

# BCG Aşısı ve Yerine Gelecek Yeni Yaklaşımlar<sup>§</sup>

A. Nedret KOÇ

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

## ÖZET

Tüberküloz (TB) bulaşıcı bir enfeksiyon hastalığı olup, dünya çapında önemini korumaya devam etmektedir. TB da erken tanı ve tedavideki zorluklardan dolayı bu hastalıktan toplumu koruma da en etkili yol aşılamadır. BCG (Bacillus-Calmette-Guérin) aşısı canlılığı azaltılmış (atenué) aşıdır. Mycobacterium bovis suşunun pasajları ile virulansını kaybettiği belirlenerek elde edilmiştir.

Aşı geliştirme aşamasındaki pasajlar ile M. bovis suşunun genomunda 16 genomik bölgede (RD1-RD16 artı nRD18) delesyonlar oluşmuştur. Bundan dolayı yıllar içinde BCG nin alt-suşları ortaya çıkmıştır. Bu suşlar dünyada dağılımıştır. Bu suşlardaki temel endişe güvenli koruma sağlayamamasıdır. Aşı çalışmalarında bu durum göz önüne alınmıştır. BCG aşısının TB'un şiddetli formundan çocukları korumakta etkinliği olmasına rağmen BCG etkinliği düşük ve koruma 0 ile %80 arasında değişkendir. Bundan dolayı yeni bir TB aşısının geliştirilmesi yönünde önemli bir çaba vardır.

Bu derlemede literatürde bulunan BCG aşısı ve yerine gelecek yeni yaklaşımlar; genetik modifiye BCG, protein antijenlerine karşı (Ag85, p65, ESAT-6) rekombinant subünit aşılar, konjuge karbonhidrat aşılar, mukoza aşılar ve tedavi amaçlı aşılar tartışılmıştır.

TB için aşı geliştirmek için umut verici adaylarla ile çok çalışmalar yapılmış, ancak çalışmalar hala TB önlenmesi açısından yeterli değildir. Bu çalışmalar halen rutine girebilecek düzeyde değildir. Bu çalışmaların insan modellerinde değerlendirilmesi TB önlenmesinde çok önemli olacaktır.

**Anahtar kelimeler:** BCG (Bacillus-Calmette-Guérin) aşısı, Mycobacterium tuberculosis, tüberküloz

## SUMMARY

### BCG Vaccine and New Approaches Against Prevention

Tuberculosis (TB) is still an important infectious disease throughout the world. Early diagnosis and treatment of TB is difficult, vaccination is the most effective way in prevention. Bacille Calmette-Guérin (BCG), an attenuated vaccine derived from Mycobacterium bovis, is the current vaccine of choice against tuberculosis (TB).

The attenuation process during vaccine development promoted certain genomic deletions, that together with the evolution of M. bovis, resulted in 16 different genomic regions (RD1-RD16, plus nRD18), when compared with the Mtb genome. Therefore, over the years sub-strains of BCG has emerged. These strains are distributed throughout the world and the main concern is that such strains can not provide reliable protection against TB. This situation is taken into consideration in the vaccine studies. Although BCG has high efficacy in protecting children from severe forms of TB, the overall protection conferred by BCG varies between 0 and 80%. There is a significant effort towards the development of a new TB vaccine.

This review is focused on BCG vaccines and new TB vaccine approaches such as genetically modified BCG, vaccines against the protein antigen (Ag85, p65, ESAT-6), recombinant subunit vaccines, carbohydrate conjugate vaccines, mucosal vaccines and therapeutic vaccines.

Much progress has been made in the effort to improve vaccination against TB, with some promising candidates, but considerable work is still required to address prevention of TB. These new approaches should be evaluated in human models to prove that the vaccine is effective and safe in TB prevention.

**Key words:** BCG (Bacillus-Calmette-Guérin) vaccine, Mycobacterium tuberculosis, tuberculosis

## GİRİŞ

Tüberküloz (TB) yaşamı tehdit eden bir enfeksiyon hastalığı olup, tüm dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Günümüzde dünya nüfusu-

nun yaklaşık üçte birinin Mycobacterium tuberculosis (MTB) ile enfekte olduğu bilinmektedir<sup>(1)</sup>. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) dünyada 2013 yılında 9 milyon yeni TB olgusu ve 1.5 milyon TB'ya bağlı ölüm olduğunu bildirmiştir<sup>(2)</sup>.

**Alındığı tarih:** 11.06.2015

**Kabul tarihi:** 27.08.2015

**Yazışma adresi:** A.Nedret Koç, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri **Tel:** (0352) 437 49 01/23379

**e-posta:** anedret@erciyes.edu.tr

<sup>§</sup> Bu derleme 7. Ulusal Mikobakteri Simpozyumu (8-10 Mayıs 2015, Mersin) Kongresi'nde sunulmuştur.

TB'lu hastaların sağlık kurumuna geç başvurması veya uygun tedaviye geç başlanması ile her bir aktif akciğer TB'lu olgunun yılda 10-15 kişiyi enfekte edebileceği düşünüldüğünde, korumanın ne kadar önemli olduğu görülmektedir. Tanıdaki gecikmeler aktif olarak bulaşın devamına, sekonder ilaç direncine ve mortalite de artışa yol açabilmektedir. Bu enfeksiyonu eradike etmenin en önemli yolu toplumda bulaş zincirini kırmaktır. Bunun içinde bu hastalıktan toplumun korunmasında en etkili yol aktif aşılama<sup>(3-5)</sup>.

Bu derlemede, BCG (Bacillus-Calmette-Guérin) aşısı ve literatürde bulunan yerine geçebilecek yeni aşı çalışmalarının gözden geçirilmesi amaçlanmıştır.

