

IMUNOPATOLOGIA INFECTIEI TUBERCULOASE

Liliana Padureanu¹, Carmen Cozmei², E.Carasevici¹

¹Laboratorul de Imunologie si Genetica – Spitalul Universitar « Sf. Spiridon », Iasi

Disciplina de Imunologie- Facultatea de Medicina, UMF Iasi

²Institutul de Sanatate Publica Iasi

I. Introducere

II. *M. tuberculosis* - structura antigenica

III. *M. tuberculosis* - factori de virulenta si patogenitate

IV. Raspunsul imun in infectia tuberculoasa

V. Granulomul tuberculos

VI. Determinismul genetic al rezistentei fata de infectia cu *M. tuberculosis*

VII. Vaccinarea antituberculoasa - actualitati, perspective

VIII. Bibliografie

I. Introducere

In anul 1905 Robert Koch primea Premiul Nobel pentru rezultatele obtinute in domeniul cercetarii infectiei tuberculoase dupa ce, in urma cu 23 de ani, reusise sa atraga atentia lumii medicale anuntind izolarea pentru prima data a agentului etiologic al tuberculozei umane si bovine si descriind metodele de coloratie utilizate pentru evidentiarea bacteriei intracelulare, tehnica de cultivare si rezultatele inocularii bacilului la animale (1).

In ciuda faptului ca este o afectiune cunoscuta de multa vreme, tuberculoza ramine si in prezent o problema majora de sanatate publica. Previziunile optimiste din anul 1970, conform carora prin cresterea nivelului de trai tuberculoza va deveni o boala a trecutului, au fost infirmate de datele statistice ale anilor ce au urmat. In anul 1993 Organizatia Mondiala a Sanatatii (OMS) declara tuberculoza urgenta sanitara pe plan mondial in conditiile in care anual se inregistreaza aproximativ 7 milioane de cazuri noi si 1,5 milioane de decese cauzate de aceasta afectiune (6,2). Pentru anul 2015 este prevazuta o crestere a numarului cazurilor de tuberculoza pina la 10 milioane, tendinta de crestere mentinindu-se si in ceea ce priveste numarul deceselor cauzate de aceasta afectiune (26). Cresterea semnificativa a incidentei in ultimii ani este cauzata si de infectia cu virusul imunodeficientei umane (HIV)/SIDA care scade

capacitatea de aparare a organismului si amplifica, de aproximativ 30 de ori, riscul imbolnavirii in urma contactului cu *Mycobacterium tuberculosis*.

Tuberculoza umana este cauzata de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), bacterie ce apartine genului *Mycobacterium* din care fac parte mai mult de 50 de specii si care se caracterizeaza prin acidorezistenta, structura chimica a acizilor micolici si prin structura antigenica.

Din grupul *Mycobacterium tuberculosis* fac parte patru specii micobacteriene cu crestere lenta : *M. tuberculosis*- agentul etiologic al tuberculozei umane, *M. bovis*- bacilul tuberculozei bovine, *M. microti* si *M. africanum*. *M. tuberculosis* face parte din grupul bacteriilor cu dezvoltare facultativ intracelulara si “in vivo” se localizeaza exclusiv in interiorul macrofagelor (Mf) organismului gazda.

II. *M. tuberculosis* - structura antigenica

Antigenele micobacteriene sunt utilizate frecvent pentru clasificarea, identificarea si tiparea micobacteriana, iar in ceea ce priveste *M. tuberculosis* multe dintre cercetari sunt orientate spre identificarea structurilor antigenice generatoare de memorie imunologica antituberculoasa in vederea obtinerii de noi vaccinuri cu eficienta superioara vaccinului BCG utilizat in prezent.

Studiile efectuate de Robert Koch pe antigenele *M. tuberculosis* obtinute din filtratul culturilor de scurta durata au reprezentat inceputurile unor cercetari ample, care dureaza si in prezent si care incearca definirea precum si caracterizarea antigenelor micobacteriene.

Tuberculinele

Primele extracte micobacteriene folosite experimental au fost **tuberculinele** obtinute de R. Koch. Initial a fost utilizat “*Old Tuberculin* ”, un preparat obtinut prin cultivarea *M. tuberculosis* timp de citeva saptamini, filtrarea mediului de cultura si concentrarea acestuia prin evaporare, iar apoi “*New Tuberculin* ”, un preparat micobacterian obtinut prin uscare in vid si resuspensionarea bacililor tuberculosi in mixtura de apa cu glicerol. Aparitia unor reactii nespecifice, cauzate de constituentii mediului de cultura, a impus separarea antigenelor micobacteriene de impuritatile existente in “tuberculina veche” rezultind astfel “*Purified Protein Derivative*” (**PPD**),

produs utilizat si astazi pe scara larga in testele cutanate de determinare a raspunsului imun celular fata de antigenele micobacteriene (3).

Chiar daca PPD este departe de a fi preparatul ideal din cauza degradarii antigenelor (mai ales a celor cu specificitate de specie), urmare a proceselor de autoliza, incalzire si precipitare proteica, incercarile ulterioare de a imbunatati calitatea preparatului PPD prin izolarea antigenelor individuale nu au dus insa la obtinerea unui produs cu eficienta si relevanta clinica superioare.

Antigenele micobacteriene se clasifica in functie de mai multe criterii:

- in functie de localizarea lor antigenele se impart in citoplasmatic (solubile) si antigene ale peretelui celular (insolubile) ;
- in functie de structura chimica antigenele se clasifica in proteine si carbohidrati ;
- gradul de raspindire la speciile apartinand genului *Mycobacterium* reprezinta un alt criteriu de clasificare.

Antigenele solubile

Identificarea si caracterizarea antigenelor micobacteriene solubile au presupus utilizarea unor tehnici ca imunoelectroforeza (Daniel si Janiki- 1978), difuzia dubla in gel de agar (Stanford si Grange- 1974) si imunoelectroforeza incrucisata (Closs- 1980).

Antigenele solubile micobacteriene pot fi impartite in 4 grupe, in functie de raspindirea lor la nivelul speciilor apartinand genului *Mycobacterium* (3):

- (1) antigene comune tuturor micobacteriilor;
- (2) antigene ale speciilor cu crestere lenta (*M. tuberculosis*);
- (3) antigene apartinand speciilor cu crestere rapida;
- (4) antigene particulare fiecarei specii .

Aceste antigene au fost obtinute dupa indepartarea fragmentelor din peretele celular prin centrifugarea suspensiilor de lizate micobacteriene si sunt reprezentate in special de proteine citoplasmatic si secretate precum si de carbohidrati solubili.

Existenta antigenelor comune tuturor speciilor micobacteriene ar putea fi o explicatie pentru lipsa specificitatii testelor serologice de diagnosticare a tuberculozei.

Utilizarea de proteine recombinante ale *M.tuberculosis* ar putea creste gradul de specificitate al testelor serologice. Prin tehnicile imunoenzimatic (ELISA) s-a

determinat nivelul seric al anticorpilor specifici unor proteine ale *M.tuberculosis*: *proteina cu masa moleculara de 34 kDa (**MS2-34**), *proteina recombinanta cu masa moleculara de 38 kDa (**p38**) si *PPD, la pacientii cu tuberculoza comparativ cu persoane aparent sanatoase (un lot PPD+ si altul PPD-). In cazul pacientilor cu forma activa de boala, testele de masurare a anticorpilor specifici complexului antigenic **MS2-34 + p38** au avut o sensibilitate de 86% in timp ce sensibilitatea testelor de masurare a anticorpilor serici anti-PPD a fost de doar 66%. Concluzia acestui studiu a fost ca utilizarea acestei proteine (MS2-34) in asociere cu proteine recombinante creste sensibilitatea si specificitatea testelor serologice de diagnosticare a tuberculozei (4).

Imunoelectroforeza filtratelor din cultura de *M. tuberculosis* a demonstrat existenta a 11 arce de precipitare: antigenele 1,2,3 reprezentate de **arabinomanani**, **arabinogalactani** si **glucani**, prezente la majoritatea speciilor din genul *Mycobacterium* ; antigenele 6,7,8 sunt proteine cu raspindire larga in timp ce antigenul 5, o proteina cu masa moleculara de 28 500-35 000 daltoni este specifica *M. tuberculosis*.

Perfectionarea tehnicilor de clonare a ADN, dezvoltarea colectiilor genomice (*genomic library*) a permis rezolvarea dificultatilor legate de izolarea si purificarea antigenelor proteice micobacteriene si obtinerea unui numar foarte mare de antigene peptidice pure.

Desi majoritatea studiilor imunologice s-au facut cu antigene derivate din fragmentarea peretelui micobacterian, totusi, **proteinele secretate activ** de catre micobacterii sunt mult mai importante atit in ceea ce priveste raspunsul imun protector cit si pentru reactiile imunopatologice (5). Aceste proteine secretate sunt componentele preponderente si cele mai importante ale filtratului culturilor pe termen scurt de *M. tuberculosis* aflate in faza logaritmica de crestere. Pentru izolarea antigenelor secretate, micobacteriile sunt cultivate timp de citeva zile in [³⁵S]metionina dupa care antigenele din supernatantul de cultura sunt separate prin electroforeza si evidentiata apoi prin autoradiografie. Culturile mai vechi contin proteine secretate dar si multe proteine eliberate prin autoliza bacililor tuberculosi (6).

In filtratul culturii de *M. tuberculosis* se gasesc aproximativ 200 de proteine, din care mai mult de 30 de proteine secretate au fost caracterizate utilizandu-se mai multe tipuri de tehnici: purificare proteica, metode imunologice si *screening*-ul colectiilor genice ale ADN-ului *M. tuberculosis*. O alta metoda de studiere a

proteinelor secretate de *M. tuberculosis* a constat în aplicarea de tehnologii genetice bazate pe fabricarea de hibrizi din genele *M. tuberculosis* și gene raportoare (*reporter genes*) ale *Escherichia coli* ce devin active numai după translocare dincolo de membrana celulară (7).

Cu toate eforturile facute pentru definirea proteinelor secretate de *M. tuberculosis* în cultură, o mare parte din activitatea imunologică a componentelor filtratului de cultură rămâne încă neclară.

Proteinele de suprafață eliberate în mediul de cultură, ca și cele secretate activ reprezintă ținte importante ale efectorilor sistemului imun chiar de la debutul infecției tuberculoase. Acestea sunt antigenele utilizate în studii experimentale ce urmăresc obținerea de vaccinuri antituberculoase vii (tulpini BCG modificate genetic) sau pe baza de peptide sintetice care să realizeze o protecție mai eficientă împotriva infecției tuberculoase ținând cont de limitele dovedite ale vaccinării BCG (8, 9).

Proteinele secretate de *M. tuberculosis* se împart în trei grupe principale, în funcție de eliberarea lor în supernatantul de cultură. Antigenele separate prin electroforeză în gel au fost identificate prin tehnici de *western blotting* (10) :

(1) **Proteine excretate**: sunt produse în cantități mici, în primele zile după însămânțarea mediului de cultură. Deși în mediu de cultură se acumulează cantități semnificative, în bacilii intacti aceste proteine se găsesc în cantități foarte mici (urme).

(2) **Proteine secretate** : aparțin peretelui celular și sunt eliberate în cursul creșterii bacililor. Concentrația acestor antigene crește treptat pe parcursul perioadei de cultivare.

(3) **Antigene citoplasmatică**, eliberate din bacteria omorită, a căror concentrație crește brusc spre finalul fazei logaritmice de creștere (ziua a 5-a), odată cu eliberarea masivă de izocitrat dehidrogenază (indicator al autolizei).

Filtratul din cultură pe termen scurt de *M. tuberculosis* conține, spre deosebire de preparatele antigenice obișnuite (ultrasonicate, filtrate de cultură pe termen lung), cantități mari de proteine secretate. După eliminarea produsilor de autoliză, în filtratul de cultură pe termen scurt s-au descris 33 de proteine (identificate parțial cu ajutorul anticorpilor monoclonali) și a fost identificată superoxid dismutază (SOD).

Țintele cheie recunoscute specific de celulele sistemului imun specific în cursul etapelor timpurii ale infecției cu *M. tuberculosis* au fost identificate ca fiind **MPT59 (Ag85B)** și antigenul **ESAT-6** (6-kDa early secretory antigenic target).

Complexul antigenic 85 este alcatuit din trei antigene cu greutate moleculara cuprinsa intre 30-32 kDa (Ag85A, B si C) , codificate de trei gene distincte si care fac parte din categoria antigenelor localizate la nivelul peretelui celular al *M. tuberculosis* de unde sunt eliberate in mediul de cultura .

Componenta preponderenta cantitativ in mediul de cultura este **Ag85B** , cea mai bine studiata componenta a complexului si care este cunoscuta sub mai multe denumiri : antigenul α , antigenul 6, antigenul a2 si MPB-59/ MPT-59. Masa moleculara a Ag 85B este de 30 kDa si are in structura atit epitopi cu specificitate de specie cit si epitopi prezenti si in structura altor specii din genul *Mycobacterium*.

Datorita capacitatii sale de legare la fibronectina acest antigen ar putea fi implicat in recunoasterea si apoi endocitarea bacilului tuberculozei in macrofagele organismului gazda. Ag 85B functioneaza ca micoliltransferaza fapt ce confera acestuia un rol important in sinteza peretelui celular devenind astfel o tinta potentiala a chimioterapicelor antituberculoase (11).

