

# MYCOBACTERIUM BOVIS BCG SUŞUNUN NEDEN OLDUĞU FATAL DİSEMİNE ENFEKSİYON OLGUSU VE İZOLATIN SPOLİGOTİPLENDİRME İLE TANIMLANMASI

## A CASE OF FATAL DISSEMINATED INFECTION CAUSED BY MYCOBACTERIUM BOVIS BCG STRAIN AND THE IDENTIFICATION OF THE ISOLATE BY SPOLIGOTYPING

Gönül ASLAN<sup>1</sup>, Necdet KUYUCU<sup>2</sup>, Esin AYDIN<sup>1</sup>, Selami GÜNAL<sup>3</sup>, Gürol EMEKDAŞ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin. (drgaslan@mersin.edu.tr)

<sup>2</sup> Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Enfeksiyon Bilim Dalı, Mersin.

<sup>3</sup> İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.

### ÖZET

Aşı suşu olarak kullanılan *Mycobacterium bovis* BCG, bağışıklık yetmezliği olan bireylerde yaygın ve ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Bu raporda, kistik fibrozis ön tanısı ile ileri incelemeye alınan ve dışkı örneğinden aside dirençli basil (ARB) izole edilerek spoligotiplendirme ile *M.bovis* BCG suşu olarak tanımlanan disemine fatal bir tüberküloz olgusu sunulmaktadır. Bir yaşındaki erkek hasta, 20 gündür devam eden ateş, öksürük ve ishal şikayeti ile hastaneye yatırılmış ve öyküsünden, 4 aylıktan itibaren tekrarlayan alt solunum yolu enfeksiyonları geçirdiği öğrenilmiştir. Olgunun ailesinde tüberküloz geçirme ya da hasta bir kişiyle temas öyküsü yoktur. Klinik muayenede fiziksel gelişme geriliği saptanan olgunun akciğer grafisinde retiküler ve retikülonodüler infiltrasyon belirlenmiştir. Hastanın ter testi, kistik fibrozis gen mutasyonu ve metabolik taramaları normal bulunmuş, yatışının 12. günü antibiyotik tedavisine rağmen ateşinin devam etmesi ve akciğer infiltrasyonlarının olması nedeniyle PPD uygulanarak, üç gün üst üste alınan mide açlık suyu ve dışkı örneklerinde aside dirençli basil (ARB) varlığı araştırılmıştır. PPD'si negatif olan ve örneklerin direkt mikroskopik incelemesinde ARB görülemeyen olgunun dışkı kültüründe Löwenstein-Jensen besiyerinde 38. günde ARB üremesi saptanmıştır. BACTEC MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube) 960 sistemiyle (Becton-Dickinson, ABD) yapılan duyarlılık testinde, izolatın rifampin, izoni-azid, streptomisin ve etambutole duyarlı olduğu belirlenmiştir. İzolatın PNB (para-nitrobenzoic acid) besiyerinde ürememesi ve niasin ve nitrat aktivitesinin negatif olması üzerine spoligotiplendirme (spacer oligonucleotide typing) yapılmış ve *M.bovis* BCG suşu için karakteristik olan DR lokuslarının varlığı saptanmıştır. Kültür pozitifliği kliniğe bildirildiği zaman ise hastanın yaklaşık iki hafta önce kaybedildiği öğrenilmiştir. Sonuç olarak sunulan bu olgu, mikobakteriyoloji laboratuvarlarının daha etkin kullanılması gerekliliğini ve erken tanı ve tedavi ile morbidite ve mortalite oranının azaltılmasında klinik-laboratuvar iş birliğinin önemini vurgulamaktadır.

