

BCG VE YENİ GELİŞTİRİLEN TÜBERKÜLOZ AŞILARI

Uğur ÖZÇELİK*

Tüberküloz halen dünyada önemli oranda hastalık ve ölüme neden olan enfeksiyon hastalıklarından biridir. Hastalıktan korunmak için tüberküloz basilinin bulunmasından yaklaşık 40 yıl sonra, ilk geliştirilen ve halen günümüzde kullanılan tek tüberküloz aşısı olan Bacille-Calmette-Guérin (BCG) insanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde tüberküloza karşı daha etkin bir aşının bulunması konusunda çalışmalar sürdürülmektedir.

BCG

Albert Calmette ve Camille Guérin Fransa'da Pasteur Enstitüsünde enfekte bir sığırın memesinden elde edilen *Mycobacterium bovis* suşunu 1908 yılından başlayarak, içinde öküz safrası bulunan patatesli besiyerinde 230 kez pasajlayarak "atenue" hale getirdiler ve insanlarda ilk kez 1921 yılında oral yolla uyguladılar (1). 1940'lı yıllarda BCG oral yol bırakılarak intradermal veya perkütan olarak uygulamaya başladı. BCG'nin yaygın olarak kullanılması özendirildi ve yeni BCG suşları geliştirilerek etkinliğine dair çalışmalar yapıldı (2,3). Günümüze dek yapılan bu çalışmalarda BCG'nin koruyuculuğu %0-80 arasında değişik oranlarda bulunmuştur (4). BCG'nin etkinliği; bir toplumda BCG aşısının uygulanmasından sonra, aşılanmış kişilerde hastalık yüzdesinde azalma olarak ifade edilir.

Çocukluk çağı tüberkülozunda BCG'nin etkinliğini araştıran beş randomize kontrollü çalışmanın ve 8 vaka kontrollü çalışmanın değerlendirildiği bir meta-analizde BCG'nin menenjit ve miliyer tüberkülozdan %80 koruduğu gösterilmiştir (5). İnfant döneminde yapılan BCG'nin etkinliğinin değerlendirildiği bir başka meta-analizde ise BCG'nin tüm tüberkülozlu vakalarda %50, tüberkülozdan ölümlerde %71, dissemine tüberkülozlarda %78, tüberküloz menenjitlerde %64 koruma sağladığı bildirilmiştir (6). Tüberkülozun sık görüldüğü ülkelerde maliyet-yarar analizi yönünden bakıldığında da, aşı çocuklarda miliyer ve menenjit tüberküloz gibi hastalığın ağır formlarından korunmada etkin bir yoldur (7). Erişkin hastalarda BCG'nin etkinliğinin araştırıldığı 1974'de yapılan Madras-Chingleput çalışmasında aşının etkinliği %0 bulunmuştur (8).

Tüberkülozdan koruyuculuk konusunda yapılan bir çok çalışmanın sonuçlarının birbirinden bu kadar farklı olması

nın nedeni konusunda bir çok hipotez vardır. Dünya'da BCG etkinliği konusunda yapılan çalışmalarda çalışmanın yapıldığı yer ekvatora yaklaştıkça BCG'nin etkinliğinin azaldığı saptanmıştır (4, 9). Bu bölgelerde sık bulunan çevresel mikobakteriler ile erken karşılaşma sonucu oluşan immünitenin BCG aşısının uygulanmasından sonra basilin çoğalmasının engellediği ve aşının koruyuculuğunu azalttığı düşünülmektedir. Bu etki erişkin dönemde yapılan BCG'nin koruyuculuk etkisinin daha düşük olmasını da açıklayabilir. İnsanlarda hücresel immüniteyi düzenleyen bir çok gen vardır ve bu topluluklardan topluluklara fark gösteriyor olabilir (10). Farklı genetik yapıda basilin virülansları arasında da fark olabilir (11). Günümüzde kullanılan BCG aşıları ilk elde edilen BCG suşunun kız suşlarıdır ve ilk BCG suşundan pasajlanarak elde edilmişlerdir. BCG genomunun tanımlanmasından sonra şimdiki suşların RD1 bölgesi gibi önemli virülans taşıyan bölgelerinin pasajlar sırasında kaybolduğunu göstermiştir ve bazı aşı suşlarında daha da farklı genetik bölgelerinde kaybı söz konusudur (12,13). Bu tüberküloz aşılarının koruyuculuğu konusunda yapılan çalışmaların yıllar içerisinde etkinliklerinin azalmasının bir açıklaması olabilir. Bazı araştırmacılara göre ise BCG etkinliğinin toplumdan topluma ve zaman içerisinde fark etmesinde, toplum içindeki tüberküloz enfeksiyon riskindeki değişiklikler sonucu tüberküloz görülmeye oranlarının değişmesinin rolü vardır.