Studii experimentale pe animale au aratat ca administrarea antigenului 85B la animale sensibilizate a determinat o reactie cutanata intensa cu specificitate superioara testarii cu PPD. Implicarea acestui antigen in generarea unui raspuns imun umoral este dovedita de sinteza de anticorpi IgG specifici a caror determinare ar putea constitui bazele unui test de serodiagnosticare a tuberculozei (12).

De asemenea, rolul important pe care il detine acest antigen in raspunsul imun antituberculos este dovedit si prin faptul ca indivizii sanatosi infectati cu *M. tuberculosis* , spre deosebire de pacientii cu forme active de tuberculoza, dezvoltă un raspuns imun celular intens fata de Ag 85 B (13). Sinteza de citokine proinflamatorii, ca interferonul γ (IFN γ) si factorul de necroza tumorală α (TNF α), este stimulata si de capacitatea acestei componente a complexului 85 de a lega fibronectina.

Localizarea sa la nivelul peretelui celular face ca aceasta structura sa functioneze ca antigen dominant recunoscut de sistemul imun al tuturor persoanelor infectate si care induce raspuns imun specific, calitati necesare unei molecule pentru a fi utilizata in structura vaccinurilor.

Celelalte componente ale complexului 85 sunt mai putin studiate pina in prezent. Ag 85A, cunoscut ca AgP32 si MPT44, este tot un antigen secretat care are capacitatea de legare la fibronectina. Masa sa moleculara este de 31-32 kDa si induce sinteza de anticorpi specifici la pacientii cu tuberculoza.

Antigenul ESAT-6, o proteina cu masa moleculara aparenta de 6 kDa (14), este un polipeptid alcatuit din 95 aminoacizi prezent in cantitati crescute in citosol dar si in peretele celular si care a fost izolat din filtratul culturii pe termen scurt de *M.tuberculosis* (15). ESAT-6 este o tinta de importanta majora pentru raspunsul imun al limfocitelor T de memorie si, la fel cu Ag85B, pare a avea un rol foarte important in activarea raspunsului imun secundar cu rol in apararea antituberculoasa, fapt dovedit prin studii pe modele animale (16).

Antigenul ESAT-6 este secretat in cultura de mai multe tulpini de *M.tuberculosis* si *M. bovis* dar nu si de bacilul Calmette- Guerin (BCG) (17) si are in structura doi epitopi care induc sinteza $IFN\gamma$; studiile efectuate cu o gama variata de antigene apartinand *M.tuberculosis* au demonstrat ca antigenul recunoscut cel mai frecvent de celulele mononucleare periferice izolate din singele venos al pacientilor cu tuberculoza este ESAT-6, parametrii utilizati pentru aprecierea raspunsului imun fiind proliferarea celulara si sinteza de $IFN\gamma$ (18).

Identificarea in genomul *M.tuberculosis* a regiunilor care nu sunt reprezentate in genomul BCG si al altor micobacterii *nontuberculoase* a reprezentat un prilej favorabil testarii unor noi molecule destinate testelor de diagnosticare a tuberculozei. Astfel de regiuni sint RD1, care contine si genele ce codifica ESAT-6 si CFP-10, si regiunea RD2, care contine genele ce codifica antigenul MPT64. Testarea PPD utilizata astazi are inconvenientul rezultatelor fals pozitive la indivizii vaccinati BCG sau dupa expunerea la micobacterii *nontuberculoase* datorita faptului ca in structura PPD exista antigene comune cu ale altor tulpini micobacteriene. Diferentierea indivizilor vaccinati BCG de cei sensibilizati la bacili nontuberculosi si de cei infectati cu *M.tuberculosis* reprezinta obiectivul testului de diagnosticare cu un reactiv nou, diferit de PPD.

Initial, antigenul ESAT –6 impreuna cu un alt antigen extracelular, **MPT64**, au fost utilizate, in studii pe animale si pacienti cu tuberculoza, in scop diagnostic. MPT64 este o proteina secretata, cu masa moleculara de 23 kDa, specifica micobacteriilor complexului *M.tuberculosis* (*M.tuberculosis*, *M.africanum*, *M.bovis*) si care activeaza limfocitele T producind reactie de hipersensibilitate de tip intirziat dupa administrare intradermica la animale infectate cu *M.tuberculosis*. Pacientii cu tuberculoza si contactii cu test pozitiv la tuberculina reactionau dupa administrarea de

MPT-64 in timp ce persoanele sanatoase, vaccinate BCG, nu dezvoltau raspuns imun fata de aceasta proteina. (19, 20).

Potentialul combinatiei dintre ESAT-6 si MPT64, ca reactiv pentru teste cutanate de diagnosticare a tuberculozei, a fost dovedit prin studii in care toti indivizii infectati cu *M.tuberculosis* au raspuns prin reactie de hipersensibilitate de tip intirziat dupa administrarea acestui complex antigenic; in ceea ce priveste reactivitatea fata de fiecare dintre cele doua antigene testate separat s-a aratat ca, in timp ce procentajul celor care au reactionat la MPT64 a fost neconcordant intre studii diferite, administrarea ESAT-6 pacientilor tuberculosi si contactilor a condus la aparitia reactiei de hipersensibilitate la un numar mare de subiecti in toate studiile care au avut acest scop (21). Utilizarea acestui antigen prin aplicarea ca patch test s-a dovedit insa a fi un test cu mare sensibilitate si specificitate de 100% (22).

Studii mai recente au combinat ESAT-6 cu un alt antigen micobacterian inalt specific (**CFP10**) utilizind acest complex antigenic in teste de diagnosticare. CFP10 are proprietati comune cu ESAT-6 : sunt molecule cu dimensiuni reduse , codificate de acelasi operon din regiunea RD-1 si induc raspun imun specific intens chiar in etapele timpurii ale infectiei tuberculoase. Asocierea celor doua antigene a demonstrat o sensibilitate a testului comparativa cu cea a testarii PPD (73% fata de 82%), specificitatea fiind indiscutabil superioara iar reactivitatea pacientilor vaccinati BCG si PPD+ a fost foarte redusa (22).

Un alt antigen al *M.tuberculosis* cu specificitate de specie este o glicoproteina cu masa moleculara de **38kDa** secretata in cultura , prezent pe suprafata micobacteriei si care fara a fi un antigen major se caracterizeaza prin antigenicitate crescuta . Acest antigen genereaza atit raspuns imun celular intens cit si sinteza de anticorpi la animale dar si la subiecti umani infectati (23, 24). Utilizat in testari cutanate la subiecti umani a dovedit o specificitate de specie mult mai redusa decit pe modelul animal (11).

Proteina de soc termic **hsp 65**, un antigen micobacterian identificat ca fiind un bun imunogen, cu rol important in inducerea unui raspuns imun protector, este produsa in cantitati importante de bacteria localizata in interiorul macrofagelor. Exista studii care arata o crestere semnificativa a limfocitelor T hsp65 reactive in cursul infectiilor tuberculoase realizate pe modele murine, mai mult de 20% din totalul de limfocite T

reactive fata de micobacterie avind aceasta specificitate (25). Din cauza numerosilor epitopi nespecifici pe care ii contine , raspunsul imun fata de acest antigen este mai putin relevant si implicit mai putin studiat.

Antigenele insolubile

Antigenele insolubile micobacteriene sunt reprezentate de componente ale peretelui micobacterian, proteine legate de membrana, carbohidrati cu masa moleculara mare, lipide, acizi micolici, glicolipide fenolice. Daca antigenele solubile se regaseau in supernatantul rezultat in urma centrifugarii puternice a suspensiilor de micobacterii lizate, antigenele insolubile sunt prezente in sedimentul format prin centrifugare.

Micobacteriile care formeaza suspensii stabile, netede, pot fi identificate sau tipate prin teste de aglutinare (*M. avium-intracellulare*); si serotipurile altor specii pot fi identificate prin aglutinare dar nu si ale *M. tuberculosis* care autoaglutineaza usor.

III. *M. tuberculosis* : factori de virulenta si patogenitate

Pentru caracterizarea patogenitatii bacteriene sunt utilizati termeni ca *virulenta* (capacitatea unei bacterii de a patrunde, a se adapta, multiplica si raspindi in tesuturile gazdei) si *toxicitate* (capacitatea de eliberare a toxinelor). Modul de viata intracelular al bacteriilor presupune convietuirea cu celula gazda, fapt explicat prin toxicitatea scazuta a bacteriei intracelulare.

Patogenitatea micobacteriilor se bazeaza aproape in exclusivitate pe capacitatea lor de a supravietui in interiorul macrofagelor; desi micobacteriile sintetizeaza si o serie de toxine (sulfolipide, factorii cord), rolul lor ca factori de virulenta este apreciat ca fiind minor.

Patogenitatea micobacteriilor cuprinde doua aspecte importante: (1) patrunderea si supravietuirea in interiorul macrofagelor si (2) perturbarea raspunsului imun al organismului gazda prin inducerea reactiilor de hipersensibilitate intirziata .

Mecanismele microbicide ale macrofagelor sunt reprezentate in principal de producerea moleculelor toxice ca *radicalii liberi de oxigen* (anion superoxid, peroxid de hidrogen, oxigen singlet, radicali hidroxil), *monoxidul de azot* dar si de apoptoza (26). Modul in care patogenii intracelulari, in general, si micobacteriile patogene, in

special, supraviețuiesc acțiunilor bactericide ale macrofagelor sunt incomplet cunoscute și variază de la o specie la alta.

Pentru bacteriile intracelulare, patrunderea în celulele gazdei reprezintă o condiție esențială atât pentru supraviețuirea cit și pentru uciderea lor. Rolul *peretelui celular al bacilului tuberculozei* în virulență și patogenitate este cunoscut și acceptat de mult timp (27); din cauza dificultăților întâmpinate în elucidarea structurii complexe a peretelui micobacterian, implicarea directă a constituenților acestuia în patogeneză nu este precis definită.

Macrofagele sunt celule fagocitare cu activitate antibacteriană variabilă, de la medie la înaltă, în funcție de starea de activare. Modul în care se produce endocitoza, prima etapă a procesului de fagocitoză, poate influența activitatea bactericidă ulterioară a macrofagelor.

Astfel, multe dintre micobacterii (*M.tuberculosis*, *M.leprae*) pot induce clivarea componentei C3 a sistemului complement, urmată de opsonizare și activarea procesului de fagocitoză, prin legarea la receptori pentru complement de pe suprafața macrofagelor (CR1/CR3). Unele bacterii intracelulare se leagă direct la CR3 printr-un situs de legare lectin-like, independent de activarea C3.

Endocitoza prin intermediul receptorilor CR1/CR3 împiedică generarea de radicali de oxigen în interiorul macrofagelor și în acest fel anulează potențialul bactericid al acestor celule din prima linie de apărare nespecifică a organismului.

Activarea puseului respirator în interiorul macrofagelor nu are ca finalitate obligatorie însă distrugerea bacililor care au pătruns intracelular. *M. tuberculosis* dispune, se pare, și de alte mijloace prin care supraviețuiește mecanismelor bactericide ale macrofagului, celula reprezentativă pentru categoria fagocitelor profesionale.

M.tuberculosis produce *superoxid dismutaza* și *catalaza* care neutralizează efectul toxic al radicalilor O_2^- și H_2O_2 . Producerea de către bacteriile intracelulare a moleculelor cu efect de inactivare a metabolitelor de oxigen nu este constitutivă și este controlată de factori sensibili la concentrația de O_2^- și H_2O_2 .

Lipoarabinomananul (LAM), glicolipid izolat din structura peretelui celular al *M.tuberculosis* și *M.leprae* este produs în cantități crescute și secretat de acești bacili, având un grad crescut de imunogenicitate. Există studii (27) care demonstrează că această moleculă inhibă funcțiile microbicide ale macrofagelor prin: (a) eliminarea

radicalilor liberi de oxigen formati intracelular; (2) inhiba activitatea proteinkinazei C (PKC); (c) blocheaza activarea procesului de transcriptie a genelor activate de IFN γ : γ .1 si HLA-DR β (28).

Capacitatea LAM de a inhiba activitatea PKC si de a bloca procesul de transcriptie a genelor IFN γ sta la baza complexitatii efectelor LAM asupra macrofagelor umane: (a) IFN γ este factorul principal al activarii functiilor bactericide ale macrofagelor; (b) PKC este implicata in reglarea diferitelor cai de transducere a semnalului implicat in activarea macrofagelor; (c) prezentarea antigenelor micobacteriene receptorului limfocitelor T se face in cupa MHC clasa II. Capacitatea LAM de a inhiba activarea transcriptiei genelor MHC clasa II la nivelul macrofagelor infectate ar putea explica efectul inhibitor nespecific al LAM asupra proliferarii limfocitelor T prin interferarea procesului de prezentare a antigenului.

In concluzie, LAM pare a avea un rol important in patogeneza tuberculozei, prin inhibarea functiilor bactericide ale fagocitelor mononucleare prin urmatoarele mecanisme: (a) blocheaza efectul activator al IFN γ asupra macrofagelor, activare ce implica transcriptia mediata de PKC al unor gene; (b) inhiba declansarea arderilor respiratorii, procese care de asemenea solicita actiunea PKC ca element reglator in transducerea semnalului; (c) elimina radicalii toxici formati in cazul in care unul din cele doua mecanisme anterioare este inefficient.

