

NEMO Mutasyonlu Bir Bebekten İzole Edilen Rifampisine Dirençli *Mycobacterium bovis* BCG Suşu

Rifampicin-Resistant *Mycobacterium bovis* BCG Strain Isolated From an Infant With NEMO Mutation

Cengiz ÇAVUŞOĞLU¹, Neslihan EDEER KARACA², Elif AZARSIZ², Ezgi ULUSOY², Necil KÜTÜKÇÜLER²

¹ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

¹ Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Izmir, Turkey.

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir.

² Ege University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Izmir, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 14.10.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 23.12.2014

ÖZ

İnterlökin (IL)-12/interferon (IFN)- γ yollarında yer alan genlerdeki mutasyonlar ve nükleer faktör kappa-B temel modülatörü (Nuclear factor-kB Essential Modulator; NEMO) mutasyonları gibi konjenital hücrel immün yetmezliği olan bebeklerde BCG aşısından sonra yaygın *Mycobacterium bovis* BCG enfeksiyonlarının geliştiği bilinmektedir. Bu raporda, NEMO defektli bir bebekten izole edilen rifampisine dirençli *M.bovis* BCG suşunun irdelenmesi amaçlanmıştır. NEMO defektli 8 aylık bir erkek bebek, ateş, yaygın lenfadenopati ve hepatosplenomegali semptomlarıyla hastanemizin pediatri kliniğine getirilmiştir. Hastanın lenf nodu ve karaciğer biyopsisi örneklerinden hazırlanan yaymanın mikroskopik incelemesinde yoğun olarak (3+) aside dirençli boyanan basil (ARB) pozitifliği saptanmıştır. Gerçek zamanlı PCR (GeneXpert MTB/RIF; Cepheid, ABD) ile örneklerde rifampisine duyarlı *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTC) varlığı tespit edilmiştir. Örneklerin MGIT960 (Becton Dickinson, ABD) besiyerinde yapılan kültürlerinde 20. günde üreme saptanmış ve izolat GenoType MTBC kiti (Hain Lifescience, Almanya) ile *M.bovis* BCG ve spoligotiplendirme ile *M.bovis* BCG [SIT 482 (BOV_1)] olarak tanımlanmıştır. MGIT960 sisteminde yapılan primer antitüberküloz ilaç duyarlılık testlerinde izolat rifampisin (RIF), izoniyazid (INH), streptomisin (STM) ve etambutol (EMB)'e duyarlı bulunmuş ve hastaya antitüberküloz tedavi başlanmıştır. Hasta 2 yaşında yeniden hepatosplenomegali yakınmasıyla başvurmuş ve deri altındaki nodüllerden direne olan apse materyalinden hazırlanan yaymada yine ARB pozitifliği (3+) saptanmıştır. Örnekte GeneXpert ile RIF'e dirençli MTC tespit edilmiş; örnekten yapılan kültürde 13. günde üreme saptanmış ve izolat *M.bovis* BCG olarak tanımlanmıştır. Duyarlılık testinde izolatin INH, STM ve EMB'e duyarlı, ancak RIF'e dirençli olduğu tespit edilmiştir. Yapılan DNA dizi analizinde *rpoB* geninin 531. kodonunda RIF direnciyle ilişkili S531L mutasyonu saptanmıştır. Hasta yaygın BCG bovis enfeksiyonu ve çoklu

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Cengiz Çavuşoğlu, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 35100 Bornova, İzmir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 232 390 3303, **E-posta (E-mail):** cengizc2003@yahoo.com

organ yetmezliğine bağlı olarak kaybedilmiştir. Ulaşılabildiği kadarıyla literatürde RIF'e dirençli *M.bovis* BCG suşunun izole edildiği sadece altı olgu bildirimi mevcuttur. Buna karşın sunduğumuz izolat, NEMO defekti olan bir hastadan izole edilen ilk RIF'e dirençli *M.bovis* BCG suşudur.

Anahtar sözcükler: Rifampisin direnci; *Mycobacterium bovis* BCG; yaygın enfeksiyon; NEMO mutasyonu.

