



# Yüz Yıllık Tüberküloz Aşısı: Bacille Calmette-Guérin Tarihçesi - BCG Aşısı Koruyucu Eğitilmiş Bağışıklığı Başlatabilir Mi?

## One Hundred of Tuberculosis Vaccine: History of Bacille Calmette-Guérin - Could BCG Vaccination Induce Trained Immunity?

© Gönül Aslan<sup>1</sup>, © Deniz Alkaya<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye

<sup>2</sup>Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye

**Atf:** Aslan G, Alkaya D. One Hundred of Tuberculosis Vaccine: History of Bacille Calmette-Guérin - Could BCG Vaccination Induce Trained Immunity? Turk J Immunol 2022;10(1):12-21

**Geliş Tarihi:** 20.12.2021

**Kabul Tarihi:** 17.03.2022

**Sorumlu Yazar:** Prof. Dr. Gönül Aslan, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye  
**Tel.:** +90 532 562 94 87 **E-posta:** drgaslan@gmail.com **ORCID:** orcid.org/0000-0002-1221-7907

### Öz

Tüberküloz (TB) *Mycobacterium tuberculosis kompleksi*'nin etken olduğu ciddi etkileri nedeniyle insanlık tarihi boyunca toplumları derinden etkileyen bulaşıcı bir hastalıktır. TB'den korunmada tarihi bir öneme sahip olan Bacille Calmette-Guérin (BCG) aşısı 100 yıllık geçmiş ile bugüne kadar 4 milyardan fazla kişiye uygulanmıştır. TB'den korunmada BCG'den daha etkili aşı geliştirme çalışmaları sürerken, BCG'nin koronavirus hastalığı pandemisine karşı koruyuculuğu ile ilgili çalışmalarla BCG, 100. yaş gününde yeniden şaşırtıcı bir şekilde gündeme gelmiştir. BCG'nin, bulaşıcı hastalıklar üzerindeki non-spesifik/TB dışı etkisine ek olarak, insanlarda mesane kanseri tedavisinde 1976 tarihinden itibaren "Gıda ve İlaç Dairesi" onaylı immünomodülatör olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, yaygın genital siğiller için topikal tedavide immünoterapi ajanı olarak kullanımına yönelik çalışmalar da sürmektedir. BCG aşısının TB enfeksiyonu riskini yaklaşık %50 oranında azaltması aslında sınırlı bir etkinlik olsa da diğer enfeksiyonlara karşı korunmada heterolog ve eğitilmiş bağışıklık aracılığı ile non-spesifik etkilerinin ortaya konması aşıya olan ilgiyi canlı tutmaktadır. Bu çalışma BCG aşısının keşfedilme ve gelişim öyküsünü, tarihçesini ve TB dışı enfeksiyon hastalıklarındaki immünolojik mekanizmalara etkisini derlemek için planlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** BCG, heterolog bağışıklık, eğitilmiş bağışıklık, COVID-19

### Abstract

Tuberculosis (TB) is an infectious disease that has deeply affected societies throughout human history due to the serious effects of *Mycobacterium tuberculosis complex*. The Bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccine, which has a historical importance in the prevention of TB, has been administered to more than 4 billion people with its 100-year history. While the studies to develop a more effective vaccine than BCG in the prevention of TB continue, BCG has surprisingly come to the fore again on its 100<sup>th</sup> birthday with the studies on the protection of BCG against the coronavirus disease pandemic. In addition to the non-specific/non-TB effect of BCG on infectious diseases, it has been used as a "Food and Drug Administration" approved immunomodulator in the treatment of bladder cancer in humans since 1976. In addition, studies on its use as an immunotherapy agent in topical treatment for common genital warts are ongoing. Although the fact that the BCG vaccine reduces the risk of TB infection by approximately 50% is actually a limited efficacy, the non-specific effects of heterologous and trained immunity in protection against other infections keep the interest in the vaccine alive. This study was planned to compile the discovery and development history of BCG vaccine, its history and its effect on immunological mechanisms in non-TB infectious diseases.

**Keywords:** BCG, heterologous immunity, trained immunity, COVID-19

**ORCID:** G. Aslan 0000-0002-1221-7907, D. Alkaya 0000-0001-8580-4152

## Giriş

Aşılar, Edward Jenner'in 1796 yılında çiçek aşısını geliştirmesinden bu yana çiçek hastalığı ve çocuk felci gibi ölümcül hastalıkların eradikasyonu başta olmak üzere halk sağlığını küresel etkileyen birçok enfeksiyon etkeninin kontrolünde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (1). Her yıl 24-30 Nisan'da kutlanan Dünya Bağışıklama Haftası'nda, aşıların bulaşıcı hastalıklarla mücadelede sağladıkları olağanüstü başarı öyküleri kutlanırken, acil aşı gereksinimleri de vurgulanmaktadır. Bu yıl 100. yaş gününü kutladığımız Bacille Calmette-Guérin (BCG) aşısı tüberküloza (TB) karşı mevcut olan tek aşıdır (2). BCG aşısının 18 Temmuz 1921'de TB ile savaşmak için tanıtılmasından bu yana geçen 100 yılda aşının bebeklerde ve küçük çocuklarda ciddi TB formlarının (TB menenjit ve miliyer TB) önlenmesinde orta düzeyde etkili olduğu, yetişkinlerde ise en yaygın TB türü olan akciğer TB'sini önlemede etkisinin sınırlı olduğu ortaya koyulmuştur (2). Geçtiğimiz yüzyılda BCG aşısı ve anti-TB ilaçların kullanıma girmesi, özellikle endemik alanda TB ile mücadelede ileriye yönelik bir adım sağlamıştır. BCG aşısı bugüne kadar, dünya çapında 4 milyardan fazla kişiye uygulanmıştır ve en yaygın kullanılan aşı olmaya devam etmektedir (1,2). 1882'de Robert Koch tarafından TB'ye neden olan *Mycobacterium tuberculosis*'in (*M. tuberculosis*) keşfinin ardından, bilim adamları TB salgınlarını önlemek amacıyla bir aşı geliştirmek için yarışmışlardır (3).

Yeni TB aşıları için gereken acil yatırımlar konusunda alarm verilirken bir yandan da BCG aşısının yenidoğanlarda ve küçük bebeklerde çok yaygın olan diğer bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı korumayı artırdığı yönünde araştırmalar yayınlanmıştır (4). BCG aşısı doğal bağışıklığı uyararak diğer bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan hastalıklar üzerinde faydalı non-spesifik etkilere sahiptir (4) ve bu etkilerin moleküler mekanizmasının çözülmeye başlanmasıyla BCG aşısına olan ilgi yeniden artmıştır. BCG aşısının immünite üzerine etkileri, bulunuşunun üzerinden neredeyse 100 yıl geçmesine rağmen hala bir gizemdir. Gelişen teknoloji ile BCG aşısının TB'ye karşı korunmada doğal bağışıklık aracılığıyla "non-spesifik" bir etki gösterdiğinin keşfedilmesi ironik olacaktır. BCG aşısının TB dışında çeşitli bulaşıcı hastalıklara karşı bilinen heterolog özgün olmayan etkisinin, şiddetli akut solunum yolu sendromu-koronavirüs-2'ye (SARS-CoV-2) karşı da faydalı olabileceği gündeme gelmiştir (5,6).

Bu makale BCG aşısının keşfedilme ve gelişim öyküsünü, tarihçesini ve TB dışı enfeksiyon hastalıklarındaki immünolojik mekanizmalara etkisini derlemek için planlanmıştır.