Acceptarea rolului LAM ca factor de protectie al *M.leprae* si *M.tuberculosis* fata de mecanismele microbicide oxigen-dependente ale fagocitelor mononucleare infectate nu poate explica insa cazurile de vindecare a infectiilor micobacteriene. Acest fenomen ar putea fi explicat prin: (a) reactiile microbicide ale radicalilor liberi de oxigen se declanseaza de timpuriu in urma fagocitozei, in timp ce micobacteria sintetizeaza si secreta complexe lipidice in cantitati semnificative dupa citeva zile de infectie ; se presupune ca macrofagele indivizilor sanatosi omoara rapid multe dintre micobacterii, iar cele care supravietuiesc sunt rezistente la mecanismele microbicide, ramin intracelular si vor cauza infectii persistente ; in acest fel, doar o parte din persoanele cu test pozitiv la tuberculina (PPD+) vor face forma activa de boala, iar in cazul indivizilor virstnici tuberculoza poate fi cauzata de o recadere a primoinfectiei care a avut loc cu multi ani inainte ; (b) mecanismele de ucidere oxigen-independente ale macrofagelor, cum sunt cele realizate de monoxidul de azot pot fi eficiente in lupta cu micobacteriile intracelulare.

Inhibarea formarii fagolizosomului

Dupa fagocitarea bacteriilor, fagozomul format intracelular este alcalin pentru ca ulterior sa devina acid. Realizarea unui mediul acid la nivelul vacuolei fagocitare, reprezinta o conditie esentiala pentru actiunea enzimelor lizozomale, factori implicati in degradarea bacteriilor omorite anterior si mai putin in procesul de omorire propriu-zis. Aceste enzime se gasesc in lizozomi si sunt descarcate in fagozom in urma fuziunii fagolizozomale.

M.tuberculosis impiedica formarea fagolizozomului; cauza probabila a acestui fenomen este implicarea unor factori produsi de acesti bacili: acidul poliglutamic, ionul de amoniu (NH_4^+) (29), adenzinul monofosfat ciclic (AMP ciclic) si sulfolipidele. Nu se cunoaste cu precizie daca aceste substante sunt active "in vivo". Prin tehnici de electoreza bidimensionala in gel a fost relevata existenta unei cantitati mari de proteine specifice celulei gazda ; una dintre acestea, denumita TACO, este retinuta doar in fagozomul ce contine micobacteria vie. Mecanismul prin care aceasta proteina ajunge in fagozom si rolul pe care il joaca nu sunt clar conturate dar prezenta sa se insoteste de esuarea fuziunii vacuolei fagocitare cu lizozomii (26).

Studiile de microscopie electronica efectuate referitor la dinamica procesului de fuziune fagosom-lizosomi si efectele acestuia asupra replicarii bacteriilor intracelulare in macrofagele umane si murine infectate "in vitro" cu tulpini virulente (H37Rv) sau avirulente (H37Ra) de *M.tuberculosis* sau cu tulpini de *M.bovis* BCG au aratat translocarea bacteriilor in afara vacuolelor fuzionate si multiplicarea preferentiala a bacteriilor in vacuole nefuzionate. Numai bacilii tuberculosi viabili apartinand tulpinilor H37Ra si H37Rv parasesc fagolizozomului odata cu evolutia procesului infectios (BCG ramine in vacuola fuzionata); dupa ce parasesc veziculele fuzionate, doar bacilii tulpinilor virulente se vor multiplica (30).

Rolul protector pe care inhibarea fuziunii fagolizosomice l-ar avea asupra micobacteriei nu este cert. Pe de alta parte, nu exista date care sa demonstreze cu certitudine faptul ca formarea fagolizosomului sporeste eficienta mecanismelor bactericide; se pare insa, ca in mediul fagolizosomal are loc inhibarea replicarii micobacteriene, cu inducerea unei stari de latenta (*dormancy*) a *M.tuberculosis*.

M.tuberculosis opsonizat cu anticorpi isi pierde capacitatea de a impiedica descarcarea enzimelor lizozomale, probabil datorita unei functii auxiliare a anticorpilor in imunitatea antituberculoasa mediata celular.

Un alt factor important de rezistenta impotriva atacului enzimatic il reprezinta peretele micobacterian, bogat in lipide.

Migrarea in citoplasma

Migrarea bacteriilor din compartimentul fagosomal, sediul evenimentelor ce au ca urmare uciderea bacteriilor (membrana fagolizozomului limiteaza procesele de autodistrugere a macrofagelor), in cel citoplasmatic reprezinta un mecanism foarte eficient de supravietuire. Acest mecanism de supravietuire apare in infectiile cu *M.leprae* si posibil si in cele cu *M.tuberculosis*.

Prezenta antigenelor micobacteriene in citoplasma este sustinuta si de implicarea dovedita a limfocitelor T citotoxice (LTc CD8+) in raspunsul imun declansat de infectia tuberculoasa; acest fapt este contradictoriu opiniei ca habitatul *M.tuberculosis* este reprezentat de endosom, ceea ce ar avea drept consecinta prezentarea antigenelor micobacteriene exclusiv limfocitelor T helper (LTh CD4+) in molecule MHC clasa II. Astfel, se pare ca proteinele secretate de *M.tuberculosis*, viabil si in diviziune, trec din compartimentul endosomal in cel citosolic unde vor ocupa cupa moleculei MHC clasa I si vor fi prezentate receptorului LTc CD8+ (31).

Captarea fierul intracelular

Fierul reprezinta un factor necesar atit bacteriilor intracelulare cit si celulei gazda pentru producerea metabolitilor toxici de oxigen si a radicalilor azotati. Astfel, competitia pentru fierul intracelular dintre bacteria intracelulara si celula gazda se reflecta in rezultatul final al convietuirii dintre patogen si celula gazda.

Pentru a-si imbunatati aportul de fier, atit bacteriile cit si celulele gazda folosesc molecule specifice. In mediul extracelular al gazdei, fierul se leaga la transferina si apoi este internalizat de catre celule gazda prin intermediul receptorilor pentru transferina. In mediul intracelular, fierul se leaga la feritina. Gradul de disponibilitate a fierului intracelular este controlat de exprimarea receptorilor pentru transferina si de concentratia intracelulara a feritinei.

Reducerea numarului de receptori pentru transferina de pe macrofage scade aportul intracelular de fier si ca urmare este afectata cresterea bacteriana. Lactoferina este o transferina, care se gaseste in cantitati mari in lizosomi. Lactoferina eliberata in fagolizosom va intra in competitie cu bacteria intracelulara pentru fierul disponibil, reducind astfel sansele de supravietuire ale acesteia.

Bacteriile isi asigura aportul de fier prin intermediul sideroforilor. Micobacteriile sintetizeaza doua clase diferite de siderofori: (i) exochelinele sunt peptide cu masa moleculara mica secretate in mediul extern si (ii) micobactinele care sunt lipide localizate la nivelul peretelui celular. Fierul este solubilizat si chelat in mediul extern de catre exocheline si apoi transportat la micobactine care il trec prin peretele celular.

Structura micobactinelor difera de la o specie la alta dar si intre tulpinile aceleiasi specii.

Proteinele de soc termic (hsp) ca factor de supravietuire intracelulara

Proteinele de soc termic sunt produse in cantitati mari cind o celula este supusa agresiunii unor factori de stress, cum ar fi: modificari ale pO_2 , pH, temperatura, lipsa elementelor nutritive.

Bacteriile intracelulare se confrunta in interiorul macrofagelor cu unii factori de stress, si incearca sa-si sporeasca sansele de supravietuire prin intensificarea sintezei de hsp. Hsp sunt implicate in plierea proteinelor si asamblare complexelor proteice; ele previn sau intirzie procesul de depliere a proteinelor. Moleculele efector toxice actioneaza prin deplierea sau dezasamblarea complexelor proteice, fenomen prevenit de hsp. Astfel, hsp este un factor ce favorizeaza supravietuirea bacteriilor intracelulare.

Gene implicate in supravietuirea intracelulara

Genele ce confera virulenta patogenilor se exprima doar atunci cind este necesar. Micobacteriile supravietuiesc in mediul inconjurator perioade indelungate de timp. In mediul inconjurator, factorii de virulenta nu sunt necesari si, ca urmare, nu se exprima. Exprimarea factorilor de virulenta este controlata de senzori specifici care permit bacteriei intracelulare sa-si activeze acesti factori. Desi stimulii externi raspunzatori de exprimarea genelor de virulenta nu sunt bine cunoscuti, este posibil ca

din aceasta categorie sa faca parte modificarile de pH, pO₂, osmolaritate, temperatura, N₂ sau fosfat. De asemenea, hsp 70 poate fi un “senzor” al starilor de stress.

IV. Raspunsul imun in infectia tuberculoasa

Infectia cu *M.tuberculosis* reprezinta un model clasic de infectie cu un patogen intracelular fata de care organismul se protejeaza elaborind un raspuns mediat celular ; este vorba, de fapt, despre un raspuns al limfocitelor T orientat impotriva macrofagelor incarcate cu agentul patogen. Imaginea « consacrata » a infectiei tuberculoase in care antigenul stimula limfocitul T pentru a sintetiza citokine ca IFN- γ , care apoi stimula activitatea bactericida a macrofagelor, a fost inlocuita in ultimii ani, pe baza numeroaselor studii efectuate, de o alta imagine, mult mai complexa, in care si-au gasit locul populatii celulare pina nu de mult neglijate, au fost relevate functionalitati necunoscute ale populatiilor celulare, toate aceste celule functionind ca un sistem mediat de actiunea citokinelor. Astfel, alaturi de LT CD4+, esentiale pentru realizarea unui raspuns imun protector, au fost evidentiata LT CD8+, LT $\gamma\delta$ ca fiind foarte importante in acest mecanism ; actiunea citotoxica a limfocitelor T asupra macrofagelor infectate, ca si sinteza unei game variate de citokine la nivelul macrofagelor (IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, TNF- α , IL-1, IL-6, TGF- β), au fost elemente care au contribuit la modificarea modelului cunoscut de raspuns imun protector antituberculos (32).

IV.1. Macrofagele

Macrofagele sunt celule cu importanta majora in raspunsul imun antituberculos prin activitatea de procesare si apoi prezentare a antigenelor dar si prin functia de celula efector cu potential microbicid, functie realizata prin enzimele lizozomale eliberate in fagozom dupa fuziunea fagozom-lizozom, sinteza de reactivi toxici de oxigen in cadrul arderilor oxidative intracelulare, producerea de intermediari azotati si prin apoptoza.

Fagocitoza

Patrunderea in interiorul macrofagelor organismului gazdei reprezinta o conditie esentiala atat pentru supravietuirea cit si pentru uciderea micobacteriilor. Dupa

endocitizare, macrofagele pot servi atât ca habitat pentru *M.tuberculosis* cât și ca celula efector bactericidă.

Recunoașterea și apoi aderarea micobacteriei la macrofag are loc fie direct, prin interacțiuni receptor-ligand, fie indirect, prin depozitarea pe suprafața patogenului a unor molecule ce aparțin organismului gazdă și pentru care există receptori pe suprafața fagocitelor.

Legarea indirectă (opsonică) presupune prezența pe suprafața micobacteriilor a unor molecule cu rol de liganzi: imunoglobulina G (IgG), produse de clivare a C3 sau structuri care leagă fibronectina, iar din partea macrofagelor prezența unor molecule ca receptorul Fc (FcR) pentru Ig și receptori pentru complement CR1 și CR3.

Legarea micobacteriei la FcR activează puseul respirator care are ca rezultat formarea radicalilor toxici de oxigen (ROI). *M.tuberculosis* poate produce clivarea C3 urmată de opsonizare și activarea procesului de fagocitoză prin legarea la receptori pentru complement, mecanism care nu duce la declanșarea arderilor respiratorii și sinteza de intermediari toxici de oxigen (33).

Legarea directă a macrofagelor se face la nivelul diferitelor receptori: receptori *lectin like* ce recunosc molecule de carbohidrați de pe suprafața bacteriilor, receptorul *scavenger A*, receptorul CR3 și receptorul *toll-like* (TLR) (34).

M.tuberculosis secreta o familie de molecule cu greutate moleculară de 32 kD care leagă fibronectina de pe suprafața macrofagelor (FnR). Totuși, legarea fibronectinei pare a fi un factor slab și inefficient de activare a fagocitozei necesitând mecanisme suplimentare pentru internalizarea patogenului.

În ciuda numeroaselor studii care au avut ca obiect explorarea primei etape a interacțiunii macrofag-micobacterie, datele privind influența modului de legare celula efector- țintă patogenă asupra viabilității bacililor intracelulari sunt controversate.

Mecanisme microbicide intracelulare mediate de molecule toxice

După fagocitarea micobacteriei, în interiorul macrofagelor se activează NADPH-oxidaza cu declanșarea consecutivă a puseului respirator oxigen-dependent în urma căruia oxigenul molecular este redus la o serie de metaboliti toxici: anion superoxid, peroxid de hidrogen și alte molecule cu efect bactericid.