**Anahtar sözcükler:** *Mycobacterium bovis* BCG, yaygın enfeksiyon, spoligotiplendirme.

## ABSTRACT

The vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG may lead to disseminated infection in patients with immune deficiency. In this report a patient who developed fatal disseminated tuberculosis caused by *M. bovis* BCG strain was presented. One year old male patient with the previous history of recurrent lower respiratory tract infection, was admitted to the hospital with the complaints of fever, cough and diarrhea continuing for 20 days. There was no family history of tuberculosis or history of contact with a tuberculosis case. Physical examination of the case revealed growth retardation and reticular and reticulonodular infiltration was detected in his chest X-ray. The results of sweat test, cystic fibrosis gene mutation analysis and metabolic screening tests were normal. Since fever continued and infiltrations persisted in the chest X-ray despite antibiotic therapy, PPD test was applied and acid-fast bacilli (AFB) were investigated in his gastric aspirate and stool samples for three consecutive days. PPD test was negative and no AFB were detected in the microscopic examination of the clinical samples. However, growth in Lowenstein-Jensen medium was detected in the stool sample on the 38<sup>th</sup> day of incubation. The antimycobacterial susceptibility testing performed at BACTEC MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube) 960 system (Becton-Dickinson, USA) revealed that the isolate was susceptible to rifampin, isoniazid, streptomycin and ethambutol. Since the isolates did not grow at PNB (para-nitro benzoic acid) medium and nicotin and nitrate activities were negative, spoligotyping (spacer oligonucleotide typing) was performed and DR loci characteristic for *M. bovis* BCG strain were detected. However, the patient died 2 weeks before the culture results were obtained. The effective use of mycobacteriology laboratories and cooperation between laboratory and clinics provide advantages in the early diagnosis and treatment of tuberculosis cases, decreasing the morbidity and the mortality.

**Key words:** *Mycobacterium bovis* BCG, disseminated infection, spoligotyping.

## GİRİŞ

İnsanlarda ilk uygulanan canlı atenüe aşılardan olan Bacillus Calmette-Guerin (BCG) aşısı, ilk kez 1906-1916 yılları arasında Paris'te Pastör Enstitüsünde Camille Guérin ve Albert Calmette tarafından geliştirilmiştir. Orijinal *Mycobacterium bovis*, safla içeren besiyerinde üretilmiş, 13 yıl boyunca her üç haftada bir toplam 231 kez pasajlanmış ve 1921 yılında canlı atenüe BCG aşısı adı altında bebeklere oral yolla uygulanmıştır<sup>1,2</sup>. 1928 yılında, oral BCG preparatlarının laboratuvarlarda virülen basille kontaminasyon sonucu ölümlere neden olması, yeni metodoloji çalışmalarını başlatmış, 1939 yılında "çoklu delme tekniği" ve 1947 yılında da "skar oluşturma tekniği" geliştirilmiştir. 1948 yılında yapılan "İlk Uluslararası BCG Kongresi" ile aşının güvenilir olduğuna karar verilerek BCG aşısının kullanımı yaygınlaştırılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü 1974 yılında gelişmekte olan ülkeler için önerdiği "Genişletilmiş Aşılama Programı"nı başlatmıştır. Aşı dünyada her yıl 120 milyon doz kullanılmakta ve yenidoğanların %85'ine BCG aşısı yapılmaktadır<sup>3,4</sup>.

Aşının güvenilirliğine rağmen istenmeyen bazı etkiler ortaya çıkabilir. Bu etkiler klinik, bakteriyolojik, histolojik ve biyolojik temellere dayanarak 4 grupta toplanmıştır. Birinci grup, lokal lezyonları ve süpürasyonları; ikinci grup, ölümcül olmayan ancak ağır lokal ve sistemik tabloları; üçüncü grup, ağır sistemik ve ölümcül tabloları (genellikle immünyetmezlikli olanlarda); dördüncü grup ise BCG kullanımı ile olduğu düşünülen ancak bakteriyolojik ve histolojik olarak kanıtlanamayan keloid oluşumunu kapsar<sup>5,6</sup>. Aşının uygulandığı yerde süpüratif lezyon ve aşı yerine yakın bölgelerde lenfadenit en sık görülen

yan etkilerdendir. Aşıdan sonra lenfadenit gelişmesinde aşının hazırlandığı suş, aşının dozu, bebeğin yaşı ve bebeğin immünolojik durumunun etkili olduğu bilinmektedir<sup>7,8</sup>.

Bu raporda, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniğinde kistik fibrozis ön tanısı ile incelemeye alınan ancak postmortem olarak yaygın *M.bovis* BCG enfeksiyonu tanısı konulan bir olgu sunulmaktadır.