### BCG aşısının tarihçesi

Calmette, insana zararsız, fakat onu vereme karşı aşılıp koruyabilen bir aşı hâline getirdiği mikroba BCG adını vermiştir<sup>(3)</sup>. BCG aşısı insanda kullanılan ilk canlılığı azaltılmış (atenüe) aşıdır. *Mycobacterium bovis* suşunun patatesli, gliserinli, sığır safralı agarda 231 sefer pasajı ile (1908-1921) virulansını kaybettiği belirlenerek elde edilmiştir. BCG ilk defa 1921 yılında Fransa'da çocuklara ağızdan bağışıklama için kullanılmıştır. BCG'nin virulan suşla kontaminasyonu sonucunda 1929-1930 yılları arasında Almanya'da Lübeck faciası olmuş, 250 çocuğun 72'si ölmüştür. BCG uygulamalarında 1927 yılında deri içine, 1947 yılında da deriye uygulama yöntemleri geliştirilmiştir<sup>(3,4)</sup>.

Türkiye'de BCG aşısı uygulaması İstanbul'da yeni doğan çocuklara ağız yolu ile 1931 yılında başlanmıştır. Sağlık Bakanlığı 1947 yılından itibaren yılın bir haftasını verem haftası olarak kabul etmiştir. 1953'te DSÖ ile iş birliği yapılarak tüm ülkede BCG aşısı kampanyası başlatılmıştır<sup>(6)</sup>.

### BCG aşısının etki mekanizması

BCG aşısı, virulan basilin oluşturduğu enfeksiyona benzer şekilde, T lenfositleri ve makrofajları uyararak TB'a karşı savunmada immun yanıt mekanizması geliştirir.

BCG'nin ilk kez kullanılan *M. bovis* suşundan üretilen Pasteur kökeni referans kökendir. BCG aşısı üretilen kültüre ve tekniğe göre immun yanıt açısından farklılıklar gösterir. Bazı BCG kökenleri "güçlü" (Pasteur 1173P2, Danimarka 1331), bazı BCG kökenleri "zayıf" (Glaxo 1077, Tokyo 172) olarak isimlendirilmiştir. "Güçlü" daha immunojen ve daha güçlü gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonuna neden olur ve daha iyi koruma sağlar<sup>(7,8)</sup>. Ancak lokal granülom güçlü kökenlerle aşılama sonrası daha fazla görülür.

BCG elde etmek için *M. bovis* suşunun atenüasyonu ile genomunda 16 genomik bölgesinde (RD1-RD16 artı nRD18) genomik delesyonlar oluşmuştur<sup>(9,10)</sup>.

### Atenüasyon sırasında gelişen delesyonlar ile farklılaşmalar

RD1, 9.5 kb bir DNA parçası olup, diğer tüm BCG suşlarında delesyona uğramıştır, ESAT-6, CFP-10, Rv3873 ve diğerleri arasında PPE protein gibi T-lenfosit epitopları kodlar<sup>(11)</sup>; RD2, Mpt64 ve CFP-21<sup>(10)</sup> içeren bir çok proteinleri kodlayan 10.7 kb DNA segmentidir; RD14, PEPGRS ve Rv1771 aileleri (gulonolakton dehidrojenaz) kodlayan bir DNA parçası olup, 9.1 kb'dır<sup>(12)</sup>. RD16, koloni morfolojik özellikleri ve hücre membran oluşumundan sorumlu olan Rv3405 kodlayan bir 7.6 kb DNA parçasıdır<sup>(13)</sup> ve nRD18, genler, alternatif RNA polimeraz sigma faktörü kodlayan 1.5 kb parça içeren eden SigI'dir. Bu genin yalnızca BCG Pasteur, Phipps ve Frappier suşlarında kaybolduğu bildirilmektedir<sup>(10)</sup>.

Yıllar içinde BCG'nin elde etme işlemi sırasında alt-suşları ortaya çıkmıştır. Bunlar BCG Rusya (ATCC 35740), BCG Moreau/Rio de Janeiro, BCG Tokyo, BCG İsveç, BCG Birkhaug (ATCC 35731), BCG Danimarka1331 (ATCC 35733), BCG Çin, BCG Prag, BCG Glaxo (ATCC 35741), BCG Tice (ATCC 35743), BCG Frappier (ATCC35.735), BCG Connaught, BCG Phipps (ATCC 35744) ve BCG Pasteur 1173'tür<sup>(14)</sup>. Bu suşlar dünyada dağılmıştır ve TB'ü önlemek için aşı geliştirilmesi için kullanılmaktadır. Bu suşlardaki temel endişe güvenli korumanın sağlanamamasıdır<sup>(10)</sup>.

### BCG aşısının etkinliği

BCG aşısı %0-80 arasında etkinlik gösterebilmektedir<sup>(15)</sup>. BCG aşısının en önemli yararı, çocuklarda TB menenjit ve yaygın hastalığa karşı %75-86 koruyucu olmasıdır<sup>(16)</sup>. Bu koruyuculuk, aşılananın immün durumu, genetiği, beslenmesi, aşılamadan önce mikobakteriler ile karşılaşır karşılaşmaması ve aşıda kullanılan BCG suşunun gücüne bağlıdır<sup>(17,18)</sup>.