## BCG Aşısının Kökeni: Koch Tüberkülininden BCG'ye

Robert Koch'un 1882'de *M. tuberculosis*'i TB'ye neden olan mikroorganizma olarak tanımlaması yeni bir çağı başlatmıştır (7). Koch 1901'de insan ve sığır tüberkülozuna *M. tuberculosis* ve *M. bovis* olmak üzere iki farklı mikroorganizmanın neden olduğunu tanımlamıştır. Kontamine inek sütüyle bulaşan *M. bovis*, özellikle küçük çocuklarda TB olgularının önemli bir kısmına neden olmaktadır (7). Koch 1890'da TB'nin önlenmesi ve tedavisi için etkili olduğunu düşündüğü tüberkülin adı verdiği bir TB aşısı keşfettiğini iddia etmiştir (7). Tüberkülin, *M. tuberculosis*'in konsantre sıvı kültüründen bakterilerin süzülerek uzaklaştırıldığı ve günümüzde antijen ve adjuvan olarak görev yapan *M. tuberculosis* proteinlerini ve glikolipidleri içeren bir subunit aşı olarak tanımlanmıştır (8). Ancak, Koch ve meslektaşları *M. tuberculosis*'in virülansını azaltma girişiminde de başarılı olamamış, klinik çalışmalarda tüberkülinin etkisiz olduğunu görmüştür (8).

1900'lerin başında, babasını TB'den kaybeden Jean-Marie Camille Guérin ve Albert Calmette Lille'de yeni açılan Pasteur Enstitüsü'nde TB'ye karşı bir aşı geliştirmek için araştırmaya başlamıştır (9). TB mastiti bulunan bir inekten izole edilen öldürücü bir *M. bovis* suşu olan "Lait Nocard"ı gliserin ve patates içeren besiyeri ortamında üretmiştir (3). Ancak basil süspansiyonunu homojenize etmekte zorlanmışlar ve kümeleşme eğilimlerini engellemek için ortama öküz safrası eklediklerinde tesadüfen subkültürde organizma virülansının azaldığını fark etmişlerdir (3). Öküz safrası ve gliserin ile ıslatılmış patates dilimleri üzerinde üretilmiş ve kuru-ufalanmış *M. bovis* kolonileri bu ortamda yeşilimsi-kahverengi bir renkle pürüzsüz hale gelmiştir (3).

Mikobakteriler, katı besiyerinde 3-4 hafta boyunca üretilmiş ve sonra yeni pasajlar yapılmıştır. Calmette ve Guérin 1908 ve 1920 yılları arasında, kültürlerini her 3 haftada bir yenileyerek 1920'de 230. pasajda virülansını kaybeden *M. bovis* basili elde etmişlerdir (9). Virülansını kaybetmiş *M. bovis* basili intravenöz olarak kobay, tavşan, sığır veya atlara enjekte edildiğinde progresif TB oluşturmadığı, sığırları özellikle yenidoğan buzağuları yaklaşık 1.5 yıl boyunca enfeksiyona karşı koruduğu gözlemlenmiştir (9). Yüksek dozlarda basil enjeksiyonu bile kobay, tavşan ve primatlarda güvenle uygulanmıştır (8). Akciğer, lenf düğümleri, karaciğer ve dalakta TB odakları gelişmesine rağmen, hiçbir zaman dejenerasyon gözlenmemiştir (3,8). Üretilen aşıya Guérin'in önerisi üzerine, Bacille Bilie Calmette-Guérin daha sonra da "Bilie" çıkarılarak BCG aşısı adı verilmiştir (9).

İlk BCG aşısı uygulaması 18 Temmuz 1921'de Benjamin Weill-Halle ve Raymond Turpin tarafından Paris'teki Charité Hastanesi'nde annesi TB'den ölen,

yenidoğan bir bebeğe oral yoldan uygulanmış, bebekte yan etki görülmemiş ve TB gelişmemiştir (8). Yenidoğana, sütte süspanse edilmiş 3x2 mg BCG dozu uygulanmış ve 5 buçuk yıl boyunca herhangi bir yan etki ya da hastalık gözlenmemiştir (8). Temmuz 1921 ve Temmuz 1922 arasında 120 bebek daha aşılanmıştır (8). BCG uygulaması başlangıçta TB'den etkilenen ailelerde yaşayan yenidoğan bebekleri hedef almıştır (8). Şubat 1927'ye kadar 200 bebeğe BCG aşısı yapılmıştır ve bir yıl sonra, bugün hala kullanılan intradermal yolun, daha güvenilir olduğu bildirilmiştir (8). Paris'te üç yıl içinde 217 bebek TB'ye karşı aşılanmış ve Pasteur Enstitüsü'nde BCG aşısının seri üretimi başlamıştır. Nihayet 1928'de Milletler Cemiyeti, aşının kullanım için güvenli olduğunu ilan etmiştir (10). Fransa'da, 1929'a kadar, yaklaşık 250.000 yenidoğan, gözle görülür yan etkiler olmaksızın oral BCG ile aşılanmıştır (8). 1928'de hayvanlar üzerinde yürütülen BCG deneyleri de sonlandırılmıştır (8). Bununla birlikte, canlı bir aşının patojenitesine geri dönüşün her zaman mevcut bir tehdit olduğuna dair güçlü endişeler devam etmiştir (8). BCG aşısının güvenli olduğu ancak etkinliği konusundaki soruların henüz cevaplanmadığına dikkat çekildiği dönemde, Calmette ve Guérin, BCG ile aşılanmış bebeklerde TB mortalitesinde bir düşüş olduğunu göstermiştir (8).

BCG aşısı programı Lübeck'de hastane müdürü Profesör Deycke ve Lübeck Sağlık Departmanı'nın baş tıp sorumlusu Dr. Alstädt tarafından sürdürülmüştür (3). Aşılanan 250 bebekten 72 yenidoğanın ölmesi BCG tarihçesine "Lübeck Felaketi" olarak geçmiştir (3). Felaket haberi üzerine Alman hükümeti, bir soruşturma başlatmıştır. BCG'nin patojenitesinin yeniden kazanıldığına dair hiçbir kanıt bulunamamış ve ölümlerin aşısı preparatlarına virülen bir *M. tuberculosis* suşu ile kazara kontaminasyonundan kaynaklandığı gösterilmiştir (3). Yaklaşık 20 ay sonra raporlar, BCG'yi temize çıkarmıştır (3). Lübeck felaketinin haberi tüm dünyaya yayılırken, önemli eleştirilere maruz kalan Calmette ve Guérin büyük bir baskı altına girmiştir. Ağustos 1930'da Uluslararası Veremle Mücadele Birliği'nin Oslo toplantısında Calmette kendini savunarak büyük alkış almıştır. Soruşturma raporları, BCG'yi temize çıkarmasına rağmen, BCG aşısı Lübeck Felaketi'nden büyük bir darbe almış ve aşısı olan güven zayıflamıştır. II. Dünya Savaşı sırasında TB pandemisinin tekrar ön plana çıkması, yeniden yaygın BCG aşılamaının başlatılmasına yol açmış ve halk aşısı karşı güven kazanmıştır (3).

Calmette, 8.075 aşıları çocuk arasında mortalitenin sadece %4.6 olduğunu, aşısız çocuklar arasında ise en az %16 olduğunu gözlemlemiş ve bu bulgu, BCG aşısının sadece TB'ye özgü mortaliteyi azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda tüm nedenlere bağlı bebek ölümlerini de önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (11). Calmette 1931'de,

aşılanmamış yenidoğanlarda aşılarla kıyasla daha yüksek mortaliteyi irdelemek için "TB enfeksiyonu bebek ölümlerinde sandığımızdan daha önemli bir rol oynuyor olabilir mi?" ve "BCG'nin konakçıda bulunması ardından sindirimi ve eliminasyonu, küçük çocuklarda çok sık görülen diğer enfeksiyonlara karşı direnç için non-spesifik bir etki sağlar mı?" sorularına cevap aramıştır (11). 1974'te Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), annelerin ve çocukların rutin olarak önerilen aşılarla evrensel erişimini sağlamak için "Genişletilmiş Bağışıklama Programı'nı" oluşturmuş, doğumda intradermal BCG aşısı uygulamasına geçilmiş ve o tarihten itibaren bugüne kadar 4 milyardan fazla aşı uygulanmıştır (12).

