

YAYGIN *MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG İNFEKSİYONUNUN LABORATUVAR TANISI

LABORATORY DIAGNOSIS OF DISSEMINATED *MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG INFECTION

Cengiz ÇAVUŞOĞLU¹ Pınar AKINCI¹ İlknur SÖYLER¹ Nuri BAYRAM² Fadıl VARDAR²

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir

¹ Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

² Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Anahtar Sözcükler: *Mycobacterium bovis* BCG, yaygın infeksiyon, moleküler tanı, IFN- γ reseptör defekti

Keywords: *Mycobacterium bovis* BCG, disseminated infection, molecular diagnosis, IFN- γ receptor deficiency

Geliş: 29 Mayıs 2006

Kabul: 04 Ocak 2007

ÖZET

Aşı kökeni olarak kullanılan *Mycobacterium bovis* BCG konjenital veya kazanılmış bağışıklık yetmezliği olan bireylerde yaygın infeksiyona yol açabilmektedir. Homozigot IFN- γ reseptör defekti olan dokuz aylık erkek bebekte BCG aşısından kısa bir süre sonra yaygın BCG infeksiyonu gelişti. Aksiller lenf düğümünden hazırlanan preparatların asidorezistan boyamasında çok sayıda asidorezistan basil görüldü. Kültür olarak 31.5 günlük inkübasyonun ardından MB/BacT (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), dördüncü haftada Löwenstein - Jensen besiyerinde asidorezistan basil üredi. Kültürde üreyen bakteri PCR-ters hibridizasyon temeline dayanan Genotype MTBC (Hain Lifescience, Nehren, Almanya) testi ile *M. bovis* BCG olarak tanımlandı.

SUMMARY

The currently used vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG, may cause disseminated infection in patients with congenital or acquired immune deficiency. Disseminated BCG infection developed shortly after BCG vaccination in a 9 month-old of male baby with homozygous IFN- γ receptor deficiency. The acid-fast staining of the dissected axillary lymph node revealed numerous acid-fast bacilli. Which later grew on MB/BacT (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) automated system and Löwenstein-Jensen slant after 31.5 day and 4 week incubation periods, respectively. The culture growing bacteria was identified as *M. bovis* BCG by Genotype MTBC assay (Hain Lifescience, Nehren, Germany) based on PCR-reverse hybridization.

GİRİŞ

Aşı kökeni olarak kullanılan *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG) *Mycobacterium tuberculosis* kompleks üyesi mikobakterilerdendir. *Mycobacterium bovis* BCG, *M. bovis*'in 13 yıl boyunca 230 kez pasajlanmasıyla elde edilmiştir. Dünya'nın bir çok ülkesinde olduğu gibi Türkiye'de de verem aşısı olarak kullanılan BCG 0.1-38/1000 arasında değişen oranlarda süpüratif lenfadenit, 0.01-330/1000000 değişen oranlarda osteit gibi lokal süpüratif komplikasyonlara yol açmaktadır. Buna karşılık altta yatan konjenital veya kazanılmış hücre-

sel bağışıklık yetmezliğin olduğu durumlarda BCG aşısından sonra BCG-osis olarak tanımlanan lenf düğümleri, akciğerler, böbrek, dalak ve diğer organları tutan yaygın infeksiyon gelişebilmektedir. *Mycobacterium bovis* BCG'nin laboratuvarında fenotipik yöntemlerle tanımlanması zor ve zaman alıcıdır. Bu nedenle bir çok laboratuvar rutin uygulamada tanımlamayı *M. tuberculosis* kompleks olarak yapmakta, *M. tuberculosis* kompleks üyeleri olan *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium africanum* ve *Mycobacterium microti* ayırımını yapmamaktadır. Son

yıllarda genomik çalışmalarından elde edilen bilgilerle günümüzde *M. tuberculosis* kompleks üyelerinin ayrımını saatler içinde yapabilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)-ters hibridizasyon testleri ve spoligotiplendirme gibi yöntemler geliştirilmiştir (1-6).

Bu çalışmada, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği'nde interferon-gama (IFN- γ) reseptör defekti ve yaygın *M. bovis* BCG enfeksiyonu tanısıyla izlenen olgunun laboratuvar tanısı sunulmuştur.

