

Femoral Hemodiyaliz Kateteri ile İlişkili *Globicatella sanguinis* Bakteremisi: Tür Düzeyinde Tanımlamada Karşılaşılan Sorunlar*

Femoral Hemodialysis Catheter-Related Bacteremia Due to *Globicatella sanguinis*: Challenges in Species Identification

Elif AKTAŞ¹, Nafia Canan GÜRİSOY², Tamer SAKACI³, Yener KOÇ³, Aziz Ahmad HAMİDİ⁴, Emin BULUT¹, Duygu ERDEMİR¹, Barış OTLU²

¹ Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul.
¹ Health Sciences University Şişli Hamidiye Etfal Training and Research Hospital, Clinical Microbiology Laboratory, Istanbul, Turkey.

² İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.

² İnönü University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Malatya, Turkey.

³ Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nefroloji Kliniği, İstanbul.

³ Health Sciences University Şişli Hamidiye Etfal Training and Research Hospital, Department of Nephrology, Istanbul, Turkey.

⁴ Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul.

⁴ Health Sciences University Şişli Hamidiye Etfal Training and Research Hospital, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Istanbul, Turkey.

* Bu çalışma, XXXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (16-20 Kasım 2016, Antalya)'nde sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 18.10.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 08.03.2017

ÖZ

Bu olguda diyabetik nefropati tanısıyla kronik hemodiyaliz programına alınan 43 yaşında kadın hastada saptanan *Globicatella sanguinis*'e bağlı kateterle ilişkili bakteremi olgusu sunulmuştur. Fırsatçı ve nadir bir patojen olan *Globicatella* cinsinin laboratuvar tanısında kullanılan yöntemler irdelenmiştir. Mayıs 2016 tarihinde hastanın bir set periferik kan kültürü ve eş zamanlı olarak kateter kültürü alınmıştır. Üreyen bakterinin tanımlanması için biyokimyasal testler, Phoenix (BectonDickinson, ABD) ve MicroScan (BeckmanCoulter, ABD) otomatik identifikasyon sistemleri, matris aracılı lazer desorpsiyon/iyonizasyon-uçuş zamanlı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) temelli Microflex MS (Bruker, Daltonics, Almanya) ve VITEK MS (database v2.0) (bioMérieux, Fransa) sistemleri kullanılmıştır. Etkene özgül p8FPL 5'-AGT TTTG ATC ATG GCT CAG-3' ve p806R 5'-GGG CTA CCA GGG TAT CTA AT-3' primerleriyle kısmi 16S rDNA dizi analizi yapılmıştır. Vankomisin, eritromisin, imipenem, sefotaksim ve benzipenisilin için minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) agar gradient yöntemiyle belirlenmiştir. Hastanın kan ve kateter kültürlerinde aynı koloni üremesi tespit edilmiştir. Kanlı besiyerlerinde bir gecelik inkübasyon sonrası gözlenen alfa-hemolitik,

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Elif Aktaş, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye
Tel (Phone): +90 212 373 5000, E-posta (E-mail): drelifaktas@yahoo.com

katalaz-negatif koloniler, Gram boyama ile gram-pozitif zincir yapan koklar şeklinde görülmüştür. İzolat, Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesinde; Bruker MS sistemi ile *G.sulfidifaciens* (skor değeri > 2), Phoenix otomatik identifikasyon sistemi ile *G.sanguinis* olarak tanımlanmıştır. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesinde; Microscan otomatize sistemiyle tanımlama yapılamamış, VITEK MS ile izolat %99.9 *G.sanguinis* ve %98.3 *G.sulfidifaciens* olarak isimlendirilmiştir. 16S rDNA dizi analiziyle izolat %100 *Globicatella sanguinis* (GenBank accessionno. KJ680157.1) olarak tanımlanmıştır. MİK değerleri vankomisin için 0.38 µg/ml, eritromisin için 1.5 µg/ml, imipenem için 0.38 µg/ml, sefotaksim için > 32 µg/ml ve benzipenisilin için 64 µg/ml olarak belirlenmiştir. Hastada katetere bağlı kan dolaşımı enfeksiyonu olarak düşünüldüğü için, tedaviye vankomisin 1 x 1 g IV/72 saat olarak 10 güne kadar devam edilmiştir. Hastanın kontrollerinde ateş ve üreme olmamıştır. *G.sanguinis*, sıklıkla karşılaşılan patojenler içerisinde yer almadığından ve laboratuvar tanısında karşılaşılan güçlükler nedeniyle belki de gözden kaçabilmekte veya yanlış tanımlanabilmektedir. BD Phoenix veritabanında *G.sulfidifaciens*, Bruker MS veritabanında *G.sanguinis* ve MicroScan veritabanında *Globicatella* cinsinin mevcut olmadığı görülmüştür. Son yıllarda gelişen tıbbi uygulamalar ve immün sistemi baskılanmış hasta popülasyonundaki artış nedeniyle nadir bakteri türleri daha da sık görülecektir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının, hem klasik mikrobiyolojik yöntemlerle hem de moleküler yöntemlerle tanı gücünün artırılması, ticari identifikasyon sistemi geliştiren şirketlerin patojen spektrumunu genişleterek veritabanlarını yenilemeleri bu tür etkenlerle oluşabilecek ciddi enfeksiyonların önlenmesi açısından önem taşımaktadır.