Tüberküloz-dışı mikobakterler (TDM), BCG ve MTB (*Mycobacterium tuberculosis*)'deki yaygın antijenlere sahiptir. TDM prevalansının düşük olduğu bölgelerde yüksek aşı koruyuculuğu varken, yüksek olduğu bölgelerde düşük koruyuculuk görülmektedir. TDM mazuryeti BCG aşılmasına karşı oluşan immün yanıtı engellemektedir<sup>(19)</sup>. BCG aşısı *Mycobacterium leprae*'ya karşı da koruma sağlar<sup>(20)</sup>. Bu güne kadar belirlenen BCG'nin değişken etkisinin muhtemel nedenleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1. BCG'nin değişken etkisinin olası nedenleri.**

- BCG suşlarında genetik delesyonlar
- Popülasyonlardaki genetik varyasyonlar
- TB suşları arasında virulansta farklılık
- Ekzojen re-enfeksiyonlardan korumaması
- Eşzamanlı parazitik enfeksiyonlarla interferans (Th2 indikasyonu)
- TDM ile interferans

### İmmünite süresi

BCG aşısının sağladığı immünite süresi belli değildir. Yaş artıkça korumanın azaldığı, aşılamadan sonra immüntenin 20 yılda kaybolduğu saptanmıştır<sup>(21)</sup>. Başka bir çalışmada tek doz alımı BCG aşısı sonrası 50-60 yıl sonra koruyuculuk %52 olduğu bildirilmektedir<sup>(22)</sup>.

### Aşılanma endikasyonu ve kullanımı

TB prevalansına bağlı olarak BCG aşılama politikası dünyada farklıdır. DSÖ tarafından TB prevalansının orta ve yüksek olduğu ülkelerde yenidoğan aşılaması önerilmektedir. Çoğu ülkelerde BCG ilk doz yenidoğan dönemi 0-3 ayda, daha sonra ilkökul çağında yinelenir. Ancak tek doz yeterli olduğu öne sürülmektedir. Ülkemizde çocuklara BCG aşısı doğumdan 0-3 ay sonra tek doz intradermal olarak kullanılmaktadır. İlk 3 ayda PPD deri testi yapılmadan, daha sonra (≥4 ay) PPD deri testi yapılarak ve PPD deri testi negatif bulunursa yapılır. BCG bu konuda deneyimli bir sağlık çalışanı tarafından sol omuza, intradermal olarak uygulanır<sup>(2,4)</sup>.

### Son yıllarda aşı çalışmaları

Dünyada TB'dan korunmada BCG aşılama tüm dünyada kabul görmüştür, ancak koruyuculuğu düşüktür<sup>(5)</sup>. Bundan dolayı onun yerine geçebilecek aşı çalışmaları; çocuklarda şiddetli TB riskini azaltmalı, dünyada en yaygın olan erişkin akciğer TB'na karşı değişken korumayı düzeltmeli ve HIV pozitif çocuk hastalarda BCG'nin yaygın hastalık riskini azaltmalıdır. Yeni geliştirilen aşı çalışmalarını değerlendirdiğimizde, genetik modifiye BCG, protein antijenlerine karşı (Ag85, p65, ESAT-6) rekombinant subünit aşular, konjuge karbonhidrat aşular, mukozal aşular ve tedavi amaçlı aşular olarak literatürlerde bulunmak-tadır<sup>(11,23-26)</sup>. Costa ve ark.<sup>(23)</sup> enfekte fare modelinde Ag85C, MPT51 ve HspX immün dominant epitoplara karşı füzyon protein

(rCMX) ekspresyonunu ile yeni rekombinant BCG (rBCG)'nin immunojenitesinin ve koruyuculuğunun araştırıldığı çalışmada, BCG'ye göre daha koruyucu olduğu ancak daha fazla çalışma yapılması gerekli olduğu bildirilmiştir.

TB'da aşı geliştirme çalışmalarında, var olan aşığı yani BCG'i iyileştirmek veya onun yerine geçebilecek birkaç yaklaşım geliştirilmiştir.

Bunlardan biri özgül ve güvenli olarak kabul edilen subunit protein aşılardır. Bu aşılarda geliştirilmesi için yapılan çalışmaların önemli olduğu bildirilmektedir. Subunit protein aşılarda uygun immun yanıt geliştirebilmesi için seçici immun epitoplara sahip olmalıdır<sup>(11,27)</sup>.

Subunit protein aşılarda, atenuye veya öldürülmüş mikroorganizmalardan oluşan aşılarda karşılaştırıldığında tam bir bağışıklık yanıtı uyarma kapasitesi azdır. Bunun için aşı formülasyonuna adjuvantlar eklenmesi önerilmektedir<sup>(11)</sup>. Araştırmacılar, immun tepkisini güçlendirmek için, bu potansiyele sahip interlökinler, lipid, lipoprotein ve immun uyarıcı peptitler gibi moleküller ile aşılarda bağışıklık epitoplarını kaynaştırmışlar ve etkinliğini değerlendirmişlerdir. Adjuvant moleküllerle subunit proteinlerin füzyon aşılarda tek başına veya atenuye vektörler içerisinde etkin-

liği araştırılmaktadır. Genel olarak, sınırlı sayıda çalışmalara rağmen, MTB epitopları ile adjuvantların moleküler füzyonu, aşı geliştirmede önemli bir alandır<sup>(11)</sup>. Son zamanlardaki çalışmalarda, rekombinant füzyon proteini ile sağlanan korunmanın BCG ile benzer olduğu rapor edilmiştir<sup>(27)</sup>.

ESAT-6 ve IL-2 ihtiva eden füzyon proteini, BCG ile karşılaştırıldığı çalışmada, rekombinant bakteriler ile aşılama BALB/c farelerde; ESAT-6 ve lenfosit sitotoksik aktiviteye karşı daha fazla IgG ve IFN $\gamma$  üretimi gösterdiği belirlenmiş fakat rekombinant aşılarda koruması hakkında değerlendirilme yapılamadığı bildirilmiştir<sup>(28)</sup>. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, adjuvant molekülleri ile MTB antiijenlerinin füzyonunun, genel immun yanıtlarla değerlendirilmesi Tablo 2'de gösterilmektedir.