ABSTRACT

It is well known that disseminated *Mycobacterium bovis* BCG infection is developed after BCG vaccination in infants with congenital cellular immune deficiencies such as mutations in genes along the interleukin (IL)-12/interferon (IFN)- γ pathway and mutations in nuclear factor-kB essential modulator (NEMO). In this report, a rifampicin-resistant *M.bovis* BCG strain isolated from an infant with NEMO defect was presented. An 8-month-old male infant with NEMO defect admitted to the pediatric outpatient clinic of our hospital with fever, generalized lymphadenopathy and hepatosplenomegaly. Microscopic examination of the smears prepared from lymph node and liver biopsy specimens revealed abundant amount (3+) of acid-fast bacilli (AFB). Rifampicin-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) was detected by real-time PCR (GeneXpert MTB/RIF; Cepheid, USA) in the samples. The growth of mycobacteria was determined on the 20th day of culture performed in MGIT960 system (Becton Dickinson, USA). The isolate was identified as *M.bovis* BCG by GenoType MTBC kit (Hain Lifescience, Germany) and defined as *M.bovis* BCG [SIT 482 (BOV_1)] by spoligotyping. In the primary anti-tuberculosis drug susceptibility test performed by MGIT960 system, the isolate was found susceptible to rifampicin (RIF), isoniazid (INH), streptomycin (STM) and ethambutol (EMB). Then anti-tuberculosis treatment was started to the patient. However, the patient at the age of 2 years, re-admitted to the hospital with the complaint of hepatosplenomegaly. Smear of spontaneously draining abscess material obtained from subcutaneous nodules revealed intensive AFB positivity (3+) once again. In the present instance RIF-resistant MTC was detected with GeneXpert system in the specimen. The growth of mycobacteria was determined on the 13th day of culture and isolate was identified as *M.bovis* BCG. The present isolate was found susceptible to INH, STM and EMB but resistant to RIF. A mutation in the *rpoB* gene (codon 531, S531L) associated with RIF resistance was detected by using the partial sequencing of the *rpoB* gene. Patient died due to disseminated *bovis* BCG infection and multiple organ failure. To our knowledge, there are only six RIF-resistant *M.bovis* BCG strains isolated from patients in the literature. However, this is the first RIF-resistant *M.bovis* BCG strain isolated from a NEMO-deficient patient.

Keywords: Rifampicin resistance; *Mycobacterium bovis* BCG; disseminated infection; NEMO mutation.

GİRİŞ

Dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi, ülkemizde de verem aşısı olarak kullanılan *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG) suşu, 0.1-38/1000 arasında değişen oranlarda süpüratif lenfadenit, 0.01-330/1000000 arasında değişen oranlarda ise osteit gibi lokal süpüratif komplikasyonlara yol açmaktadır^{1,2}. Buna karşın, altta yatan konjenital veya kazanılmış hücrel immün yetmezliğin olduğu durumlarda, BCG aşısından sonra "BCG-osis" olarak tanımlanan, lenf düğümleri, akciğerler, böbrek, dalak ve diğer organları tutan yaygın enfeksiyon gelişebilmektedir¹⁻³. Mikobakteriyel hastalıklara Mendelyen duyarlılık, patojenitesi düşük mikobakteri türleri ve *M.bovis* BCG enfeksiyonlarına karşı genetik yatkınlığa yol açan, sağlıklı çocuklarda sorun yaratmayan ve seyrek görülen bir bozukluktur. İnterlökin (IL)-12 ve interferon (IFN)- γ yolaklarını etkileyen *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IL12B* ve *IL12RB1* genlerindeki otozomal mutasyonlar ile nükleer faktör kapp-B

temel modülatörü (Nuclear factor-kB Essential Modulator; NEMO) defektine yol açan X'e bağlı geçen mutasyonların, mikobakteriyel hastalıklara karşı Mendelyen duyarlılığa yol açtığı bilinmektedir. NEMO mutasyonu olan hastaların yaklaşık %40'ında mikobakteriyel enfeksiyon geliştiği bildirilmiştir⁴⁻⁹. Bu raporda, NEMO defektli bir bebekten izole edilen rifampisine dirençli *M.bovis* BCG suşunun irdelenmesi amaçlanmıştır.