Anahtar sözcükler: *Globicatella*; otomatize sistem; MALDI-TOF MS; 16S rDNA dizi analizi.

ABSTRACT

In this case, catheter-related bacteremia due to *Globicatella sanguinis* in a 43 years old female patient undergoing hemodialysis with the diagnosis of diabetic nephropathy was presented and the methods in the laboratory diagnosis of the rare opportunistic pathogen, *Globicatella* cins, were investigated. A set of peripheral blood cultures and simultaneous catheter culture was obtained from the patient in third of May 2016. Biochemical tests, Phoenix (Becton Dickinson, USA) and MicroScan (Beckman Coulter, USA) automated systems and matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF MS) based Microflex MS (Bruker, Daltonics, Germany) and VITEK MS (database v2.0) (bioMérieux, France) systems were used for the identification of the cultured bacteria. Partial 16S rDNA sequencing was done by using specific p8FPL 5'-AGT TTG ATC ATG GCT CAG-3' and p806R 5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA AT-3' primers. Minimal inhibitory concentrations (MICs) for vancomycin, erythromycin, imipenem, cefotaxime and benzylpenicillin were determined by agar gradient method. The blood and catheter cultures yielded the same type of bacterial colonies. Alfa-hemolytic, catalase negative colonies observed on blood agar plates after an over night incubation yielded gram-positive cocci on Gram staining. In Şişli Hamidiye Etfal Hospital, the isolate was identified as *G.sulfidifaciens* (score value > 2) by Bruker MS system and as *G.sanguinis* by Phoenix automated system. In İnönü University, the isolate could not be identified by Microscan automated system while VITEK MS named the isolate as 99.9% *G.sanguinis* and 98.3% *G.sulfidifaciens*. The 16S rDNA sequencing identified the isolate as 100% *G.sanguinis* (GenBank accessionno. KJ680157.1). The MIC values were 0.38 µg/ml, 1.5 µg/ml, 0.38 µg/ml, > 32 µg/ml and 64 µg/ml for vancomycin, erythromycin, imipenem, cefotaxime and benzylpenicillin, respectively. The patient was diagnosed as catheter-related bacteremia and vancomycin (1 x 1 g IV/72 h) was used for up to 10 days. No fever and bacterial growth in cultures were present in her control visits. As *G.sanguinis* is not among the commonly encountered pathogens and due to difficulties in laboratory diagnosis, it may be misdiagnosed or mis-identified in clinical laboratories. BD Phoenix and Bruker MS data bases lack *G.sulfidifaciens* and *G.sanguinis*, respectively, while the *Globicatella* genus is not present in MicroScan database. The increased number of molecular implementations and the increasing number of immunosuppressed patient populations in recent years will lead to the emergence of rare bacteria. Increasing the diagnostic power of clinical microbiology laboratories by conventional and molecular methods and renewal of the databases of commercial identification systems by expanding the pathogen spectrum are significantly important for the prevention and control of infections caused by these agents.

Keywords: *Globicatella*; automated systems; MALDI-TOF MS; 16S rDNA sequencing.

GİRİŞ

Globicatella cinsi, daha çok insanlardan izole edilen *Globicatella sanguinis* ve sıklıkla hayvanlardan izole edilen *Globicatella sulfidifaciens* olmak üzere iki türe sahip, nadir görülen, fırsatçı patojen bir bakteridir^{1,2}. Ancak her iki türün de herhangi bir belirti vermeden insanlarda bulunabildiği gösterilmiştir³. *Globicatella* türlerinin diğer katalaz-negatif, gram-pozitif koklardan ayırımı güçtür. Bu amaçla Gram boyama ile görünüşleri ve çeşitli biyokimyasal reaksiyonları kullanılmakta, ancak net bir tür ayırımı yapabilmek için bunların yanı sıra 16S rDNA dizileme gibi genotipik yöntemler ve/veya protein paterninin karşılaştırılması gerekmektedir¹⁻⁹.

Bu olguda; diyabetik nefropati tanısıyla kronik hemodiyaliz programına alınan 43 yaşında kadın hastada saptanan *G.sanguinis*'e bağlı kateterle ilişkili bakteremi olgusu sunulmuştur ve *Globicatella* cinsinin laboratuvar tanısında kullanılan yöntemler irdelenmiştir.

OLGU SUNUMU

Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nefroloji Polikliniğinde diabetes mellitus, hipertansiyon ve diyabetik nefropatiye bağlı kronik böbrek yetmezliği tanısıyla takip edilen 43 yaşındaki kadın hastaya Aralık 2015 tarihinde koroner damar hastalığı nedeniyle anjiyografi ve stent koyma işlemi yapılmış ve o tarihten itibaren haftada 3 gün 4 saat düzenli hemodiyaliz tedavisi başlanmıştır. Geçici sağ femoral kateterinden hemodiyaliz tedavisi almakta olan hasta üşüme, titreme ve ateş şikâyetleriyle hastanemiz hemodiyaliz merkezine başvurduğunda; hemodiyaliz kateterinin etkin çalışmadığı gözlemlendi. Hastanın fizik muayenesinde genel durumu iyi, bilinci açık, oryante, koopereydi. TA: 150/80 mmHg, ateş: 36.8°C, solunum sayısı: 18/dakika olarak saptandı. Sistem muayenelerinde patolojik özellik saptanmadı. Yapılan rutin laboratuvar tetkiklerinde; lökosit: 8470/µl, hemoglobin: 9.1 g/dl, hematokrit: %27.4, trombosit: 553.000/µl, glukoz: 204 mg/dl, kreatinin: 6.2 mg/dl, üre: 95 mg/dl, total protein: 6.8 g/dl, albumin: 3.9 g/dl, CRP: 6 mg/L olarak saptandı.

Mayıs 2016 tarihinde hastanın birer set periferik kan kültürü ve kateter kültürü alındı. Femoral kateteri çekilip, geçici sağ juguler kateter takıldı, hemodiyalize alındı ve diyaliz sonrası 1 g parenteral vankomisin uygulandı. BACTEC 9240 (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, ABD) otomatize kan kültür sisteminde pozitif sinyal veren örnekler; %5 koyun kanlı agar ve çikolata agara ekilerek, %5 CO₂'li ortamda 37°C'de inkübe edildi. Hastanın kan ve kateter kültürlerinde bir gecelik inkübasyon sonrası üreyen koloniler alfa-hemolitik, katalaz-negatif, Gram boyama ile gram-pozitif zincir yapan koklar şeklinde görüldü (Resim 1).

İzolat, Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesinde; Phoenix otomatik identifikasyon sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile *G.sanguinis* olarak tanımlandı. Matrisli lazer desorpsiyon/ionizasyon-uçuş zamanlı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) temelli Microflex MS (Bruker, Daltonics, Almanya) platformunda MALDI Biotyper 3.1 yazılımı kullanılarak *G.sulfidifaciens* olarak tanımlandı (skor > 2). BD Phoenix veritabanında *G.sulfidifaciens* ve Bruker MALDI Biotyper kütüphanesinde ise *G.sanguinis*'in



Resim 1. *G.sanguinis*'in (A) Gram boyama, (B) Kanlı agar'da koloni görünümü.

mevcut olmadığı görüldü. İzolatın biyokimyasal profili değerlendirildiğinde; H₂S ve β-glucuronidase üretiminin olmaması, pyridonylaryl amidase ve β-N-acetyl glucosaminidase üretimi vehipurat hidroliz testinin pozitif olması^{4,5} *G.sanguinis* olma olasılığını güçlendirdi.

