Praca oryginalna

Zastosowanie nowoczesnych metod mikrobiologicznych do diagnozowania powikłań po szczepieniu BCG. Opis przypadków

Modern microbiological methods in diagnosis of adverse reactions after BCG vaccination. Case reports.

Zofia Zwolska[1], Ewa Augustynowicz-Kopeć[1], Anna Zabost[1], Jerzy Ziółkowski[2], Joachim Buchwald[3], Marian Płończak[4], Wojciech Walas[5], Marek Ziębiński [5]

[1]. Zakład Mikrobiologii IGiCHP Warszawa, Kierownik: Prof.dr hab. Z. Zwolska.
[2]. Klinika Pneumonologii i Alergologii Wieku Dziecięcego AM Warszawa. Kierownik: Prof.dr hab. Marek Kulus
[3]. IGiCHP Rabka, Dyrektor: dr J.Buchwald,
[4]. Oddz. Urazowy, SPSK, Otwock. Ordynator: dr S. Pomianowski.
[5]. OIOM, Woj. Centrum Med. Opole, Ordynator dr n. med. W.Walas

Summary: The attenuated bacilli Calmett-Guerin (BCG) vaccine is administered worldwide to prevent tuberculosis and is considered to have an excellent safety profile. In Poland, since 1955 BCG mass vaccinations have been compulsory. More than 95 % newborns and 80 % of older children of the population have been vaccinated. Complications of vaccination are uncommon. Although BCG has been used safely for many years, it can cause disease in humans, especially those with cellular immunodeficiencies. The risks associated with BCG vaccination include local complications, extraregional localized disease, and disseminated BCG disease. Identification of M.bovis BCG in laboratory is a very difficult process. Routine identification of mycobacterial isolates in clinical laboratories involves culture of Mycobacterium tuberculosis complex which includes M.tuberculosis, M.bovis, M.africanum and M.microti and the vaccine strain M.bovis BCG. Most laboratories cannot quickly differentiate between BCG and other members of M.tuberculosis complex and some cases of BCG complications in children may be considered and treated as tuberculosis. Because of difficulties in proper identification of BCG strains isolated from the patients, the prevalence of BCG infections is not know exactly. Knowledge of BCG infection would be of particular interest to the clinician responsible for the therapy. We describe the several methods using in mycobacterial laboratory for identification and suggest the modern algorithm of BCG strains identification including mycolic acids profile by HPLC and 14C PZA resistance methods. The methods allowed us fast and accurate identify M.bovis BCG infection in 5 children which have been described in our paper. Preliminary diagnosis for four children among five tested was tuberculosis. One immunocompromised HIV negative child died, one still excrets BCG bacilli. To our knowledge, this is the first report of BCG complication (AEFI) in Polish children in which HPLC and 14 C PZA methods have been used for rapid identification of M.bovis BCG infection and/or complication.

Pneumonol. Alergol. Pol. 2004, 72, 505:511

Key words: adverse event of BCG vaccination, identification algorithm of M.bovis BCG, mycolic acids profiles , HPLC, Gene-Probe, DST to pyrazinamide

Wstęp:

BCG jest jedyną, dostępną szczepionką używaną do szczepień przeciwgruźliczych. Historia szczepionki ma swój początek w 1908 r, kiedy to wyizolowany w Instytucie Pasteura z krowiego mleka wirulentny szczep *M.bovis* poddano pasażowaniu na pożywkach bakteriologicznych. Początkowo pożywkę stanowił ziemniak z żółcią. Kolejno, co 2 tyg pasażowano prątki zmieniając pożywki na Soutona, ziemniaka z gliceryną i bulionem (7). Po 13 latach i 230 pasażach w 1921 r. otrzymano zatenuowany szczep, który dla uhonorowania jego odkrywców nazwano Bacillus Calmette-Geurin (BCG). Szczep ten na skutek delecji lub/i wielopunktowych mutacji w genomie (27) utracił swoją wirulencję i nigdy nie powrócił do swojej pierwotnej zjadliwości. Obecnie wiadomo, że utrata wirulencji związana jest z delecją trzech dużych sekwencji DNA nazwanej regionami RD1–RD3 w segmencie DNA 9,3 kb (16). Szczepy *Myc.bovis BCG* rozesłano do laboratoriów na wszystkich kontynentach, gdzie podczas tysięcy przeprowadzonych pasaży, w warunkach lokalnych, ujawniły się różnice fizjologiczne, biochemiczne i genetyczne, które zostały utrwalone w genomie bakteryjnym. Odmienne warianty z których wytwarzano szczepionkę nazwano „podszczepami BCG". Nazwy tej używa się do tej pory podając również miejsce pochodzenia np. BCG podszczep brazylijski, duński, francuski, japoński itp. W Polsce do szczepień używa się BCG Moreau, podszczep brazylijski produkowany w Wytwórni Surowic i Szczepionek w Lublinie.

