylerden elde edilen hümmesal hümmesal tarafından tanındığı bildirilmiştir (4).

Avrupa Birliği'nde yapılan TB-aşı çalışmaları

Avrupa Birliği'nin beşinci ve altıncı çerçeve programlarında tüberküloz aşı araştırmaları için fon ayrılmış ve çeşitli araştırmalar desteklenmiştir. Devam eden 24 aşı çalışmasında; kobaylara, heterolog prime-boost formatında verilen adjuvanı

veya adjuvanlı Ag85B/ESAT6 füzyon proteini, Ag85A eksprese eden DNA veya MVA aşılı ile BCG aşısına eşdeğer koruyucu yanıt elde edilmiştir (50) (Tablo 5).

Tablo 5. Avrupa Birliği'nde yapılan aşı çalışmaları (50).

Aşı adı	Adjuvan	Uygulanması	Kontrol grubu ile karşılaştırmalı deney sonuçları			
			Yaşam süresi	Akciğerde CFU azalması	Dalakta CFU azalması	Akciğerlerde konsolidasyon
Ag85A DNA + MVA/Ag85A		Heterolog prime-boost. DNA im, MVA id	p<0,05	Farksız	p<0,05	p<0,05
Ag85B/ESAT-6 füzyon	DDAMPL	sc	p<0,05	Farksız	p<0,05	Farksız
Ag85B/ESAT-6 füzyon	AS02	sc	Farksız	Farksız	p<0,05	Farksız
Hsp65 plazmid DNA (CMV4.65)		im	Farksız	Farksız	p<0,05	Farksız
AM-Ag85B konjuge	L3	sc, intranazal	Farksız	Farksız	p<0,05	Farksız
rAg85A protein	AS02	sc	Farksız	Farksız	Farksız	-
Fowlpox/Ag85A + MVA/Ag85A		Heterolog prime-boost. id	Farksız	Farksız	Farksız	-
Ag85A DNA	Vaxfectin	Booster, im	Farksız	Farksız	Farksız	-
Ag85A DNA + rAg85A	Vaxfectin-Ag85A, AS02-rAg85A	Heterolog prime-boost im, sc	Farksız	Farksız	Farksız	-
Ag85B/ESAT-6 füzyon	DDAMPL/TDB	sc	Farksız	Farksız	Farksız	-
Ag85B/ESAT-6 füzyon	DDAMPL/TDB	DDAMPL sc prime, TDB'de oral booster	Farksız	Farksız	p<0,05	-
Ag85B/ESAT-6 füzyon + AM	L3	sc, intranazal	Farksız	Farksız	Farksız	-
<i>M. tuberculosis</i>		sc	Farksız	Farksız	Farksız	-

<i>hpaP</i> - mutant						
rBCG-Hly		sc	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
rBCG Pasteur::RD1-2F9		sc	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
BCG Danish + Ag85BESAT-6	DDAMPL	Het. prime-boost, sc	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
BCG Danish + MVA/Ag85A		Het. prime-boost, sc	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
BCG Danish + BCG Danish		Homolog Prime-boost, sc	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<i>M. tuberculosis</i> <i>phaP</i> - mutant			p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
PstS3-Ag85A DNA + BCG Danish		Het. prime-boost in, sc	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
<i>M. micro</i> OV254::RD1-2F9		sc	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
BCG Danish + MVA.85A+FP.85A		sc	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
rBCGΔUreCHly		sc	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
AM-TT	L3	sc, intranasal	Farksız	Farksız	Farksız	Farksız