OLGU

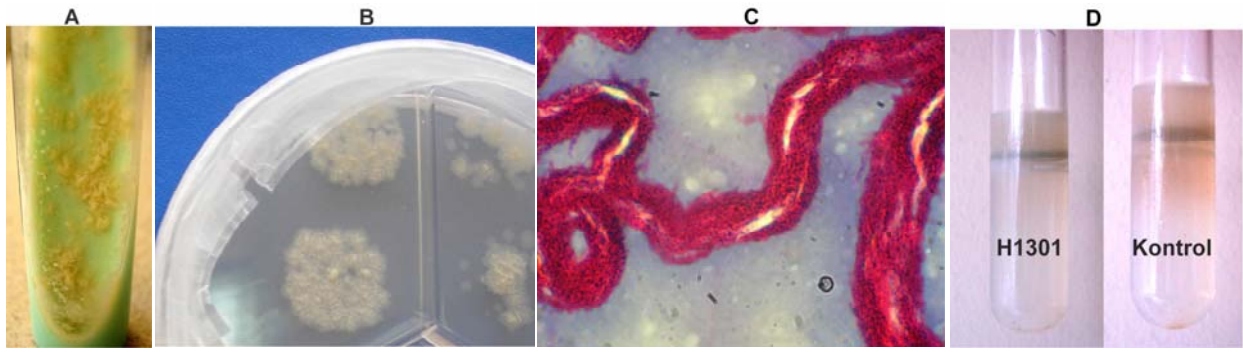
Üç aylıkken BCG aşısı yapılan dokuz aylık erkek bebek makülopapüler döküntü, hepatosplenomegali, aksiller ve servikal bölgede lenfadenomegali yakınmalarıyla Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği'ne yatırıldı. Yaygın tüberküloz düşünülen olguda altta yatan primer hastalığı araştırmak amacıyla yapılan incelemelerde homozigot IFN- γ reseptör defekti saptandı. Hastanın aksiller lenf düğümünden hazırlanan preparatların Kinyoun ve auramin-rhodamin boyamalarında asidorezistan basil görüldü. Lenf dokusunda TMA yöntemiyle (Gen-Probe MTD; San Diego, California) ile *M. tuberculosis* kompleks RNA'sı saptandı. Otuzbirbuçuk günlük inkübasyonun ardından MB/BacT (bio Mérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), dördüncü haftada Löwenstein Jensen (LJ) besiyerinde asidorezistan basil (izolat H1301) üredi. Yapılan biyokimyasal testlerde dört günlük ve yedi günlük pirazinamidaz testinin negatif olduğu saptandı (Şekil 1). İzolatın 7H10 agarda proporsiyon yöntemiyle yapılan duyarlılık testinde rifampin, izoniyazit, streptomisin ve etambutole duyarlı olduğu belirlendi. Kültürde üreyen bakteri PCR-ters hibridizasyon temeline dayanan Genotype Mycobacterium CM (Hain Lifescience, Nehren, Almanya) testi ile *Mycobacterium tuberculosis* kompleks olarak tanımlandı (Şekil 2a). Bu bulgularla *M. bovis* olarak tanınan bakteride *M. bovis* ile *M. bovis* BCG ayrımı için Genotype MTBC (Hain Lifescience, Nehren, Almanya) testi kullanıldı (Şekil 2b). Altı farklı *M. tuberculosis* kompleks üyesini tanımlayan proplar içeren PCR-ters hibridizasyon temelli bir yöntem olan Genotype MTBC testinde *M. bovis* BCG'ye özgül, tanı koydurucu bant paternleri saptandı. Ayrıca izolatın İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yapılan spoligotiplendirmesinde *M. bovis* BCG için karakteristik olan DR lokusları saptandı (Şekil 3).