Od ponad 80 lat szczepionka BCG jest używana rutynowo i zaszczepiono nią dotychczas ponad 80 % populacji tj. około 3 miliardy noworodków na świecie. Od 1960 r. szczepionka BCG jest stosowana również w immunoterapii nowotworow (3,14). Szczepionka BCG charakteryzuje się stosunkowo wysokim bezpieczeństwem, niemniej jednak proces szczepienia może wywołać różne, niepożądane reakcje (NOP) takie jak: zmiany skórne w miejscu iniekcji, powiększenie węzłów chłonnych i bardzo rzadko uogólnione zakażenie prątkami BCG. Te ostatnie występują z częstością ocenianą na 1-10 /milion podawanych dawek prawie wyłącznie u pacjentów z zaburzeniami odporności i są zaliczane do najcięższych odczynów poszczepiennych, które na ogół kończą się śmiercią (1, 11). Częstość NOP po szczepieniach BCG waha się w zależności od kraju, w którym prowadzono badania i zależy od wielu czynników jak np.: dawka i użyty podszczep BCG, liczba żywych cząstek bakterii w szczepionce, wiek i stan immunologiczny szczepionych, poprawność techniki szczepienia, doświadczenie personelu medycznego wykonującego szczepienia i oceniającego objawy niepożądane a ponadto od rzetelnej rejestracji (12,13).

Należy jednak podkreślić, że częstość występowania zakażeń wywołanych *M.bovis* BCG nie jest dokładnie znana, głównie z powodu długotrwałego i trudnego procesu identyfikacji mikrobiologicznej szczepów *M.bovis* BCG i trudności w odróżnieniu ich od innych gatunków wchodzących w skład *M.tuberculosis complex* (22). Może zdarzyć się, że NOP zostaje uznane za gruźlicę ponieważ laboratoria rutynowo identyfikują wyhodowany gatunek prątków jako należący do kompleksu *Mycobacterium tuberculosis*, w skład którego wchodzą prątki *M.tbc, M.bovis*, *M.bovis* BCG, *M.africanum* i *M.microti* (25). Większość laboratoriów prątka na świecie nie jest w stanie szybko zidentyfikować *M.bovis* BCG i/lub wykonać niezbędny test lekowrażliwości na pyrazinamid (PZA). Zastosowanie konwencjonalnych metod identyfikacyjnych nie pozwala na odróżnienie prątków BCG od innych gatunków Myc. tuberculosis, ponieważ dwa główne testy identyfikacyjne niacynowy i 14C NAP nie są swoiste dla gatunku BCG. Również w Polsce dalsza identyfikacja do podgatunku BCG jest procesem trudnym i może być wykonana tylko w nielicznych laboratoriach wyłącznie przy wyraźnym, klinicznym podejrzeniu NOP. Dotyczy to szczególnie NOP, które występują nie bezpośrednio po szczepieniu. Opisano przypadki uogólnionej infekcji BCG po 6 latach od szczepienia u chłopca z niedoborami układu immunologicznego (20) i po 30 latach u zakażonego wirusem HIV chorego (2).

Celem podjętej pracy było sporządzenie algorytmu identyfikacji gatunkowej *Myc. bovis* BCG w przypadkach podejrzenia powikłań poszczepiennych.

Bodźcem do opracowania algorytmu identyfikacji stało się 5 przypadków NOP rozpoznanych ostatnio w Krajowym, Referencyjnym Laboratorium Prątka (KRLP). Spośród pięciorga dzieci tylko jedno było podejrzewane klinicznie o powikłania związane ze szczepieniem BCG, pozostałych rozpoznano klinicznie i wstępnie zidentyfikowano mikrobiologicznie gruźlicę. Po wykonaniu szczegółowej identyfikacji mikrobiologicznej we wszystkich prezentowanych przypadkach stwierdzono *M.bovis* BCG