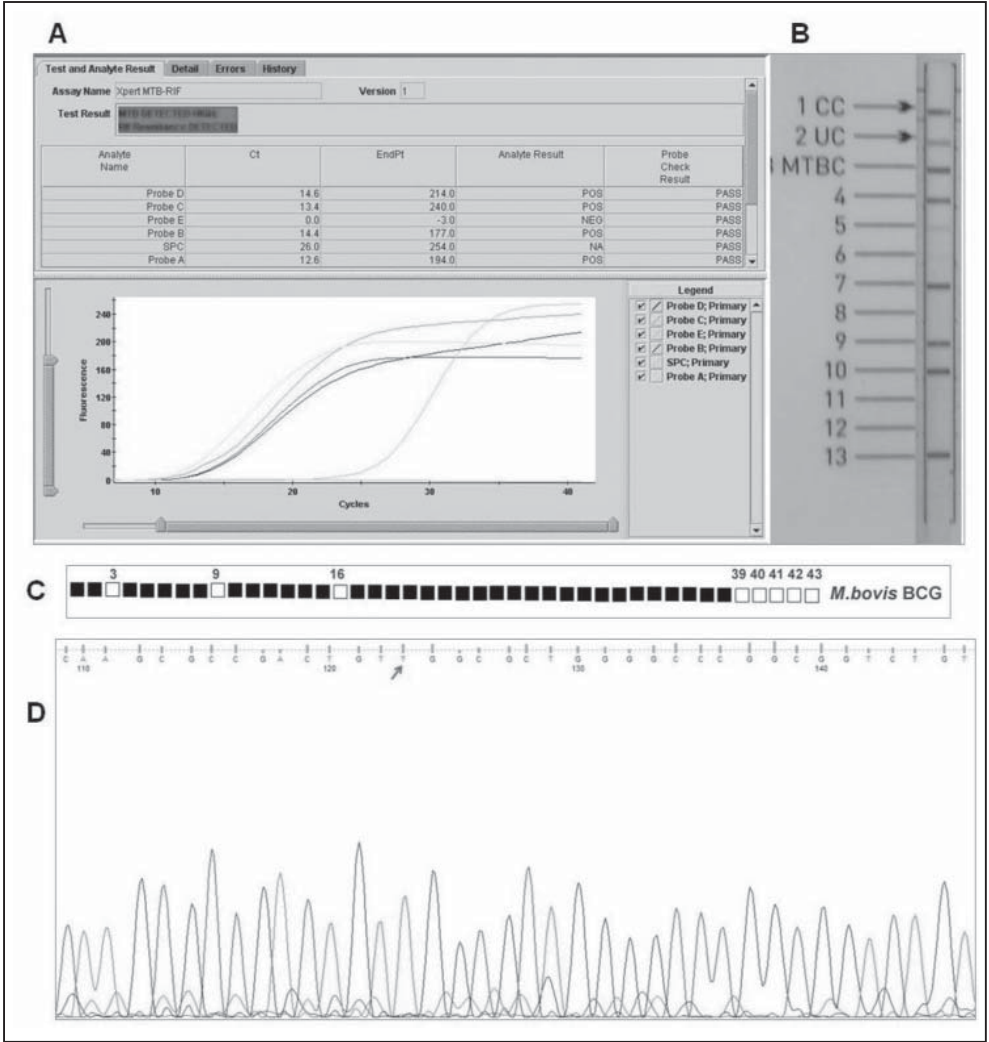
OLGU SUNUMU

NEMO defektli 8 aylık bir erkek bebek, ateş, yaygın lenfadenopati ve hepatosplenomegali semptomlarıyla Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Servisi'ne getirildi. Olgunun lenf nodu ve karaciğer biyopsi örneklerinden hazırlanan yaymanın mikobakteriyolojik incelemesinde, aside dirençli boyanan basil (ARB) varlığı "3+" olarak değerlendirildi. Aynı örneklerde gerçek zamanlı PCR (GeneXpert MTB/RIF; Cepheid, ABD) yöntemiyle rifampisin (RIF)'e duyarlı *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) saptandı. Örneklerin kültüründe, MGIT960 (Becton Dickinson, ABD) otomatize sıvı besiyerinde 20. günde üreme belirlendi. Kültürde üreyen mikobakteri GenoType MTBC Kiti (Hain Lifescience GmbH, Almanya) ile *M.bovis* BCG ve spoligotiplendirme ile *M.bovis* BCG (SIT 482 [BOV_1]) olarak tanımlandı. Kültürden yapılan antitüberküloz duyarlılık testi için MGIT960 yöntemi kullanıldı. Duyarlılık testi sonucunda izolatanın RIF, izoniyazid (INH), streptomisin (STM) ve etambutol (EMB)'e duyarlı olduğu belirlendi ve hastaya antitüberküloz tedavi başlandı.