BCG geliştirilmesi, TB için aşının doğru tasarım için en iyi seçim olduğu bildirilmektedir. Bunun için rBCG araştırmaları son yıllarda önemini korumaktadır<sup>(11,24)</sup>. rBCG geliştirilmesinin temel amacı, BCG'ye benzer ya da üstün koruma ile uzun süreli işlevsel hafızasını indükleyebilen bir aşı tasarlamaktır. Bugüne kadar hayvan modellerinde ve insan klinik denemelerinde, etkili rBCG aşılama çalışmaları bildirilmektedir<sup>(24)</sup>.

**Tablo 2. Son yıllarda BCG yerine geçebilecek aşı çalışmaları ve genel immun yanıtlarla değerlendirilmesi.**

| Antijen                        | Adjuvan          | CD4* | CD8* | Koruma* | Kaynak |
|--------------------------------|------------------|------|------|---------|--------|
| Ag85A                          | -                | N    | N    | =       | 37     |
| HspX <sub>91-110</sub>         | Pam2Cys          | ↑    | N    | ↑       | 54     |
| PPE27kDa                       | Flagellin        | N    | N    | N       | 55     |
| ESAT-6                         | C-terminal Hsp70 | N    | N    | N       | 56     |
| Hsp65                          | IL-2             | N    | ↑    | =       | 57     |
| ESAT-6                         | IL-12p70         | ↑    | ↑    | ↓       | 58     |
| Ag85B                          | IL-15            | ↑    | ↑    | ↑       | 59     |
| ESAT-6                         | GM-CSF           | ↑    | ↑    | N       | 60     |
| rBCG1:Ag85B-CFP10(rBCG1)/BCG2: | -                | ↑    | ↑    | ↑       | 61     |
| Ag85B-CFP10-IL-12 (rBCG2)      | -                | -    | -    | -       | -      |
| rBCG-AE (Ag85A-ESAT-6)         | -                | N    | N    | ↓       | 25     |
| rBCG:Ag85B-ESAT-6-Rv2608       | -                | ↑    | ↑    | N       | 62     |
| rBCG $\Delta ureC::hly+$       | -                | ↑    | ↑    | N       | 44     |
| rBCG $\Delta ureC::hly+$       | -                | ↑    | ↑    | =       | 63     |
| rBCG-85B-IL-15/rBCG-85B        | -                | ↑    | ↑    | =       | 59     |

BCG için korumanın karşılaştırılması, N: değerlendirilmemiş, =: eşit, ↑: yüksek, ↓: düşük

rBCG aşılama çalışmalarında, sitokinlerin üretimi ve sitotoksik fonksiyonların indüklenmesinin belirlenmesi için hem CD4+ T hem de CD8+ T hücrelerinin uyarılmış olduğunu belirlemek önemlidir<sup>(29,30)</sup>. Son yıllarda yapılan rBCG aşılama çalışmaları ve genel immun yanıtlarla değerlendirilmesi Tablo 2’de gösterilmiştir.

BCG’nin etkisinin artırılması çalışmalarında, vektörler ile proteinlerin ekspresyonu kadar proteinlerin füzyonu, rBCG aşılarının geliştirilmesinde önemli bir strateji olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, BCG’deki MTB proteinlerin süper ekspresyonu örneğin, Ag85B ekspresyonu ile oluşan rBCG:30, BCG göre daha fazla hafıza hücre ürettiği ve korumada yararlı olduğu bildirilmektedir<sup>(31)</sup>. Erken sekrete edilen antijenik target-6 (ESAT-6) ve Ag85B’den oluşan Hibrit 1 aşısı ile yapılan hayvan modeli çalışmada; TB’den koruma gösterdiği ve güvenle kullanılabilmesi rapor edilmektedir<sup>(32)</sup>. Yine bir hibrid aşısı olan H56 subunit aşısı (Rv2660c ile kombine edilen ESAT-6, Ag85B antijenlerinden oluşan bir füzyon protein) CD4+ T hücre yanıtı artırarak koruyucu immunitiyi sağladığı ve latent TB farelerde reaktivasyonu kontrol ettiği bildirilmektedir<sup>(33)</sup>. TB öncesi ve sonrası Hibrit 1 (H1) (ESAT-6 +Ag85B), H56 (Rv2660c + ESAT-6 + Ag85B), H4 (Ag85B +TB10.4) ve H28 (Ag85B ve TB10.4+ Rv2660c) aşılarının etkinliğinin araştırıldığı çalışmada, hibrit aşılardan koruyucu etkisi olduğu ve tek başına ESAT-6 antijeninin hibrit aşılardan kadar etkin olduğu bildirilmektedir<sup>(34)</sup>.

Plazmid-tabanlı aşısı çalışmaları Faz I klinik faza geçmiştir ve bu plazmid-tabanlı aşılarda, antibiyotik direnç genlerinin geçişini önlemek için oksotrofik BCG suşları gelişiminin önemli olduğu bildirilmektedir<sup>(24)</sup>. Adenovirus 35 (rAd35) aşısı vektörü ile MTB antijenleri (Ag85A, 85B ve TB10.4) kaplanmış aşısı (rBCG/rAd35aşısı) çalışmasında, Mtb antijeni MPT64 de azalma ve koruma ile ilgili de CD8+T hücrelerinde artış

belirlenmiştir<sup>(35)</sup>.