TARTIŞMA

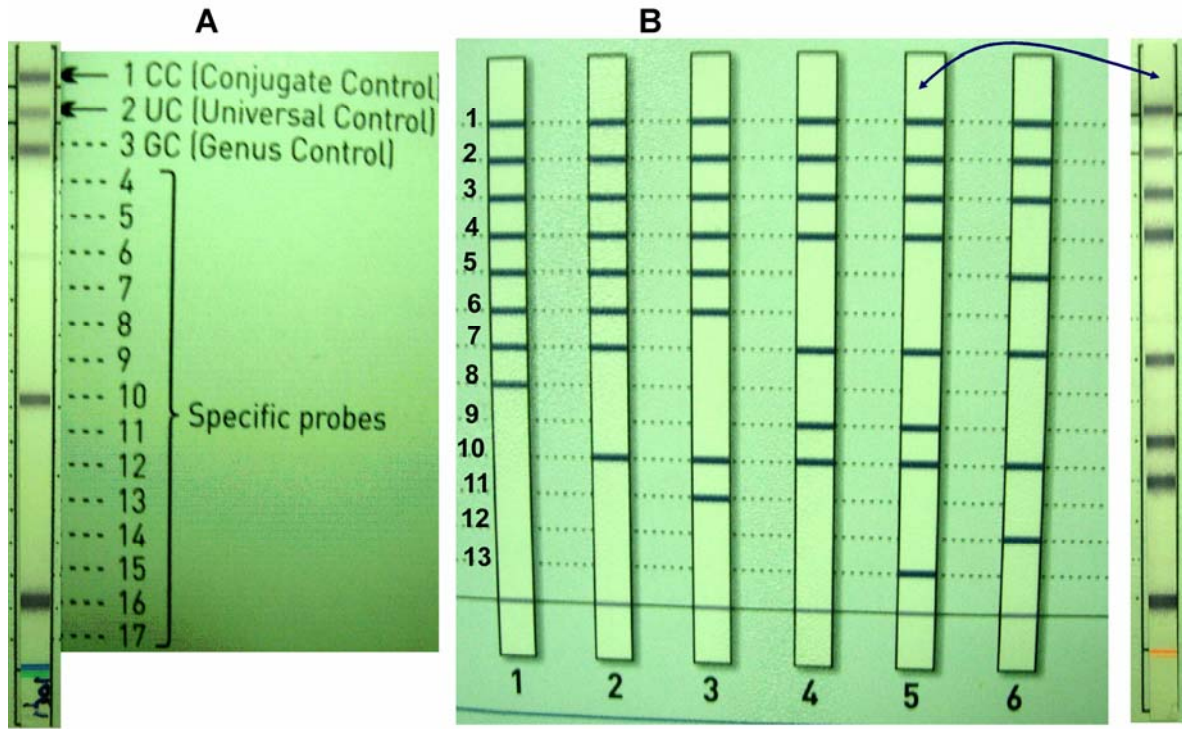
Mycobacterium tuberculosis kompleks üyesi olan *M. bovis* BCG klinik örneklerden *M. tuberculosis* kompleksi saptayan TMA yöntemiyle (Gen-Probe MTD; San Diego, California) *M. tuberculosis* kompleks olarak saptanmıştır. Bu laboratuvar kanıtın yardımıyla etkenin kültürde üremesi beklenmeden antitüberküloz tedaviye başlanmıştır. Kültürde üreyen bakteri Genotype Mycobacterium CM (Hain Lifescience, Nehren, Almanya) testi ile *Mycobacterium tuberculosis* kompleks olarak tanınmıştır (Şekil 2a). 16S-23S rRNA ITS gen bölgesini hedef alan ve insanlarda hastalık etkeni mikobakteri türlerinin önemli bir bölümünü saptayabilen Genotype Mycobacteria CM gibi PCR-ters hibridizasyon testleri rutin uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle haftalarca süren tanımlama işlemleri altı saat içinde tamamlanabilmektedir. Bu testler çok sayıda klinik çalışmada değerlendirilmiş hızlı, duyarlı ve özgül bulunmuştur (7).

Niyasin testinin negatif olması, nitratları nitritlere indirgememesi, pirazinamidaz üretmemesi, T2H ile üremesinin inhibe olması *M. bovis* ve *M. bovis* BCG'in ayırt edici özellikleridir. Buna karşılık, bazı *M. bovis* BCG kökenlerinde niyasin toplanma testi pozitif olabilmektedir (4, 5). Bu çalışmada incelenen izolat H1301'in pirazinamidaz testinin negatif olduğu saptandı. Fenotipik testlerle *M. bovis* ve *M. bovis* BCG ayrımını yapmak güçtür. Yüksek performanslı likit kromatografi (HPLC) ile yapılan hücre duvarı analizi *M. tuberculosis* kompleks üyelerinin ayrımında kullanılan yöntemlerden biridir (8). Bununla birlikte, HPLC rutin uygulamalar için uygun bir teknik değildir.