Dünya'da halen BCG aşısı uygulamaları (14);

Global tüberküloz programı (GTP) ve yaygınlaştırılmış aşı programı (EPI) BCG'nin sadece doğumda veya sağlık kurumu ile ilk karşılaşmada uygulanmasını önermektedir ve bu dünyada halen birçok ülkede uygulanan tarzıdır. Aşının erişkin yaşta uygulanmasının yeterince koruyucu olduğunun gösterilmemesi ve aşının çocukluk çağında geçirilen tüberkülozun yaygınlaşmasını önlediğine ilişkin veriler olması, bu görüşü desteklemektedir. Yakın zamana kadar ülkemizin de içinde bulunduğu bazı ülkelerde halen tekrarlanan aşı uygulamaları yapılmaktadır. Tekrarlanan aşıların tüberkülozdan korunmada ek bir fayda sağladığı gösterilememiştir (15-17,). Hollanda ve ABD gibi bazı ülkelerde BCG hiçbir zaman rutin uygulanmamıştır ve daha sonra bazı ülkelerde de rutin uygulamadan çıkarılmıştır. Bu ülkelerde BCG sadece risk gruplarına uygulanmaktadır.

* Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Göğüs Hastalıkları Ünitesi

BCG'nin diğer etkileri: BCG'nin başta Lepra olmak üzere diğer mikobakteriler üzerine de etkili olduğu gösterilmiştir (17, 18). M.ulcerans enfeksiyonu olan Buruli ülseri ve çevresel mikobakterilere özellikle M.avium-intracellulare'ye bağlı gelişen lenfadenitlere karşı da koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (19, 20).

BCG'nin uygulanması

İnfantlarda 0.05 ml, çocuklarda 0.1 ml 25, 26 G iğneler ile genellikle üst kol deltoid bölgesine intradermal olarak uygulanması önerilir. DSÖ BCG ile doğar doğmaz veya sağlık kurumları ile ilk karşılaşmada aşılamaı önermektedir. Ülkemizde ise aşı bebekler 2 aylıkken uygulanmaktadır. Aşının yeni doğan döneminde uygulanması ile görülen yan etkilerin çok olması ve tüberkülin deri testi yanıtının daha az olduğu bilinmekle beraber (21), aşının doğar doğmaz mı yoksa 2-3 aylıkken mi yapılması gerektiği konusu geniş çaplı araştırmalar ile kesinlik kazanmamıştır. Ancak aşının etkinliği konusunda yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, bebeklik döneminde ilk kez uygulanan aşının daha ileri yaşlarda uygulanana göre koruyuculuk etkisinin daha belirgin olduğu görülmektedir (4,6). Son çalışmalar çocuklukta yapılan bir doz aşının 50-60 yıl koruyucu olduğunu göstermiştir (22).

BCG aşısı sonrası görülen normal deri reaksiyonu

Aşı sonrası aşı uygulanan yerde 2-3 hafta sonra bir papül oluşur. 4-6 haftada bu papül yaklaşık 0.5 cm boyutunda ülserleşir ve bunun üzerinde bir kabuk oluşur. Bu kabuk birkaç kez düşüp yeniden oluşabilir. Genellikle 8-12 haftada yerine bir skar dokusu bırakarak iyileşir (14). BCG uygulanması sonrası skar oluşması genellikle beklenen bir bulgu olmasına rağmen, daha önce yapılan çalışmalarda değişik oranlarda aşı sonrası skar olmadığı bildirilmiştir. Ancak skar oluşmamasının aşının koruyuculuğu olmadığı anlamına gelmediği bilinmektedir (23).

Kontrendikasyonları

Dünya Sağlık Örgütü uygulamada semptomatik HIV enfeksiyonunu gerçek olarak tek bir kontrendikasyon olarak göstermektedir (14). Ancak bir çok ülkede şu koşullarda BCG aşısının uygulanması önerilmemektedir: konjenital immün yetmezlikler, HIV enfeksiyonu, lenfoma, lösemi, Hodgkin hastalığı ve retikuloendotelyal sistemin diğer tümörleri, kortikosteroidler veya diğer bağışıklığı baskılayan ilaçlar veya radyoterapi alan hastalar, yüksek ateş, gebelik, yaygın deri enfeksiyonu ve yanıklar, tüberkülin deri testi pozitif olanlar.