Nanopartikül-temelli rekombinant DNA plazmid aşısının (nano-Esat-6/3e-FL); fare modelinde intramusküler aşılama ile MTB’le karşı yüksek T hücre cevabı göstererek TB’u korumada önemli bir aşısı olabileceğini bildirmektedir<sup>(36)</sup>.

Güney Afrika’da 2-6 yaş HIV negatif BCG yapılmış çocuklarda Faz IIB olarak değerlendirilen çalışmada, MTB’nin immunodominant antijen 85A ekspresyonu vektör olarak da poxvirus kullanıldığı aşısı “Modified Vaccinia Ankara (MVA)”, aşısının iyi tolere edildiği ve hücresel immun yanıtı indüklediği, ancak korumasında plaseboya göre bir fark olmadığı rapor edilmektedir<sup>(37)</sup>.

Parental rBCG aşılamanın antijen ve füzyon proteinlerin farklı olmasından etkilenmeden CD4+ ve CD8+ T hücreleri aktive ederek daha iyi koruma sağladığı bildirilmektedir<sup>(23)</sup>.

Yeni rekombinant BCG aşısı (rBCG) gelişim tanımlamak için bir aşısının immünolojik durum gözden geçirilmelidir. Örneğin, fare modellerinde hem MTB enfeksiyonunda hem de BCG aşılama, akciğerlerde hafıza hücreleri kadar CD4+ efektör T hücrelerin (fenotip CD44hiCD62LloCCR7lo) ve sentral T hücreleri (TCM, CD44hiCD62LhiCCR7hi) düzeyinde değerlendirilmesi önerilmektedir<sup>(38-40)</sup>. TB karşı koruma için T hücrelerinin salgıladığı interferon (IFN)  $\gamma$  üretimi, makrofajların mikrobiyal öldürücü fonksiyonların uyarımı için önemli bir sitokindir<sup>(41,42)</sup>. Son zamanlarda, bazı yazarlar TB enfeksiyonunda koruyucu hafızayı değerlendirmede; Tümör nekroz faktörü (TNF)  $\alpha$  ve interlökin (IL)-2 sitokinler veya IFN $\gamma$  ve IL-17 seviyelerinin ölçülmesinin gerekli olduğunu öne sürmektedirler<sup>(43,44)</sup>.

Aşısı gelişiminde farklı bir yaklaşımda aşısının verilmiş yolundaki değişiklikler<sup>(45,46)</sup>. Blazevic ve

ark.<sup>(45)</sup> MTB'e karşı mukozal bağışıklığın değerlendirilmek için, CpG ile adjuvanlanmış rekombinant 85B antijen (Ag85B/CpG) ve/veya BCG intranazal olarak farelere vererek enfeksiyona karşı koruma yeteneği araştırmışlardır. Mukozal enfeksiyona karşı koruma yeteneğinin iyi olduğu ancak akciğer enfeksiyonları için daha fazla araştırma gerektiğini vurgulamışlardır. Benzer olarak fare modelinde MTB karşı mukozal bağışıklığın değerlendirildiği bir başka çalışmada aşı vektörü olarak human parainfluenza type 2 virus (rhPIV2) ve antijen olarak Ag85B kullanıldığı rekombinant (rhPIV2-Ag85B) aşının intranazal alımı sonucunda etkinliği belirlenmiş olsa da yeni aşı ve veriliş yolu için ek çalışmalar gerektiğini belirlemişlerdir<sup>(46)</sup>.

Aşı gelişiminde diğer bir yaklaşımda tüberküloza karşı karbohidrat-protein konjüge aşının denemeleridir<sup>(42-44)</sup>. Källenius ve ark.<sup>(47)</sup> tarafından MTB büyük yapısal yüzey bileşeni olan lipoarabinomannanın (LAM), arabinomannan kısmının proteinle (mikobakteriyel) konjugasyonun, fare ve domuzda koruyucu etkisinin olduğu ve hem hücresel hem de hümmoral yanıtı etkilediği bildirilmektedir.

Benzer olarak, *Mycobacterium tuberculosis* RvH37 suşunun lipoarabinomannan spesifik oligosakkaritlerinin, tetanoz ve difteri toksoid ile konjugasyonu ile oluşan konjüge oligosakkarit-protein aşı denemelerinde, yüksek ölçüde immünojenik yanıt oluştuğu kanıtlanmıştır<sup>(48)</sup>.

Tüberküloza karşı MTB büyük yapısal yüzey bileşeni olan LAM'nın arabinomannan kısmının *Pseudomonas aeruginosa* eksoprotein A (rEPA) ile konjugasyonu ile elde edilen aşının, immunize farelerde antikor yanıtını artırdığı ve organlarda MTB koloni sayısının azaldığı bildirilerek aşı gelişiminde önemli olduğu vurgulanmıştır<sup>(49)</sup>.

BCG yerine geçebilecek aşı çalışmalarında sınır-

lı insan denemelerine başlanmıştır. Ancak sonuçlar hâlen devam etmektedir. Çocuklarda koruyucu tüberküloz aşılarda faz I aşamasında devam eden VPM1002 (rBCGDureC:hly) aşı çalışması yanında MVA85A (MVA expressing Rv3804) çalışması faz IIb tamamlanmış ve etkisiz olduğu belirlenmiştir. Erişkinlerde MTBVAC (rMtbDPhoPDFadD26), H1 (Rv1886+Rv3875 füzyon protein ve adjuvant IC31 veya CAF01), H4 (Rv1886+Rv0288 füzyon protein ve adjuvant IC31), Ad5HUAG85A (Human Ad 5 expressing Rv3804) ve H56 (Rv1886+Rv3875 +Rv2660 füzyon protein ve adjuvant IC31) aşı çalışmaları faz I aşamasında devam ederken MVA85A aşı çalışması Faz IIb aşamasındadır<sup>(26)</sup>.