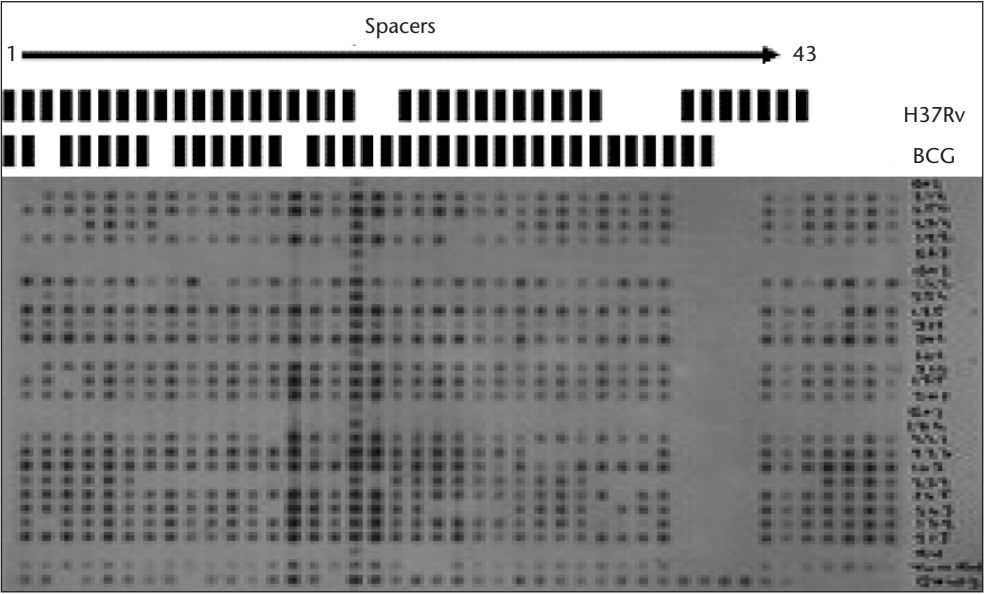
## OLGU SUNUMU

Sezaryen ile 4100 g ağırlığında doğan bir yaşındaki erkek hasta, 20 gündür devam eden ateş, öksürük ve günde 4-5 kez olan sarı renkte, bazen taşar tarzda olan şekilsiz, pis kokulu ishal şikayeti ile hastaneye yatırıldı. Öyküsünde 4 aylıktan itibaren zaman zaman tekrarlayan öksürük ve alt solunum yolu enfeksiyonu nedeniyle tedavi aldığı öğrenildi. Olgunun ailesinde tüberküloz geçirme ya da hasta bir kişiyle temas öyküsü yoktu. Fizik muayenede; fiziksel gelişme geriliği, ateş, takipneik ve soluk olduğu tespit edildi. Laboratuvar bulgularında, yattığı sürece, hemoglobinin 4.5-9.5 g/dl, beyaz küre sayısının 5000-35.000/mm<sup>3</sup> ve trombosit sayısının 28-313.000/mm<sup>3</sup> arasında değiştiği belirlendi. Akciğer grafisinde retiküler ve retikülonodüler infiltrasyonu saptandı. Viral serolojisi negatif saptanan hastanın ter testi, kistik fibrozis gen mutasyonu, metabolik taramaları normal, gaita sindirim analizinde lipid ve redükta madde pozitif olarak bulundu. Yatışının 12. gününü antibiyotik tedavisine rağmen ateşin devam etmesi ve akciğer infiltrasyonlarının olması nedeniyle PPD uygulandı ve dışkıda aside dirençli basil (ARB) araştırıldı. PPD'si negatif tespit edildi. Mide açlık suyunda (3 gün üst üste alınan) ve dışkıda ARB saptanmadı. Dışkı kültürünün beşinci haftasında (38. gün) Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerinde ARB üredi. İzolatın, BACTEC MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube) 960 (Becton-Dickinson, ABD) sistemiyle yapılan duyarlılık testinde rifampin, izoniazid, streptomisin ve etambutole duyarlı olduğu belirlendi. PNB (para-nitrobenzoic acid) besiyerinde üreme olmadı. Niasin ve nitrat testi negatif olarak değerlendirildi. Kültür pozitifliği kliniğe bildirildiğinde ise hastanın kaybedildiği öğrenildi. İzolatın İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapılan spoligotiplendirmesinde *M.bovis* BCG için karakteristik olan DR lokusları saptandı (Resim 1).