1. Opis przypadków

Przypadek 1

3-letnia dziewczynka (N.K.) z 10 punktami wg skali Apgar po urodzeniu została zaszczepiona BCG w drugiej dobie życia. Proces gojenia po szczepieniu BCG był prawidłowy. W 12 miesiącu życia, z powodu nieobecności blizny poszczepiennej zgodnie z obowiązującym w Polsce kalendarzem szczepień, wykonano powtórne szczepienie BCG. W dniu rewakcynacji dziecko było zdrowe. W cztery tygodnie później w miejscu podania szczepionki stwierdzono owrzodzenie o średnicy 2,5x3,0 cm wypełnione treścią ropną. Jak wynika z relacji rodziców nie było żadnego urazu ani działania substancji toksycznych. Stan ogólny dziecka był w dalszym ciągu dobry, bez odczynu węzłowego. Z powodu powiększania się ropnia i stałego wycieku jego zawartości przez okres ponad 2 lat, dziewczynkę skierowano do Poradni Pulmonologicznej Kliniki Pulmonologii i Alergologii Wieku Dziecięcego AM w Warszawie. Wykonano test tuberkulinowy podając 2 j tuberkuliny POD RT-23 uzyskując wynik ujemny. Badanie przedmiotowe dziecka nie wykazywało odchyleń, węzły chłonne obwodowe nie były powiększone. Wykonano badanie radiologiczne klatki piersiowej, tomografię linijną węzłów tchawiczo-oskrzelowych i stężenie IgA, IgG i IgM w surowicy uzyskując wszystkie wyniki prawidłowe. W miejscu zaszczepienia BCG pozostał dosyć głęboki, kraterowaty ubytek, który prawdopodobnie będzie wymagał w przyszłości korekcji plastycznej. Treść ropną skierowano do badania w laboratorium prątka z podejrzeniem NOP. Z ropy wyhodowano *M.bovis* BCG.

Przypadek 2.

5-letnia dziewczynka (N.M.) z wrodzoną siniczą wadą serca, opóźnieniem rozwoju psychoruchowego, drgawkami w wywiadzie została przyjęta do szpitala z powodu bólów brzucha. W badaniu radiologicznym klatki piersiowej stwierdzono naciek zapalny w płacie dolnym płuca prawego i po stronie lewej w płacie dolnym. Leczenie cefalosporyną nie spowodowało poprawy, w badaniach obrazowych klatki piersiowej obserwowano narastanie zmian zapalnych oraz pojawienie się płynu w lewej jamie opłucnowej. Ponieważ ojciec dziecka chorował na gruźlicę, u dziewczynki podejrzewano również proces swoisty. Stwierdzono zwiększenie OT do 30 mm, (2 lata wcześniej wynosił 11 mm). Pobrano popłuczyny żołądkowe i wysłano do diagnostyki do laboratorium prątka. W systemie Bactec wyhodowano *Mycobacterium tuberculosis complex*. Podejrzewając gruźlicę włączono leczenie przeciwprątkowe oraz tazobactam i amikacynę. Po wykonaniu dalszej diagnostyki gatunkowej prątków stwierdzono *Mycobacterium bovis* BCG.

Przypadek 3.

Dziewczynka (B.B) urodzona z 10 punktami wg skali Apgar została zaszczepiona BCG w 2 dobie urodzeniowej. W 6 miesiącu życia zaobserwowano powiększenie węzłów chłonnych pachowych, które nasilało się. Po przyjęciu do szpitala zapalenie węzłów chłonnych pachowych oceniono jako niepożądany odczyn poszczepienny. W 9 m-cu przyjęto ponownie dziecko do szpitala, gdzie wykonano biopsję węzłów chłonnych. Wynik badania histopatologicznego nieznany. Dziecko przyjmowano jeszcze dwukrotnie do szpitala, w końcu wykonano posiew z rany w kierunku prątków gruźlicy. W laboratorium regionalnym z wydzieliny pobranej ze zmiany w dole pachowym lewym wyhodowano szczep należący do kompleksu Mycobacterium tuberculosis oporny na INH. Badanie histologiczne wycinka wykazało możliwość zmian po szczepieniu BCG. Podejrzewając gruźlicę włączono leczenie przeciwprątkowe i skierowano dziecko do Centrum Zdrowia Dziecka z podejrzeniem zaburzeń receptora interferonu γ. Szczep przesłano do KRLP gdzie po wykonaniu dalszej diagnostyki mikrobiologicznej stwierdzono Mycobacterium bovis BCG

Przypadek 4.

8-miesieczny chłopiec (C.M.) z 10 punktami Apgar po urodzeniu, był zaszczepiony planowo BCG. W okresie okołoporodowym był leczony z powodu zakażenia wewnątrzmacicznego i hiperbilirubinemii. Od 5 miesiąca życia chorował na nawracające infekcje górnych dróg oddechowych, grzybicę jamy ustnej, obserwowano częste stany podgorączkowe i brak przyrostu masy ciała. Ambulatoryjne leczenie antybiotykami nie przyniosło efektów. Po wystąpieniu objawów zapalenia płuc dziecko hospitalizowano, wdrażajac antybiotykoterapię o szerokim spektrum, leczenie przeciwgrzybicze, a wobec stale pogarszającego się stanu również – przeciwwirusowe. W badaniu tomokomputerowym klatki piersiowej stwierdzono masywne zmiany miąższowe w obu płucach. Ponieważ podejrzewano tło gruźlicze choroby pobrano treść oskrzelową i popłuczyny żołądkowe i wysłano do laboratorium prątka. Po otrzymaniu hodowli prątków należących do kompleksu Mycobacterium tuberculosis rozpoznano gruźlicę i wdrożono leczenie przeciwprątkowe. Dziecko zmarło w 11 dobie pobytu na OIOM-ie. W badaniu autopsyjnym i mikroskopowym stwierdzono: obecność płynu w jamach opłucnowych, przewlekłe martwiczo-złuszczeniowe zapalenie płuc w fazie organizacji, nietypowe ziarniniaki w wątrobie i śledzionie, hypoplazję lub pozapalny zanik grasicy. Nie wykonano posiewów w kierunku prątków z tkanek pobranych podczas sekcji. Przesłany do KRLP szczep wyhodowany za życia dziecka zidentyfikowano jako *M.bovis* BCG.