### **Tüberküloz tedavisinde kullanılması için geliştirilen aşılarda**

TB tedavisinde kullanılması için öldürülmüş TDM suşlarından oluşan aşılarda faz çalışmaları başlamıştır<sup>(50)</sup>. Bu aşılardan biri DAR-901, *M. vaccae* suşlarından geliştirilmiştir. HIV pozitif erişkinlerde TB tedavisi için kullanılması amaçlanmaktadır<sup>(51)</sup>. Faz III çalışmasındaki araştırmanın yorumlanmasında zorluklar olduğu bildirilmektedir<sup>(50)</sup>. Koruyucu aşılarından bazıları tedavi amacıyla da düşünülmektedir. Aktif TB'li hastalarda M72/AS01E aşı faz IIa düzeyinde test edilmektedir<sup>(50)</sup>. Bundan başka öldürülmüş veya yarı saflandırılmış bakteriden hazırlanan aşılarda TB tedavisine ek olarak verilmektedir<sup>(52)</sup>. Tedavi amacı ile çalışılan diğer bir aşı RUTI'dir<sup>(53)</sup>. Bu aşı erişkin ve adölesan grupta temas sonrası aşılama, latent TB enfeksiyonu için düşünülmüştür. Faz IIb aşamasında beklemektedir. Çin ilaç sanayisinde (AnHui Longcom), *M. vaccae* suşlarında geliştirilmiştir ve tedavi amacıyla da düşünülmüştür. Ancak etkinliği hakkında bir bilgi verilmemiştir<sup>(50,51)</sup>. Hindistan'da lepra tedavisi için öldürülmüş *Mycobacterium indicus pranii* suşlarından aşı geliştirilmiştir. Retrospektif olarak spesifik TB karşı faz III çalışmasında koruyucu etkisi belirlenmiş ve lisans almasına

rağmen, faz III çalışmasında daha fazla değerlendirilmesi gerektiği bildirilmektedir<sup>(50)</sup>.

Sonuç olarak, BCG aşılımlarına rağmen TB tüm dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Bundan dolayı onun yerine geçebilecek aşı çalışmaları hızla devam etmektedir. Ancak bu çalışmaların daha deney aşamasında olduğu görülmektedir. Bununla beraber, hayvan modellerindeki çalışmalardan umut verici sonuçlar alındığı bildirilmiş ve insan çalışmalarında da Faz1- FazIIb-FazIII'e kadar ulaşılmıştır. Bu çalışmaların sürdürülmesi insan modellerindeki sonuçların bir an önce değerlendirilmesi TB'dan korunmada çok önemli olacaktır.

## KAYNAKLAR

1. **Rappuoli R, Aderem A.** A 2020 vision for vaccines against HIV, tuberculosis and malaria. *Nature* 2011; 473:463-9. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10124>
2. World Health Organization. 2015 [http://www.who.int/campaigns/tb-day/2015/event/en/].
3. **Levinson W.** Review of Medical Microbiology and Immunology, McGraw-Hill Companies. Çeviri: Özgünen T. Kitap: Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünolojisi. Güneş Tıp Kitabevleri, 2008;161-8.
4. **Kuzdan C, Bakır M.** Tüberküloz aşısı. Eds: Badur S, Bakır M, Akademi Yayınları, İstanbul 1. Baskı 2012; 309-327.
5. **Abu-Raddad LJ, Sabatelli L, Achterberg JT, et al.** Epidemiological benefits of more-effective tuberculosis vaccines, drugs, and diagnostics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:13980-85. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0901720106>
6. **Tuğluoğlu F.** Cumhuriyet döneminde verem mücadelesi ve propaganda faaliyetleri. *İstanbul Üniversitesi Yakın Dönem Türkiye Araştırmaları Dergisi* 2011; 7.
7. **Smith D, Harding G, Chan J, et al.** Potency of 10 BCG vaccines as evaluated by their influence on the bacillemic phase of experimental airborne tuberculosis in guinea-pigs. *J Biol Stand* 1979; 7:179-97. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-1157\(79\)80021-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-1157(79)80021-9)
8. **Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al.** An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 1998; 282:121-5. <http://dx.doi.org/10.1126/science.282.5386.121>
9. **Abebe F.** Is interferon-gamma the right marker for bacille Calmette-Guérin-induced immune protection? The missing link in our understanding of tuberculosis immunology. *Clin Exp Immunol* 2012; 169:213-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04614.x>
10. **Mittrucker HW, Stenhoof U, Kohler A, et al.** Poor correlation between BCG vaccination-induced T cell responses and protection against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:12434-9. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0703510104>
11. **Junqueira-Kipnis AP, Marques Neto LM, Kipnis A.** Role of fused *Mycobacterium tuberculosis* immunogens and adjuvants in modern tuberculosis vaccines. *Front Immunol* 2014; 5:188. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00188>
12. **Kaufmann SH, Lange C, Rao M, et al.** Progress in tuberculosis vaccine development and host-directed therapies - a state of the art review. *Lancet Respir Med* 2014; 4:301-20. [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70033-5](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70033-5)
13. **Hoft DF, Blazevic A, Abate G, et al.** A new recombinant bacille Calmette-Guérin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers. *J Infect Dis* 2008; 198:1491-501. <http://dx.doi.org/10.1086/592450>
14. **Leung AS, Tran V, Wu Z, et al.** Novel genome polymorphisms in BCG vaccine strains and impact on efficacy. *BMC Genomics* 2008; 9:413. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-413>
15. **Brewer TF, Colditz GA.** Relationship between bacille Calmette-Guérin (BCG) strains and the efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1995; 20:126-35. <http://dx.doi.org/10.1093/clinids/20.1.126>
16. **Colditz GA, Berkey CS, Mosteller F, et al.** The efficacy of bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analyses of the published literature. *Pediatrics* 1995; 96:29-35.
17. **Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P.** Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* 1993; 73:469-85. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90135-D](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(93)90135-D)
18. **Wilson ME, Fineberg HV, Colditz GA.** Geographic latitude and the efficacy of bacillus Calmette-Guérin vaccine. *Clin Infect Dis* 1995; 20:982-91. <http://dx.doi.org/10.1093/clinids/20.4.982>
19. **Stanford JL, Shield MJ, Rook GA.** How environmental mycobacteria may predetermine the protective efficacy of BCG. *Tubercle* 1981; 62:55-62. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-3879\(81\)90037-4](http://dx.doi.org/10.1016/0041-3879(81)90037-4)
20. **Karonga Prevention Trial Group.** Randomised 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. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)02166-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(96)02166-6)
21. **al-Kassimi FA, al-Hajjaj MS, al-Orainey IO, Bamgboye EA.** Does the protective effect of neonatal BCG correlate with vaccine-induced tuberculin reaction? *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1575-8. <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.152.5.7582297>
22. **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. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.291.17.2086>
23. **da Costa AC, Costa-Júnior Ade O, de Oliveira FM, et al.** A new recombinant BCG vaccine induces specific Th17 and Th1 effector cells with higher protective efficacy against tuberculosis. *PLoS One* 2014;