Hasta 2 yaşında tekrar hepatosplenomegali yakınmasıyla başvurdu. Hastanın deri altındaki nodüllerinden direne olan apse materyalinden alınan örnekten hazırlanan yaymanın mikroskopik incelemesinde ARB "3+" olarak değerlendirildi. Aynı örnekte GeneXpert MTB/RIF ile RIF'e dirençli MTC saptandı (Şekil 1A). Örneğin kültüründe MGIT960 sıvı besiyerinde 13. günde üreme belirlendi. Kültürde üreyen mikobakteri GenoType MTBC ile *M.bovis* BCG ve spoligotiplendirme ile *M.bovis* BCG (SIT 482 [BOV_1]) olarak tanımlandı (Şekil 1B, Şekil 1C). Yapılan duyarlılık testinde izolatanın RIF'e dirençli, INH, STM ve EMB'e duyarlı olduğu belirlendi; *rpoB* geninin dizi analizinde 531. kodonda RIF direncinden sorumlu S531L mutasyonu saptandı (Şekil 1D). Hasta yaygın BCG bovis enfeksiyonu ve çoklu organ yetmezliği nedeniyle kaybedildi.

TARTIŞMA

Literatürde çeşitli hastalardan izole edilen toplam altı RIF'e dirençli *M.bovis* BCG suşu bildirilmiştir¹⁰⁻¹⁵. Buna karşın bizim raporumuzda sunulan izolat, NEMO defektli bir hastadan izole edilen ilk RIF'e dirençli *M.bovis* BCG suşudur. Bugüne kadar bildirilen altı *M.bovis* BCG klinik izolatanın ikisinde RIF ve INH'a birlikte direnç olduğu belirtilmiştir^{10,11}. Bu suşlardan biri, bir hastanın balgam örneğinden, diğer suş ise BCG aşısının ardından süpüratif lenfadenit yakınmasıyla başvuran ve primer immün yetmezliği olan (IFN- γ /IL-12 yolağında defekt) 3.5 aylık bir kız çocuğundan izole edilmiştir^{10,11}. Bu izolatanın DNA dizi analizinde, RIF direncinden sorumlu *rpoB* geninde D516V mutasyonu ve INH direncinden sorumlu *katG* geninde S315T mutasyonu saptanmıştır¹¹. Diğer dört RIF'e dirençli *M.bovis* BCG suşundan ikisi HIV ile enfekte 6 ve 9 aylık iki bebekten izole edilmiştir^{12,13}.



Şekil 1. (A) GeneXpert MTB/RIF ile 531. kodondaki mutasyona uyan E probunun negatif olarak saptandığı RIF'e dirençli *M.tuberculosis* kompleks sonucu; (B) Genotype Mycobacterium CM testinde *M.bovis* BCG için tanı koydurucu 4, 7, 9, 10 ve 13 no'lu problarda hibridizasyon bantları; (C) 3, 9, 16, 39-43 no'lu DR lokuslarının negatif olduğu *M.bovis* BCG için karakteristik spoligotiplendirme paterni; (D) *rpoB* geninin DNA dizi analizinde 531. kodonda TCG 531TTG (S531L) mutasyonu.

Her iki izolatın da *rpoB* geninin dizi analizinde 531. kodonda RIF direnciyle ilişkili S531Y mutasyonu saptanmıştır^{12,13}. Diğer iki *M.bovis* BCG suşundan biri IFN- γ reseptör defekti olduğu düşünülen 14 aylık erkek bebekten izole edilmiş ve fenotipik yöntemlerle RIF direnci saptanmış, diğer suş ise tedavi amacıyla intravezikal BCG uygulanan ve BCG sistiti gelişen yaşlı bir kadın hastadan izole edilmiş ve *rpoB* geninin dizi analizinde 531. kodonda RIF direncinden sorumlu S531L mutasyonu saptanmıştır^{14,15}.