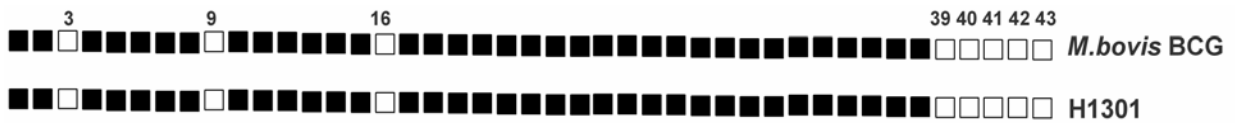
Son yıllarda genomik çalışmalarından elde edilen bilgilerle günümüzde *M. tuberculosis* kompleks üyelerinin ayrımını yapabilen ters hibridizasyon temeliyle çalışan Genotype MTBC (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Almanya) testi geliştirilmiştir. Genotype MTBC testiyle *gyrB* genindeki polimorfizimler ve *M. bovis* BCG'deki RD1 delesyonları temel alınarak *M. bovis* ssp. *bovis*, *M. bovis* ssp. *caprae*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* I, *M. microti* ve *M. tuberculosis*/I/*M. africanum* II/*M. canettii* tanımlanabilmektedir (6). İzolat H1301 Genotype MTBC ile *M. bovis* BCG olarak tanındı (Şekil 2b).



Şekil 1. İzolat H1301'in (A) LJ ve (B) 7H10 agar besiyerindeki kolonileri, sıvı besiyerinde üreyen bakterinin oluşturduğu (C) kord formasyonu ve (D) negatif pirazinamidaz testi



Şekil 2. (A) Genotype Mycobacterium CM testinde *M.tuberculosis* kompleks için tanı koydurucu 10 ve 16 numaralı problarda hibridizasyon bantları, (B) Genotype MTBC testinde *M. bovis* için spesifik 5 no.lu bant paterni (1. *M. tuberculosis*/*M. africanum* II/*M. canettii*; 2. *M.africanum* I; 3. *M. microti*; 4. *M. bovis* ssp. *bovis*; 5. BCG; 6. *M.bovis* ssp.*caprae*). Genotype MTBC testinde aşağıdaki problemler bulunmaktadır: 1. Konjugat kontrolü; 2. Amplifikasyon kontrolü (23S rRNA); 3. *M.tuberculosis* kompleks spesifik prob (23S rRNA); 4-12. *M. tuberculosis* kompleks üyelerini tanımlayıcı problemler (*gyrB*); 13. *M. bovis* BCG spesifik prob (RD1)



Şekil 3. 3, 9, 16, 39-43 nolu DR lokuslarının negatif olduğu *M.bovis* BCG için karakteristik spoligotiplendirme paterni

Spoligotiplendirme 37-41 bç'lik değişken DNA dizileriyle ayrılmış 36 bç'lik 43 direkt tekrar (*direct repeat*; DR) lokuslarındaki delesyonların değerlendirilmesini temel alan epidemiyolojik çalışmaların yanı sıra *M. bovis* BCG'nin tanımlanmasında kullanılan bir moleküler yöntemdir. Spoligotiplendirmede son beş DR lokusunda (39-43) delesyon saptanması *M. bovis* için tanımlayıcıdır. Beş DR lokusundaki delesyonlara ek olarak 3, 9 ve 16 nolu lokuslarda delesyon olması *M. bovis* BCG için karakteristiktir. Bu çalışmada incelenen kökünde *M. bovis* BCG için karakteristik spoligotiplendirme paterni saptandı (Şekil 3). Bununla birlikte, *M. bovis* BCG ile aynı spoligotiplendirme paterni gösteren *M. bovis* kökenlerinin olduğu da bilinmektedir (9, 10). Bu bulgularla izolat H1301 *M. bovis* BCG olarak tanınmıştır.