- 9:e112848.  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0112848>
24. **da Costa AC, Nogueira SV, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP.** Recombinant BCG: Innovations on an old vaccine. Scope of BCG strains and strategies to improve long-lasting Memory. *Front Immunol* 2014; 5:152.  
<http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00152>
  25. **Deng YH, He HY, Zhang BS.** Evaluation of protective efficacy conferred by a recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing a fusion protein of Ag85A-ESAT-6. *J Microbiol Immunol Infect* 2014;47:48-56.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2012.11.005>
  26. **Weiner J 3rd, Kaufmann SHE.** Recent advances towards tuberculosis control: vaccines and biomarkers. *J Inter Med* 2014; 275:467-80.  
<http://dx.doi.org/10.1111/joim.12212>
  27. **Soares AP, Kwong Chung CK, Choice T, et al.** Longitudinal changes in CD4(+) T-cell memory responses induced by BCG vaccination of newborns. *J Infect Dis* 2013; 207: 1084-94.  
<http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jis941>
  28. **Ottenhoff TH.** New pathways of protective and pathological host defense to mycobacteria. *Trends Microbiol* 2012; 20:419-28.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2012.06.002>
  29. **Behr MA, Small PM.** Has BCG attenuated to impotence? *Nature* 1997; 389:133-4.  
<http://dx.doi.org/10.1038/38151>
  30. **Hanekom WA.** The immune response to BCG vaccination of newborns. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1062: 69-78.  
<http://dx.doi.org/10.1196/annals.1358.010>
  31. **Hoft DF, Blazevic A, Abate G, et al.** A new recombinant bacille Calmette-Guérin vaccine safely induces significantly enhanced TB-specific immunity in human volunteers. *J Infect Dis* 2008; 198:1491-501.  
<http://dx.doi.org/10.1086/592450>
  32. **van Dissel JT, Arend SM, Prins C, et al.** Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31 promotes strong and long-lived *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell responses in naïve human volunteers. *Vaccine* 2010; 28:3571-81.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.02.094>
  33. **Aagaard C, Hoang T, Dietrich J, et al.** A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. *Nat Med* 2011; 17:189-94.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nm.2285>
  34. **Hoang T, Aagaard C, Dietrich J, et al.** ESAT-6 (EsxA) and TB10.4 (EsxH) based vaccines for pre- and post-exposure tuberculosis vaccination. *PLoS One* 2013; 8:e80579.  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080579>
  35. **Rahman S, Magalhaes I, Rahman J, et al.** Prime-boost vaccination with rBCG/rAd35 enhances CD8+ cytolytic T-cell responses in lesions from *Mycobacterium tuberculosis*-infected primates. *Mol Med* 2012; 18:647-58.  
<http://dx.doi.org/10.2119/molmed.2011.00222>
  36. **Feng G, Jiang Q, Xia M, et al.** Enhanced immune response and protective effects of nano-chitosan-based DNA vaccine encoding T cell epitopes of Esat-6 and FL against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS One* 2013;8:e61135.  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061135>
  37. **Tameris MD, Hatherill M, Landry BS, et al.** Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet* 2013; 381:1021-8.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60177-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60177-4)
  38. **Henao-Tamayo MI, Ordway DJ, Irwin SM, Shang S, Shanley C, Orme IM.** Phenotypic definition of effector and memory T-lymphocyte subsets in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17:618-25.  
<http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00368-09>
  39. **Junqueira-Kipnis AP, Turner J, Gonzalez-Juarrero M, Turner OC, Orme IM.** Stable T-cell population expressing an effector cell surface phenotype in the lungs of mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2004; 72:570-5.  
<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.72.1.570-575.2004>
  40. **Kipnis A, Irwin S, Izzo AA, Basaraba RJ, Orme IM.** Memory T lymphocytes generated by *Mycobacterium bovis* BCG vaccination reside within a CD4 CD44lo CD62 ligand(hi) population. *Infect Immun* 2005; 73:7759-64.  
<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.11.7759-7764.2005>
  41. **Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM.** Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 1993; 178:2243-7.  
<http://dx.doi.org/10.1084/jem.178.6.2243>
  42. **Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR.** An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 1993; 178:2249-54.  
<http://dx.doi.org/10.1084/jem.178.6.2249>
  43. **Ottenhoff TH.** New pathways of protective and pathological host defense to mycobacteria. *Trends Microbiol* 2012; 20:419-28.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2012.06.002>
  44. **Desel C, Dorhoi A, Bandermann S, Grode L, Eisele B, Kaufmann SH.** Recombinant BCG ΔureC hly+ induces superior protection over parental BCG by stimulating a balanced combination of type 1 and type 17 cytokine responses. *J Infect Dis* 2011; 204:1573-84.  
<http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jir592>
  45. **Blazevic A, Eickhoff CS, Stanley J, et al.** Investigations of TB vaccine-induced mucosal protection in mice. *Microbes Infect* 2014; 16:73-9.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2013.09.006>
  46. **Watanabe K, Matsubara A, Kawano M, et al.** Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed *Mycobacteria*-specific immune responses by intranasal immunization. *Vaccine* 2014; 32:1727-35.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.108>
  47. **Källenius G, Pawlowski A, Hamasur B, Svenson SB.** *Mycobacterial glycoconjugates* as vaccine candidates against tuberculosis. *Trends Microbiol* 2008; 16:456-62.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.007>
  48. **Hamasur B, Källenius G, Svenson SB.** Synthesis and immunologic characterisation of *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan specific oligosaccharide-protein conjugates. *Vaccine* 1999; 17:2853-61.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00124-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00124-3)