### BCG Aşısı Suşları

Virülen *M. bovis*'te Region of Difference-1 (RD-1) olarak adlandırılan dokuz genli bir lokus (Rv3871, PE35, PPE68, ESAT-6, CFP-10, Rv3876, Rv3877, Rv3878 ve Rv3879c proteinlerini kodlayan) bulunmaktadır (13). Virülen *M. bovis*'de seri pasajlarla türün zayıflamasında rol oynayan ana genetik modifikasyonun, RD-1 bölgesinin kaybı olduğu genetik çalışmalarla ortaya konmuştur (13). Calmette ve Guérin'in orijinal BCG suşu dünya çapında çeşitli laboratuvarlara dağıtılmış ve onlarca yıllık aşı çalışmalarında genetik varyasyonun bir sonucu olarak bir dizi farklı suş gelişmiştir (14). Daha sonra, RD-2 gen bölgesinin silinmesi ile Pasteur, Danish, Glaxo, Tice, Montreal (Frappier) ve Connaught suşları oluşmuştur (15). Genetik olarak farklı 20'den fazla BCG suşu olmasına rağmen şu anda dünya çapında kullanılan aşıların %90'ı (Pasteur 1173 P2, Danish 1331, Glaxo 1077 Danimarka, Tokyo 172-1 ve Rus BCG-I27) 5 suştan oluşmaktadır (15). Üretim tesisinde küf kontaminasyonu nedeniyle yaygın olarak kullanılan BCG-Connaught suşlarının, üretimi 2011 yılında FDA tarafından askıya alınmıştır (16). Connaught suşu, küresel pazarın önemli bir bölümünü sağladığından, üretiminin sona ermesi, dünya çapında bir BCG sıkıntısına yol açmıştır (16).

### BCG Aşısının "Heterolog T-hücresi" ve "Eğitilmiş Bağışıklık" Uyarımı

Doğal bağışıklık sistemi, patojen mikroorganizmalara karşı birincil savunma hattıdır. Bağışıklık hücreleri, çevre ile doğrudan teması olan organlarda özellikle gastrointestinal sistem, solunum yolları ve akciğerlerde sirkülasyon içindedir (17). Uzun yıllar boyunca, doğal bağışıklık yanıtın bir patojen ile daha önceki maruziyetten etkilenmediği ve "öğrenemediği" düşünülmeyle birlikte (17), son 10 yılda, birkaç çalışma, doğal bağışıklık sisteminin hazırlanmasının veya "eğitilmesinin", bitkiler, böcekler ve insanlar dahil olmak üzere evrimsel olarak uzak organizmalarda gözlemlenen eski bir yanıt olduğunu göstermiştir (17-19). Sonraki enfeksiyonlara karşı doğal bağışıklık yanıtında

artış olarak tanımlanan “eğitilmiş bağışıklık”, bağışıklık hücrelerinin patojenlere daha güçlü bir yanıt vermelerine ve edinsel yanıtları daha güçlü bir şekilde aktive etmelerine izin veren epigenetik ve metabolik programlama yoluyla oluşmaktadır (20).

Yaşam boyu karşılaşılan enfeksiyonlar ve bireyin aşılama geçmişi immün sistem üzerinde doğal ve edinsel bağışıklık yanıtlarını etkileyecek izler bırakmaktadır. T-hücresi cevabının, akraba olmayan virüslerle önceki enfeksiyonlardan etkilendiğine dair güçlü kanıtlar sayesinde hastalık sonucunu etkileyen T-hücre çapraz reaksiyonu “heterolog bağışıklık” olarak tanımlanmıştır (21-23). Tarihsel olarak, aşılardan hastalığa özgü olmayan birçok etkisi olduğu bilinmektedir: Örneğin, 17. yüzyılda Vaccinia virüsü aşısının sadece çiçek hastalığına karşı değil, aynı zamanda kızamık, kızıl ve frengiye karşı da koruduğu bildirilmiştir (24). BCG aşılamaının non-spesifik yararlı etkileri heterolog lenfosit cevabını aktif eden mekanizma ile oluşmaktadır (25). 1960’larda yapılan çalışmalarda, BCG aşılamaından sonra uyarılan lenfositlerin ürettikleri Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ile non-spesifik bakteriyel patojenlere karşı çapraz koruma geliştiği bildirilmiştir (25). IFN- $\gamma$  uyarısı ile aktive olan makrofajlar, ikincil bir enfeksiyona karşı doğal bağışıklığı desteklemektedir (26). Bu heterolog lenfosit yanıtı önce deneysel hayvan çalışmaları daha sonra da insanlarda non-spesifik bakteriyel patojenlerin algılanması üzerine periferik kan mononükleer hücreleri (PMKH) tarafından IFN- $\gamma$  üretiminin artırıldığını bildiren çalışmalarla gösterilmiştir (27). BCG heterolog bağışıklığın yanı sıra doğal bağışıklıkta etkin rol oynayan hücrelerin uyarımıyla gelişen eğitilmiş bağışıklık sayesinde hafıza özelliği de kazanmaktadır (28).

Nötrofiller, doğal öldürücü hücre (NK) ve monositler/makrofajlar doğal bağışıklık belleğinin efektör hücreleridir (29). Nötrofiller kısa ömürlü olduklarından immünolojik belleğe katkıları monositler ve NK hücrelerine kıyasla daha azdır (29). NK bellek hücreleri viral enfeksiyonlarda, T/B lenfositlerinden bağımsız şekilde konak immün yanıtında etkin görev almaktadır (29). BCG aşısı tarafından uyarılan eğitilmiş bağışıklık, monositler ve makrofajlar tarafından üretilen sitokin tümör nekrozis faktör (TNF), interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), reaktif oksijen radikalleri (ROS), antimikrobiyal proteazların daha etkili salınımı ve nötrofiller tarafından patojenin öldürülmesini sağlamaktadır (30).

Batı Afrika, Hindistan ve Haiti’de yapılan birkaç randomize çalışmada BCG aşısının neonatal sepsis ve çeşitli üst solunum yolu enfeksiyonlarını önleyerek yenidoğan ölümlerini azalttığı bildirilmiştir (31,32). BCG ayrıca kutanöz leishmaniasis ve sıtma dahil üzere protozoan enfeksiyonlara karşı spesifik olmayan koruyucu etkilere sahiptir ve hayvan modellerinde çeşitli bakteri gruplarına

(*Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella enteritidis*) ve viral enfeksiyonlara karşı koruma sağlamıştır (33-36). BCG aşısı bulaşıcı hastalıklar üzerindeki etkisine ek olarak, insanlarda mesane kanseri tedavisinde immünomodülatör ve yaygın genital siğiller için topikal tedavide immünoterapi ajanı olarak güçlü non-spesifik etki göstermekte ve farelerde deri altına uygulanarak tümörlerin büyümesini azaltmaktadır (37-40).