Aşı sonrası görülebilen yan etkiler(20)

Lokal reaksiyonlar

a-BCG lenfadeniti: En sık görülen lokal reaksiyondur. Genellikle aşı uygulaması sonrası 2 ayda görülür. Aşının uygulandığı yere göre aksiller veya supraklavikuler

lenfadenopati gelişir. Buna yönelik lokal veya sistemik bir tedavi uygulanması önerilmez. Kalsifiye olarak veya apse kıvamına gelip akarak iyileşirler. Apsel kıvamına gelmiş ve akacak nitelikteki lenf nodları insizyon ile boşaltılabilir. Bu hastalarda lenf nodlarının gidişi bir tedavi uygulanmasa bile disseminasyonun belirtisi olabileceğinden izlenmelidir.

b-BCG yapılan yerde yaygın ülser: Aşı sonrası aşı uygulanan yerde normal bir reaksiyon olarak gelişen ülserin erken başlaması ve yayılmasıdır. Genellikle daha önce tüberküloz mikrobi ile karşılaşan kişilere yeniden aşı yapıldığında görülür. Koch reaksiyonudur. Ülkemizde de ilköğretim okulları birinci sınıf öğrencilerine zaman zaman tüberkülin deri testi yapılmadan aşı uygulamaları sonrası görülmektedir. Sekonder enfeksiyonları önlemek dışında temiz tutmak dışında bir tedavi uygulamaya gerek yoktur.

c-Lupus vulgaris: Aşıya bağlı reaksiyonun çevre dokuda oluşturduğu deri tüberkülozudur.

d-BCG uygulanan yerde keloid oluşması: BCG aşısı uygulanması sonrası normalde görülen skar dokusunun aşırı oluşması ile oluşur.

Sistemik reaksiyonlar

BCG'nin çok nadir görülen komplikasyonlarından.

a-BCG osteoiti, osteomyeliti: İskandinav ülkeleri ve doğu Avrupa ülkelerinde tipik olarak kullanılan aşı suşuna bağlı rapor edilmiştir (27). Bağışıklığı baskılanmış hastalarda da görülebilir (28).

b-Sistemik BCG reaksiyonu: Genellikle doğumsal veya kazanılmış bağışıklık sisteminin eksikliklerinde görülür. Ölümcül seyredebilir. Son zamanlarda tanımlanmış olan bağışıklık sisteminin özellikle mikobakterilere karşı savunma yetersizliği ile giden interferon-gama ve interlökin-12 reseptör eksikliği hastalıklarında diğer enfeksiyon etkenleri ile belirgin bir enfeksiyon olmazken, BCG dahil mikobakteriler ile yaygın hastalık görülebilmektedir (29,30).

c-BCG sonrası ölüm: Çok nadirdir. Aşı suşuna bağlı vücutta yaygın hastalık ölüm ile sonuçlanabilir.

BCG sonrası tüberkülin deri testi yanıtı

BCG aşısı sonrası 8-12 haftada tüberkülin deri testi pozitifleşir. Kesin sınırları çizilmemekle birlikte aşıya bağlı tüberkülin deri testi yanıtının genellikle 15 mm'nin altında olduğu ve aşının üzerinden geçen zamanla giderek azaldığı kabul edilmektedir. BCG sonrası tüberkülin deri testi yanıtının değerlendirildiği bir meta analizde 15 yıla kadar aşıya bağlı pozitif tüberkülin deri testi yanıtının sürebileceği bildirilmiştir (31). Bir kişiye uygulanan BCG sayısı arttıkça, oluşan tüberkülin deri testi yanıtının çapının

artacağı ülkemizden de yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (32, 33). Aşı sonrası tüberkülin deri testi yanıtının aşının koruyuculuğu ile ilişkisi olmadığı toplumsal çalışmalarda gösterilmiştir (34-36).