Daha sonra İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesine gönderilen izolatın Microscan (Beckman, Coulter, ABD) otomatize sistem ile tanımlaması yapılamadı ve sistemin veritabanı incelendiğinde *Globicatella* cinsinin bulunmadığı görüldü. Aynı merkezde izolat, MALDI-TOF MS-temelli VITEK MS (database v2.0) (bioMérieux, Fransa) sistemi ile %99.9 *G.sanguinis* ve %98.3 *G.sulfidifaciens* olarak tanımlandı. İzolatın tür düzeyinde kesin identifikasyonu için özgül p8FPL 5'-AGT TTG ATC ATG GCT CAG-3' ve p806R 5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA AT-3' primerleri kullanılarak kısmi 16S rDNA dizi analizi yapıldı. Bu amaçla EZ1 otomatize ekstraksiyon sistemi (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı ve ardından yaklaşık 800 baz çiftlik 16S rDNA bölgesi her iki yönde; GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems/ABD) ısı döngü cihazı kullanılarak çoğaltıldı. Amplifikasyon koşulları; 94°C'de 3 dakikalık ilk denatürasyonu takiben, 35 döngü olarak 94°C/30 sn denatürasyon, 60°C/30 sn bağlanma ve 72°C/1 dk uzama olarak uygulandı. %1'lik agaroz jel elektroforezinde elde edilen bantlar dizi analizinde kullanılmak üzere; "QIAquick Gel Extraction" kiti (Hilden, Almanya) kullanılarak saflaştırıldı. "ABI PrismBigDyeTerminator v3.1 (Applied Biosystems, ABD)" kiti kullanılarak, "dideoxy nucleotide sequencing" işlemi gerçekleştirildi. Sekans ürünleri, ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, ABD) cihazına yüklendi ve elde edilen kromatogramlar, NCBI'da (National Centre for Biotechnology Information) yer alan Gen Bankası ve BLAST (Basic Local Alignment Tool) sunucusu kullanılarak veri bankasında kayıtlı diğer izolatlar ile karşılaştırıldı. Elde edilen dizilerin tür düzeyinde identifikasyonlarında yüksek oranda doğruluğundan emin olmak için; E-değeri 0.0 ve maksimum benzerlik oranları %99'un üzerinde olan veriler tanımlamada kullanıldı. Toplamda yaklaşık 800 bp'lik bölgenin dizi analizi yapıldı ve izolat; %100 *G.sanguinis* (GenBank accessionno. KJ680157.1) ve %99 *G.sulfidifaciens* (GenBank accessionno. KT825515.1) olarak tanımlandı.

Çeşitli antibiyotikler için minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) agar gradient yöntemiyle belirlendi. MİK değerleri; vankomisin için 0.38 µg/ml, eritromisin için 1.5 µg/ml, imipenem için 0.38 µg/ml, sefotaksim için > 32 µg/ml ve benzipenisilin için 64 µg/ml

olarak belirlendi. Hastada katetere bağlı kan dolaşımı enfeksiyonu düşünüldüğü için tedavisine vankomisin 1 x 1 g IV/72 saat olarak 10 güne kadar devam edildi. Kontrollerinde ateşi tekrarlamayan hastanın kültürlerinde üremesi ve ek bir şikâyeti olmadı.

TARTIŞMA

Çeşitli mukozal yüzeylerde kalıcı flora elemanı olarak bulunabilen, insan ve hayvanlarda fırsatçı patojen olduğu belirtilen *G.sanguinis*; 16S rDNA dizi analizleri yapılan kadar *Streptococcus uberis* olarak tanımlanmakta olup, 1992 yılında yeni bir takson olarak kabul edilmiştir^{1,6}. *G.sanguinis*'in; bakteremi ve endokarditli hastaların kan kültürlerinden, üri-ner sistem enfeksiyonlu hastaların idrarından, menenjitli hastaların beyin omurilik sıvılarından, cerrahi alan enfeksiyonlarından izole edildiği ve kuzularda meningoensefalit salgınına neden olduğu bildirilmiştir³⁻⁸. *Globicatella* cinsine ait ikinci bir tür *G.sulfidifaciens* ise daha çok hayvanlardan izole edilmekte ve 16S rDNA dizisi *G.sanguinis* ile %99.2 oranında benzerlik gösterebilmektedir. Ancak tüm hücre protein paterni ve biyokimyasal profili incelendiğinde tür ayrımı daha net yapılabilmektedir². Çalışmada; eş zamanlı olarak Phoenix otomatik identifikasyon sistemi ve Bruker Microflex MS ile çalışılan izolat, tür düzeyinde farklı sonuçlar vermiştir. Bu iki sistemin veritabanları incelendiğinde; her birinin *Globicatella* cinsine ait yalnızca birer tür içerdiği, MicroScan veritabanında ise *Globicatella* cinsinin bulunmadığı görülmüştür. VITEK MS, veritabanında bulunan her iki tür için de birbirine çok yakın yüzdelerle tanımlama yapmıştır (%99.9 *G.sanguinis* ve %98.3 *G.sulfidifaciens*). İzolatın tür düzeyinde kesin identifikasyonu için yapılan 16S rDNA dizi analizi sonucunda izolat, %100 *G.sanguinis* olarak tanımlanmıştır.