### Heterolog T-hücresi Bağışıklığı

T-hücresi bağışıklığı, T-hücresi reseptörlerinin (THR), “Majör histokompatibilite kompleksi’ne” bağlı antijen sunan hücreler (ASH) tarafından sunulan bir antijenle etkileşimi yoluyla çalışmaktadır (41). T-hücresinin ASH ile etkileşimi spesifiktir ve bu etkileşim bellek T-hücresinin üretimine yol açmaktadır (41). BCG aşısındaki antijenlerin epitoplarının ilk etkileşimi sırasında üretilen bellek T-hücresi, non-spesifik antijenlerle çapraz reaksiyona girer (41). BCG ile aşılanmış gönüllü deneklerden izole edilmiş PKMH’lerin, TB dışı patojenler ve “Toll Like Reseptör” ligandları ile stimülasyonu uzun süreli bir heterolog T-helper 1 (Th1) ve Th17 cevabı oluşmaktadır (41). Böylece IFN- $\gamma$  ve TNF gibi sitokinlerin salınımı non-spesifik patojenin daha hızlı temizlenmesine yardımcı olur (41). Epitoplardaki yapısal benzerlik, çapraz reaktif T-hücre yanıtlarında rol oynamakta, THR farklı epitop yapısında birden fazla ligandı tanımaktadır (42). Çapraz reaktivitenin temelini aminoasitlerin biyokimyasal benzerliği ve dizilimine bağlı olduğu gösterilmiş ve bu da görünüşteki farklı T-hücresi epitoplarının aslında biyokimyasal olarak beklenenden çok daha benzer olduğunu göstermiştir (42). Çapraz koruma da birincil patojene karşı gelişen edinsel immünite sayesinde IFN- $\gamma$  gibi sitokinlerin salınımı ikincil bir patojene karşı etkin doğal konak savunmasına aracılık etmektedir (43). *In vitro* ortamda, Epstein-Barr virüsüne özgü insan T-lenfositlerinin, influenza A epitopları ile çapraz reaksiyona girebildiğinden, bunun yanı sıra hepatit C ve insan immün yetmezlik virüsü ile insan koronavirüsü ve *M. tuberculosis* arasında çapraz reaktivasyon geliştiği bildirilmiştir (41). Ancak bu tür çapraz reaksiyonların immüнопatolojiye yol açabileceği de bildirilmiştir (44). Hepatit C enfeksiyonu olan hastalarda, influenza nöraminidaz antijeni ile çapraz reaksiyona giren CD8<sup>+</sup> T-hücresi yanıtlarının şiddetli hepatite yol açtığı bildirilmiştir (44). Sonuçta, çapraz reaktif T-hücre yanıtlarını karakterize etme aşılardan tasarlanmasında, aşı stratejilerinin belirlenmesinde ve hatta belki de enfeksiyondan sonra hastalığın sonucunu tahmin etmede faydalı olabilir (44). BCG ve *M. tuberculosis*’in 4.000’den fazla epitop spektrumu olsa da BCG epitoplarının tüm patojenlerle paylaşılması zor bir

ihtimal gibi görünmekte, bu nedenle bellek T-hücrelerinin aktivasyon kaynağını bulmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (24).

### Eğitilmiş Bağışıklık

“Eğitilmiş bağışıklık” terimi, aşılarda doğal bağışık yanıt üzerindeki güçlendirici etkilerini tanımlamaktadır (27). Heterolog bağışıklığın gelişmesi birkaç hafta sürer ve birçok çalışmada bildirilen perinatal mortalitedeki hızlı düşüş, BCG aşısı uygulamasının non-spesifik etkisine bağlı olarak bağışıklık hücrelerinin uyarılma mekanizmasıyla açıklanmıştır (45). Dendritik hücreler, monositler ve NK hücreleri eğitilmiş bağışıklığın non-spesifik bellek hücreleri olarak kalmaktadır ve T/B hücreleri yanıtlarından bağımsız olarak non-spesifik ikincil enfeksiyonlara karşı koruma sağlamaktadırlar (46). Non-spesifik etkinin olası mekanizmalarını ortaya çıkarmak için *in vivo* çalışmaların çoğunda BCG kullanılmıştır (27). BCG aracılı etkilerin edinsel immüniteden bağımsız olup olmadığını test etmek için, B ve T-hücrelerinden yoksun şiddetli kombine immün yetmezliği olan fareler (BCG ile aşılanan ve aşılanmayan kontrol grubu) *Candida albicans* ile enfekte edildiğinde, BCG aşıları farelerin kontrol grubu farelere kıyasla daha düşük mortalite gösterdiği bildirilmiştir. BCG ile aşılanmış farelerde, aşılamadan bir ay sonra monositöz, pro-enflamatuvar sitokin artışı ve patern tanıma reseptörlerinin ekspresyonunda artış gözlenmiştir (27). Bu farelerin, monositlerinde pro-enflamatuvar sitokin genlerinin artan transkripsiyonuyla bağlantılı, promotör bölgesinde bir epigenetik yeniden programlama mekanizması olan lizin 4'te histon 3'ün (H3K4) metilasyonunu artırmıştır (27).

BCG ile aşılanmış bireylerden izole edilen PKMH'lerin *in vitro* ortamda *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* gibi herhangi bir patojenle uyarılması durumunda bu hücrelerden salınan pro-enflamatuvar sitokin (TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ ) miktarlarının arttığı bildirilmiştir (27). BCG aşısının insan monositleri üzerindeki etkisinin en az 3 ay sürdüğü ve aşılamadan sonra bir yıla kadar bazı koruyucu etkileri ve sonrasında lipopolisakkarit ile indüklenen TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  üretiminin, aşılama öncesi seviyelere kıyasla önemli ölçüde yüksek kaldığı gözlenmiştir (47). BCG ile aşılama T ve B-hücrelerinde olduğu gibi monositler veya makrofajların da heterolog etkilerinde rol oynamaktadır (48).

BCG aşısının *Brucella melitensis* enfeksiyonuna *in vitro* etkisini inceleyen bir çalışmada aşılanmış hayvanlarda bakteri temizlenmesi ve hücre sağkalımının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (46). BCG aşısının monosit veya makrofajların fonksiyonlarını nasıl etkilediği, fagositozun yanı sıra ROS üretimi ve hücre içi öldürme ya da toksisitesi yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (49). 1959'da BCG ile aşılanmış farelerde yapılan çalışmada *Salmonella enteritidis* enfeksiyonuna karşı direnç ile

fagositik fonksiyonlar arasında bir ilişki bulunduğu BCG ile aşılanmış hayvanlardaki makrofajların daha aktif ve lizozomal yapılarla dolu oldukları gözlemlenmiştir (26). BCG ile aşılanmış farelerin makrofaj aktivitesinin, aşılanmamış farelerin makrofajlarına kıyasla daha yüksek hücre içi öldürme kapasitesine sahip olduğu bu fonksiyonun da non-spesifik uyarımla artan ROS üretimi sayesinde olduğu ortaya konmuştur (26,49).

BCG aşısının NK hücreleri üzerinden heterolog bağışıklıktaki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada saflaştırılmış NK hücrelerinin, aşılamadan sonra non-spesifik bakteri ve mantar patojenlerine karşı daha yüksek miktarda pro-enflamatuvar sitokin ürettiği tespit edilmiştir (50,51). BCG'nin mesane kanseri üzerindeki etkisi, NK hücre fonksiyonlarına bağlıdır ve bu nedenle NK eksikliği olan farelerde BCG aşısı immünoterapötik etki göstermemektedir (50,51). Yenidoğanlarda BCG aşısının non-spesifik etkileri özellikle solunum yolu enfeksiyonlarına ve sepsise karşı gözlenmektedir (52,53). BCG ile aşılanmış düşük doğum ağırlıklı yenidoğanlarda hem çok düşük hem de yüksek sitokin üretimi, yüksek bebek ölüm oranı ile ilişkilendirilmiştir (54). Bu bulguların tümü, BCG'nin belirli mikroorganizmalara veya hastalık türlerine karşı korumadaki özgülüne ve BCG aşılamadan sonra bağışıklık tepkilerinde şimdiye kadar açıklanamayan bir değişkenliği işaret etmektedir (55).

### Doğal Bağışıklıkla İlgili Mekanizmalar

Mekanizma olarak, eğitilmiş bağışıklığın metabolik, immünolojik ve epigenetik olmak üzere üç ayırt edici özelliği vardır; oksidatif fosforilasyondan aerobik glikolize doğru metabolik geçiş, doğal bağışıklık hücrelerini epigenetik olarak etkilemektedir ve TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$  gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin ve ikinci bir uyarı üzerine ROS üretimini ve salınımını uyarılmaktadır (56). Bu özellikleri ile, eğitilmiş bağışıklığın da edinsel bağışıklık gibi bellek özelliği gösterdiği belirlenmiştir (57). Bir dizi patojene karşı BCG aşısının koruyucu etkilerini gösteren hayvan deneyleri, kemik iliği içindeki hematopoietik kök hücre düzeyindeki miyeloid hücre farklılaşmasının indüklenmesine işaret etmekte ve aynı zamanda insan deneyleri için de gerekçe sağlamaktadır (57,58). Cirovic ve ark. (59) bir insan *in vivo* aşılama modeli kullanarak, sağlıklı bireylerde BCG aşısının doğal bağışıklığı ve CD14<sup>+</sup> monositlerindeki epigenetik değişiklikleri indüklediğini bildirmiştir.