M.tuberculosis a demonstrat, *in vitro*, sensibilitate la actiunea peroxidului de hidrogen. Totusi, contributia radicalilor toxici la uciderea micobacteriilor de catre macrofage *in vivo* ramine controversata (35).

Studii pe modele murine de infectie tuberculoasa demonstreaza implicarea ROI in primele etape ale infectiei, inainte de activarea macrofagelor mediata de IFN- γ , de producerea de monoxid de azot si de acidifierea fagosomului (36).

Un mecanism microbicid important, caracteristic macrofagelor, il reprezinta sinteza unor cantitati crescute de monoxid de azot (NO) si alti radicali azotati (RNI) in urma activarii NO-sintetazei (NOS2), urmare a actiunii unor citokine ca IFN γ si TNF α . RNI si-au demonstrat implicarea in procesul de distrugere a micobacteriilor atat *in vitro* cit si *in vivo* dar in special pe modele murine unde radicalii azotati au rol protector atat in fazele acute cit si in infectiile cronice persistente (37). Desi mult mai putine, exista totusi si date referitoare la contributia RNI in infectia tuberculoasa umana, date ce indica existenta unui nivel crescut de NO-sintetaza (NOS2) in macrofagele obtinute prin lavaj brohoalveolar de la pacienti cu tuberculoza. Mai mult, eliberarea de NO este mult crescuta la acesti pacienti (38).

Apoptoza

Un alt mecanism de aparare fata de infectia cu *M.tuberculosis*, la fel de controversat ca si cele expuse anterior, este apoptoza. Printre mecanismele de declansare a apoptozei sunt: legarea receptorului Fas, sinteza de TNF- α , actiunea ATP⁴⁻ la nivelul receptorului macrofagic purinergic P2Z (P2X₇) sau a acidului picolinic (26). Se pare ca tulpinile virulente da *M.tuberculosis* dispun si de mecanisme de blocare a apoptozei, posibil prin sinteza crescuta de receptori TNFR2 care formeaza cu TNF- α complexe inactive.

Dupa declansarea apoptozei, se pare ca expresia anumitor receptori de suprafata ai macrofagelor este crescuta, fenomen ce favorizeaza endocitarea celulei apoptotice de un alt fagocit. Organismul gazda este in felul acesta protejat, virulenta micobacteriei fiind redusa initial prin apoptoza iar apoi printr-o noua fagocitoza a macrofagului infectat de catre un alt macrofag activat, fiind astfel limitata si raspindirea micobacteriei.

O alta functie importanta a macrofagelor este cea de celule prezentatoare de antigen, implicate in activarea celulelor T. Raspunsul imun protector al limfocitelor T fata de infectia cu *M.tuberculosis* consta in sinteza de IFN- γ si in actiuni citotoxice care au drept tinte macrofagele infectate cu bacili tuberculosi, actiuni care definesc un raspuns imun tip Th1 (*T helper 1*). Antigenele micobacteriene (proteice si ne-proteice) reprezinta posibili activatori ai fagocitelor mononucleare, celule care in urma activarii sintetizeaza o gama variata de citokine proinflamatorii (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 si TNF- α) si inhibitorii ((IL-10, TGF- β). Clasele de citokine secretate de fagocitele mononucleare dupa expunerea la antigenele micobacteriene sint implicate in reglarea raspunsului imun al limfocitelor T (39).

IV.2. Limfocitele T

Rezistenta dobindita fata de infectia micobacteriana este realizata in principal de limfocitele T (LT). Importanta majora a limfocitelor T este sustinuta de incidenta crescuta a tuberculozei si a altor infectii bacteriene intracelulare la persoane cu deficiente ale limfocitelor T (de exemplu infectia cu HIV).

Limfocitele T periferice se compun din doua populatii distincte fenotipic : **LT α/β** si **LT γ/δ** .

Limfocitele T cu molecule TCR (*T cell receptor*) tip α/β reprezinta mai mult de 95% din LT de la nivelul organelor limfoide secundare si al circulatiei periferice, atat la oameni cit si la soareci. Aceste limfocite T cuprind la rindul lor doua subpopulatii celulare: **LT CD4+ α/β** , care recunosc peptide antigenice prezentate in cupa moleculelor MHC clasa II si **LT CD8+ α/β** , care interactioneaza cu peptide antigenice prezentate in cupa MHC clasa I, peptidele prezentate fiind rezultatul procesarii proteolitice a proteinelor micobacteriene in interiorul celulelor prezentatoare de antigen (macrofage, celule dendritice).

Restul de aproximativ 1- 5% din LT periferice si 5% din LT de la nivelul organelor limfoide exprima pe suprafata receptori TCR alcatuiti din lanturi γ si δ . Aceste **LT γ/δ** exprima molecula CD3 dar sunt lipsite de molecula CD4 si mai putin de 5% din totalul lor exprima pe suprafata molecula CD8. Modul in care acest set de LT recunoaste antigenul, ca si mecanismul de procesare a antigenului in celula prezentatoare de antigen, nu sunt bine cunoscute.

LT α/β CD4+

M.tuberculosis se localizeaza in compartimentul endosomal al macrofagelor, fapt ce permite accesul antigenelor micobacteriene la calea de prezentare in cupa moleculei MHC II.

LT CD4+ activate prin legarea specifica a peptidelor antigenice la receptorul TCR vor initia un raspuns imun protector fata de infectia micobacteriana ce consta in sinteza de citokine si in actiune citotoxica asupra macrofagelor infectate. Citokinele secretate (IFN- γ , GM-CSF, TNF- α/β) reprezinta calea prin care LT CD4+ stimuleaza functiile microbicide ale macrofagelor iar, pe de alta parte, regleaza proliferarea mediata de IL-2 a LT CD8+ si LT $\gamma\delta$ (38). LT CD4+ sintetizeaza o gama variata de citokine (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 si cantitati mari de IFN γ), antigenele proteice solubile (PPD, filtrat din cultura de scurta durata) fiind puternic imunogene pentru aceste celule. LT CD4+ controleaza cresterea micobacteriilor in interiorul macrofagelor nu numai prin intermediul citokinelor ci si prin contactul direct intercelular (11).

LT CD4+ implicate in raspunsul imun celular antituberculos sunt considerate LTh0 (*LT helper 0*), evolutia dupa activare a acestor celule neputind fi delimitata cu precizie in cele doua linii celulare distincte LTh1 si LTh2 asa cum se practica in studiile pe modele murine (11). Diferentierea LT CD4+ α/β dupa activare se face in functie de citokinele secretate : LTh1, care sintetizeaza IFN- γ si IL-2, si LTh2 care elibereaza IL-4, IL-5, IL-10. In cazul subiectilor umani distinctia intre cele doua subpopulatii de LTh este dificila si delimitarea LTh1 de LTh2 nu ar aduce beneficii in ceea ce priveste elucidarea deficientelor imunologice ce favorizeaza evolutia procesului tuberculos (41).

Studii efectuate pe modele murine cu diferite antigene si agenti infectiosi au evidentiat rolul important al IL-12 in initierea si reglarea raspunsului tip Th1; aceste studii au utilizat in special IL-12 exogena sau anticorpi blocanti pentru determinarea efectelor biologice si farmacologice ale IL-12 *in vivo* si *in vitro*. O serie de cercetari au urmarit evaluarea capacitatii si mecanismelor unor patogeni, inclusiv ale *M.tuberculosis* de a stimula producerea de IL-12 de catre fagocitele mononucleare (39). Rezultatele obtinute au evidentiat: (a) o crestere a sintezei de IL-12 imediat dupa infectarea cu *M.tuberculosis*, (b) fagocitoza reprezinta un semnal eficient pentru stimularea sintezei de IL-12 la nivelul monocitelor si (c) IL-12 secretata de monocitele

infectate cu *M.tuberculosis* moduleaza producerea de IFN- γ si activitatea citotoxica a LT CD4+. Astfel, IL-12 este produsa de fagocitele mononucleare, ca parte a evenimentelor celulare asociate cu fagocitoza si are rol in reglarea raspunsului imun precoce fata de infectiile cu *M.tuberculosis* (42). Producerea de IL-12 in urma declansarii procesului de fagocitoza poate reprezenta un mecanism natural (innascut) de aparare impotriva microorganismelor intracelulare. Capacitatea patogenilor intracelulari de a patrunde in interiorul celulelor fara a declansa fagocitoza si/sau fara a modula secretia de citokine a fagocitelor mononucleare reprezinta probabil un mecanism important de eludare a raspunsului imun celular.

Raspunsul imun al subiectilor sanatosi cu test pozitiv la tuberculina se caracterizeaza prin intradermoreactie intens pozitiva (reactie de hipersensibilitate de tip intirziat) si eliberare de IFN- γ asociate cu activitate citototxica asupra macrofagelor infectate, toate aceste manifestari apartinind limfocitului T CD4+. La pacientii cu tuberculoza activa, activitatea LT CD4+ este mult scazuta si, in consecinta, sinteza de IFN- γ , ca raspuns la stimularea acestor celule cu antigene solubile ale *M.tuberculosis*, este redusa, iar testul cutanat cu tuberculina este slab/absent. Aceasta reactivitate slaba fata de antigenele micobacteriene nu este cauzata de o deviere a raspunsului imun catre modelul Th2 si se explica prin sinteza la nivelul macrofagelor de citokine ca TGF- β si IL-10, citokine care inhiba functiile LT CD4+ (36, 41, 43).

Cele mai multe studii de explorare a raspunsului imun la pacientii cu tuberculoza sunt realizate cu LT din singele periferic. Datele existente pina acum referitoare la raspunsul imun local arata ca persoanele sanatoase PPD+ au la nivelul alveolelor pulmonare LT CD4+ specifice antigenelor *M.tuberculosis* (44).

LT α/β CD8+

Rolul important pe care il au LT CD8+ in raspunsul imun protector este unanim admis. Studiile efectuate pe animale deficiente in moleculele MHC I si in LT CD8+ au demonstrat ca acestea sunt mult mai susceptibile la infectia tuberculoasa si cea cu BCG (32). Implicarea LT CD8+ contrazice teoria conform careia localizarea *M.tuberculosis* in compartimentul vezicular al macrofagelor implica prezentarea antigenelor micobacteriene exclusiv in cupa MHC II limfocitului T CD4+. Studii de microscopie electronica au demonstrat faptul ca *M.tuberculosis* se poate gasi si liber, in citoplasma (40). Exista, de asemenea, ipoteza conform careia proteinele secretorii

apartinind tulpinilor vii de *M.tuberculosis*, in diviziune, trec din fagosom in citoplasma si vor fi prezentate limfocitului T CD8+ in cupa MHC clasa I (45, 46).

Tintele antigenice recunoscute de LT CD8+ la indivizi infectati cu *M.tuberculosis* dar fara forma activa de boala sunt de interes major tinind cont de faptul ca acestea ar putea constitui bazele unui nou vaccin antituberculos. Persoanele sanatoase cu test pozitiv la tuberculina prezinta in alveolele pulmonare LT CD8+ specifice MHC I- restrictate care s-au dovedit a fi celule citotoxice eficiente asupra macrofagelor infectate si producatoare de citokine ca IFN- γ (47). Tintele LT CD8+ nu sunt bine cunoscute dar se pare ca antigenele recunoscute de aceasta populatie celulara sunt : Ag 38kDa, hsp65 si Ag19kDa (34,33).

LT γ/δ

Implicarea LT γ/δ in imunitatea impotriva bacteriilor intracelulare este sustinuta de o serie de rezultate experimentale (48):

1. LT γ/δ din singele periferic al indivizilor sanatosi sint stimulate cu dificultate de antigenele micobacteriene rezultind *in vitro* o proliferare limitata (de 10-20 ori) a LT γ/δ . Elementul activator pare a fi o molecula micobacteriana neproteica, ce actioneaza probabil ca superantigen pentru LT V γ 9 δ 2.

LT γ/δ apartinind soarecilor imunizati cu micobacterii sunt puternic stimulate de componente micobacteriene. Totusi, contributia stimulării oligoclonale a LT γ/δ la rezistenta impotriva bacteriilor cu dezvoltare intracelulara, "sechestrare" de obicei in compartimentul intracelular, nu este suficient de bine cunoscuta.

2. LT γ/δ sunt prezente frecvent in focarul inflamator. Astfel, infectiile cu micobacterii la soareci sunt insotite de un influx precoce de LT γ/δ la locul replicării bacteriene.

LT γ/δ au fost izolate si din centrul necrotic al leziunilor de limfadenita tuberculoasa, in timp ce in leziunile granulomatoase ganglionare ale pacientilor cu tuberculoza, numarul LT γ/δ este redus, fapt ce indica infiltrarea precoce a leziunilor inflamatorii cu celule T γ/δ .

Analiza flow-citometrica a populatiei de LT γ/δ in singele periferic si in produsul de lavaj bronhoalveolar provenite de la pacienti cu tuberculoza pulmonara activa arata o scadere marcata a numarului acestor celule comparativ cu rezultatele

obținute în urma determinărilor efectuate pe aceleași produse biologice recoltate de la subiecți normali și de la pacienți cu alte afecțiuni granulomatoase (sarcoidoză, berilioză). Aceste rezultate demonstrează existența unei relații strinse cauza-efect între scăderea sau absența subsetului de LT $V\gamma 9+/V\delta 2+$ reactive față de antigenele *M.tuberculosis* și apariția manifestărilor clinice ale bolii, fapt ce susține implicarea acestor celule în răspunsul imun protector antituberculos (49).