YENİ TÜBERKÜLOZ AŞILARI

BCG aşısının koruyuculuğu konusundaki farklılıklar olması, toplumda en büyük sorunu oluşturan erişkin çağı akciğer tüberkülozu üzerine belirgin etkisinin gösterilmemiş olması, BCG sonrası tüberkülin deri testinin pozitifliğinin hastalık ayırımında zorluk oluşturmaması, canlı aşı olması nedeni ile yan etkilerin görülebilmesi nedeni ile yeni aşı çalışmaları yapılmaktadır. Halen insan çalışmalarına geçilmemiş olan bu aşılar yeni geliştirilen moleküler tekniklerin önemli oranda yararı olmuştur. Yeni geliştirilecek olan bir tüberküloz aşısında beklenen özellikler; güvenli, stabil, ucuz olması; Dünya çapında tüberküloz hastalığı ve enfeksiyonuna karşı koruma sağlaması; tek uygulamada sonra bile etkin olması, yaşam boyu süren bir immünolojik hafıza oluşturmaması; diğer çocukluk çağı aşıları ile birlikte uygulanabilmesi ve tüberkülin deri testi üzerine bir etkisinin olmaması şeklinde sayılabilir.

Bugün üzerinde çalışılan yeni tüberküloz aşılarını 3 başlık altında toplamak mümkündür.

Canlı-zayıflatılmış (attenuated) mikobakteri aşıları: Genetik olarak modifiye edilmiş BCG veya M.tuberculosis'den oluşturulan aşılardır. Zayıflatıldıkları için hastalık oluşturmazlar. Birçok antijen bulundurdıklarından immünolojik hafıza üzerine olumlu etkileri vardır. Buna karşın bağımsızlığı baskılanmış kişilerde halen sorun oluşturabilirler. "Auxotrophic" mutantlar bu amaçla kullanılabilir. BCG'ye Th1 yanıtını artırmak için sitokin genleri eklenebilir, antijenler eklenebilir veya CD8 yanıtını artırmak için hemolizin eklenebilir. M.tuberculosis'in "Auxotrophic" mutantları olarak; "ProC ve TrpD auxotrophic" mutant, "pantothena auxotrophic" mutant, "lysin auxotrophic" mutant ile yapılan hayvan çalışmaları vardır (36, 37).

Sub-unit aşıları: Sıklıkla proteinler veya peptidler, bazen lipid veya karbonhidrat antijenlerini içeren aşılardır. Genellikle tüberküloza karşı oluşan immüniteyi etkileyen yapılar seçilir. Bağımsızlığı baskılanmış hastalarda sorun oluşturmazlar ve yan etkileri beklenmez. Ancak saflaştırılmaları ve adjuvant ile kompleks oluşturmaları konusunda sorun oluşturabilirler. Oluşturdukları immünitenin daha kısa süreli olması söz konusu olabilir. Bu konuda üzerinde en çok çalışma yapılan antijenler hücre duvarı sentezinde rol alan "antijen 85 kompleks"e ait antijenlerdir. Bir diğeri ise RD1 bölgesi tarafından sentez edilen ve virülansda rolü olduğu düşünülen ESAT-6'dır. Diğerleri t Mtb72-F Mtb 32C, Mtb39, Mtb32N (38-40)

DNA aşıları: Tüberküloz immünitesinde rol oynayan

antijenleri sentez eden DNA parçalarının verilmesi ile oluşur. Bağımsızlığı baskılanmış hastalarda uygulanabilir ve yan etkileri beklenmez. Bu amaçla sıklıkla kullanılan DNA aşıları; Antijen 85 A ve B, ESAT-6; MPT63 ve 64, HSP65, lepra HSP60, KATG antijenlerini sentezleyen DNA parçalarıdır ve bazen birden fazla antijeni kodlayan DNA'nın birlikte verilmesi şeklinde hayvan modellerinde çalışmalar sürdürülmektedir (41-46)

Aşı çalışmalarının insanlarda uygulanabilir hale gelmesi yıllar almaktadır. Genellikle önce murin modellerinde uygulanmaya başlanmakta, sonra farelere ve insanlardan önce diğer primatlara uygulanmaktadır. İnsanlarda uygulanması yapılan tek yeni tüberküloz aşısı çevresel bir mikobakteri olan M.vaccae'dir. Bu aşının uygulanmasındaki amaç immüniteyi uyarak organizmanın basile karşı verdiği yanıtı artırmasıdır. Ölü formu kullanılmaktadır. Etkinliğine dair HIV pozitif ve negatif insanlarda yapılan çalışmaların sonuçları farklılıklar göstermektedir. Faydalı olduğuna dair yayınlar yanında (47-49) belirgin etkisi olmadığına dair de yayınlar vardır (50).