### Gelişmiş Aşı Yanıtları

Doğumda uygulanan BCG aşısının antijen sunan hücreler tarafından uyarılan T-lenfosit aktivasyonu ve bellek hücreleri aracılığıyla pnömokok, hepatit B aşılara ve tetanoz toksoidlerine yanıt olarak sitokinleri artırdığı

bildirilmiştir (60). Yetişkinlerde BCG aşısının etkisini belirlemek için planlanan randomize kontrollü çalışmada, BCG bağışıklamasından 14 gün sonra influenza aşısı uygulanmış ve BCG ile aşılanmış deneklerin, plasebo alan gruba kıyasla H1N1/09 aşı suşuna karşı hemaglutininin inhibisyon antikor yanıtlarını belirgin şekilde artırdığı ve kalıcı IL-1 $\beta$  yanıtı (Th1 aktivasyonunun bir belirteci) olduğu gözlemlenmiştir (60,61).

BCG'nin sıtma üzerinde non-spesifik koruma sağladığı klinik ve deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (62). *Plasmodium berghei* ANKA suşu ile enfekte olmuş farelerin çoğunun, klinik olarak deneysel serebral malarya semptomları geliştirmeden uzun süre hayatta kaldıkları, ancak koruyucu etkinin zamanla azaldığı bildirilmiştir (62). BCG aşılanması uygulanmış farelerde deneysel serebral malarya enfeksiyonundan korunmada parazit yükünde azalma yerine beyindeki pro-enflamatuvar sitokin ve CD8<sup>+</sup> T-hücrelerin etkin olabileceği belirtilmiştir (62). Randomize kontrollü faz 1 klinik çalışmada BCG aşısı uygulamasının sağlıklı gönüllülerde sıtmaya karşı bağışıklığı indüklemesi ve koruyucu etkinliğinin değerlendirilerek NK hücresi, monosit aktivasyonunu ve parazit yükünü azalttığı bildirilmiştir (63). Fare modellerinde BCG'nin *Plasmodium yoelii* enfeksiyonlarında parazitemiyi ve mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir (64,65). BCG ile aşılanmış farelerin *P. yoelii*'ye karşı hem IgM hem de mortalite ve parazitemiye karşı koruyucu IgG2a ürettiği, aşılanmamış farelerin ise sadece IgM ürettiği gözlemlenmiştir (64). BCG uygulamasının T-hücresi uyarımı ve IFN- $\gamma$  üretimi, spesifik immün yanıt ve antikor izotip değişimi üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (64).

BCG aşısının, *M. tuberculosis* enfeksiyonuna özgü olmayan doğal bağışıklığın da içinde olduğu geniş koruyucu etkileri olduğuna dair çok sayıda epidemiyolojik çalışma vardır ve bu non-spesifik yanıtı epigenetik olarak modifiye edilmiş makrofajlar yardımı ile oluşturduğu düşünülmektedir (3,48,66). 1927 yılında yapılan bir çalışmada, doğumda BCG aşısı uygulanan İsveçli çocukların ölüm oranı aşılanmamış çocuklara göre yaklaşık üç kat daha düşük olarak bildirilmiştir (3). Mortalitedeki bu azalmanın TB enfeksiyonun önlenmesiyle açıklanamayacağı ve BCG'nin sağladığı non-spesifik immüniteden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (3). Batı Afrika'da, ölüm oranının yüksek olduğu bir bölgede BCG aşı izi ve tüberkülin reaksiyonu pozitif çocukların daha yüksek oranda hayatta kalma oranları BCG aşısı ile ilişkilendirilmiştir (67). Gine-Bissau'da BCG aşısına bağlı yenidoğan ölümlerinde genel bir azalma rapor edilmiş ve bunun nedeninin daha az yenidoğan sepsisi, solunum yolu enfeksiyonu ve ateş olgusu olduğu bildirilmiştir (53). BCG'nin doğal immün hafıza ve heterolog lenfosit aktivasyonun indüksiyonu ile sitokin üretimi, makrofaj

aktivitesi, T-hücre aktivasyonu ve antikor titrelerinin artmasını sağlayarak herpes ve influenza virüsleri dahil olmak üzere çeşitli DNA ve RNA virüslerine karşı koruma sağladığı farelerde yapılan deneysel çalışmalar ile bildirilmiştir (36).

Neonatal dönemde BCG aşısı uygulanmış veya gecikmiş çocukluk çağı BCG aşısının uygulandığı randomize bir çalışmada, BCG ile aşılanmış yenidoğanlarda mortalitenin azaldığı, neonatal sepsis, solunum yolu enfeksiyonları ve ateşin önlendiği bildirilmiştir (68,55). Ancak Hindistan'da 2 kg altındaki yenidoğanlarda yapılan randomize kontrollü bir çalışmada BCG (rus suşu) ile aşılanmanın mortalite oranına etki etmediği yönünde bulgular elde edilmiştir (69). Bu durumun kullanılan aşı suşuyla ilgili olabileceği düşünülmektedir. Yapılan bir olgu kontrol çalışmasında küçük çocuklarda BCG aşılamasının spesifik olarak respiratuvar sinsitiyal virüs (RSV) enfeksiyonu insidansı üzerindeki etkisi araştırılmış ve BCG aşılamasının RSV'nin neden olduğu akut alt solunum yolu enfeksiyonu insidansını azaltabileceğini göstermiştir (69). Buna benzer bir etkinin görüldüğü bir başka çalışmada BCG'nin akut üst solunum yolu enfeksiyonu insidansı üzerindeki etkisini incelemek için yaşlı bireyler art arda üç ay boyunca ayda bir kez aşılanmıştır. Bu çalışmada, BCG aşılaması ile plaseboya kıyasla solunum yolu enfeksiyonlarında anlamlı bir azalma bildirilmiştir (70).

Japonya'da BCG aşısının etkisinin araştırıldığı çalışmada, BCG'nin tüberkülin negatif yaşlı bireylerde pnömoni riskini artırdığı tüberkülin pozitiflerde ise riski azalttığı gözlemlenmiştir (36). Güney Afrika'daki adolesan dönem bireylerle yapılan çalışmada BCG aşılamasıyla solunum yolu enfeksiyonlarında neredeyse üç kat azalma olduğu bildirilmiştir (36). BCG'nin enfeksiyonlara karşı profilaktik koruma sağlamanın yanı sıra, virüsle ilişkili bazı klinik durumlarda immünoterapi ajanı olarak da etkili olduğu bildirilmiştir. Örneğin, insan papilloma virüsünün (HPV) neden olduğu deri ve genital siğillere karşı BCG uygulanması CD4<sup>+</sup> lenfositlerinin aktivasyonu, TNF- $\alpha$  artışına ve dolayısıyla HPV'nin gen transkripsiyonunun azalmasına yol açmaktadır (71). Yaygın siğilleri nedeniyle topikal BCG ile tedavi edilen çocukların %65'inde olumlu etkiler görülmüştür. Benzer şekilde, Hindistan'da 4 haftalık aralıklarla üç doz BCG'den sonra viral siğillerde %48.5 veya tek doz BCG'den sonra %28.6 oranında tam bir temizlenme sağlandığı bildirilmiştir (72,73).

Influenza A virüsü akciğer epiteli hücrelerinde enfeksiyona neden olur ve enfeksiyonu takiben bu hücreler apoptotik-nekrotik hale gelip aşırı enflamasyonu ve sitokin fırtınasını tetikler (47). Alveolar makrofajlar, apoptotik hücreleri efferositoz adı verilen bir süreçle sindirerek akciğer iltihabını azaltmaktadır (74). Farelerde yapılan çalışmalarda intranazal BCG immünizasyonunun alveolar

fagositer efferositozunu artırdığı ve ölümcül influenza A virüsü pnömonisine karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (74). İntranazal BCG uygulanmasından iki gün sonra öldürücü dozda influenza A ile enfekte edilmiş önceden BCG aşısı olan tüm farelerin, kontrol grubuna göre sağkalımının anlamlı düzeyde yüksek olduğu bildirilmiştir (74,75). DSÖ'nün bir meta-analiz çalışmasında, BCG aşısının tüm nedenlere bağlı bebek ölümlerini %30 azalttığı tespit edilmiştir. Buna karşılık, Hindistan'da yakın zamanda yapılan iki randomize kontrollü çalışmada ise yenidoğan BCG aşısının bebek ölümleri üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı yönünde bulgular elde edilmiştir. Ancak bu, BCG'nin farklı bir suşunun kullanılmasıyla açıklanmıştır (24,72,76-78).