În cursul infecțiilor micobacteriene, LT γ/δ sintetizează interleukine și sunt de asemenea implicate în realizarea mecanismelor citotoxice. Astfel, activitatea lor biologică este similară celei a LT α/β (50). Din cauza că LT γ/δ sunt activate înainte de LT α/β se pare că aceste celule participă la elaborarea răspunsului imun în pauza dintre momentul intervenției mecanismelor de apărare nespecifică mediate de celulele NK (*Natural Killer*) și fagocitele inflamatorii și cel al activării mecanismelor imune specifice mediate de LT α/β . Este posibil ca LT γ/δ să fie implicate în activarea precoce a macrofagelor, până la apariția în focar a LT α/β precum și în chemotactismul și activarea ulterioară a LT α/β .

Activarea LT γ/δ de către *M.tuberculosis* se realizează cu participarea TCR γ/δ dar antigenele micobacteriene recunoscute de TCR ca și modul în care acest antigen este prezentat limfocitului T γ/δ de către celulele prezentatoare de antigen nu sunt pe deplin cunoscute. Pentru activarea LT γ/δ este necesară costimularea prin legarea moleculei CD28 de pe suprafața celulei.

Există studii experimentale care demonstrează faptul că macrofagele alveolare pot servi drept celule prezentatoare de antigen atât pentru LT γ/δ resting (HLA DR-, IL-2R-) cit și pentru cele activate (HLA DR+, IL-2R+) participante la elaborarea răspunsului imun (51).

Activarea LT γ/δ este condiționată de prezența monocitelor sau a macrofagelor alveolare dar nu și de fagocitarea și procesarea micobacteriei având în vedere faptul că LT γ/δ sunt stimulate de antigene solubile. LT γ/δ sunt activate la nivelul receptorului TCR γ/δ . Populația de LT $V\delta 2+$ umane sunt stimulate de către mici liganzi nepeptidici, iar studiile efectuate pe LT γ/δ murine au evidențiat faptul că aceste celule pot recunoaște antigenul direct, fără implicarea unor molecule care să prezinte antigenul.

Proliferarea LT γ/δ presupune, pe de o parte, stimulare de catre antigenele micobacteriene iar, pe de alta parte, prezenta celulelor accesorii. Macrofagele alveolare, in absenta antigenului nu reusesc activarea LT γ/δ asa cum s-ar intimpla in cadrul unui raspuns imun alloreactiv. Astfel, participarea macrofagelor alveolare sau a monocitelor la raspunsul imun impotriva antigenelor micobacteriene este esentiala pentru activarea si proliferarea LT γ/δ (40).

Procesul de proliferare a LT V γ 9/V δ 2 are loc sub influenta IL-2 sintetizata de LT CD4+; incapacitatea de proliferare a LT V γ 9 in urma stimulării cu *M.tuberculosis* intilnita la pacientii HIV+ fiind consecinta deficitului de LTh si nu a unor disfunctii ale LT γ/δ (52).

IV.3. Procesarea si prezentarea antigenelor micobacteriene

Celulele apartinand subseturilor de LT descrise produc IFN- γ si in acelasi timp pot indeplini activitati citotoxice (53).

Majoritatea studiilor efectuate asupra antigenelor recunoscute de LT CD4+ au fost orientate in principal spre cercetarea proteinelor secretate activ de *M.tuberculosis* dar au vizat si lipoproteinele si proteinele de soc termic. Multi dintre epitopii peptidici ai proteinelor micobacteriene sunt recunoscuti MHC II-restrictat, prezentati deci limfocitului T CD4+ dupa fixarea lor in cupa diferitelor variante alelice de molecule MHC II. Cunoasterea mecanismelor de procesare si prezentare a antigenelor proteice micobacteriene este utila pentru fabricarea de vaccinuri antituberculoase si reactivi noi pentru diagnosticarea infectiei tuberculoase (54).

LT CD4+ si LT γ/δ pot fi activate de micobacteria intacta si de antigenele sale citosolice. Totusi, cele doua subpopulatii sunt diferite in ceea ce priveste spectrul antigenelor citosolice recunoscute: LT CD4+ recunosc antigene a caror greutate moleculara variaza intr-un spectru foarte larg, in timp ce LT γ/δ recunosc o gama restrinsa de antigene, in principal cu greutate moleculara de 10-15 kDa. Ambele subseturi de LT sint in egala masura citotoxice pentru monocitele infectate cu *M.tuberculosis* si de asemenea produc IFN- γ in cantitati mari (in supernatantul de cultura al LT CD4+ s-au dozat 2458 $\pm$ 213 pg/ml iar in cultura de LT γ/δ 2349 $\pm$ 245). Prin tehnici ELISPOT s-a evidentiat faptul ca numarul de celule T γ/δ care produc IFN- γ este de doua ori mai mic decit cel al LT CD4+, ceea ce presupune o secretie

mult mai eficienta de IFN- γ a populatiei γ/δ . In schimb, LT CD4⁺ secreta cantitati importante de IL-2, comparativ cu LT γ/δ , in concordanta cu proliferarea redusa a LT γ/δ comparativ cu cea a LT CD4⁺. Aceste rezultate indica faptul ca LT CD4⁺ si celulele T γ/δ indeplinesc functii efectorii similare (citotoxicitate, sinteza de IFN- γ) in cadrul raspunsului imun fata de macrofagele infectate cu *M.tuberculosis* in ciuda diferentelor existente in gama de antigene recunoscute, producerea de IL-2 si eficienta procesului de sinteza a IFN- γ (55).

LT recunosc nu numai antigenele micobacteriene de natura proteica ci si antigene nonpeptidice prezentate in molecule MHC-like, codificate de gene diferite de cele apartinand complexului MHC si reunite in familia de molecule CD1. Aceste molecule sunt glicoproteine non-polimorfe, asociate cu β 2-microglobulina si exprimate pe majoritatea celulelor prezentatoare de antigen profesioniste. Deosebirea structurala importanta dintre CD1 si moleculele MHC I si II determina ca antigenele prezentate de complexul CD1 sa fie fundamental diferite fata de cele prezentate in cupa MHC. Antigenele prezentate de moleculele apartinand familiei CD1 sunt mai intii procesate, la fel ca si in cazul prezentarii MHC restrictate (56).

O categorie de antigene CD1b-restrictate ale *M.tuberculosis* prezentata limfocitului T este cea a acizilor micolici ceea ce sustine teoria gamei largi de antigene recunoscute de LT (57).

LT α/β recunosc lipoarabinomananul (LAM) prezentat de molecula CD1b. Prezentarea acestui antigen lipoglicanic presupune internalizarea micobacteriei si acidifierea endosomului. Celulele T activate de LAM produc IFN- γ si realizeaza mecanisme citolitice (58).

LT α/β dublu negative (CD4⁻ CD8⁻) umane recunosc antigene prezentate de molecule apartinand complexului CD1. S-a demonstrat ca, in mod special, molecula CD1b actioneaza ca element de restrictie genetica pentru antigenele derivate din *M.tuberculosis*.

Fractiunea antigenica prezentata de moleculele CD1b limfocitului T α/β CD4⁻ CD8⁻ este comuna multor specii micobacteriene (59).

In singele venos al donatorilor sanatosi au fost identificate trei subseturi de LT care recunosc antigene micobacteriene CD1c-restrictat. Aceste celule T sunt MHC-nerestrictate si procesul de recunoastere a antigenului este independent de moleculele

TAP care sunt necesare prezentării în context MHC. Spre deosebire de răspunsul imun MHC-restrictat, care este generat de peptide micobacteriene, LT CD1c restrictate recunosc antigene micobacteriene lipidice. Celulele T CD1c-restrictate manifestă un potențial citotoxic semnificativ față de celulele care au pe suprafața moleculei CD1c chiar în absența antigenelor micobacteriene (60).

Se dovedește astfel că familia de molecule CD1 reprezintă o categorie distinctă de molecule prezentatoare de antigen care prezintă o clasă bine definită de antigene straine și self celulelor T MHC-nerestrictate.

V. Granulomul tuberculos

În cursul infecțiilor cu bacterii facultativ intracelulare interacțiunea dintre patogen și celulele sistemului imun este un eveniment localizat, leziunea granulomatoasă reprezentând "sediul central" al răspunsului imun. Incapacitatea organismului gazda de a forma granulomul, sau distrugerea acestei leziuni organizate, are ca rezultat agravarea afecțiunii cauzată de agentul infecțios. Pe de altă parte, leziunile granulomatoase extinse produc perturbări ale funcțiilor țesutului în care este localizat transformându-se dintr-un factor de protecție în unul patogenetic.

Granulomul este o leziune bine structurată și localizată, alcătuită din limfocite T cu diferite fenotipuri și macrofage aflate în diferite stadii de diferențiere (celule gigante multinucleate, celule epitelioide, monocite recent ajunse în focar și macrofage mature). Leziunea este limitată la exterior de un înveliș alcătuit în special din limfocite T. Bacteriile sunt situate în interiorul macrofagelor din structura granulomului. Prin necrozarea celulelor din interiorul granulomului se formează un centru cazeos, dar încă solid. Granulomul se poate încapsula prin fibroză și uneori se calcifică (61).

În stadiile timpurii ale formării granulomului are loc un influx de PMN (polimorfonucleare neutrofile) și monocite sangvine care ajung din circulație în focar sub acțiunea unor semnale proinflamatorii mediate de produși bacterieni, fracțiuni de complement (C5a) și citokine. Macrofagele infectate sintetizează citokine în cantități crescute (IL-1, IL-6, IL-8 și TNF- α) care stimulează celulele endoteliale locale și fagocitele circulante; studii efectuate pe linii de monocite umane infectate *in vitro* cu *M.tuberculosis* (tulpina virulentă vie) demonstrează faptul că în urma fagocitării patogenului se produce activarea genei MCP-1 (citokina chemotactică a monocitelor) care pare a fi implicată în stimularea influxului de monocite în cursul formării

granulomului (62). Celulele endoteliale activate din vecinatatea leziunii primare exprima pe suprafata selectine si integrine in cantitati crescute, molecule care favorizeaza procesul de diapedeza al fagocitelor inflamatorii. Desi PMN si monocitele limiteaza replicarea bacteriei, doar in putine cazuri reusesc distrugerea acesteia. Aceste fagocite elibereaza enzime proteolitice care produc leziuni tisulare. Astfel, in stadiul initial granulomul este o leziune exsudativa.

Limfocitele T specifice pot fi activate la nivalul ganglionilor limfatici regionali. Limfocitele T recirculante adera intim la celulele endoteliale prin intermediul integrinelor si migreaza apoi spre sediul infectiei (63). Lipoarabinomananul din structura peretelui micobacterian pare a fi implicat in atragerea LT la locul de formare a granulomului in cursul infectiei cu *M.tuberculosis*. Astfel, supernatantul de cultura al macrofagelor umane infectate *in vitro* cu tulpini virulente de *M.tuberculosis* exercita efecte chemotactice asupra LT, efect ce poate fi blocat prin utilizarea de anticorpi monoclonali anti-LAM (64). Treptat, infiltratul celular se organizeaza si formeaza granulomul in care predomina macrofagele. TNF pare a fi un factor cu importanta deosebita in procesul de organizare a granulomului. In toate stadiile de evolutie a granulomului, populatia dominanta de LT este reprezentata de LT α/β ; totusi, in etapele initiale de formare a leziunii populatia de LT γ/δ este bine reprezentata. In urma interactiunii specifice cu macrofagele infectate LT produc IFN- γ si activeaza functiile antibacteriene ale macrofagelor.

Formarea granulomului reprezinta un mecanism de protectie al organismului fata de infectia cu bacterii facultativ intracelulare, rolul sau fiind de limitare a replicarii bacteriene si de localizare a procesului infectios. Aceste deziderate sunt realizate prin:

- a) Activarea macrofagelor, celule care au capacitatea de a inhiba cresterea bacteriei.
- b) Incapsularea leziunii prin fibroza si calcificare
- c) Procese de necroza care duc la reducerea nutrientilor si a aportului de oxigen.

Totusi in cele mai multe cazuri, reactiile imune de la nivelul leziunii granulomatoase nu reusesc eradicarea patogenilor care vor supravietui in stare de latentă. Intre bacteria persistenta in focar si mecanismele de aparare ale gazdei se stabileste un echilibru labil, care poate fi mentinut perioade indelungate de timp.