KAYNAKLAR

1. Sakula A. BCG: who were Calmette and Guérin ? Thorax 1983;38:806-812.
2. Hart PD'A, Sutherland I. BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. Final report to the Medical Research Council. BMJ 1977;2:293-295.
3. Palmer CE, Shaw LW, Comstock GW. Community trials of BCG vaccination. Am Rev Tuber Pulmon Dis 1958;77:877-907.
4. Fine PEM. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. Lancet 1995;346:1339-1345.
5. Rodrigues LC, Diwan VK, Wheeler JG. Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and military tuberculosis. A meta analysis. Int J Epidemiol 1993;22:1154-1158.
6. Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, ve ark. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis: meta analysis of the published literature. JAMA 1994;271:698-702.
7. Bourdin Trunz B, Fine PEM, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and military tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. The Lancet 2006;367:1173-1180.
8. Tuberculosis Prevention Trial Madras. Trial of BCG vaccines in South India for tuberculosis prevention. Indian J Med Res 180;72 (Suppl):174.
9. Comstock GW, Livesay VT, Woolpert SF. Evaluation of BCG vaccination among Puerto Rican children. AJP 1974;64:283-291.

10. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam K, Whittle H, Hill A. Variations in the NRAMPI gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med* 1998;338:640-644.
11. Herman PWM, Messadi F, Guebrexabher H, ve ark. Analysis of the population structure of Mycobacterium tuberculosis in Ethiopia, Tunisia and the Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J Infect Dis* 1995;171:1504-1513.
12. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, ve ark. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 1999;284:1520-1523.
13. Agger EM, Andersen P. A novel TB vaccine: towards a strategy based on our understanding of BCG failure. *Vaccine* 2002;21:7-14.
14. Fine PEM, Carnerio IAM, Milstien JB, Clements CJ. Issues relating to the use of BCG in immunization programmes. A discussion document. World Health Organization, Geneva 1999.
15. Sepulveda RL, Prcha C, Sorensen RU. Case-control study of the efficacy of BCG immunization against pulmonary tuberculosis in young adults in Santiago, Chile. *Tuber Lung Dis* 1992;73:372-377.
16. Tala-Heikkilä MM, Tuominen JE, Tala EO. Bacillus Calmette-Guerin revaccination questionable with low tuberculosis incidence. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1324-1327.
17. Karonga Prevention Trial Group. Randomized controlled trial of single BCG, repeated BCG, or combined BCG and killed Mycobacterium leprae vaccine for prevention of leprosy and tuberculosis in Malawi. *Lancet* 1996;348:17-24.
18. Fine PEM. Primary prevention of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobacterial Dis* 1996;64 (suppl):S44-S49.
19. Smith PG, Revill WDL, Lukwago E, Rykushin YP. The protective effect of BCG against Mycobacterium ulcers disease: a controlled trial in an endemic area of Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1976; 70:449-457.
20. Trnka L, Pankova D, Svandova E. Six years' experience with the discontinuation of BCG vaccination. Protective effect of BCG vaccination against Mycobacterium avium intracellulare complex. *Tuber Lung Dis* 1994;75:348-352.
21. Ildırım İ, Sapan N, Çavuşoğlu B. Comparison of BCG vaccination at birth and at third month of life. *Arch Dis Child* 1992;67:80-82.
22. Aranson 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: 2086-2091.
23. Sterne JAC, Fine PEM, Ponnighaus JM, ve ark. Does bacille Calmette-Guerin scar size have implications for protection against tuberculosis or leprosy? *Tuber Lung Dis* 1996;77:117-123.
24. A joint statement by the advisory council for the elimination of tuberculosis and the advisory committee on immunization practices. The role of BCG vaccine in the prevention and control of tuberculosis in the United States. *MMWR* 1996;45: No RR-4.
25. Immunisation against infectious disease. London: HMSO 1996;1-290.
26. American Academy of Pediatrics. Tuberculosis. In: Pickering LK, ed. 2000 Red book: Report of the committee on infectious diseases. 25 th ed. Elk Grove Village, IL (Çeviri). İstanbul: Turgut yayıncılık, 2001:593-618.
27. Lotte A, ten Dam HG, Henderson R. Second IUATLD study on complications induced by intradermal BCG vaccination. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* 1988;63:47-59.
28. Casanova JL, Jouanguy E, Lamhadi S, Blanche S, Fischer A. Immunological conditions of children with BCG disseminated infection (letter). *Lancet* 1995;346:581.
29. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, ve ark. A mutation in the interferon-gama- receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med* 1996;335:1941-1949.
30. Altare F, Durandy A, Lammas D, ve ark. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* 1998;280:1432-1435.
31. Wang L, Turner M, Elwood R, Schulzer M, Fitzgerald J. A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax* 2002;57:804-809.
32. Ildırım I, Hacımustafaoğlu M, Ediz B. Correlation of tuberculin induration with the number of Bacillus Calmette-Guerin vaccines. *Pediatr Infect Dis* 1995;14:1060-1063.
33. Kuyucu N, Kuyucu S, Bakırtaş A, Karacan C. BCG revaccination and tuberculin reactivity. *Indian J Pediatr* 2001;68:21-25.
34. Comstock GW. Identification of an effective vaccine against tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 479-480.
35. Fine PEM, Sterne JAC, Ponnighaus JM, Rees RJW. Delayed-type hypersensitivity, mycobacterial vaccines and protective immunity. *Lancet* 1994; 344: 1245-1249.
36. Comstock GW. Simple, practical ways to assess the protective efficacy of a new tuberculosis vaccine. *Clin Infect Dis* 2000;30 (Suppl 3): S250-S253.
37. Ginsberg AM. A proposed national strategy for tuberculosis vaccine development. *Clin Infect Dis* 2000;30 (Suppl 3):S233-S242.
38. Smith DA, Parish T, Stoker NG, Bancroft GJ. Characterization of auxotrophic mutants of Mycobacterium tuberculosis and their potential as vaccine candidates. *Infect Immun* 2001;69:1142-1150.