TDB: trehaloz dibehenat

TARTIŞMA, SONUÇ VE BEKLENTİLER

TB'a karşı etkin ve yeni aşılardan geliştirilmesi, çok aktif bir araştırma alanıdır. Dünya nüfusunun yaklaşık %80'i BCG ile aşılanmasına rağmen, yeni TB olguları saptanmaktadır. BCG aşısı, özellikle menenjit olmak üzere çocuklarda diseminasyon TB'ü önlerken, erişkinlerde akciğer TB'una karşı koruyucu etki göstermemektedir. Dünya nüfusunun 1/3'ü (yaklaşık 2 milyar) TB'lu ve bu kişilerin 14 milyonu AIDS'lidir. HIV ile infekte TB'lu hastalarda antiretroviral tedavi sırasında, TB alevlenmekte ve *M. tuberculosis* suşlarında anti-TB ilaçlara çoğul direnç (MDR) artmaktadır. Avrupa'da, TB izolatlarının %14'ünde MDR saptanmıştır. *M. tuberculosis* ile infekte kişilerde, her yıl 8-9 milyon aktif TB ve 2 milyon ölüm saptanmaktadır (4). Bir günde TB'a bağlı ölüm sayısı 4300'dür. Bu rakamlar, erişkin yaşlarda TB'a karşı immün yanıtları artıracak yeni bir aşıya acil ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Laboratuvarlarda, insanlarda kullanılan yeni bir aşının geliştirilmesi yaklaşık 20 yıl alır. Bu sürenin büyük bir kısmı, yeni teknolojinin güvenle uygulanması için gereken uzun ve sıkıcı düzenleyici işlemlere ve insanlarda kullanılan materyallere bağlıdır. Bu nedenle, yeni bir TB aşısı için, uzun yıllar beklemeden, mevcut BCG aşısının etkinliğini artırmak amacıyla çalışmalar yapılmaktadır. Son 10 yılda, yeni bir TB aşısı geliştirme çalışmaları hızlanmış; moleküler biyoloji, genomik, proteomik ve transkriptomik alanında çok önemli gelişmeler kaydedilmiş, çok sayıda aşı potansiyeli olan antijenler tanımlanmış ve yüzlerce aşı deneyleri yapılmıştır.

Yeni TB aşılarının, en az üç hedefi vardır; aşının primer infeksiyonu önlemesi, latent TB'ularda T hücre yanıtlarını kuvvetlendirerek hastalığın gelişmesini durdurması ve özellikle MDR ve HIV kemoterapisi sırasında terapötik etkilere sahip olması amaçlanmaktadır. Bu amaçlarla, aşı çalışmalarında, eski veya yeni bulunan adjuvanların emülsiyon veya süspansiyon içinde farklı antijenlerle, antijen ve adjuvan kombinasyonları halinde ve değişik uygulama yerlerinden verilmesiyle oluşan immün yanıtlar karşılaştırılmıştır. Formolde öldürülmüş BCG ve yeni bazı adjuvanlar içinde ölü basillerle aşılamanın koruyucu immün yanıtlar oluşturduğu saptanarak, aşılar da uygun adjuvan kullanılmasının önemi ve aşı için canlı bakterinin koşul olmadığı gösterilmiştir (36). Subünit aşılarla kombine edilecek adjuvanlar arasında, en iyi adjuvan mineral yağ kapsayan inkomplet Freund adjuvanı (FI A) olmasına rağmen bu adjuvanın, oldukça toksik olması nedeniyle insanlarda kullanılamaması, lipid yapısında yeni adjuvanların aranmasına yol açmış ve insanlarda toksik olmayan L3 adjuvanı gibi yeni lipid adjuvanlar bulunmuştur (19,26). Yeni aşılarda, moleküler düzeyde etkileri araştırılmış ve doğal infeksiyon sırasında oluşan immün yanıtlarla karşılaştırılmıştır. İnsan deneylerinde yeni TB aşılarının değerlendirilmesini sağlayan; önceden BCG ile aşılanan sağlıklı kişilerle aktif hastaları birbirinden ayırması yanında M. tuberculosis ve diğer mikobakterilerle infekte kişiler arasında da ayırım yapabilen yeni TB tanı yöntemlerinin geliştirilmesinin kritik önemi vardır. Yeni aşı geliştirme çalışmalarında, genellikle, serumda mikobakteri antijenlerine özgül IgG antikorları, IFN- γ , Th1 ve Th2 yanıtları ölçülmüştür. İncelenen aşı adaylarının, BCG aşısında olduğu gibi, karşılaşma öncesi (pre-exposure) verildiklerinde etkili iken mevcut infeksiyonu iyileştirememeleri, artan immün aktivasyona bağlı olduğu ve geliştirilen yeni TB aşılarının Th1 yanında Th2 yanıtlarını da indüklemesi gerektiği anlaşılmıştır.

İnsan çalışmalarında yeni TB aşılarının değerlendirilmesinin yapılabilmesi için, aşının uygulandığı popülasyondaki M. tuberculosis ve/veya HIV enfeksiyonları ve BCG ile aşılanıp aşılanmadıkları konusunda bilgiler elde edilmelidir. Yeni TB aşılarının geliştirilebilmesi, toplumdaki kişi ve kuruluşların işbirliği yapmasına bağlıdır. TB'un endemik olduğu ülkelerde, sağlık personelinin cesaretlendirilmesi özellikle önemlidir. Erişkinlerde global aşılama programları olmadığı için, yeni TB aşılarının klinik testlerinin yapılacağı ülkelerde, erişkinler ikna edildikten sonra aşılanmalıdır. Yeni TB aşılarının, AIDS ve sıtma aşılarının denendiği bölge ve kişilerde denenmesi başarı şansını artıracaktır.