49. **Glatman-Freedman A, Casadevall A, Dai Z, et al.** Antigenic evidence of prevalence and diversity of *Mycobacterium tuberculosis* arabinomannan. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3225-31.  
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.7.3225-3231.2004>
50. **Frick M.** The TB Vaccines Pipeline: Where are We Going, Where Have We Been? [2013 Pipeline Report]. London: HIV i-Base and Treatment Action Group, 2013; 263-83.
51. **von Reyn CF, Mtei L, Arbeit RD, et al; DarDar Study Group.** Prevention of tuberculosis in Bacille Calmette-Guérin-primed, HIV-infected adults boosted with an inactivated whole-cell mycobacterial vaccine. *AIDS* 2010; 24:675-85.  
<http://dx.doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283350f1b>
52. **Prabowo SA, Gröschel MI, Schmidt ED, et al.** Targeting multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) by therapeutic vaccines. *Med Microbiol Immunol* 2013; 202:95-104.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00430-012-0278-6>
53. **de Bruyn G, Garner P.** *Mycobacterium vaccae* immunotherapy for treating tuberculosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; CD001166.
54. **Gowthaman U, Singh V, Zeng W, et al.** Promiscuous peptide of 16 kDa antigen linked to Pam2Cys protects against *Mycobacterium tuberculosis* by evoking enduring memory T-cell response. *J Infect Dis* 2011; 204:1328-38.  
<http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jir548>
55. **Le Moigne V, Robreau G, Mahana W.** Flagellin as a good carrier and potent adjuvant for Th1 response: study of mice immune response to the p27 (Rv2108) *Mycobacterium tuberculosis* antigen. *Mol Immunol* 2008; 45:2499-507.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2008.01.005>
56. **Tebianian M, Hoseini AZ, Ebrahimi SM, et al.** Cloning, expression, and immunogenicity of novel fusion protein of *Mycobacterium tuberculosis* based on ESAT-6 and truncated C-terminal fragment of HSP70. *Biologicals* 2011; 39:143-8.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.02.002>
57. **Shi C, Yuan S, Zhang H, Zhang T, Wang L, Xu Z.** Cell-mediated immune responses and protective efficacy against infection with *Mycobacterium tuberculosis* induced by Hsp65 and hIL-2 fusion protein in mice. *Scand J Immunol* 2009; 69:140-9.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2008.02207.x>
58. **Deng Y, Bao L, Yang X.** Evaluation of immunogenicity and protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* infection elicited by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing human Interleukin-12p70 and Early Secretory Antigen Target-6 fusion protein. *Microbiol Immunol* 2011; 55:798-808.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00376.x>
59. **Tang C, Yamada H, Shibata K, et al.** Efficacy of recombinant bacille Calmette-Guérin vaccine secreting interleukin-15/antigen 85B fusion protein in providing protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 2008; 197:1263-74.  
<http://dx.doi.org/10.1086/586902>
60. **Yang X, Bao L, Deng Y.** A novel recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin strain expressing human granulocyte macrophage colony-stimulating factor and *Mycobacterium tuberculosis* early secretory antigenic target 6 complex augments Th1 immunity. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2011; 43:511-8.  
<http://dx.doi.org/10.1093/abbs/gmr045>
61. **Lin CW, Su IJ, Chang JR, ChenYY, Lu JJ, Dou HY.** Recombinant BCG coexpressing Ag85B, CFP10, and interleukin-12 induces multifunctional Th1 and memory T cells in mice. *APMIS* 2011; 120:72-82.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2011.02815.x>
62. **LuY, XuY, Yang E, Wang C, Wang H, Shen H.** Novel recombinant BCG coexpressing Ag85B, ESAT-6 and Rv2608 elicits significantly enhanced cellular immune and antibody responses in C57BL/6 mice. *Scand J Immunol* 2012; 76:271-7.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2012.02726.x>
63. **Farinacci M, Weber S, Kaufmann SH.** The recombinant tuberculosis vaccine rBCG ΔureC::hly(+) induces apoptotic vesicles for improved priming of CD4(+) and CD8(+) T cells. *Vaccine* 2012; 30:7608-14.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.031>