SARS-CoV-2 pandemisi başlangıcında BCG'nin koronavirüs hastalığı -2019'a (COVID-19) karşı etkinliği gündeme gelmiş ve rutin BCG bağışıklamasının yüksek düzeyde olduğu gelişmekte olan ülkelere COVID-19 ile ilişkili ölüm oranının düşük düzeyde olduğu bildirilmiştir (79). Virjinya'da yapılan bir araştırmada BCG aşı indeksi ve COVID-19'dan ölümler arasında önemli bir ters korelasyon olduğu, BCG indeksindeki her %10'luk artışın, COVID-19 mortalitesinde %10.4'lük bir azalmayla ilişkili bulunduğu bildirilmiştir (79). BCG aşısının erken dönemde rutin olarak yapıldığı Almanya ve İskandinav ülkelerinin aksine, Fransa ve İngiltere'deki yüksek ölüm oranları muhtemelen BCG aşılama oranının daha büyük çocuklara uygulanmasından kaynaklanmaktadır. İngiltere ve Fransa'da BCG aşısının bebeklikte uygulandığı gruplarda eğitimli bağışıklığın gözlemlendiği fakat aşının 12-13 yaş çocuklara uygulandığında bu bağışıklığın sağlanmadığı veya daha kısa sürebileceği düşünülmektedir (80). BCG aşısı uygulaması olmayan veya kesintiye uğramış ülkelere kıyasla daha güçlü BCG aşılama politikasına sahip ülkelerin, COVID-19 mortalite oranlarının daha düşük olduğu bildirilmiştir (80). Hollanda'da sağlık çalışanlarında BCG veya plasebo uygulaması yapılan araştırma ve Avustralya'da devam eden randomize klinik araştırmalar, yetişkinlerde BCG aşısının COVID-19'a karşı ne ölçüde koruma sağladığı konusunda bilgi verecektir (81,82). BCG güvenilir ve iyi tolere edilen bir aşı olmasına rağmen canlı atenüe bir aşı olduğundan bağışıklığı baskılanmış yaşlı kişilerde kontrendikedir (83). Bu nedenle bu kişilere BCG uygulanırken çok dikkatli olunmalıdır. Bu gruplarda BCG uygulamasının güvenilirliği hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır (83). TB insidansı, BCG uygulanması ve COVID-19 insidansı hakkındaki (174 ülkeye ait) verilerin değerlendirdiği çalışmada düşük TB insidansı ve düşük BCG uygulaması olan ülkelere COVID-19 insidansının yüksek, TB insidansı ve rutin BCG bağışıklamasının yüksek düzeyde olduğu ülkelere COVID-19 enfeksiyon oranları ve ölüm oranlarının çok daha düşük olduğu bildirilmiştir.

Vektör olarak rekombinant BCG (rBCG) suşlarının kullanımı T-hücre cevabını artırmak ve viral temizlenmeyi kolaylaştırmak için denenmiştir (8). Bu teknoloji immünojenik bir antijeni kodlayan DNA parçasının *M. bovis*'e yerleştirilmesini ve antijenin bu hücrelerde eksprese edilmesini sağlamaktadır (24). BCG'nin heterolog antijenler için vektör olarak kullanılması, adjuvan aktivitesi, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi ASH'ler içinde replike olma kapasitesinden kaynaklanmaktadır. SARS-CoV-2 spike proteininin dahil edildiği bir rBCG aşısı, spike proteinine karşı spesifik bağışıklığı indükleyerek bağışıklığı artırma potansiyeline sahip olabileceği gibi bağışıklığın fazla uyarılmasının olumsuz etkileri de gözlenebilmektedir (24).

Bu yıl 100. doğum gününü kutladığımız BCG aşısı, TB ve özellikle TB menenjit, miliyer TB gibi TB'nin şiddetli formlarını önlemesi, antimikrobiyal bağışıklığı indüklemesi nedeniyle geçen yüzyılda milyonlarca hayatı kurtarmıştır. Geçtiğimiz on yılda bulaşıcı olan ve olmayan hastalıklar üzerindeki non-spesifik faydalı etkilerinin moleküler mekanizmaları çözümlenmiştir. BCG uyarımıyla üretilen bellek T-hücrelerinin non-spesifik antijenlerle çapraz reaksiyonu heterolog Th1, Th17 cevabı ve IFN- $\gamma$ , TNF gibi sitokinlerin salınımıyla non-spesifik patojenin daha hızlı temizlenmesine yardımcı olduğu ortaya konmuştur. BCG tarafından uyarılan doğal bağışıklığın, TNF, IL-1, IL-6, ROS ve antimikrobiyal proteazlar aracılığıyla patojenlerin öldürülmesine katkı sağlayarak eğitilmiş bağışıklığı oluşturduğu kanıtlanmıştır. BCG'nin, bulaşıcı hastalıklar üzerindeki non-spesifik/ TB dışı etkisine ek olarak, insanlarda mesane kanseri tedavisinde immünomodülatör olarak, yaygın genital siğiller için topikal tedavide immünoterapi ajanı olarak kullanılmaktadır.

DSÖ raporuna göre; 2019 yılında yaklaşık 10 milyon yeni TB olgusu olduğu ve 1,5 milyon insanın TB nedeniyle öldüğü tahmin edilmektedir (84). DSÖ'ye göre 2030 TB eliminasyonu hedeflerine ulaşılabilmesi için morbiditenin %90 ve mortalitenin %95.14 azaltılması gerekmektedir. Ağustos 2020 itibarıyla 14 TB aşısı adayından, ikisinin faz 3 aşamasına geçtiği bildirilmiştir (84). COVID-19 aşılıları için 8.5 milyar dolar ayrılırken dünyada en çok görülen ve en çok öldüren enfeksiyon hastalığı olan TB için 0.117 milyar dolar bütçe ayrılmıştır. Dünyada TB'nin devam eden yükü göz önüne alındığında, aşının 100. yıl dönümü bir kutlama nedeni olmaktan çok, ağırlıklı olarak yoksulları etkileyen hastalıkların ihmal edildiğini çarpıcı biçimde ortaya koymaktadır. TB eliminasyonu hedeflerine ulaşabilmek için etkinliği yüksek TB aşısı araştırmalarının yeniden canlandırılması gerekmektedir.