Bazı fare çalışmalarında, yeni geliştirilen TB aşıları; yeni adjuvanlar içinde, oral veya nazal yol gibi farklı yollardan veya prime-boost yöntemine göre uygulanarak, primer BCG aşısının indüklediği immün yanıtlar ve koruyuculuğu kuvvetlendirilmeye çalışılmıştır. Booster aşılama şemalarından hiçbirinde fare akciğesindeki bakteri yükü, booster aşı yapılmayanlara göre, azalmamıştır. Ancak, iki booster doz aşı verilen farelerde, kontrol aşıları farelere göre granülomatöz inflamasyonun ilerlemesi durmuştur. Booster doz olarak aşı verilen tüm gruplarda, dalakta T hücre proliferasyonu ve IFN- γ üretimi yanıtı, bir tek doz BCG aşısı verilerek indüklenen kontrollere göre artmıştır. Uygun bir adjuvan içinde, booster olarak DNA ve protein karışımından oluşan heterolog aşılamadan sonra BCG'nin koruyucu etkinliği kuvvetlenmektedir (19,51).

Aşı deneylerinin başlatılabilmesi için diğer önemli konular içinde; deneyin yapılacağı yerin belirlenmesi, standart protokollerin hazırlanması, etik konuların gözden geçirilmesi, denek bilgi formlarının hazırlanması sayılabilir. Aşının özgüllüğü, güvenliği, immünojenliği ve etkinliğini ölçen yöntemler belirlenmelidir (32). Global boyutta TB'un kontrol altına alınabilmesi, koruyucu ve tedavi edici özellikte yeni aşılarda geliştirilmesi için toplum ve toplumlar arası işbirliği gerekmektedir.

HIV/AIDS aşılarında gözlemlendiği gibi, yeni TB aşılarının geliştirilmesi aşırı çalışma ve dikkat gerektiren, zor ve riskli girişimlerdir. Çok sayıda insan üzerinde, sayısız aşılarda yapılan deneyler ve alınacak sonuçların yüzlerce araştırmacı tarafından izlenmesi ve karşılaştırılması gerekmektedir. Güney Afrika'da aktif TB'lularda

terapötik aşı olarak verilen, randomize kontrollü M. vaccae aşı deneylerinde, aşidan sonra immün yanıtların alevlenmesi sonucu ağır akciğer immün patolojileri ile karakterize Koch reaksiyonları meydana gelmiştir. İnsanlarda yapılan klinik deneylerin, saydam olması gereklidir. Etik ve legal sorumlulukları vardır. Bunlara ilaveten, gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak kullanılması için, yeni aşının etkili ve piyasaya uygun bir fiyatla sunulması gerekmektedir. Multi komponentli subünit aşılar ve prime-boost aşılama stratejilerinin yüklü bir maliyeti vardır. Fakat, global olarak TB'lu sayısına bakılınca, ortada büyük bir market vardır ve etkin bir aşının geliştirilebileceği ümitleri devam etmektedir. TB aşı geliştirme deneylerine, DSÖ tarafından; alan tespiti, deneye katılma kriterleri, ölçümler, immün assayler ve klinik deneye alınan aşı adayının üretimini sağlayacak endüstriyel yatırımlar belirlendikten sonra başlanmaktadır. Bu alanda çalışma yapan diğer katılımcı ve organizasyonlar arasında; Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH), Bill ve Melinda Gates Vakfının desteklediği Aeras Global TB Aşı Vakfı, Avrupa Birliği Komisyonu tarafından desteklenen Avrupa'lı araştırmacılar ağı (Network of European researchers) ve GlaxoSmithKline (GSK) ve IDRI-Corixa gibi farmasötik üreticiler sayılabilir (52). Klinik deneylere katılacak halk ve özel sektör işbirliği olmadan sonuç alınamayacağı aşıkardır. Yeni TB aşı/aşıları geliştirilip piyasaya verilebilirse tüm çaba ve masrafların karşılanacağı düşüncesiyle, yeni aşılarda faz çalışmaları tamamlanmaya doğru gitmektedir. Planlar yapılmış ve hedefler belirlenmiştir. Yeni aşının, 2015 yılında kullanılmaya başlanması ve 2050 yılında dünyadan TB'un eradike edilmesi beklenmektedir (18).