Przypadek 5.

18 miesięczny chłopiec (C.M) został przyjęty na oddział Traumatologii i Ortopedii Dzieci z podejrzeniem zapalenia prawego stawu biodrowego. Wywiad okołoporodowy był obciążajacy: matka w okresie ciąży z powodu zagrażającego poronienia przyjmowała leki hormonalne. Dziecko urodzone o czasie z hiperbilirubinemią, było leczone fototerapią, przy czym zostało zaszczepione planowo szczepionką BCG. W 16 m-cu życia, z powodu zapalenia płuc podawano prawdopodobnie dożylnie linkomycynę. Kolejna infekcja dróg oddechowych po 2 miesiącach powikłana była stanem zapalnym stawu biodrowego i ponownie leczona linkomycyną. Podczas kolejnych cotygodniowych konsultacji pediatrycznych odczyn tuberkulinowy wynosił 10/12mm. Posiewy w kierunku bakterii tlenowych były ujemne, obraz radiologiczny płuc był bardzo trudny do oceny ze względu na asymetrię: lewa wnęka była w ogóle niewidoczna. Wywiad rodzinny wykazał, że obydwoje dziadkowie kaszlą, ale nie byli badani w kierunku gruźlicy. Wykonano nakłucie stawu biodrowego, płyn wysłano do

laboratorium prątka, wynik badania genetycznego (Gen-Probe), był dodatni, typowy dla prątków należących do kompleksu *M.tuberculosis* na podstawie którego rozpoznano gruźlicę stawu biodrowego. Włączono leczenie przeciwprątkowe INH, RMP i PZA i wypisano dziecko do domu. Wyhodowany szczep prątków gruźlicy przesłano do KRLP, gdzie stwierdzono *M.bovis* BCG.

2. Badania bakteriologiczne

Materiały przysłane do diagnostyki mikrobiologicznej. Do Zakładu Mikrobiologii, IGiChP przysłano do diagnostyki następujące materiały: w przypadku 1. – ropną wydzielinę pobraną z ropnia utworzonego w miejscu szczepienia, w przypadku 2. – popłuczyny żołądkowe, w przypadku 3. – wyhodowany w laboratorium regionalnym szczep, w przypadku 4. – popłuczyny oskrzelowe i w przypadku 5. – płyn ze stawu biodrowego.

Metody: Próbki materiału po opracowaniu odczynnikami używanymi rutynowo do homogenizacji i dekontaminacji 2 % N-acetylo-cysteiną i 2 % NaOH, wirowano a osad barwiono metodą Ziehl-Neelsona (Z-N), rozmazy oglądano w mikroskopie świetlnym. Osad posiewano na pożywki Lowensteina-Jensena (L-J) i pożywki hodowlane w systemie Bactec-460Tb (Becton-Dickinson). Po uzyskaniu wzrostu na L-J przeprowadzono obserwacje dotyczące morfologii i czasu wzrostu szczepów i wykonano szereg testów identyfikacyjnych: a/. test niacynowy, b/. radiometryczne testy 14 CNAP i c/. test oporności na pyrazinamid (PZA) w systemie Bactec 460-TB, (30) oraz d/. testy AccuProbe (Gene-Probe, San Diego C.A.) z sondą genetyczną dla *M.tuberculosis complex* e/. test analizy składu kwasów ß-hydroksy-γ-tłuszczowych (kwasów mykolowych) w wysokowydajnej płynnej, chromatografii HPLC używając chromatografu Varian oraz posługując się własną bibioteką wzorów kwasów mykolowych BCG (6, 29).