BCG aşısı Dünya Sağlık Örgütü'nün Genişletilmiş Aşılama Programı'nda yer alan altı aşıdan biridir. Amerika Birleşik Devletleri ve Hollanda'da BCG aşısı hiçbir zaman genel kullanım için önerilmemiştir. İsveç ve Çek Cumhuriyeti gibi ülkeler de bu politikaya dönmüştür. Dünyanın diğer bölgelerinde farklı politikalarla BCG aşısı uygulanmaktadır. Günümüzde her yıl yaklaşık 118 milyon doz BCG aşısı yapılmaktadır. 1921 yılından bu yana dünya genelinde üç milyar dozdan fazla BCG aşısı yapılmıştır. Bu uygulamalar sırasında immün yetmezliği olan bireyler dışında önemli bir yan etki görülme insidansının çok düşük olduğu saptanmıştır. BCG'nin

meninjit ve miliyer tüberküloz gibi yaygın tüberküloz formlarına karşı korunmada oldukça etkili (%80) olduğu düşünülmektedir. Buna karşılık, bu görüşü destekleyen verilerin çoğu gözlemsel ve olgu-kontrol çalışmalarından elde edilmiştir. BCG aşısının akciğer tüberkülozuna karşı koruyuculuğu aşının yapıldığı topluma, ülkeye ve kullanılan BCG alt türüne bağlı olarak oldukça değişkenlik (%0-80) göstermektedir. BCG aşısından daha etkili bir aşı gerekli olmakla beraber yeni aşılardan kontrollü uzun dönem aşı çalışmaları ile daha iyi koruma sağladığı kanıtlanıncaya kadar en azından bir on yıl daha BCG aşısı kullanılacaktır (2).

Sonuç olarak, immün sistemin hücresel komponentinin etkilendiği immün yetmezlik olgularında mikobakterilerin yol açtığı yaygın infeksiyonlara karşı duyarlılığın arttığı bilinmektedir. Özellikle interlökin 12 veya IFN- γ reseptör defekti olan çocuklarda BCG aşısından sonra gelişen yaygın BCG infeksiyonları bildirilmiştir (3, 11, 12). Bu nedenle BCG aşısının ardından gelişen lokal veya yaygın mikobakteri infeksiyonlarında *M. bovis* BCG etken olarak düşünülmeli ve hastalar immün yetmezlik yönünden araştırılmalıdır.

TEŞEKKÜR

Spoligotiplendirme için Sayın Prof. Dr. Rıza Durmaz'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Bloom BR, Fine PEM.** The BCG experience: Implications for future vaccines against tuberculosis. In: Bloom BR, ed. *Tuberculosis*. Washington, DC: ASM Press, **1994**: 531-57.
2. **Brosch R, Behr MA.** Comparative genomics and evolution of *Mycobacterium bovis* BCG. In: Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs WR, Jr eds. *Molecular Genetics of Mycobacteria*. Washington, DC: ASM Press, **2005**: 155-64.
3. **Mansouri D, Adimi P, Mirsaeidi M, et al.** Inherited disorders of the IL-12-IFN- γ axis in patients with disseminated BCG infection. *Eur J Pediatr* **2005**; 51: 753-7.
4. **Winn W Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G.** *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: Lippincott William and Wilkins, **2005**: 115-40.
5. **Kent PT, Kubica GP.** Public Health Laboratory. A Guide for the Level III Laboratory. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Atlanta: **1985**.
6. **Richter E, Weizenegger M, Rusch-Gerdes S, Niemann S.** Evaluation of Genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* **2003**; 41: 2672-5.
7. **Makinen J, Sarkola A, Marjamaki M, Vilijanen MK, Soini H.** Evaluation of GenoType and LIPA Mycobacteria assays for identification of Finnish mycobacterial isolates. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 3478-81.
8. **Zwolska Z, Augustynowicz-Kopec E, Zabost A, et al.** Modern microbiological methods in diagnosis of adverse reactions after BCG vaccination. Case reports. *Pneumonol Alergol Pol* **2004**; 72: 505-11.
9. **Zanini MS, Moreira EC, Salas CE, et al.** Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from south-east Brazil by spoligotyping and RFLP. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **2005**; 52: 129-33.

10. **Cave DM, Murray M, Nardell E.** Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs WR Jr, eds. *Molecular Genetics of Mycobacteria*. Washington, DC: ASM Press, **2005**: 33-46.
11. **Dorman SE, Picard C, Lammas D, et al.** Clinical features of dominant and recessive interferon gamma receptor 1 deficiencies. *Lancet* **2004**; 364: 2113-21.
12. **Dorman SE, Holland SM.** Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev* **2000**;11: 321-33.

İLETİŞİM

Doç. Dr. Cengiz ÇAVUŞOĞLU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
35100 Bornova, İZMİR
e-posta: cengiz.cavusoglu@ege.edu.tr