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. 2005.
2. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis (Edinb) 2003;83:91-7.
3. Karakousis PC, Bishai WR, Dorman SE. Mycobacterium tuberculosis cell envelope lipids and the host immune response. Cell Microbiol 2004;6:105-16.
4. Andersen P, Doherty TM. TB subunit vaccines--putting the pieces together. Microbes Infect 2005;7:911-21.

5. Briken V, Porcelli SA, Besra GS, et al. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol* 2004;53:391-403.
6. Dao DN, Kremer L, Guerardel Y, et al. Mycobacterium tuberculosis lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. *Infect Immun* 2004;72:2067-74.
7. Chatterjee D, Bozic CM, McNeil M, et al. Structural features of the arabinan component of the lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis. *J Biol Chem* 1991;266:9652-60.
8. Ottenhoff TH, Verreck FA, Hoeve MA, et al. Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)* 2005;85:53-64.
9. Wilkinson RJ, Young DB. Novel Vaccines Against Tuberculosis. Levine MM, Kaper JB, Rappuoli R et al. (eds). *New Generation Vaccines*. Third Edition, Revised and Expanded. New York - Basel: Marcel Dekker, 2004:519-35.
10. Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)* 2004;84:93-101.
11. Haile M. Studies on new tuberculosis vaccine candidates in animal models. Karolinska Institutet, Thesis. 2005.
12. Rodriguez A, Tjarnlund A, Ivanji J, et al. Role of IgA in the defense against respiratory infections IgA deficient mice exhibited increased susceptibility to intranasal infection with Mycobacterium bovis BCG. *Vaccine* 2005;23:2565-72.
13. Haile M, Kallenius G. Recent developments in tuberculosis vaccines. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18:211-5.
14. Hamasur B, Haile M, Pawlowski A, et al. A mycobacterial lipoarabinomannan specific monoclonal antibody and its F(ab') fragment prolong survival of mice infected with Mycobacterium tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2004;138:30-8.
15. Orikasa K, Namima T, Ota S, et al. Acute eosinophilic pneumonia associated with intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy of carcinoma in situ of the bladder. *Int J Urol* 2003;10:622-4.
16. Orme IM. Mouse and guinea pig models for testing new tuberculosis vaccines. *Tuberculosis (Edinb)* 2005;85:13-7.
17. Orme IM. Current progress in tuberculosis vaccine development. *Vaccine* 2005;23:2105-8.
18. Stop TB. Draft Strategic Plan of the Stop TB Partnership Working Group on

TB Vaccine Development 2nd Global Plan to Stop TB 2005-2015 (GPII) Status: 28 April 2005. 2005.

19. Haile M, Hamasur B, Jaxmar T, et al. Nasal boost with adjuvanted heat-killed BCG or arabinomannan-protein conjugate improves primary BCG-induced protection in C57BL/6 mice. *Tuberculosis (Edinb)* 2005;85:107-14.

20. McShane H, Hill A. Prime-boost immunisation strategies for tuberculosis. *Microbes Infect* 2005;7:962-7.

21. Silva CL, Bonato VL, Coelho-Castelo AA, et al. Immunotherapy with plasmid DNA encoding mycobacterial hsp65 in association with chemotherapy is a more rapid and efficient form of treatment for tuberculosis in mice. *Gene Ther* 2005;12:281-7.

22. Izzo A, Brandt L, Lasco T, et al. NIH pre-clinical screening program: overview and current status. *Tuberculosis (Edinb)* 2005;85:25-8.

23. Rowland SS, Mayner RL, Barker L. Advancing TB vaccines to Phase I clinical trials in the US: regulatory/manufacturing/licensing issues. *Tuberculosis (Edinb)* 2005;85:39-46.

24. Goonetilleke NP, McShane H, Hannan CM, et al. Enhanced immunogenicity and protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* of bacille Calmette-Guerin vaccine using mucosal administration and boosting with a recombinant modified vaccinia virus Ankara. *J Immunol* 2003;171:1602-9.

25. Wang J, Thorson L, Stokes RW, et al. Single mucosal, but not parenteral, immunization with recombinant adenoviral-based vaccine provides potent protection from pulmonary tuberculosis. *J Immunol* 2004;173:6357-65.

26. Haile M, Schroder U, Hamasur B, et al. Immunization with heat-killed *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) in Eurocine L3 adjuvant protects against tuberculosis. *Vaccine* 2004;22:1498-508.

27. Aldwell FE, Brandt L, Fitzpatrick C, et al. Mice fed lipid-encapsulated *Mycobacterium bovis* BCG are protected against aerosol challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2005;73:1903-5.