Wyniki

W systemie Bactec-460 TB otrzymano hodowle z wszystkich 4 materiałów tj. z ropy, popłuczyn żołądkowych, oskrzelowych i z płynu ze stawu biodrowego; czas wzrostu wynosił od 15-42 dni. Z 3 posiewów na L-J hodowle prątków BCG otrzymano w 2 przypadkach; czas wzrostu od 6-8 tyg. Badanie bakterioskopowe było dodatnie tylko w jednym przypadku, niepoliczalną liczbę prątków obserwowano w ropie pobranej z przypadku 1. Pozostałe materiały były AFB ujemne. Badanie genetyczne w jednym przypadku było ujemne przy otrzymanej hodowli techniką Bactec (Tab. I). Kolonie na L-J o mlecznym zabarwieniu, kalafiorowatej morfologii i kwasoooporne w rozmazach barwionych oceniono jako typowe dla *M.tuberculosis complex*. Wyhodowane szczepy poddano szczegółowej identyfikacji. Testy wrażliwości potwierdziły spodziewaną u wszystkich *M.bovis* i *M.bovis* BCG oporność na PZA i wrażliwość na pozostałe leki INH, RMP, SM i EBM oprócz jednego przypadku (nr.3), w którym stwierdzono oporność na INH. Dziecko to nadal choruje i prątkuje wydalając szczep BCG. Powodem INH-oporności jest prawdopodobnie wcześniejsza INH profilaktyka. Nie udało jednak się ustalić tego faktu

Testy identyfikacyjne wykazały następujące wyniki: test niacynowy – ujemny potwierdził że szczepy nie należą do *M.tuberculosis*, test 14 CNAP – dodatni wskazywał na przynależność wszystkich szczepów do *M.tuberculosis complex*, typowanie metodą HPLC- ujawniło profil elucyjny kwasów mykolowych typowy dla *M.bovis* BCG. (tab II.)

Tabela 1 Wyniki badań mikrobiologicznych w próbkach otrzymanych od 5 badanych dzieci
Table 1. Results of microbiological tests in specimens received from 5 children

No	Próbka kliniczna/ SPECIMEN	AFB	Genetyka/ Genetics	Wzrost w dniach/ Growth in days		Test wrażliwości na leki / Drug sensitivity test				
				L-J	BATEC	INH	RMP	SM	EMB	PZA
1	Ropa/Pus	+++	+	+6tyg/ weeks	+42 dni/ days	W/S	W/S	W/S	W/S	O/R
2	Popłucz.żołądkowe/ Gastric aspirate	(–)	(–)		+15 dni/ days	W/S	W/S	W/S	W/S	O/R
3	Szczep/Strain					O/R	W/S	W/S	W/S	O/R
4	Popł.oskrzelowe /Bronchial washing	(–)	+	(–)	+29 dni/ days	W/S	W/S	W/S	W/S	O/R
5	Płyn ze stawu biodrowego / Hip joint liquid	(–)	+	+6 tyg/ weeks	+25 dni/ days	W/S	W/S	W/S	W/S	O/R

W/S – wrażliwy/ sensitive
O/R- oporny / resistant

Tabela 2. Wyniki identyfikacji mikrobiologicznej
Table 2. Results of microbiological identification

No	Test niacynowy / Niacin test	^{14}C NAP test	Profil kwasów mykolowych met.HPLC / Mycolic acids profile in HPLC
1	(–)	M.tbc complex	*M.bovis* BCG
2	(–)	M.tbc complex	*M.bovis* BCG
3	(–)	M.tbc complex	*M.bovis* BCG
4	(–)	M.tbc complex	*M.bovis* BCG
5	(–)	M.tbc complex	*M.bovis* BCG

Rycina I. Charakterystyczny chromatogram HPLC dla *Mycobacterium bovis* BCG
Figure. I. Charrakteristic HPLC chromogram of *Mycobacterium bovis BCG*.

Proponowany algorytm identyfikacji *M.bovis* BCG

W przypadku podejrzenia NOP po szczepieniu BCG postępowanie lekarskie w zakresie diagnostyki mikrobiologicznej powinno uwzględniać:

1. Posiew w kierunku bakteriologii ogólnej dla wykluczenia infekcji wywołanej bakteriami Gram + lub Gram (–). Czas trwania badania do 48 h
2. Posiew w kierunku prątków gruźlicy w automatycznych systemach hodowlanych (Bactec-460 Tb, Bactec-MGIT-960 lub MB/BacT (czas trwania badania do 6 tyg.) badanie genetyczne (czas trwania badania 1 dzień).
3. Typowanie gatunkowe w chromatografii HPLC, test PZA wrażliwości w systemie Bactec -460 TB

Ze względu na trudności w identyfikacji *M.bovis* BCG proponuje się odesłanie wyhodowanego szczepu do Krajowego Referencyjnego Laboratorium Prątka, gdzie będzie możliwe wykonanie typowania i testu lekowrażliwości. Czas trwania badania 5-7 dni.