Granulomul tuberculos, dupa constituire, poate evolua in 5 moduri diferite:

1. Menținerea echilibrului dintre bacilul persistent și răspunsul imun local de apărare, cu păstrarea unei stări de imunitate în absența semnelor clinice de boală. La mai mult de 90% din persoanele infectate cu *M.tuberculosis* infecția rămâne în acest stadiu.
2. Rareori reacțiile imune de la nivelul granulomului reușesc eradicarea bacteriei.
3. În cazul unui răspuns imun exagerat, reacțiile de necroză se intensifică, afectând țesuturile pe o arie extinsă. Secreția exagerată de citokine generatoare de fibroză (TNF și TGF- β (factor de creștere tumorală)) duce la apariția fibrozei pulmonare. Bacteria rămâne localizată în interiorul leziunii necrotice. Manifestările clinice vor fi cele cauzate de afectarea pulmonară, evoluția fiind benignă.
4. Ramolirea leziunii granulomatoase ca urmare a acțiunii mecanismelor citolitice. În detritusul celular *M.tuberculosis* va crește necontrolat iar la nivelul țesuturilor organului afectat apar leziuni extensive. Se produce diseminarea infecției micobacteriene pe cale hematogenă cu apariția de localizări secundare ale infecției iar eliminarea conținutului infectat al granulomului în caile bronhoalveolare favorizează răspândirea bacililor în mediul înconjurător. TNF poate fi eliberat în circulație cauzând apariția casexiei. Boala are evoluție malignă și este înalt contagioasă.
5. În cazul unui răspuns imun insuficient sau defectuos al LT, leziunea granulomatoasă se dezintegrează rapid și bacilul este diseminat. La pacienții cu imunodeficiențe severe (SIDA) leziunea granulomatoasă nu se dezvoltă, afecțiunea fiind de la început cu evoluție diseminată, în general letală.

VI. Determinismul genetic al rezistenței față de infecția cu *M.tuberculosis*

Rezistența organismului față de bacteriile intracelulare este controlată genetic, factorii ereditari având o importanță deosebită în infecțiile cu spectru clinic larg, așa cum sunt tuberculoza și lepra. Acest determinism genetic a fost demonstrat încă din 1927 când un număr de 251 de copii au fost vaccinați accidental cu *M.tuberculosis* viu, în loc de BCG. După șase ani de la acest eveniment, 2% dintre copii sufereau de tuberculoză, 51% au fost bolnavi dar se vindecasera, 31% au murit iar 16% nu au prezentat niciodată semne clinice de tuberculoză (32).

Factorii genetici sunt cei care controlează trecerea de la stadiul de infecție la cel de boală impartind indivizii în "susceptibili" și "rezistenți". Aceste influențe ereditare sunt demonstrate pe modele murine și par a se manifesta și la populația umană, deși genele implicate nu au fost încă identificate.

Gravitatea si/sau forma clinica a bolii sunt, de asemenea, controlate de factori genetici.

Deși nu există încă argumente convingătoare se pare că tot genetica hotărâște dacă infecția va evolua abortiv sau dacă se va manifesta într-o formă stabilă.

Studiile efectuate pe soareci au demonstrat existența unei singure gene cu transmitere autosomal dominantă pe cromozomul 1 și care este responsabilă de rezistența împotriva BCG, *M.tuberculosis*, *M.lepraemurium* și *M.avium/M.intracellulare*. Această genă, denumită **Bcg** este identică cu gena **Ity** implicată în rezistența soarecilor față de *S.typhimurium*. Cel mai probabil, omologul genei Bcg murine se găsește la om pe cromozomul 2q.

Studiile efectuate pe linii de soareci congenici susceptibili și rezistenți au evidențiat mecanismele codificate de genele Bcg. Diferențele dintre liniile Bcg rezistente (Bcg^r) și cele Bcg susceptibile (Bcg^s) sunt importante în special în cursul primelor săptămâni ale infecției. Odată cu intervenția LT în răspunsul imun, deosebiriile sunt mai puțin marcate.

Macrofagele soarecilor Bcg^r sintetizează cantități mai mari de radicali liberi de oxigen după stimularea cu IFN- γ și/sau ca rezultat al infecției. Aceste celule exprimă pe suprafața un număr mai mare de molecule MHC II, deci pot fi celule prezentatoare de antigen eficiente pentru LT CD4⁺. De asemenea, răspunsul celulelor T CD4⁺ pare a fi mai intens la soarecii Bcg^r, în timp ce liniile murine Bcg^s dezvoltă un răspuns mai puternic al LB.

VII. Vaccinarea antituberculoasă : actualități, perspective

Izolarea bacilului tuberculozei de către Koch, în 1882 a fost urmată de încercări repetate de preparare a unui vaccin antituberculos. Concluzia cercetărilor efectuate atunci a fost aceea că un vaccin antituberculos eficient ar trebui să fie un vaccin viu atenuat. Un astfel de vaccin a fost produs de Calmette și Guérin dintr-un bacil tuberculos izolat de la un caz de mastită bovină. Alegerea unei tulpini bovine și nu umane a fost motivată de observația că infecția cu *Mycobacterium bovis* în perioada copilariei protejează individul adult față de infecția tuberculoasă.

Vaccinul BCG (bacilul Calmette -Guérin) a fost administrat inițial (în 1921) pe cale orală la nou-născuți (64). Începând cu anul 1966 eficiența imunizărilor a crescut considerabil prin utilizarea vaccinului sub formă liofilizată, administrarea

facindu-se intradermic. Vaccinarea BCG pe scara larga a avut ca rezultat reducerea semnificativa a morbiditatii si mortalitatii cauzate de tuberculoza.

Efectul protector al vaccinarii BCG este totusi discutabil, gradul de protectie antituberculoasa estimat prin numeroase studii efectuate in diferite zone geografice ale lumii indicind valori procentuale cuprinse intre 0% (Georgia, Illinois- SUA, 1947) si 80 % (Marea Britanie, 1950) (6). Tipul de raspuns imun dezvoltat in urma vaccinarii BCG sau dupa infectia cu o micobacterie patogena este influentat de expunerea anterioara a populatiei la diferite micobacterii din mediu. O explicatie a acestui fenomen este aceea ca unele populatii umane sunt protejate in urma contactului cu micobacteriile din mediu, fenomen ce mascheaza eficienta vaccinarii BCG (65).

Desi aceasta expunere nu duce la aparitia unor manifestari patologice, exceptie facind persoanele cu imunosupresie, contactul cu astfel de micobacterii (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*) induce o hipersensibilizare de tip intirziat fata de antigenele micobacteriene , manifestare evidentiata prin teste cutanate.

Variatia regionala a eficientei vaccinarii BCG a mai fost explicata si prin modul diferit de reactie a sistemului imun fata de diverse specii sau populatii micobacteriene din mediu; astfel, unele specii/populatii micobacteriene declanseaza un raspuns imun protector iar altele , prin raspunsul imun indus cauzeaza leziuni necrotice grave. Prin vaccinarea BCG, raspunsul imun indus de micobacteriile din mediu este amplificat, vaccinarea fiind eficienta doar in regiunile in care efectele sale se suprapun unui raspuns imun protector.

Efectele pe care sensibilizarea prin contactul cu micobacteriile din mediu le are asupra tipului de raspuns imun declansat de infectii ulterioare pot fi evaluate prin masurare citokinelor tip Th1-Th2.

Un alt neajuns al vaccinarii BCG este acela ca administrarea sa la un copil neinfestat (cu reactie negativa la tuberculina) are efect protector fata de formele grave de infectie primara, in special cele cauzate de diseminarea bacililor din complexul primar, dar eficienta sa in ce priveste prevenirea persistentei bacililor in tesuturi si a reactivarii lor ulterioare pe parcursul vietii este foarte limitata. Din aceste motive si din cauza unor posibile riscuri de reactii locale severe, nu sint vaccinate BCG persoanele infectate, cu reactie pozitiva la tuberculina (6).

Deși majoritatea agenților infecțioși induc un răspuns imun specific prin antigene care se caracterizează prin specificitate de specie sau de tulpină, în cazul micobacteriilor nu se observă acest fenomen. Astfel, BCG protejează individul atât față de infecția cu *Mycobacterium leprae* cât și față de tuberculoză și de asemenea protejează copiii de limfadenite cervicale cauzate de micobacterii din mediul înconjurător. Se pare deci că antigenele micobacteriene care induc imunitate protectoare fac parte din categoria celor comune tuturor speciilor aparținând genului.

Explorarea răspunsului imun primar indus de vaccinarea BCG comparativ cu răspunsul imun manifestat la persoane sensibilizate înainte de vaccinare a relevat diferențe semnificative în ce privește reactivitatea față de PPD (derivat proteic purificat obținut din tuberculina) la indivizii aparținând celor două grupe testate (64). Persoanele nesensibilizate anterior nu au reacționat față de diferite preparate antigenice micobacteriene în primele patru săptămâni după vaccinare, în această situație răspunsul imun dezvoltându-se treptat pe parcursul anului în care s-a realizat studiul. La persoanele sensibilizate anterior vaccinării s-a înregistrat un răspuns imun puternic și instalat rapid, cu un maxim de intensitate în cursul primei săptămâni după vaccinare. Diferența dintre cele două tipuri de răspuns este similară celei existente între răspunsul imun primar și cel secundar, de memorie, cel din urmă caracterizându-se nu numai printr-o inițiere mai rapidă dar și prin intensitate mai mare.

Explorarea *in vitro* a populațiilor de LT provenite de la persoane vaccinate BCG releva activarea unor populații celulare cu specificități foarte variate, stimulate de toate tipurile de antigene micobacteriene (64). În cursul răspunsului imun primar are loc stimularea treptată a acestor limfocite cu repertoriu variat. Primele antigene recunoscute de LT după o săptămână de la vaccinare sunt cele secretate, din filtratul de cultură, urmând apoi recunoașterea celor din peretele celular și membranare. Preparatele de antigene citosolice induc un răspuns imun întârziat, decelabil după 1 an de la momentul vaccinării. Rezultate similare s-au obținut și pe modele animale, la care primele antigene recunoscute de celulele sistemului imun specific după infecție erau cele secretate, urmate apoi de antigenele citosolice (hsp 65). Se confirmă astfel ipoteza conform căreia antigenele extracelulare (secretate sau provenite din peretele celular) reprezintă tinte cheie recunoscute la nivelul macrofagelor infectate în etapele inițiale ale infecției.

Investigarea specificitatii celulelor activate in urma vaccinarii BCG se poate realiza prin stimularea lor cu fractiuni antigenice cu valori apropiate ale maselor moleculare, extrase din filtratul de cultura pe termen scurt (ST-CF) al *M. tuberculosis*. Raspunsul imun este foarte heterogen, toti indivizii testati recunoscind un ansamblu de fractiuni antigenice.

O parte din indivizii testati raspund prin sinteza unor cantitati mari de IFN- γ , urmare a stimulării cu antigene cu masa moleculara joasa izolate din ST-CF, pe tot parcursul anului urmator vaccinarii. Una dintre cele mai importante tinte ale raspunsului imun este ESAT-6 care, la modelul animal, a fost identificata ca fiind tinta principala a raspunsului imun antituberculos de memorie (66). Gena ESAT-6 este absenta la toate tulpinile de BCG, fapt ce explica lipsa reactivitatii fata de aceasta proteina observata la persoanele vaccinate BCG.

Vaccinarea BCG initiaza un raspuns imun celular specific intens, ce consta in doua mecanisme efectorii, posibil protectoare: secretie de IFN- γ si activarea mecanismelor citotoxice (67). Desi pe modelele animale este demonstrata eficienta celor doua mecanisme, in cazul indivizilor umani exista doar dovezi indirecte care sa sustina implicarea IFN- γ si a mecanismelor citotoxice in asigurarea protectiei antituberculoase. Astfel, donatorii care au capacitatea de a controla evolutia infectiei prezinta activitate citotoxica intensa si numar mai mare de LT producatoare de IFN- γ comparativ cu pacientii cu forme avansate de tuberculoza. De asemenea, pacientii cu pleurezie tuberculoasa prezinta la nivelul lichidului pleural LT CD4+ antigen specifice, producatoare de IFN- γ si citotoxice. Clonele de LT CD4+ citotoxice sunt in principal LTh1 (68), dar nu este certa implicarea acelorasi clone in ambele functii efectorii la subiectii umani. La acelasi donator se pot manifesta simultan si activitati citotoxice nespecifice iar, pe de alta parte, activitatile citotoxice pot fi realizate si de alte populatii de LT: LT CD8+, LT $\gamma\delta$, celule NK.

Rezultatul studiilor lui Ravn demonstreaza raspunsuri imune asemanatoare fata de antigenele *M. tuberculosis* la persoanele nesesibilizate sau sensibilizate anterior, ce constau in activarea mecanismelor efectorii ale celulelor Th1 si citotoxice, diferite inregistrandu-se doar la nivel de cinetica a raspunsului imun.

Studiile de citometrie in flux efectuate pe celule mononucleare periferice provenite de la indivizi vaccinati BCG si stimulate apoi *in vitro* cu preparate antigenice micobacteriene releva existenta unei populatii bine reprezentate de LT $\gamma\delta$

care pare a fi implicata in raspunsul imun fata de infectia micobacteriana. Cresterea importanta a LT $\gamma\delta$ specifice antigenelor micobacteriene reprezinta un indicator al unui raspuns imun asemanator celui de memorie (*memory-like*) indus de vaccinarea BCG la nivelul acestei populatii limfocitare (69).

Extractele micobacteriene stimuleaza preferential LT $\gamma 9+\delta 2+$, celulele cu acest fenotip fiind prezente in numar mare la persoanele PPD+, asimptomatice, infectate cu *M. tuberculosis*, ceea ce indica un posibil efect protector al LT $\gamma 9+\delta 2+$. Proliferarea populatiei de LT $\gamma\delta$ in prezenta extractelor micobacteriene este conditionata de activitatea LTh CD4+ a caror functie helper se manifesta, in aceasta situatie, prin sinteza de IL-2. La rindul lor, LT $\gamma\delta$ functioneaza ca celule helper pentru LT CD4+ si LT CD8+, contribuind astfel la reglarea raspunsului imun *in vivo*.