## TARTIŞMA

BCG aşısı dünyada uygulanan en güvenli aşılarından biri olmasına karşın, istenmeyen ağır yan etkilerinin görülme oranı %0.018 olarak bildirilmektedir<sup>9</sup>. Bunlar arasında kemik ve eklem lezyonları, deri lezyonları, akciğer ve çoklu organ tutulumları sayılabilir. Çoklu organ tutulumu olanların çoğunda, zeminde kronik granülomatöz hastalık, ağır kombine immünyetmezlik, interferon-gama reseptör defekti gibi primer enfeksiyonlar veya HIV enfeksiyonları vardır<sup>10,11</sup>.

*M.bovis* BCG suşunun, klasik fenotipik yöntemlerle tanımlanması zor ve zaman alıcı olduğundan laboratuvar tanısı genellikle yapılamamaktadır. Bu nedenle birçok laboratuvar rutin uygulamada tanımlamayı *M.tuberculosis* kompleks (MTC) olarak yapmaktadır. MTC üyeleri arasında *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis* BCG, *M.canettii*, *M.africanum* ve



**Resim 1.** X ışını filminden elde edilen görüntüde, en alt sırada spoligotiplendirme ile saptanan *M. bovis* BCG için karakteristik DR lokuslarındaki aralıklı bölgeler.

*M. microti* şeklinde tür ayırımı genellikle araştırma amaçlı yapılmaktadır. Günümüzde MTC üyelerinin ayırımını saatler içinde yapabilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)-ters hibridizasyon testleri ve spoligotiplendirme yöntemleri geliştirilmiştir<sup>12</sup>.

Bu olgu sunumu ile, laboratuvarımızda izole edilen ilk *M. bovis* BCG izolatının tanımlama yöntemlerinin irdelenmesi amaçlanmıştır. Laboratuvarımızda tüberküloz tanısında Ehrlich-Ziehl Neelsen (EZN) boyama yöntemi ile ARB aranması, LJ ve MGIT kültür yöntemleri kullanılmaktadır. Kültürde ARB pozitifliği saptanan izolatlar öncelikle PNB besiyerine inoküle edilmektedir. PNB besiyerinde 3 gün içerisinde ARB üremesi olmadığında izolatlar MTC üyesi, olduğunda ise tüberküloz dışı mikobakteriler (NTM) olarak değerlendirilmektedir. Şüpheli durumlarda, izolatların niasin, nitrat ve katalaz aktiviteleri değerlendirilerek tanımlamaya gidilmektedir.

Laboratuvarımıza ARB aranması için gönderilen tüm örneklerden, istem yapılmamış olsa bile LJ besiyerinde kültür yapılmaktadır. Bu olguda yalnızca dışkıda EZN yöntemi ile ARB aranması istenmiştir. Olgunun dışkı örneğinde direkt mikroskopi ile ARB saptanmamış, ancak LJ besiyerinde 38. günde ARB üremesi olması dikkatimizi çekmiştir. İzolatın PNB besiyerinde ürememesine karşın niasin ve nitrat aktivitesinin negatif olması üzerine spoligotiplendirmesinin yapılmasının uygun olacağı düşünülmüştür.

Spoligotiplendirme (Spacer oligonucleotide typing), MTC üyelerine özgül direkt tekrarlayan (direct repeat; DR) dizi grupları arasına serpiştirilmiş aralıklı (spacer) dizilerdeki DNA polimorfizmlerinin tespitine dayanır<sup>13,14</sup>. Muhtemelen komşu veya uzak DR elementleri arasında homolog rekombinasyonlar ve birçok *M. tuberculosis* izolatının DR böl-

gesinde bulunan hareketli *IS6110* insersiyon elementinin sürüklenmesiyle yeni dizilerin oluşması, izolatlar arası polimorfizme neden olmaktadır<sup>15</sup>. DR lokusundaki DR elementleri 36 baz çifti (bç) uzunluğunda olup, sayısı MTC üyeleri arasında farklılık göstermektedir. Bu DR elementleri arasına, 36-41 bç'lik tekrar etmeyen DNA parçaları aralıklar halinde serpilmiştir. PCR temelli spoligotiplendirme yöntemi ile, DR lokusunda 43 adet bilinen aralıklı dizinin amplifikasyonu gerçekleştirilebilir. Ticari sistemlerde, 37 *M.tuberculosis* H37Rv ve 6 *M.bovis* BCG'den izole edilen aralıklı sekanslar, oligonükleotid olarak sentezlendikten sonra naylon membran striplere sabitlenmiştir. İzolatlara, PCR ve ardından da bu naylon membran striplere ters hibridizasyon uygulanır ve tiplendirme "özümlü aralıklı diziler" in varlığı veya yokluğuna göre yapılır. Ancak *M.bovis* izolatları için bu yöntemin, RFLP analiz yönteminden daha az ayırım yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir<sup>14</sup>.