**Hakem Değerlendirmesi:** Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

### Yazarlık Katkıları

Konsept: G.A., D.A., Dizayn: G.A., D.A., Veri Toplama veya İşleme: G.A., D.A., Analiz veya Yorumlama: G.A., D.A., Literatür Tarama: G.A., D.A., Yazan: G.A., D.A.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar makalenin içeriği ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

**Finansal Destek:** Yazarlar herhangi bir yerden finansal destek almamışlardır.

### Kaynaklar

- McShane H. Tuberculosis Vaccines: Beyond Bacille Calmette-Guerin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011;366:2782-9.
- Ottenhoff THM, Kaufmann SHE. Vaccines against Tuberculosis: Where Are We and Where Do We Need to Go? *PLoS Pathog.* 2012;8:e1002607.
- Lobo N, Brooks NA, Zlotta AR, Cirillo JD, Boorjian S, Black PC, et al. 100 years of Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy: from cattle to COVID-19. *Nat Rev Urol.* 2021;18:611-22.
- Covián C, Retamal-Díaz A, Bueno SM, Kalergis AM. Could BCG vaccination induce protective trained immunity for SARS-CoV-2? *Front Immunol.* 2020;11:970.
- Fuge O, Vasdev N, Allchorne P, Green JS. Immunotherapy for bladder cancer. *Res Rep Urol.* 2015;7:65-79.
- Kühtreiber WM, Tran L, Kim T, Dybala M, Nguyen B, Plager S, et al. Long-term reduction in hyperglycemia in advanced type 1 diabetes: the value of induced aerobic glycolysis with BCG vaccinations. *NPJ Vaccines.* 2018;3:23.
- Kaufmann SH, Winau F. From bacteriology to immunology: the dualism of specificity. *Nat Immunol.* 2005;6:1063-6.
- Lange C, Aaby P, Behr MA, Donald PR, Kaufmann SHE, Netea MG, et al. 100 years of Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin. *Lancet Infect Dis.* 2021;7:1473-3099.
- Luca S, Mihaescua T. History of BCG Vaccine. *Maedica (Bucur).* 2013;8:53-8.
- Lange B. Nouvelles recherche sur les causes des accidents de Lubeck. *Rev Tuberc Extrait.* 1931;12:1142-70.
- Calmette A. Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. *Proc R Soc Med.* 1931;24:1481-90.
- Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA. Vaccines in development and New Vaccine Strategies. *Vaccines.* Edinburg. Philadelphia Elsevier Saunders. 2013:1008-17.
- Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis. *J Bacteriol.* 1996;178:1274-82.
- Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;27:5596-601.
- Ritz N, Curtis N. Mapping the global use of different BCG vaccine strains. *Tuberculosis (Edinb).* 2009;89:248-51.
- Messing EM. The BCG Shortage. *Bladder Cancer.* 2017;27:227-8.
- Muthamilarsan M, Prasad M. Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *J Biosci.* 2013;38:433-49.
- Rodrigues J, Brayner FA, Alves LC, Dixit R, Barillas-Mury C. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in Anopheles gambiae mosquitoes. *Science.* 2010;10:1353-5.
- Mulder WJM, Ochando J, Joosten LAB, Fayad ZA, Netea MG. Therapeutic targeting of trained immunity. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18:553-66.
- Netea MG, Latz E, Mills KH, O'Neill LA. Innate immune memory: a paradigm shift in understanding host defense. *Nat Immunol.* 2015;16:675-9.
- Selin LK, Nahill SR, Welsh RM. Cross-reactivities in memory cytotoxic T lymphocyte recognition of heterologous viruses. *J Exp Med.* 1994;1:1933-43.
- Welsh RM, Selin LK. No one is naive: the significance of heterologous T-cell immunity. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:417-26.
- Mathurin KS, Martens GW, Kornfeld H, Welsh RM. CD4 T-cell-mediated heterologous immunity between mycobacteria and poxviruses. *J Virol.* 2009;83:3528-39.
- Parmar K, Siddiqui A, Nugent K. Bacillus Calmette-Guerin Vaccine and Nonspecific Immunity. *Am J Med Sci.* 2021;361:683-9.
- Pasteur M. An Address on Vaccination in Relation to Chicken Cholera and Splenic Fever. *Br Med J.* 1881;13:2:283-4.
- Mackanness GB. The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. *J Exp Med.* 1969;1:973-92.
- Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Joosten LA, Iffrim DC, Saeed S, et al. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;23:17537-42.
- Netea MG, Quintin J, van der Meer JW. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe.* 2011;19:355-61.
- Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature.* 2009;29:557-61.
- Moorlag SJCFM, Rodriguez-Rosales YA, Gillard J, Fanucchi S, Theunissen K, Novakovic B, et al. BCG Vaccination Induces Long-Term Functional Reprogramming of Human Neutrophils. *Cell Rep.* 2020;17:1083-7.
- Roth A, Gustafson P, Nhaga A, Djana Q, Poulsen A, Garly ML, et al. BCG vaccination scar associated with better childhood survival in Guinea-Bissau. *Int J Epidemiol.* 2005;34:540-7.
- Stensballe LG, Sørup S, Aaby P, Benn CS, Greisen G, Jeppesen DL, et al. BCG vaccination at birth and early childhood hospitalisation: a randomised clinical multicentre trial. *Arch Dis Child.* 2017;102:224-31.
- Dos Santos JC, Silva MVT, Ribeiro-Dias F, Joosten LAB. Non-specific effects of BCG in protozoal infections: tegumentary leishmaniasis and malaria. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25:1479-83.
- Fox AE, Evans GL, Turner FJ, Schwartz BS, Blaustein A. Stimulation of nonspecific resistance to infection by a crude cell wall preparation from Mycobacterium phlei. *J Bacteriol.* 1966;92:1-5.
- Weiss DW, Bonhag RS, Parks JA. Studies On The Heterologous Immunogenicity Of A Methanol-Insoluble Fraction Of Attenuated Tubercle Bacilli (BCG). I. Antimicrobial Protection. *J Exp Med.* 1964;1:53-70.
- Moorlag SJCFM, Arts RJW, van Crevel R, Netea MG. Non-specific effects of BCG vaccine on viral infections. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25:1473-8.



37. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol*. 2002;168:1964-70.
38. Metawea B, El-Nashar AR, Kamel I, Kassem W, Shamloul R. Application of viable bacille Calmette-Guérin topically as a potential therapeutic modality in condylomata acuminata: a placebo-controlled study. *Urology*. 2005;65:247-50.
39. Jaisinghani AK, Dey VK, Suresh MS, Saxena A. Bacillus Calmette-Guerin Immunotherapy for Recurrent Multiple Warts: An Open-Label Uncontrolled Study. *Indian J Dermatol*. 2019;64:164.
40. Weiss DW, Bonhag RS, Deome Kb. Protective activity of fractions of tubercle bacilli against isologous tumours in mice. *Nature*. 1961;3:889-91.
41. Benn CS, Netea MG, Selin LK, Aaby P. A small jab - a big effect: nonspecific immunomodulation by vaccines. *Trends Immunol*. 2013;34:431-9.
42. Frankild S, de Boer RJ, Lund O, Nielsen M, Kesmir C. Amino acid similarity accounts for T cell cross-reactivity and for "holes" in the T cell repertoire. *PLoS One*. 2008;19:1831.
43. Netea MG, van Crevel R. BCG-induced protection: effects on innate immune memory. *Semin Immunol*. 2014;26:512-7.
44. Urbani S, Amadei B, Fiscaro P, Pilli M, Missale G, Bertoletti A, et al. Heterologous T cell immunity in severe hepatitis C virus infection. *J Exp Med*. 2005;7:675-80.
45. Arts RJW, Carvalho A, La Rocca C, Palma C, Rodrigues F, Silvestre R, et al. Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity. *Cell Rep*. 2016;6:2562-71.
46. Kleinnijenhuis J, van Crevel R, Netea MG. Trained immunity: consequences for the heterologous effects of BCG vaccination. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2015;109:29-35.
47. Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Benn CS, Joosten LA, Jacobs C, et al. Long-lasting effects of BCG vaccination on both heterologous Th1/Th17 responses and innate trained immunity. *J Innate Immun*. 2014;6:152-8.
48. Sakuma T, Suenaga T, Yoshida I, Azuma M. Mechanisms of enhanced resistance of Mycobacterium bovis BCG-treated mice to ectromelia virus infection. *Infect Immun*. 1983;42:567-73.
49. Howard JG, Biozzi G, Halpern BN, Stiffel C, Mouton D. The effect of Mycobacterium tuberculosis (BCG) infection on the resistance of mice to bacterial endotoxin and Salmonella enteritidis infection. *Br J Exp Pathol*. 1959;40:281-90.
50. Chiesa MD, Marcenaro E, Sivori S, Carlomagno S, Pesce S, Moretta A. Human NK cell response to pathogens. *Semin Immunol*. 2014;26:152-60.
51. Brandau S, Riemensberger J, Jacobsen M, Kemp D, Zhao W, Zhao X, et al. NK cells are essential for effective BCG immunotherapy. *Int J Cancer*. 2001;1:697-702.
52. Aaby P, Roth A, Ravn H, Napirna BM, Rodrigues A, Lisse IM, et al. Randomized trial of BCG vaccination at birth to low-birth-weight children: beneficial nonspecific effects in the neonatal period? *J Infect Dis*. 2011;15:245-52.
53. Biering-Sørensen S, Aaby P, Lund N, Monteiro I, Jensen KJ, Eriksen HB, et al. Early BCG-Denmark and Neonatal Mortality Among Infants Weighing <2500 g: A Randomized Controlled Trial. *Clin Infect Dis*. 2017;1:1183-90.
54. Andersen A, Jensen KJ, Erikstrup C, Ravn H, Fisker AB, Lisse IM, et al. Both very low- and very high in vitro cytokine responses were associated with infant death in low-birth-weight children from Guinea Bissau. *PLoS One*. 2014;8:9.
55. de Bree LCJ, Koeken VACM, Joosten LAB, Aaby P, Benn CS, van Crevel R, et al. Non-specific effects of vaccines: Current evidence and potential implications. *Semin Immunol*. 2018;39:35-43.
56. Sánchez-Ramón S, Conejero L, Netea MG, Sancho D, Palomares Ó, Subiza JL. Trained Immunity-Based Vaccines: A New Paradigm for the Development of Broad-Spectrum Anti-infectious Formulations. *Front Immunol*. 2018;17:9.
57. Freyne B, Marchant A, Curtis N. BCG-associated heterologous immunity, a historical perspective: intervention studies in animal models of infectious diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2015;109:52-61.
58. Mitroulis I, Ruppova K, Wang B, Chen LS, Grzybek M, Grinenko T, et al. Modulation of Myelopoiesis Progenitors Is an Integral Component of Trained Immunity. *Cell*. 2018;11:172:147-61.
59. Cirovic B, de Bree LCJ, Groh L, Blok BA, Chan J, van der Velden WJFM, et al. BCG Vaccination in Humans Elicits Trained Immunity via the Hematopoietic Progenitor Compartment. *Cell Host Microbe*. 2020;12:322-34.
60. Ritz N, Mui M, Balloch A, Curtis N. Non-specific effect of Bacille Calmette-Guérin vaccine on the immune response to routine immunisations. *Vaccine*. 2013;26:3098-103.
61. Blok BA, Arts RJW, van Crevel R, Aaby P, Joosten LAB, Benn CS, et al. Differential effects of BCG vaccine on immune responses induced by vi polysaccharide typhoid fever vaccination: an explorative randomized trial. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39:1177-84.
62. Witschkowski J, Behrends J, Frank R, Eggers L, von Borstel L, Hertz D, et al. BCG Provides Short-Term Protection from Experimental Cerebral Malaria in Mice. *Vaccines (Basel)*. 2020;9:745.
63. Walk J, de Bree LCJ, Graumans W, Stoter R, van Gemert GJ, van de Vegte-Bolmer M, et al. Outcomes of controlled human malaria infection after BCG vaccination. *Nat Commun*. 2019;20:874.
64. Matsumoto S, Yukitake H, Kanbara H, Yamada H, Kitamura A, Yamada T. Mycobacterium bovis bacillus calmette-guérin induces protective immunity against infection by Plasmodium yoelii at blood-stage depending on shifting immunity toward Th1 type and inducing protective IgG2a after the parasite infection. *Vaccine*. 2000;22:779-87.
65. Parra M, Liu X, Derrick SC, Yang A, Tian J, Kolibab K, et al. Molecular analysis of non-specific protection against murine malaria induced by BCG vaccination. *PLoS One*. 2013;4:e66115.
66. Kaufmann E, Sanz J, Dunn JL, Khan N, Mendonça LE, Pacis A, et al. BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell*. 2018;11:176-90.
67. Garly ML, Martins CL, Balé C, Baldé MA, Hedegaard KL, Gustafson P, et al. BCG scar and positive tuberculin reaction associated with reduced child mortality in West Africa. A non-specific beneficial effect of BCG? *Vaccine*. 2003;20:2782-90.
68. Stensballe LG, Nante E, Jensen IP, Kofoed PE, Poulsen A, Jensen H, et al. Acute lower respiratory tract infections and respiratory syncytial virus in infants in Guinea-Bissau: a beneficial effect of BCG vaccination for girls community based case-control study. *Vaccine*. 2005;26:1251-7.
69. Jayaraman K, Adhisivam B, Nallasivan S, Krishnan RG, Kamalarathnam C, Bharathi M, et al. Two Randomized Trials

- of the Effect of the Russian Strain of Bacillus Calmette-Guérin Alone or With Oral Polio Vaccine on Neonatal Mortality in Infants Weighing <2000 g in India. *Pediatr Infect Dis J.* 2019;38:198-202.
70. Wardhana, Datau EA, Sultana A, Mandang VV, Jim E. The efficacy of Bacillus Calmette-Guerin vaccinations for the prevention of acute upper respiratory tract infection in the elderly. *Acta Med Indones.* 2011;43:185-90.
  71. Salem A, Nofal A, Hosny D. Treatment of common and plane warts in children with topical viable Bacillus Calmette-Guerin. *Pediatr Dermatol.* 2013;30:60-3.
  72. Podder I, Bhattacharya S, Mishra V, Sarkar TK, Chandra S, Sil A, et al. Immunotherapy in viral warts with intradermal Bacillus Calmette-Guerin vaccine versus intradermal tuberculin purified protein derivative: A double-blind, randomized controlled trial comparing effectiveness and safety in a tertiary care center in Eastern India. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2017;83:411.
  73. Daulatabad D, Pandhi D, Singal A. BCG vaccine for immunotherapy in warts: is it really safe in a tuberculosis endemic area? *Dermatol Ther.* 2016;29:168-72.
  74. Mukherjee S, Subramaniam R, Chen H, Smith A, Keshava S, Shams H. Boosting efferocytosis in alveolar space using BCG vaccine to protect host against influenza pneumonia. *PLoS One.* 2017;7:12-7.
  75. Cayabyab MJ, Hovav AH, Hsu T, Krivulka GR, Lifton MA, Gorgone DA, et al. Generation of CD8+ T-cell responses by a recombinant nonpathogenic Mycobacterium smegmatis vaccine vector expressing human immunodeficiency virus type 1 Env. *J Virol.* 2006;80:1645-52.
  76. Bueno SM, González PA, Cautivo KM, Mora JE, Leiva ED, Tobar HE, et al. Protective T cell immunity against respiratory syncytial virus is efficiently induced by recombinant BCG. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;30:20822-7.
  77. Higgins JP, Soares-Weiser K, López-López JA, Kakourou A, Chaplin K, Christensen H, et al. Association of BCG, DTP, and measles containing vaccines with childhood mortality: systematic review. *BMJ.* 2016;13:355.
  78. Curtis N. BCG Vaccination and All-Cause Neonatal Mortality. *Pediatr Infect Dis J.* 2019;38:195-7.
  79. Does BCG vaccination protect against acute respiratory infections and COVID-19? 2020. A rapid review of current evidence. Available at: <https://www.cebm.net/covid-19/does-bcg-vaccination-protect-against-acute-respiratory-infections-and-covid-19-a-rapid-review-of-current-evidence/>. Accessed on 2 Aug 2020.
  80. Escobar LE, Molina-Cruz A, Barillas-Mury C. BCG vaccine protection from severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;28:17720-6.
  81. US National Library of Medicine, Reducing health care workers absenteeism in Covid-19 pandemic through BCG vaccine (BCG-CORONA). *ClinicalTrials.gov* (2020). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04328441>. (Last Accessed 15 April 2020).
  82. US National Library of Medicine, BCG vaccination to protect healthcare workers against COVID-19 (BRACE). *ClinicalTrials.gov* (2020). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04327206>. (Last Accessed 15 April 2020).
  83. Hesseling AC, Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Fine PE, Godfrey-Faussett P, et al. The risk of disseminated Bacille Calmette-Guerin (BCG) disease in HIV-infected children. *Vaccine.* 2007;2:14-8.
  84. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.