Omówienie wyników

M. bovis BCG chociaż należy do najbezpieczniejszych, żywych szczepionek bakteryjnych może wywoływać objawy uboczne. pospolite ale również ciężkie, uogólnione (22). Te ostatnie występują wyłącznie u chorych w immunosupresji. W Polsce stosowana klasyfikacja NOP wyróżnia następujące postacie: 1. w miejscu szczepienia – owrzodzenie i/lub ropień, 2. W powiększenie okolicznych węzłów chłonnych, ich ropne zapalenie, 3. uogólniony rozsiew prątków BCG w skórze, kościach, stawach i innych narządach wewnętrznych, 4. keloid, 5. toczeń (4, 10, 26). Do najcięższych powikłań poszczepiennych należy uogólniony rozsiew BCG, który na ogół kończy się śmiercią. Przegląd piśmiennictwa pozwala stwierdzić, że najcięższy rodzaj powikłań poszczepiennych występuje rzadko i na ogół w kilka miesięcy po szczepieniu. Z danych literaturowych wynika, że częstość NOP po BCG jest w wielu krajach nie doszacowana (5). To samo zjawisko niekompletnego zgłaszania dotyczy NOP występujących po innych rodzajach szczepionek (15). Jak podaje FitzGerald np. w 1987 r zarejestrowano w Kanadzie tylko 2 przypadki NOP, natomiast w Brytyjskiej Kolumbii, gdzie jest dużo mniejsza populacja w latach 1983-1987 zarejestrowano aż 67 przypadków. Stanowiło to w stosunku do 1456 zaszczepionych dzieci 0,046 % niepożądanych reakcji, przy czym około 70 % z nich dotyczyło odczynu miejscowego, 28 % odczynu węzłowego i 1 przypadek zgonu u dziecka z ciężkim niedoborem immunologicznym. FitzGerald wyraźnie podkreśla, że rejestry NOP w wielu krajach podają dużo niższe niż faktycznie istniejące dane.

Talbot i wsp. (22) przejrzeli dane o NOP w latach 1980-1995 w ponad 5000 publikowanych doniesień i dodatkowo zidentyfikowali 27 przypadków uogólnionych infekcji BCG niż raportowano. Ponad 70 % przypadków wystąpiło u dzieci poniżej 2 r.ż. Cztery przypadki wystąpiły u ludzi dorosłych. Większość chorych była w immunosupresji wywołaną AIDS, lub wykazywało inne niedobory immunologiczne. Tylko u 4 chorych z rozsianą infekcją wstępnie rozpoznana i leczona jako gruźlica wywołana BCG, nie znaleziono immunosupresji. W przeglądanych danych z literatury autorzy znaleźli wiele przypadków błędnie zdiagnozowanych metodami mikrobiologicznymi. W Polsce częstość rozpoznawania NOP wynosi rocznie około 0,2 pro-

mila (w liczbach bezwzględnych około 200 dzieci średnia 2,7 lat) głównie dotyczy ropni i owrzodzeń w miejscu szczepienia, w następnej kolejności zmian w regionalnych węzłach chłonnych (21). Nie wiadomo jednak, ile przypadków było potwierdzonych mikrobiologicznie.

Główne powody nie doszacowania NOP wynikają z przyczyn subiektywnych tj. braku zaufania do możliwości potwierdzenia mikrobiologicznego i obiektywnych tj faktycznie istniejących trudności w identyfikacji *M.bovis* BCG, dostępnych tylko w nielicznych laboratoriach prątka o najwyższym stopniu referencyjności (29). Klinicyści, często rozczarowani długo trwającą diagnostyką mikrobiologiczną nie wysyłają do laboratorium próbek klinicznych pobranych od chorych, czasami zlecają jedynie badanie histopatologiczne. Istotnie, diagnozowanie NOP, podobnie zresztą jak gruźlicy jest procesem trudnym i wymaga nowoczesnego wyposażenia laboratorium prątka. Prątki *M.bovis* BCG są morfologicznie, fizjologicznie, biochemicznie i genetycznie zbliżone do innych gatunków wchodzących w skład całego kompleksu tuberculosis.

Zastosowanie konwencjonalnych metod identyfikacyjnych nie pozwala na odróżnienie prątków BCG od innych gatunków kompleksu. Nawet w laboratoriach III poziomu referencyjności proces diagnostyki kończy się zwykle na zaliczeniu wyhodowanego szczepu do *M.tuberculosis complex* co może sugerować potwierdzenie gruźlicy. Jeżeli zlecenie lekarskie nie zawiera wyraźnego podejrzenia NOP po szczepieniu BCG laboratorium nie prowadzi dalszej diagnostyki różnicowej (28). Spośród 15 testów mikrobiologicznych stosowanych do identyfikacji gatunkowej BCG (29), zaledwie 5 jest gatunkowo swoistych. Należą do nich: 1. typowanie fagowe przy użyciu mykobakteriofaga D33 (Warsaw) (9), 2. amplifikacja w technice PCR RD1 regionu w genomie prątków (19, 23), 3. analiza RFLP z użyciem elementu insercyjnego IS1081 jako sondy (24), 4. amplifikacja w metodzie PCR swoistego regionu DNA zawierającego MPTR (8) i 5. analiza chromatograficzna HPLC kwasów mykolowych (6). Metody te mają swoje wady i zalety, jednak wszystkie mogą być stosowane wyłącznie w laboratoriach naukowych.