LT $\gamma\delta$ au capacitatea de a sintetiza cantitati mari de IFN- γ , participind alaturi de LT $\alpha\beta$ si celulele NK la elaborarea raspunsului imun tip 1. De asemenea este posibil ca LT $\gamma\delta$ rezultate in urma vaccinarii BCG sa fie implicate in etapele initiale ale raspunsului imun primar *in vivo*, prin stimularea sintezei de IFN- γ la nivelul LT $\alpha\beta$ precum si in activitatea citotoxica a LT sau in stimularea functiilor microbicide ale macrofagelor (69).

Tendintele actuale in domeniul vaccinologiei urmaresc producerea unei noi generatii de vaccinuri, mai putin agresive, care sa contina agenti infectiosi omoriti. Studiile comparative efectuate pe soareci vaccinati cu BCG viu si cu tulpina omorita de BCG au permis identificarea factorilor implicati in obtinerea raspunsului imun protector urmare a administrarii vaccinului BCG viu (70). Atit bacteria vie cit si cea omorita induce in prima saptamina dupa vaccinare raspunsuri imune asemanatoare in tesuturile in care s-a inoculat vaccinul si la nivelul ganglionilor limfatici. Raspunsul local initial este nespecific si consta in sinteza de IFN- γ (de catre celulele NK si probabil LT $\gamma\delta$) si IL-1 β al carei nivel crescut este un indicator de activare a monocitelor/ macrofagelor.

Dupa ziua a 14-a apar diferente semnificative intre cele doua tipuri de raspuns imun. La locul inocularii vaccinului viu, infiltratul inflamator devine mai abundent, dar cantitatea de IFN- γ si numarul bacililor acido-rezistenti (BAR) scad in paralel cu cresterea acestora la nivelul ganglionilor limfatici. De asemenea se inregistreaza si cresterea nivelului iNOS (monoxid de azot- sintetaza inductibila), enzima ce

reprezinta un marker de activare a macrofagelor si care este probabil unul dintre cei mai importanti efectori microbicizi.

Diferentele dintre rezultatele vaccinarii cu cele doua tulpini BCG (vie si omorita) pot fi determinate de capacitatea bacilului viu de a ajunge in ganglionii limfatici. $\text{TNF-}\alpha$ si $\text{IL-1}\beta$ favorizeaza migrarea celulelor Langerhans, in timp ce precursorii celulelor dendritice au capacitatea de a fagocita BCG si de a stimula un raspuns imun specific la nivelul LT atat la soareci cit si la oameni (71). Dupa vaccinarea cu BCG viu, la nivelul ganglionilor limfatici sunt prezente celule dendritice mature in numar mare.

Perspectivale vaccinarii antituberculoase

Eficienta limitata a vaccinarii BCG a impus reorientarea catre fabricarea de noi vaccinuri prin tehnici de inginerie genetica sau bazate pe utilizarea unor tulpini micobacteriene nepatogene.

Multe dintre cercetarile actuale in domeniul vaccinarii antituberculoase urmaresc izolarea acelor fractiuni antigenice din *M.tuberculosis* care induc in organism un raspuns imun protector si apoi includerea acestora, sub forma de copii multiple, in vectori corespunzatori.

O alta varianta de vaccinare testata in prezent consta in administrarea de micobacterii saprofite din mediul inconjurator, lipsite de potential patogen si care nu produc reactii locale severe in cazul administrarii lor la persoane reactive la tuberculina. Din aceasta categorie face parte *M.vaccae*, o micobacterie non-patogena, cu crestere rapida, si care prezinta un potential imunoterapeutic testat la cazurile de tuberculoza activa.

a) Vaccinuri antituberculoase preparate din recombinanti genici

Din ansamblul metodelor de inginerie genetica, tehnologia ADN-ului recombinant ofera noi perspective de preparare a unor vaccinuri. Vectorii utilizati sunt reprezentati de microorganisme atenuate.

Principiul metodei de preparare este similar celui de clonare a genelor care codifica anumite proteine. Prin tehnici de biologie moleculara, gena care codifica antigenul dorit este inserata in genomul vectorului. Aceasta gena inserata, impreuna cu genomul microorganismului, este transcrisa si translata, obtinindu-se astfel

antigenul protector dorit impreuna cu alte proteine ale microorganismului. In urma administrarii unui astfel de vaccin se induce raspuns imun umoral si mediat celular atit impotriva antigenului protector cit si fata de proteinele microorganismului vector (72).

Antigenele secretate de *M. tuberculosis* in cursul cresterii pe mediul de cultura sunt considerate ca fiind componente esentiale ale unui viitor vaccin antituberculos cu eficienta mai mare decit BCG (73). Utilizarea unor tehnici de exprimare a acestor proteine sub forma recombinanta rezolva dificultatile de ordin tehnic pe care le prezinta purificarea biochimica a proteinelor din cultura si testarea lor in asociere cu diferiti adjuvanti. Obtinerea unor cantitati mari de proteine ale *M. tuberculosis* permite utilizarea lor in studii pentru obtinerea de noi vaccinuri sau ca tinte ale unor noi chimioterapice antituberculoase (9).

Testarile efectuate pe *Escherichia coli* si *Bacillus subtilis* ca gazde pentru sinteza proteinelor *M. tuberculosis* au avut rezultate nesatisfacatoare. Utilizarea *M. smegmatis* si *M. vaccae*, micobacterii nepatogene cu crestere rapida, a permis exprimarea si sinteza unor cantitati crescute de proteine extracelulare majore recombinante ale *M. tuberculosis*, in forma lor nativa (74). Ambele specii micobacteriene cresc de 10 ori mai repede decit *M. tuberculosis* si produc proteine extracelulare in cantitati de 5-10 ori mai mari .

M. smegmatis produce patru dintre proteinele extracelulare majore ale *M. tuberculosis*, dar in cantitati diferite fata de *M. tuberculosis*; in culturile de *M. tuberculosis*, cea mai bine reprezentata cantitativ este proteina de 30 de kDa, urmata in ordine descrescatoare de proteinele de 32, 16 si 23,5 kDa, raportul fiind aproximativ 3:2:1,5:1 ; la nivelul *M. smegmatis*, cantitatea de proteina de 23,5 kDa exprimata este cel putin de doua ori mai mare decit pentru celelalte trei proteine, raportul aproximativ fiind de 1,5:1,5:1:3 pentru proteinele de 30, 32, 16 si 23,5 kDa. Cauza acestor diferente cantitative nu este cunoscuta.

M. vaccae este o micobacterie lipsita de potential patogen, prezenta in sol, si care a fost utilizata in testari clinice ca agent imunoterapeutic antituberculos adjuvant, in special la cazurile multirezistente la chimioterapice, in situatiile de asociere a infectiei cu HIV, dar si in alte afectiuni al caror mecanism patogenetic este de natura imunologica (6). Spre deosebire de vaccinul BCG, *M.vaccae* se administreaza ca preparat omorit termic. Mecanismele care stau la baza posibilei sale actiuni

terapeutice nu sunt cunoscute dar se stie ca atunci cind este administrat in doza adecvata induce un raspuns imun de tip 1 intens (75). *M. vaccae* are in egala masura capacitati terapeutice si profilactice in ce priveste infectia cu *M. tuberculosis* la modele murine si de asemenea este un adjuvant util pentru inducerea unui raspuns imun de tip 1 de catre antigenele asociate.

Sistemele genetice bazate pe exprimarea unor antigene recombinante in *M. vaccae*, create in scopul studierii raspunsului imun fata de aceste proteine, sunt eficiente in special in cazul acelor antigene ale *M. tuberculosis* a caror imunogenicitate este sporita de modificarile posttranslationale. Unul dintre antigenele *M. tuberculosis* exprimate in *M. vaccae* si testate sub aceasta forma, cu rezultate controversate insa, este antigenul lipoproteic cu masa moleculara 19 kDa (75).

Virusul *Vaccinia* (*Cowpox virus*) reprezinta un vector potrivit pentru clonare, datorita capacitatii sale de replicare eficienta in organismul uman. Incercarile de preparare a unui astfel de vaccin antituberculos s-au bazat pe inserarea in genomul virusului *Vaccinia* a unor gene apartinand *M. tuberculosis* care codifica proteinele micobacteriene cu mase moleculare de 71, 65, 35, 19 si 12 kDa (76). Injectarea la soarece a virusului recombinant a determinat sinteza de anticorpi impotriva proteinelor respective.

In studiile sale experimentale, Zhu a testat capacitatea protectoare a unor alte fractiuni antigenice micobacteriene, si anume glico-lipoproteinele de 19 si respectiv 38 de kDa ale *M. tuberculosis*. Ambele imunogene au fost exprimate in cantitati mari de celulele infectate cu virusul *Vaccinia* recombinant ce contine genele celor doua antigene. Administrarea virusului recombinant la soareci infectati cu *M. tuberculosis* a determinat scaderea semnificativa a numarului de bacterii la nivel pulmonar comparativ cu soarecii la care s-a administrat virusul control. Acesta este primul dintre rezultatele cercetarilor efectuate pe virusuri recombinante care releva rolul posibil al glico-lipoproteinelor secretate administrate impreuna cu virusul *Vaccinia* in realizarea protectiei antituberculoase (24).

b) Vaccinarea ADN

Vaccinarea ADN reprezinta o metoda eficienta de exprimare *in vivo* a unor antigene nonself permitind astfel imunizarea indivizilor fata de diferite virusuri, protozoare sau micobacterii. Vaccinurile ADN sunt alcatuite din plasmide ADN care

contin gene ce codifica sinteza unui anumit imunogen. Plasmidul se administreaza parenteral, sub forma unor solutii apose, sau sunt invelite in sfere din aur si injectate intramuscular sau subcutanat. Vectorii plasmidici sunt apoi internalizati de celulele musculare, la locul inocularii, ramainind extracromozomial in interiorul acestor celule si apoi sunt transcrisi si translati in proteina dorita. Proteinele exprimate ca rezultat al vaccinarii ADN sunt procesate si prezentate pe calea MHC I, inducind un raspuns citotoxic al LT. Limfocitele T helper si limfocitele B sunt de asemenea activate (77) .

Un dezavantaj al vaccinarii ADN este reprezentat de posibilitatea ca totusi ADN-ul administrat sa se integreze in genomul celulei gazda si astfel sa se produca fenomene de mutageneza oncogenica. De asemenea, un alt posibil efect advers al vaccinarii ADN consta in sinteza de anticorpi anti-ADN si aparitia de manifestari autoimune (72).

Administrarea experimentală de plasmide ADN are ca rezultat secretia de proteine *in vivo*, producerea unui raspuns imun umoral si celular si, in cele din urma, protejarea animalelor fata de boli infectioase cu etiologii diferite justificind astfel tentativele de inlocuire a vaccinurilor vii cu vaccinuri ADN.

Mecanismele prin care diferitele vaccinuri ADN confera imunitate protectoare nu sunt inca bine cunoscute. Unul dintre factorii care influenteaza rezultatul vaccinarii ADN ar putea fi natura populatiei de celule prezentatoare de antigen si modul in care aceste celule proceseaza antigenul. Se pare ca ADN-ul bacterian, prin fragmentele care stimuleaza sinteza de IL-2, TNF- α dar si celulele NK influenteaza de asemenea raspunsul imun indus de vaccinarea ADN.

Dupa administrarea lor ca vaccinuri ADN, proteinele micobacteriene implicate in inducerea unui raspuns imun protector actioneaza prin mecanisme diferite:

- **Ag 38 kDa** este implicat in transportul bacterian de fosfati. Vaccinul ADN ce contine genele glicoproteinei 38 kDa are gradul cel mai inalt de specificitate dintre toate vaccinurile ADN testate, o proteina cu structura asemanatoare acestui Ag fiind intilnita doar la *M.intracellulare*.

Capacitatea acestei structuri de a induce un raspuns imun protector infirma opiniile potrivit carora antigenele comune ar fi mai eficiente in vederea fabricarii unui vaccin decit cele cu specificitate de specie. Utilizarea unui vaccin ADN Ag 38 kDa nu ar presupune riscul dezvoltarii unor manifestari autoimune asa cum s-ar putea intimpla in cazul vaccinarii cu proteina de stress hsp65 a *M.leprae*.

- **Ag 85B** prin functia sa de legare a fibronectinei poate fi implicat in procesul de fagocitare a micobacteriei si initierea unui raspuns imun fata de aceasta tinta ar putea avea ca rezultat inhibarea procesului de multiplicare bacteriana.

- Antigenului **hsp 65** poate avea functie de transportor universal pentru vaccinuri, de multe ori indivizii fiind sensibilizati fata de aceasta structura in urma contactului cu microbi comensali, cu reactivitate incrucisata.

- Un alt antigen utilizat experimental ca vaccin ADN datorita capacitatii sale de a determina un raspuns imun protector este o **proteina de 36 kDa** apartinund *M.leprae* a carei structura prezinta secvente de identitate cu un polipeptid codificat de genomul *M.tuberculosis*.