Bir yaşındaki olgumuzun, 4 aylıktan itibaren tekrarlayan öksürük ve alt solunum yolu enfeksiyonları geçirme öyküsü ve saptanan klinik bulgular, klinisyenleri kistik fibrozis ön tanısına yönlendirmiştir. Yapılan ileri incelemeler sırasında, alınan mide açlık suyu ve dışkı örneklerinde ARB görülmemiş, ancak dışkı kültüründe beşinci haftada ARB üremesi saptanmıştır. İzolat, rifampin, izoniazid, streptomisin ve etambutole duyarlı bulunmuş ve bu sonucun Ritz ve arkadaşlarının<sup>16</sup>, *M.bovis* BCG aşı suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlı olduğunu rapor ettiği çalışması ile uyumlu olduğu görülmüştür. Hastamızın dışkı örneğinden izole edilen suş spoligotiplendirme ile *M.bovis* BCG suşu olarak tanımlanmıştır (Resim 1). Kültür pozitifliği kliniğe bildirildiği zaman ise hastanın yaklaşık iki hafta önce kaybedildiği öğrenilmiştir. Sonuç olarak sunulan bu olgu, mikobakteriyoloji laboratuvarlarının daha etkin kullanılması gerekliliğini ve erken tanı ve tedavi ile morbidite ve mortalite oranının azaltılmasında klinik-laboratuvar iş birliğinin önemini vurgulamaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Pereira SM, Dantas OM, Ximenes R, Barreto ML. BCG vaccine against tuberculosis: its protective effect and vaccination policies. Rev Saude Publica 2007; 41 (Suppl 1): 59-66.
2. Ritz N, Hanekom WA, Robins-Browne R, Britton WJ, Curtis N. Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis. FEMS Microbiol Rev 2008; 32: 821-41.
3. Starke JR. Tuberculosis in children. Diagnosis and treatment. Prim Care 1996; 23: 861-81.
4. Russel DG. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2: 569-77.
5. Lotte A, Wasz-Höckert O, Poisson N, et al. Second IUATLD study on complications induced by intradermal BCG-vaccination. Bull Int Union Tuberc Lung Dis 1988; 63: 47-59.
6. Sagic L. Adverse events following BCG vaccination. Med Pregl 2004; 57 (Suppl 1): 41-7.
7. Goraya JS, Viridi VS. Bacille Calmette-Guérin lymphadenitis. Postgrad Med J 2002; 78: 327-9.
8. Milstien JB, Gibson JJ. Quality control of BCG vaccine by WHO: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety. Bull World Health Organ 1990; 68: 93-108.
9. Toida I, Nakata S. Severe adverse reactions after vaccination with Japanese BCG vaccine: a review. Kekkaku 2007; 82: 809-24.
10. World Health Organization (WHO) Vaccine Preventable Diseases: Monitoring System 2006. Global Summary. Geneva 2006. Available at: <http://www.who.int/vaccines-documents/GlobalSummary/GlobalSummary.pdf>

11. Yalçın S. Tüberküloz aşılıları. *Katkı Pediatri Derg* 2006; 28: 554-72.
12. Çavuşoğlu C, Akıncı P, Söyler İ, Bayram N, Vardar F. Yaygın *Mycobacterium bovis* BCG enfeksiyonunun laboratuvar tanısı. *İnfeksiyon Derg* 2007; 21: 39-44.
13. Lari N, Rindi L, Bonanni D, Tortoli E, Garzelli C. Molecular analysis of clinical isolates of *Mycobacterium bovis* recovered from humans in Italy. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4218-21.
14. Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, et al. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology* 2002; 148(Pt 2): 519-28.
15. Kammerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 907-14.
16. Ritz N, Tebruegge M, Connell TG, Sievers A, Robins-Browne R, Curtis N. Susceptibility of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains to antituberculous antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 316-8.