Klinik laboratuvarlarda *Globicatella* ile nadiren karşılaşıldığından, biyokimyasal ve metabolik özelliklerinin kullanıldığı fenotipik test sonuçları alışılmışın dışında kalmaktadır. Bu yüzden tanımlanamayan streptokok benzeri organizma veya biyokimyasal profilinin benzerliğinden dolayı *Aerococcus viridans* olarak bildirilmekte ya da gözden kaçabilmektedir^{1,5}. Son yıllarda gelişen tıbbi uygulamalar ve immün sistemi baskılanmış hasta popülasyonundaki artış ile birlikte, antibiyotiklerin seçici baskısı şimdiye kadar tanımlanmamış mikroorganizmaların görülme sıklığını artırmaktadır. Yeni ve nadir görülen mikroorganizmaların giderek artan oranlarda tespitinin bir başka nedeni de; 16S rDNA dizi analizi gibi moleküler ve kütle spektrometresi gibi yeni proteom bazlı yöntemlerin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında yerini almasıdır. Özellikle immünsüpresyon, invaziv girişim, diyabet ya da kronik hastalıkları olan hasta grubu için ciddi risk oluşturan, çoğunlukla fırsatçı olan ve mortal seyredebilen bu yepyeni mikroorganizmaların enfeksiyon etkeni olduğuna karar vermek, patojenite mekanizmalarını belirlemek, uygun antibiyotik tedavisini planlamak, gerçek-zamanlı sürveyanslarını oluşturmak ve enfeksiyon yönetim stratejilerini belirlemek için doğru bir şekilde tür düzeyinde tanımlanabilmesi şarttır⁹. *G.sanguinis*, sıklıkla karşılaşılan patojenler içerisinde yer almadığından ve laboratuvar tanısında karşılaşılan güçlükler nedeniyle belki de gözden kaçabilmekte veya yanlış tanımlanabilmektedir. BD Phoenix veritabanında *G.sulfidifaciens*, Bruker MS veritabanında *G.sanguinis* ve MicroScan veritabanında *Globicatella* cinsinin mevcut olmadığı görülmüştür.

Son yıllarda gelişen tıbbi uygulamalar ve immün sistemi baskılanmış hasta popülasyonundaki artış nedeniyle nadir bakteri türleri daha sık görülecektir. Günümüzde henüz tek başına tüm bakteriyel türleri tanımlayabilecek mükemmel bir yöntem bulunmamaktadır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının, hem klasik mikrobiyolojik yöntemlerle hem de moleküler yöntemlerle tanı gücünün artırılması, ticari identifikasyon sistemi geliştiren şirketlerin patojen spektrumunu genişleterek veritabanlarını yenilemeleri bu tür etkenlerle oluşabilecek ciddi enfeksiyonların önlenmesi açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Collins MD, Aguirre M, Facklam RR, Shallcross J, Williams AM. *Globicatella sanguis* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive catalase-negative bacterium from human sources. J Appl Bacteriol 1992; 73(5): 433-7.
2. Vandamme P, Hommez J, Snauwaert C, et al. *Globicatella sulfidiffaciens* sp. nov. Isolated from purulent infections in domestic animals. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51(5): 1745-9.
3. Héry-Arnaud G, Doloy A, Ansart S, et al. *Globicatella sanguinis* meningitis associated with human carriage. J Clin Microbiol 2010; 48(4): 1491-3.
4. Lau SKP, Woo PCY, Li NKH, et al. *Globicatella* bacteraemia identified by 16S ribosomal RNA gene sequencing. J Clin Pathol 2006; 59(3): 303-7.
5. Abdul-Redha RJ, Balslew U, Christensen JJ, Kemp M. *Globicatella sanguinis* bacteraemia identified by partial 16S rRNA gene sequencing. Scand J Infect Dis 2007; 39(8): 745-8.
6. Matusnami M, Otsuka T, Ohkusu K, Sogi M, Kitazono H, Hosokawa N. Urosepsis caused by *Globicatella sanguinis* and *Corynebacterium riegellii* in an adult: case report and literature review. J Infect Chemother 2012; 18(4): 552-4.
7. Jain N, Mathur P, Misra MC. *Globicatella sanguinis* meningitis in a post head trauma patient: first case report from Asia. J Infect Dev Ctries 2012; 6(7): 592-4.
8. Vela AI, Fernández E, lasHeras A, et al. Meningoencephalitis associated with *Globicatella sanguinis* infection in Lambs. J Clin Microbiol 2000; 38(11): 4254-5.
9. Loong SK, Khor CS, Jafar FL, AbuBaka S. Utility of 16S rDNA sequencing for identification of rare pathogenic bacteria. J Clin Lab Anal 2016; 30(6): 1056-60.