28. Gilbert SC, Moorthy VS, Andrews L, et al. Synergistic DNA-MVA prime-boost vaccination regimes for malaria and tuberculosis. *Vaccine* 2005. In Press.

29. Oettinger T, Jorgensen M, Ladefoged A, et al. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tuber Lung Dis* 1999;79:243-50.

30. Chennai. Tuberculosis Research Centre (ICMR). Fifteen year follow up of trial of BCG vaccines in south India for tuberculosis prevention. *Indian J Med Res* 1999;110:56-69.
31. Aronson NE, Santosham M, Comstock GW, et al. Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska Natives: A 60-year follow-up study. *JAMA* 2004;291:2086-91.
32. Wang L, Turner MO, Elwood RK, et al. A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax* 2002;57:804-9.
33. Vordermeier HM, Cockle PC, Whelan A, et al. Development of diagnostic reagents to differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and *M. bovis* infection in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:675-82.
34. de Lisle GW, Wards BJ, Buddle BM, et al. The efficacy of live tuberculosis vaccines after presensitization with *Mycobacterium avium*. *Tuberculosis (Edinb)* 2005;85:73-9.
35. Doherty TM, Olsen AW, van PL, et al. Oral vaccination with subunit vaccines protects animals against aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2002;70:3111-21.
36. Chambers MA, Wright DC, Brisker J, et al. A single dose of killed *Mycobacterium bovis* BCG in a novel class of adjuvant (Novasome) protects guinea pigs from lethal tuberculosis. *Vaccine* 2004;22:1063-71.
37. Pinto R, Saunders BM, Camacho LR, et al. *Mycobacterium tuberculosis* defective in phthiocerol dimycocerosate translocation provides greater protective immunity against tuberculosis than the existing bacille Calmette-Guerin vaccine. *J Infect Dis* 2004;189:105-12.
38. Grode L, Seiler P, Baumann S, et al. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest* 2005;115:2472-9.
39. Pym AS, Brodin P, Majlessi L, et al. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med* 2003;9:533-9.
40. Horwitz MA. Recombinant BCG expressing *Mycobacterium tuberculosis* major extracellular proteins. *Microbes Infect* 2005;7:947-54.
41. Ceberre I, Dorrell L, McShane H, et al. Phase I clinical trial safety of DNA- and modified virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)

vaccines administered alone and in a prime-boost regime to healthy HIV-1-uninfected volunteers. Vaccine 2005. In Press.

42. McShane H, Pathan AA, Sander CR, et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. Nat Med 2004;10:1240-4.

43. Cai H, Hu XD, Yu DH, et al. Combined DNA vaccine encapsulated in microspheres enhanced protection efficacy against Mycobacterium tuberculosis infection of mice. Vaccine 2005;23:4167-74.

44. Huygen K. Plasmid DNA vaccination. Microbes Infect 2005;7:932-8.

45. Zhu D, Jiang S, Luo X. Therapeutic effects of Ag85B and MPT64 DNA vaccines in a murine model of Mycobacterium tuberculosis infection. Vaccine 2005;23:4619-24.

46. Ferraz JC, Stavropoulos E, Yang M, et al. A heterologous DNA priming-Mycobacterium bovis BCG boosting immunization strategy using mycobacterial Hsp70, Hsp65, and Apa antigens improves protection against tuberculosis in mice. Infect Immun 2004;72:6945-50.

47. Howarth M, Elliott T. The processing of antigens delivered as DNA vaccines. Immunol Rev 2004;199:27-39.

48. Brandt L, Skeiky YA, Alderson MR, et al. The protective effect of the Mycobacterium bovis BCG vaccine is increased by coadministration with the Mycobacterium tuberculosis 72-kilodalton fusion polyprotein Mtb72F in M. tuberculosis-infected guinea pigs. Infect Immun 2004;72:6622-32.

49. Skeiky YA, Alderson MR, Owendale PJ, et al. Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. J Immunol 2004;172:7618-28.

50. Williams A, Hatch GJ, Clark SO, et al. Evaluation of vaccines in the EU TB Vaccine Cluster using a guinea pig aerosol infection model of tuberculosis. Tuberculosis (Edinb) 2005;85:29-38.

51. Buddle BM, Skinner MA, Wedlock DN, et al. Cattle as a model for development of vaccines against human tuberculosis. Tuberculosis (Edinb) 2005;85:19-24.

52. Girard MP, Fruth U, Kieny MP. A review of vaccine research and development: Tuberculosis. Vaccine 2005. In Press.

KURS