39. Pavelka MS, Chen B, Kelley CL, Collins FM, Jacobs WR Jr. Vaccine efficacy of a lysine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2003;71:4190-4192.
40. Martin C. Tuberculosis vaccines: past, present and future. *Curr Opin Pulm Med* 2006;12: 186-191.
41. Coler RN, Campos-Neto A, Ovendale P, ve ark. Vaccination with the T cell antigen MTB 8.4 protects against challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2001;166:6227-6235.
42. Olsen AW, Van Pinxteren LAH, Okkels LM, Rasmussen PB, Andersen P. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. *Infect Immun* 2001; 69: 2773-2778.
43. Lozes E, Huygen K, Content J, ve ark. Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex. *Vaccine* 1997;15:830-833.
44. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VLD, ve ark. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 1999;400:269-271.
45. Morris S, Kelley C, Howard A, Zhongming L, Collins F. The immunogenicity of single and combination DNA vaccines against tuberculosis. *Vaccine* 2000; 18:2155-2163.
46. Tanghe A, D'souza S, Roseels V, ve ark. Improved immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding Ag85 by protein boosting. *Infect Immun* 2001;69:3041-3047.
47. Fonseca DPA, Benaissa-Trouw B, Van Engelen M, Kraaijeveld CA, Snippe H, Verheul FM. Induction of cell-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis* using DNA vaccines encoding cytotoxic and helper T-cell epitopes of the 38-kilodalton protein. *Infect Immun* 2001;69:4839-4845.
48. Repique CJ, Li A, Collins FM, Morris SL. DNA immunization in a mouse model of latent tuberculosis: effect of DNA vaccination on reactivation of disease and reinfection with a secondary challenge. *Infect Immun* 2002;70:3318-3323.
49. Corlan E, Marica C, Macavei C, Stanford JL, Stanford CA. Immunotherapy with *Mycobacterium vaccae* in the treatment of tuberculosis in Romania.1. Newly-diagnosed pulmonary disease. *Respir Med* 1997;91:13-19.
50. Corlan E, Marica C, Macavei C, Stanford JL, Stanford CA. Immunotherapy with *Mycobacterium vaccae* in the treatment of tuberculosis in Romania.1. Chronic or relapsed disease. *Respir Med* 1997;91:21-29.
51. Waddell RD, Chintu C, Lein AD, ve ark. Safety and immunogenicity of a five-dose series of inactivated *Mycobacterium vaccae* vaccination for the prevention of HIV-associated tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2000;30 (Suppl 3):S309-S315.
52. Mayo Re, Stanford JL. Double-blind placebo-controlled trial of *Mycobacterium vaccae* immunotherapy for tuberculosis in KwaZulu, South Africa, 1991-97. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000;94:563-568.