Bu çalışmada sunulan *M.bovis* BCG suşunda, RIF'e dirençli *M.tuberculosis* suşlarında olduğu gibi *rpoB* geninde en sık görülen S531L mutasyonu saptanmıştır. Buna karşın, Hong ve arkadaşları ile Hesseling ve arkadaşları *M.bovis* BCG izolatlarında, RIF'e dirençli *M.tuberculosis* suşlarında çok seyrek görülen S531Y mutasyonu tespit etmişlerdir^{12,13,16}. Bildirilen suş sayısı kısıtlı olduğundan, sözü edilen çalışmalarda saptanan mutasyonların *M.bovis* BCG suşlarında görülme sıklığı hakkında bir sonuç çıkarmak mümkün değildir. Normal bir konaktaki hastalık, etkili antitüberküloz ilaçların uygun doz ve sürelerde kullanılmasıyla, kazanılmış direnç gelişimi ortaya çıkmaksızın tedavi edilebilmektedir. Ancak yaygın BCG enfeksiyonu olan hastalarda, hemen daima altta yatan ağır bir immün yetmezlik bulunmaktadır. Bu durum, antitüberküloz tedavi sırasında bakterinin tamamen ortadan kaldırılmasını güçleştirerek, basil popülasyonu içinde ortaya çıkan az sayıdaki dirençli mutantların seçilmesine yol açabilmektedir. Bu nedenle BCG bovis enfeksiyonlarında, ilaç direnci gelişimini önlemek için altta yatan hastalığın ve enfeksiyonun birlikte tedavi edilmesi gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Bloom BR, Fine PEM. The BCG experience: implications for future vaccines against tuberculosis, pp: 531-57. In: Bloom BR (ed), Tuberculosis. 1994. ASM Press, Washington, DC.
2. Brosch R, Behr MA. Comparative genomics and evolution of *Mycobacterium bovis* BCG, pp: 155-64. In: Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs WR Jr (eds), Molecular Genetics of Mycobacteria. 2005. ASM Press, Washington, DC.
3. Mansouri D, Adimi P, Mirsaeidi M, et al. Inherited disorders of the IL-12-IFN-gamma axis in patients with disseminated BCG infection. Eur J Pediatr 2005; 164(12): 753-7.
4. Filipe-Santos O, Bustamante J, Haverkamp MH, et al. X-linked susceptibility to mycobacteria is caused by mutations in the NEMO leucine zipper domain that impair CD40 dependent IL-12 production. J Exp Med 2006; 203(7): 1745-59.
5. Zonana J, Elder ME, Schneider LC, et al. A novel X-linked disorder of immune deficiency and hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in IKK-gamma (NEMO). Am J Hum Genet 2000; 67(6): 1555-62.
6. Döffinger R, Smahi A, Bessia C, et al. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kB signaling. Nat Genet 2001; 27(3): 277-85.
7. Mansour S, Woffendin H, Mitton S, et al. Incontinentia pigmenti in a surviving male is accompanied by hypohidrotic ectodermal dysplasia and recurrent infection. Am J Med Genet 2001; 99(2): 172-7.
8. Kutukculer N, Genel F, Aksu G, et al. Cutaneous leukocytoclastic vasculitis in a child with interleukin-12 receptor beta-1 deficiency. J Pediatr 2006; 148(3): 407-9.
9. Çavuşoğlu C, Akıncı P, Söyler İ, Bayram N, Vardar F. Yaygın *Mycobacterium bovis* BCG enfeksiyonunun laboratuvar tanısı. İnfeksiyon Derg 2007; 21(1): 39-44.
10. Renvoisé A, Pang S, Bernard C, et al. First whole-genome sequence of a clinical isolate of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* BCG. Genome Announc 2014; 2(4). pii: e00611-14.
11. Diniz LM, Guimarães T, Oliveira Md, Pinto JA, Miranda SS. Lymphadenitis caused by infection with an isoniazid- and rifampin-resistant strain of *Mycobacterium bovis* BCG in an infant with IFN-γ/IL-12 pathway defect. J Bras Pneumol 2014; 40(2): 188-92.
12. Hong DN, Huyen MN, Lan NT, et al. Rifampin-resistant *Mycobacterium bovis* BCG-induced disease in HIV-infected infant, Vietnam. Emerg Infect Dis 2013; 19(7): 1168-70.

13. Hesselning AC, Schaaf HS, Victor T, et al. Resistant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin disease: implications for management of bacillus Calmette-Guérin disease in human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23(5): 476-9.
14. Costa FF, Castro G, Andrade J, Jesus Ade R, de Almeida RP, Nascimento-Carvalho CM. Resistant *Mycobacterium bovis* disseminated infection. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25(2): 190.
15. Wolfe JN, Blackwood-Antonation KS, Sharma MK, Cook VJ. A case of acquired rifampin resistance in *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin-induced cystitis: necessity for treatment guidelines. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2006; 17(3): 183-5.
16. Yue J, Shi W, Xie J, Li Y, Zeng E, Wang H. Mutations in the rpoB gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol* 2003; 41(5): 2209-12.