Majoritatea antigenelor care induc raspuns imun protector fac parte din categoria proteinelor secretate in mod activ de micobacteria vie, aceasta caracteristica fiind valabila doar in cazul Ag 85B si a Ag 38kDa dar nu si pentru celelalte antigene mentionate anterior: hsp 65 si proteina de 36 kDa.

VIII. Bibliografie

1. Schmidt S., 2000. *A short history of tuberculosis*. Mod. Asp. Immunobiol. 1(3): 95
2. Flynn J.L., 2001. Tuberculosis: latency and reactivation . Infect. Immun. 69(7): 4195-4201
3. Grange J.M., 1990. *The mycobacteria*, din *Principles of bacteriology, virology and immunity*.ed by Topley and Wilson, vol. 2: 73-103
4. Amicosante M., 1995. *Evaluation of a novel tuberculosis complex-specific 34 kDa protein in the serological diagnosis of tuberculosis*. European Respiratory Journal. 1995. 8: 2008
5. Mendez-Samperio P., 1995. *Specificity of T cells in human resistance to Mycobacterium tuberculosis infection*. Cellular Immunology. 162(2):194
6. Grange J.M., 1998, *The Mycobacteria*, din *Microbiology and microbial infections*, ed. by Topley and Wilson, vol.2
7. Gomez M., 2000. *Identification of secreted proteins of Mycobacterium tuberculosis by a bioinformatic approach*. Infection and Immunity, 68(4): 2323- 2327
8. Pal P.G., 1992. *Immunization with extracellular proteins of M. tuberculosis induces cell-mediated immune responses and substantial protective immunity in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis*. Infect. Immun., 60(11): 4781-4792
9. Andersen P., 1994. Effective vaccination of mice against M. tuberculosis infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect. Immun.*, 62(6): 2536-2544
10. Andersen P., 1991. Proteins released from M.tuberculosis during growth. *Infection and Immunity*. 59(6):1905
11. Daniel TM., 2000. *Immunology of tuberculosis* din *Tuberculosis*, vol.144, edited by L.B. Reichman : 187-214).

12. Sada E.D, 1991. *Purification and characterization of the 30 000 Da native antigen of M.tuberculosis and characterization of six monoclonal antibodies reactive with a major epitope of this antigen.* J. Lab. Clin.Med 118 : 589-598
13. Havlir D.V.,1991. *Human immune response to M.tuberculosis antigens.* Infect. Immun. 59 : 665-670
14. Boesen H., 1995 *Human T-cell responses to secreted antigen fractions of M.tuberculosis.* Infection and Immunity. 63(4): 1491
15. Sorensen A., 1995. *Purification and characterisation of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by M.tuberculosis.* Infection & Immunity. 63(5):1710
16. Brandt L., 1996. *Key epitopes on the ESAT-6 antigen recognized in mice during the recall of protective immunity to M. tuberculosis.* J.Immunol 1996 ; 157 : 3527- 3533
17. Harboe M. ,1996. *Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis and for its absence in Mycobacterium bovis BCG.* Infection &Immunity. 64(1):16
18. Mustafa A.S., 1998. *Comparison of antigen-specific T-cell responses of tuberculosis patient using complex or single antigens of M.tuberculosis.* Scand.J.Immunol. 48(5):535-543
19. Roche PW., 1996. *Human T-cell epitopes on the Mycobacterium tuberculosis secreted protein MPT64.* Scandinavian Journal of Immunology. 43(6): 662
20. Oettinger T., 1995 *Mapping of the delayed-type hypersensitivity-inducing epitope of secreted protein MMMPT64 from M.tuberculosis.* Infect.Immun. 63(12) :4613-4618
21. Elhay M.J.,1998. *Delayed -type hypersensitivity response to ESAT-6 and MPT64 from M.tuberculosis in the guinea pig.*Infect.and Immun .66(7) :3454-3456
22. van Pinxteren L.A., 2000. *Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 si CFP10.* Clinical and diagnostic laboratory immunology 7(2) :155-160
23. Vordermeier H.M., 1991. *Identification of a T-cell stimulatory peptides from the 38-kDa protein of M.tuberculosis"* J.Immunol. 147:1023
24. Zhu X., 1997 *Functions and specificity of T cells following nucleic acid vaccination of mice against M.tuberculosis infection.* J. Immunol., 158: 5921-5926
25. Bonato V.L, 1998 . *Identification and characterization of protective T-cells in hsp 65 DNA-vaccinated and M. tuberculosis- infected mice.* Infect. Immun. 66(1): 169-175
26. Hingley – Wilson, 2000, *The immunobiology of the mycobacterial infected macrophage*, Mod. Asp. Immunobiol. 1(3), 96- 101
27. Chan J. ,1991. *Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of M.tuberculosis in macrophages.* Infection and Immunity. 59: 1755
28. Dunn P. ,1995. *Virulence ranking of some M.tuberculosis and M.bovis strain according to their ability to multiply in the lungs, induce lung pathology and cause mortality in mice.* Infection and Immunity. 63:3428
29. Crowle A., 1991. *Evidence that vesicles containing living, virulent M.tuberculosis or M.avium in cultured human macrophages are not acidic.* Journal of Immunology. 59(5):1823
30. McDonough K.A., 1993. *Pathogenesis of tuberculosis: interactions of M.tuberculosis within macrophages.* Infection and Immunity. 61: 2763
31. Ehlers S. ,1994. . *Progress in TB research: Robert Koch's dilemma revisited.* Immunology Today. 15: 1
32. Flynn J.L., 1992. *Major MHC I-restricted T cells are required for resistance to M.tuberculosis infection.* Proc Natl Acad Sci USA.89 : 12013-12017
33. Kaufmann S.H., 1993, *Immunity to intracellular bacteria*, in *Fundamental immunology*, Ed. by WE. Paul, Raven Press,: 1252-1287
34. Flynn J.L., 2001. *Immunology of tuberculosis.* Annu.Rev. Immunol. 19:93-129
35. Laochumroonvorapong, P. 1996. *H2O2 induces monocyte apoptosis and reduces viability of M.avium-M.intracellulare.* Infection and Immunity.64: 452
36. Cooper A.M., 2000. *Transient Loss of Resistance to Pulmonary Tuberculosis p47^{phox} Mice.* Infect. Immun. 68: 1231-1234.
37. Flynn J.A., 1998. *Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis.* J. Immunol. 160 :1796-1803
38. Wang C-H.,1998. *Increased exhaled NO in active pulmonary tuberculosis due to inducible NOS upregulation in alveolar macrophages.* Eur. Resp.J 11 :809-815
39. Fulton SA., 1996. *Interleukin-12 production by human monocytes infected with M.tuberculosis: role of phagocytosis.* Infection and Immunity, 64(7): 2523-31

40. Boom W.H., 1992. *Role of the mononuclear phagocyte as antigen-presenting cell for human gamma delta T cells activated by live M.tuberculosis*. Infect.Immun. 60 :3480-3488
41. Lin Y.,1996. *Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis*. Infection and Immunity, 64(4): 1351-6
42. Munk ME., 1996. *Functions of T-cell subsets and cytokines in mycobacterial infections*. Eur Respir J Suppl. 20: 668-75
43. Toossi Z., 1995. *Enhanced production of TGF- β by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF- β in tuberculous granulomatous lung lesions*. J.Immunol 154 :465-473
44. Tan J.S.,1997 *Human alveolar T lymphocytes responses to M.tuberculosis antigens : role for CD4+ and CD8+ cytotoxic Tcells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis*. J.Immunol.159 :290-297
45. Mazzaccaro RJ, 1996. *Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by Mycobacterium tuberculosis infection*. Proc Natl Acad Sci U S A , 93 (21): 11786-791
46. Orme IM., 1993. *T cell response to Mycobacterium tuberculosis*, J Infect Dis., 167 (6): 1481-97
47. D'Souza CD., 1997. *An anti-inflammatory role for gamma delta T lymphocytes in acquired immunity toMycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 158 (3): 1217-21
48. Li B., 1996. *Disease-specific changes in gammadelta T cell repertoire and function in patients with pulmonary tuberculosis*. J Immunol, 157 (9): 4222-29
49. Pechhold K., 1994. *Primary action of V gamma9-expressing gamma delta T cells by M.tuberculosis Requirement for Th1 type CD4 T cell help and inhibition by IL-10*. J.immunol. 152:4984-4992
50. Kithiganahalli N.B., 1995. *Alveolar macrophages as accessory cells for human γ/δ T cells activated by Mycobacterium tuberculosis.*, 154 (11): 5959-68
51. Weshch D., 1996. *Mycobacteria-reactive gamma delta T cells in HIV-infected individuals: lack of Vgamma 9 cell responsiveness is due to deficiency of antigen-specific CD4 T helper type 1 cells*. Eur. J. Immunol., 26: 557-62
52. Boom WH., 1996. *The role of T-cell subsets in Mycobacterium tuberculosis infection*. Infect Agents Dis 5 (2): 73-81
53. Vordermeier HM., 1995. *T-cell recognition of mycobacterial antigens*. Eur Respir J Suppl., 20: 657-67
54. Tsukaguchi K, 1995. *CD4+ alpha beta T cell and gamma delta T cell responses to Mycobacterium tuberculosis. Similarities and differences in Ag recognition, cytotoxic effector function, and cytokine production*. J.Immunol . 154 (4): 1780-96
55. Porcelli S, 1992. *CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen*. Nature , 360 (6404): 593-97
56. Beckman EM, 1994. *Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells*. Nature , 372 (6507): 691-694
57. Sieling PA, 1995. *CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens*. Science, 269 (5221): 227-30
58. Thomssen H, 1995. *Human CD4-CD8- alpha beta + T-cell receptor T cells recognize different mycobacteria strains in the context of CD1b.*, Immunology 85 (1): 33-40
59. Beckman EM, 1996. *CD1c restricts responses of mycobacteria-specific T cells. Evidence for antigen presentation by a second member of the human CD1 family*. 1996, J Immunol 157 (7): 2795-803
60. Dannenberg, AM. 1994. *Roles of cytotoxic delayed-type hypersensitivity and macrophage-activating cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis*. Immunobiology. 191(4-5):461
61. Friedland, JS. 1993. *Phagocytosis of M.tuberculosis or particulate stimuli by human monocytic cells induces equivalent monocyte chemotactic protein-1 gene expression*. Cytokine. 5(2):150
62. Shijubo, N. 1994. *Intercellular adhesion molecule 1 antigen in tuberculosis*. Kekkaku. 69(7):471
63. Berman, JS. 1996. *Chemotactic activity of mycobacterial lipoarabinomannans for human blood T lymphocytes in vitro*. Journal of Immunology. 156(10):3825
64. Ravn P., 1997. *Non-MHC restricted cytotoxic activity of blood mononuclear cells stimulated with secreted mycobacterial proteins and other mycobacterial antigens*. Infect. Immun., 62(12): 5305-5311

65. Fine P.E.M., 1998. *The effect of heterologous immunity upon the apparent efficacy of (e.g.BCG) vaccines.* Vaccine, 16(20): 1923-1928
66. Lalvani A., 1998. *Human cytolytic and IFN- γ secreting CD8⁺ LT specific for M. tuberculosis.* Proc Natl Acad Sci USA, 95(1): 270-275
67. Denis O., 1997. *Induction of cytotoxic T-cell responses against culture filtrate antigens in M. bovis bacillus Calmette-Guérin- infected mice.* Infect. Immun, 65(2): 676-684
68. Ravn P., 1994. *Non-MHC restricted cytotoxic activity of blood mononuclear cells stimulated with secreted mycobacterial proteins and other mycobacterial antigens.* Infect. Immun., 62(12): 5305-5311
69. Hoft D.F., 1998. *BCG vaccination enhances human $\gamma\delta$ T cell responsiveness to mycobacteria suggestive of a memory-like phenotype.* J. Immunol. 161(2): 1045-1054
70. Chambers M.A., 1997. *Differential responses to challenge with live and dead M. bovis bacillus Calmette- Guérin.* J. Immunol. 1997, 158: 1742-1748
71. Daugelat S., 1995. *Influence of mouse strain and vaccine viability on T-cell responses induced by M. bovis bacillus Calmette- Guérin.* Infect Immun., 63(5): 2033-2040
72. Fiordalisi M.N., 1998. *Active and passive immunization,* in *Microbiology and microbial infections*, ed. by Topley and Wilson, vol. 3, 1998: 107-119
73. Horwitz M.A., 1995. *Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of M. tuberculosis.* Proc Natl Acad Sci USA, 92(5):1530-1534
74. Harth G., 1997. *High level heterologous expression and secretion in rapidly growing nonpathogenic mycobacteria of four major M. tuberculosis extracellular proteins considered to be leading vaccine candidates and drug targets,* Infect. Immun, 65(6): 2321-2328
75. Abou- Zeid Christiane, 1997. *Induction of a type 1 immune response to a recombinant antigen from M. tuberculosis expressed in M. vaccae.* Infect. Immun. 65(5): 1856-1862
76. Lyons J., 1990. *Expression of M. tuberculosis and M. leprae protein by Vaccinia virus.* Infect. Immun, 58(12): 4089-4098
77. Tighe Helen, 1998. *Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint,* Immunol. Today, 19(2):89-97