Cztery przypadki spośród pięciu omawianych w naszej pracy były wstępnie zakwalifikowane i leczone jako różne postacie gruźlicy. Szczegółowa identyfikacja czynnika etiologicznego zweryfikowała rozpoznanie, u jednego dziecka dopiero pośmiertnie. Wcześniejsza diagnostyka w laboratorium prątka mogła zaoszczędzić dzieciom wielokrotnego leczenia antybiotykami szerokospektralnymi. Należy również pamiętać, że kryteria identyfikacji infekcji rozsianej po szczepieniu obejmują konieczność wyizolowania prątków BCG co najmniej z dwóch narządów/miejsc innych niż miejsce szczepienia (22). Aby wypełnić to kryterium lekarz musi pamiętać o przysłaniu do diagnostyki mikrobiologicznej kilku próbek od jednego chorego. Z powodu tak trudnej diagnostyki mikrobiologicznej każdy przypadek klinicznego podejrzenia NOP po szczepieniu BCG powinien być skierowany do KRLP w Warszawie w celu wyhodowania z pobranych próbek prątków BCG i wykonania swoistych testów identyfikacji gatunkowej i lekowrażliwości.

Na koniec warto wspomnieć o stosowaniu BCG jako nieswoistego czynnika immunostymulacyjnego w leczeniu pierwotnych, powierzchownych nieinwazyjnych guzów pęcherza (carcinoma urotheliale Ta, T is, T1) i nawrotów tego samego charakteru (18).

W r. 1976 Morales opublikował pierwsze pozytywne wyniki leczenia pierwotnego raka pęcherza moczowego (18), w Polsce pierwsze własne wyniki opublikowali Mazurek i wsp. (17). Wystąpienie powikłań związanych z tą terapią jak np. gruźliczopodobne zapalenie głębszych warstw ściany pęcherza, zapalenia gruczołu krokowego, najądrzy i inne wymagają również diagnostyki mikrobiologicznej w laboratorium prątka, wyhodowania szczepu bakteryjnego, identyfikacji gatunku szczepionkowego BCG lub M.tuberculosis dla odróżnienia możliwego również procesu gruźliczego u chorego po immunoterapii.

Wnioski:

1. Identyfikacja *M.bovis* BCG i odróżnienie od gatunków wywołujących gruźlicę wymaga zastosowania nowoczesnych metod mikrobiologicznych izotopowych, genetycznych i chromatograficznych.
2. Zastosowanie testu analizy kwasów mykolowych w chromatografii HPLC umożliwia w ciągu 1 dnia identyfikację gatunkową *M.bovis* BCG.
3. Każdy szczep prątków gruźlicy wyhodowany od dzieci powinien mieć wykonany oprócz lekowrażliwości na INH, RMP, SM, EMB również test wrażliwości na PZA w systemie Bactec-460 Tb.

Piśmiennictwo

1. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am.J Respir Crit Care Med 2000, 161,137-95.
2. Armbruster C, Junker W, Vetter N i wsp. Disseminated Bacille Calmette-Guerin infection in an AIDS patients 30 years after BCG vaccination. J Infect Dis 1990, 162: 1216. (Letter).
3. Brosman SA.: Bacillus Callmette-Guerin immunotherapy. Urol.Clin North Am 1992, 19:557-564.
4. Dangoisse Ch., Song M: Condiute a tenir devant les complication cutanees du BCG. Ann Dermatol Venereol 1990, 117, 45-51.
5. FitzGerald MJ: Management of adverse reaction to Bacille Calmette-Guerin Vaccine. Clin Infect Diseases 2000; 31 (suppl 3): 875-76.
6. Floyd MM, Silcox VA, Jones WD Jr. Separation of Mycobacterium bovis BCG from Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis by using high-performance liquid chromatography of mycolic acids. J Clin Microb 1992,30, 5, 1327-1330.
7. Fomukong NG, dale JW, Osborn TW i wsp.: Use of gene probes based on the insertion sequence IS986 to differentiate between BCG vaccine strains. J.Appl. Bacteriol. 1992, 72: 126-133.
8. Frothingham R. Differentation of strains in Mycobacterium tuberculosis complex by DNA sequence polymorphism, including rapid identification of *M.bovis* BCG. J Clin Microbiol 1995; 33:840-844.
9. Jones WD. Differentiation of known strains of BCG from isolates of Mycobacterium bovis and Mycobacterium tuberculosis by using mycobacteriophage 33D. J Clin Microbiol 1975;1:391-392.
10. Kalabarczyk L., Ciupińska M., Kalabarczyk K.: Obraz kliniczny i histopatologiczny niepożądanych odczynów skórno-węzłowych po szczepieniach BCG. Przegl. Dermatol.. 2002, 4/89, 275-280.
11. Kurenko-Deptuch M., Bernatowska E., Zwolska Z.: Niedobór receptora dla interferonu gamma u trojga pacjentów z uogólnionym zakażeniem szczepionkowym prątkiem BCG. Pedi. Pol. 2004, 79, 11, 872-877.
12. Lotte A, Wasz-Hockert O, Poisson N, i wsp. BCG complications: estimates of the risk among vaccinated subjects and statistical analysis of their main characteristics. Adv.Tuberc Res 1984; 21: 107-193.
13. Lotte A, Wasz-Hockert O, Poisson N, i wsp.: Second IUATLD study on complications induced by intradermal BCG-vaccination.Bull Int union Tuberc 1988; 63:47-59.
14. Lugosi L.: Theoretical and methodological aspects of BCG vaccine from discovery of Calmette and Guerin to molecular biology. A review. Tubercle Lung Dis. 1992, 73:252-261.
15. Magdzik W.: Surveillance niepożądanych odczynów poszczepiennych (AEFI). Przegl. Epid. 1992, XLVI, 1-2, 27-33.
16. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ i wsp. Molecular analysis of genomic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent *M.bovis*. J Bacteriol 1996, 178,5; 1274-1282.
17. Mazurek LJ, Kayzer AH, Salska Z i wsp. Własne doświadczenia z zastosowaniem preparatu BCG w formie dopęcherzowej w leczeniu powierzchownych raków pęcherza moczowego. Pamiętnik Dnia Urologicznego, Bydgoszcz, 5-6 czerwiec 1987
18. Morales A.long-term results and complication of intracavitary bacillus Camette-Geurin therapy for bladder cancer. J.Urol. 1984, 132, 457-459.
19. Parson LM, Brosch R, Cole ST i wsp. Rapid simple approach for identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. J Clin Microbiol 2002; 40:2339-2345.
20. Passwell J., Katz D., Frank Y i wsp. :Fatal disseminated BCG infection. Am J Dis Child 1976; 130: 433-6.,
21. Szczuka I. : Bezpieczeństwo szczepień BCG. Niepożądane odczyny poszczepienne. Część I. Postacie powikłań. System nadzorowania. Przegl.Epidemiol 2002,56,1-13.
22. Talbot EA, Perkins MD, Silva SF i wsp..: Disseminated bacille Calmette-Guerin disease after vaccination: case report and review. Clin Infect Dis 1997; 24:1139-1146.
23. Talbot EA, Wiliams DL, Frothingham R. PCR identification of Mycobacterium bovis BCG. J Clin Microbiol 1997; 35: 566-569.
24. van Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW i wsp. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphism in Mycobacterium tuberculosis complex species: a reliable tool for recognizing Mycobacterium bovis BCG. J.Clin Microbiol 1992, 30:1772-1777.
25. W-J, Su., C-Y.Huang, C-Y. Huang, R-P. Perng:: Utility of PCR assays for rapid diagnosis of BCG infection in children. Int J Tuberc Lung Dis 2001, 5(4): 380-384.
26. Wytyczne IGiCHP wykonywania prób tuberkulinowych i szczepień BCG 1995, Warszawa
27. Zhang Y, Wallace RJ, Jr, Mazurek GH.: Genetic differences beetween BCG substrains. Tubercle Lung Dis. 1995, 76, 43-50
28. Zwolska Z, Augustynowicz-Kopeć E, Zabost A, i wsp. Metody izotopowe, genetyczne i chromatograficzne w diagnostyce powikłań po szczepieniu BCG. Przegląd Epidem 2004, Suplem.1, 58;123-128.
29. Zwolska Z, Augustynowicz-Kopeć E, Zabost A: i wsp.: Zastosowanie nowoczesnych metod mikrobiologicznych do diagnostyki powikłań po szczepieniu BCG. Pneum. Alergol.Pol. 2004,7-8,269
30. Zwolska Z. Wybrane zagadnienia mikrobiologii gruźlicy. Choroby infekcyjne układu oddechowego u dzieci. red. D. Chmielewskiej-Szewczyk, Via Medica 2001, 237-264

Wpłynęła: 31.01.05
Adres: Zakład Mikrobiologii, IGiChP, ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa