

# Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında Sıklıkla Atlanan Bir Etken: *Arcanobacterium haemolyticum*

## A Frequently Overlooked Bacteria in Clinical Microbiology Laboratories: *Arcanobacterium haemolyticum*

Ahmet BALIKCI, Aynur E. TOPKAYA, Zeliha BELAŞ

Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.  
Maltepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 14.01.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 13.04.2011

### ÖZET

Önceden *Corynebacterium haemolyticum* olarak bilinen *Arcanobacterium haemolyticum*, fakültatif anaerop, katalaz negatif, CAMP inhibisyon testi pozitif, gram-pozitif bir basildir. Bu bakteri, genellikle çocuk ve genç erişkinlerde farenjite neden olmakta ve akut farenjitlerin %0.5-3'ünden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. *A. haemolyticum*'un hemolitik aktivitesinin koyun kanlı besiyerinde yavaş olması, üremesinin flora bakterileri tarafından baskılanması ve koloni morfolojisinin beta-hemolitik streptokoklar ile karışması nedeniyle, rutin yöntemlerle incelenen boğaz kültürlerinde genellikle göz ardı edilmektedir. Bu çalışmada, çocuk hastalara ait boğaz kültürlerinde, koyun ve insan kanlı besiyerleri kullanılarak *A. haemolyticum* sıklığının araştırılması ve besiyerlerinin *A. haemolyticum* tanısındaki etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, Mart-Temmuz 2010 tarihleri arasında hastanemizin pediatri polikliniklerine başvuran ve tonsillofarenjit bulguları olan 355 hastadan (median yaş: 7 yıl) alınan boğaz kültürleri değerlendirilmiştir. Tonsiller ve posterior orofarenksten alınan sürüntü örnekleri, yarısı %5 koyun kanı diğer yarısı da %5 insan kanı içeren iki bölmeli besiyerine ekilmiş; kültürler %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 37°C'de inkübe edilmiş ve 24, 48 ve 72. saatlerde beta-hemoliz yapan ve mikroskopik incelemede gram-pozitif basil morfolojisinde görülen koloniler ileri incelemeye alınmıştır. *A. haemolyticum* tanısı, katalaz testinin negatif, ters CAMP testinin pozitif olmasına ve API-Coryne (bioMérieux, Fransa) tanımlama testi ile saptanan biyokimyasal özelliklerine göre konulmuştur. Çalışmamızda, 56 (%16) hastaya ait boğaz kültüründe beta-hemoliz oluşturan koloniler saptanmış ve bunların %14 (49/355)'ü beta-hemolitik streptokok (46 A grubu, 2 G grubu, 1 C grubu), %2 (7/355)'si ise *A. haemolyticum* olarak tanımlanmıştır. *A. haemolyticum* izolatlarının tümü 24. saatte insan kanlı agarda beta-hemoliz oluşturmaları sonucu tanımlanmış; koyun kanlı agarda beta-hemoliz oluşumu ise dört suş için 48. saatte ve

**İletişim (Correspondence):** Yrd. Doç. Dr. Ahmet Balıkçı, Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Feyzullah Caddesi No: 39 Maltepe, İstanbul, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 536 227 9283, **E-posta (E-mail):** balikciyahmet@yahoo.com

üç suş için 72. saatte gerçekleşmiştir. Sonuç olarak, ilkbahar/yaz dönemindeki beş aylık süre içinde tonsillofarenjitli çocuk hastaların boğaz kültürlerinde *A. haemolyticum* saptanma oranı %2 olarak belirlenmiş ve suşların tümü 24. saatte insan kanlı agardan izole edilmiştir. Dolayısıyla, mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin boğaz kültürlerinin değerlendirilmesinde *A. haemolyticum*'um atlanmaması için, aynı veya farklı petrilere koyun kanlı besiyeri ile beraber insan kanlı besiyerinin de kullanılmasının yararlı olacağı düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** *Arcanobacterium haemolyticum*; farenjit; beta-hemoliz; insan kanlı agar; laboratuvar tanısı.

## ABSTRACT

*Arcanobacterium haemolyticum*, previously known as *Corynebacterium haemolyticum*, is a facultative anaerobic, gram-positive bacillus with negative catalase and positive CAMP inhibition test results. It may be the causative agent of about 0.5-3% of acute bacterial pharyngitis especially in children and young adults. Since growth of *A. haemolyticum* is usually inhibited by flora members and since it slowly develops hemolysis in sheep blood agar and its colony morphology resembles beta-hemolytic streptococci, it is frequently overlooked in the evaluation of throat cultures. The aims of this study were to investigate the isolation frequency of *A. haemolyticum* from the throat cultures of pediatric patients by using both sheep and human blood agar media, and to evaluate the performances of those media for the identification of *A. haemolyticum*. A total of 355 patients (median age: 7 years) who were admitted to pediatric outpatient clinics with the symptoms of tonsillopharyngitis between March-July 2010 period, were included in the study. Swab samples obtained from tonsils and posterior oropharynx were inoculated into a divided plate which contained 5% sheep blood agar in one half and 5% human blood agar in the other half. After incubation in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C, the beta-hemolytic colonies with a microscopic morphology of gram-positive bacilli were further evaluated on 24, 48 and 72<sup>th</sup> hours. Identification of *A. haemolyticum* was based on negative catalase test, positive reverse CAMP test and biochemical characteristics obtained by API-Coryne (bioMérieux, France) identification system. In our study, beta-hemolytic colonies were detected in the throat cultures of 56 (16%) patients, of which 14% (49/355) were identified as beta-hemolytic streptococci (46 group A, 2 group G, 1 group C), and 2% (7/355) were identified as *A. haemolyticum*. All of the *A. haemolyticum* isolates were characterized by the production of beta-hemolysis in human blood agar at 24 hours, while the beta-hemolysis generation time in sheep blood agar was 48 hours for four isolates and 72 hours for three isolates. *A. haemolyticum* was identified in 2% of children with tonsillopharyngitis during the five months study period in spring/summer. All of the strains were isolated at human blood agar in 24 hours. Thus, in order to isolate *A. haemolyticum* in routine throat cultures, sheep blood agar plates together with human blood agar plates should be used in clinical microbiology laboratories.

**Key words:** *Arcanobacterium haemolyticum*; pharyngitis; beta-hemolysis; human blood agar; laboratory diagnosis.

## GİRİŞ

*Arcanobacterium haemolyticum*, önceden *Corynebacterium haemolyticum* olarak da bilinen fakültatif anaerob, katalaz negatif, CAMP inhibisyon testi pozitif, gram-pozitif bir basildir. Neden olduğu enfeksiyonlar farenjit ve farenjit dışı olarak iki grupta ele alınmaktadır. Farenjit olguları sıklıkla genç erişkinler olarak dikkati çekerken, farenjit dışı (sinüzit,

yumuşak doku enfeksiyonları, osteomyelit, pnömoni, menenjit) olgular ileri yaştaki kişilerdir<sup>1</sup>. Farklı yaş gruplarında sıklığı değişmekle beraber etken olarak en sık saptandığı 15-30 yaş aralığındaki akut farenjitli hasta örneklerinde saptanma oranının kültürde %0.5-3 olduğu tahmin edilmektedir.

Hastalık tablosu, beta-hemolitik streptokok ve Epstein-Barr virus (EBV) tarafından oluşturulan farenjite benzer olarak ateş, eksüdatif farenjit, lenfadenopati ve döküntü ile karışımıza çıkar. Bazen de difteriye benzer psödomembranlar görülebilir<sup>2</sup>. Penisilin, sefalosporin, makrolid ve vankomisin grubu antibiyotiklere genellikle duyarlı olan *A.haemolyticum*, trimetoprim-sülfametoksazol, tetrasiklin, klindamisin ve siprofloksasine nadiren dirençli bulunabilir<sup>1</sup>.

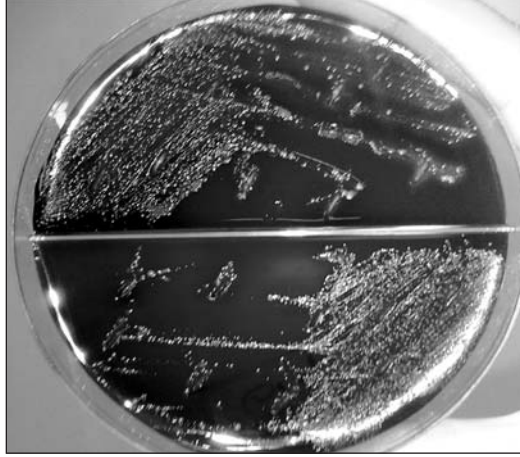
*A.haemolyticum*, yavaş üreyen bakteriler arasında yer almakla beraber kültür için özel bir besiyerine ihtiyaç duymamakta; insan veya %5 koyun kanlı besiyerinde rahatlıkla üremektedir. Koyun kanlı besiyerinde 24 saatte küçük, mat, çevresinde alfa-hemoliz oluşturan koloniler şeklinde ürer. Bu hemoliz 48. saatte beta-hemolize döner. İnsan kanlı besiyerinde ise ilk 24 saatte beta-hemoliz oluşturur<sup>3</sup>. *A.haemolyticum*'un hemolitik aktivitesinin, beta-hemolitik streptokokları izole etmek amacıyla kullanılan koyun kanlı besiyerinde yavaş olması, üremesinin flora bakterileri tarafından baskılanması ve morfolojik özelliklerinin bu bakterilerle karışması nedeniyle, rutin yöntemlerle incelenen boğaz kültürlerinde tanımlanması zordur. *A.haemolyticum* farenjitinin tanısı, fosfolipaz D antikorunu kullanarak da konulabilir; ancak bu amaçla kullanılacak serolojik testler henüz rutin kullanıma girmediğinden, tanı için kültür esastır<sup>4</sup>.

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında boğaz kültürlerinde çoğunlukla A, C, G grubu beta-hemolitik streptokoklar aranmakta, *A.haemolyticum* göz ardı edilmektedir. Bu çalışmada, hastanemizin çocuk polikliniklerine başvuran hastalara ait boğaz sürüntüsü örneklerinde, koyun ve insan kanlı besiyerleri kullanılarak *A.haemolyticum* sıklığının araştırılması ve besiyerlerinin *A.haemolyticum* tanısındaki etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Mart-Temmuz 2010 tarihleri arasında Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi pediatri polikliniklerine tonsillofarenjit semptomlarıyla müracaat eden toplam 355 çocuk hastanın boğaz kültürleri dahil edildi. Tüm boğaz kültürü örnekleri, çalışma yürütücüsü tarafından dile değdirilmeden, tonsillalar üzerinde birkaç saniye süreyle çevrilerek ve posterior orofarenkse sürülerek alındı.

Boğaz kültürü örnekleri Stuart transport besiyeri ile en geç bir saatte mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırıldı ve yarısı %5 koyun kanı diğer yarısı da %5 insan kanı içeren iki bölmeli besiyerine ekildi. Örnekler 48 saat %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 37°C'de inkübe edildi. 24 ve 48. saatlerde beta-hemoliz yapan ve Gram boyanmasında gram-pozitif basil morfolojisinde görünen koloniler ileri incelemeye alındı. *A.haemolyticum* tanısı, katalaz testinin negatif, ters CAMP testinin pozitif olması ve API-Coryne (bioMérieux, Fransa) ticari tanımlama testi ile biyokimyasal olarak konuldu.



**Resim 1.** Üst yarısı insan, alt yarısı koyun kanıyla hazırlanmış kanlı besiyerinde *A. haemolyticum* üremesi.

## BULGULAR

Çalışmamızda değerlendirilen tonsillofarenjit ön tanılı 355 çocuk hastaya ait boğaz kültürlerinin 56 (%16)'sında beta-hemoliz oluşturan koloniler saptanmış ve bunların 49 (%14)'ü beta-hemolitik streptokok (46 A grubu, 2 G grubu, 1 C grubu), 7 (%2)'si ise *A. haemolyticum* olarak tanımlanmıştır. Hastaların yaş median dağılımı; *A. haemolyticum* üreyenlerde 7, beta-hemolitik streptokok üreyenlerde 7.5, üreme olmayan grupta ise 6 yıl olarak saptanmıştır.

Besiyerinin koyun kanlı tarafında 24 saatlik değerlendirmelerde *A. haemolyticum* benzeri üremeye rastlanmamış; 7 suşun tamamı besiyerinin insan kanlı tarafında beta-hemoliz yapması nedeniyle şüphelenilerek ileri incelemeye (Gram, CAMP, API) alınan kültürlerden izole edilmiştir. Kırk sekiz saatlik değerlendirmede 4 suş koyun kanlı ağarda beta-hemoliz oluşturmuş, 3 suş ise ancak 72. saatte bu besiyerinde beta-hemoliz oluşturmuştur (Resim 1).

## TARTIŞMA

Üst solunum yolu enfeksiyonları içinde en sık karşılaşılan klinik tablo olan akut farenjitin etyolojisinde farklı mikroorganizma grupları rol oynamaktadır. Akut farenjit özellikle çocuklarda sıklıkla viral etkenler (rinovirus, adenovirus, EBV, koksaki virus vb.) tarafından oluşturulmakta, ancak rutin mikrobiyolojik incelemede boğaz kültürlerinde grup A, C, G hemolitik streptokok dışındaki etkenler aranmamaktadır. *Corynebacterium diphtheriae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Francisella tularensis* gibi mikroorganizmalar ise klinisyenin özel isteğine bağlı olarak araştırılmaktadır<sup>1</sup>.

Antibiyotik kullanımının tedavi süresini ve komplikasyonları azaltması sebebiyle *A. haemolyticum*'un kültürde tanımlanması ve bildirilmesi önemlidir. Kanlı agar plaklarında 24 saatlik inkübasyon süresinde, beta-hemoliz çapının ve koloni morfolojisinin

iyi değerlendirilememesi nedeniyle en az 48 saatlik inkübasyon süresi önerilmektedir<sup>5-7</sup>. Zira bu bakteri rutinde kullanılan %5'lik koyun kanlı besiyerlerinde genelde 24-48 saat içinde üremeye başlar, ancak koloniler 48-72. saate kadar görülmeyebilir. Rutin kültürler çoğunlukla 24-48 saatte değerlendirildiğinden, kolonilerin küçüklüğü ve hemolitik aktivitelerinin az olması nedeniyle *A.haemolyticum* kolayca gözden kaçabilmektedir<sup>8,9</sup>. Tavşan veya insan kanı ile hazırlanmış besiyerlerinde ve %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda üremenin hızlandığı, kolonilerin ve hemoliz zonlarının genişlediği tespit edilmiştir<sup>1</sup>. Yapılan bir çalışmada, en iyi üremenin 48 saatte %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda %5 at kanlı triptik soy agar (TSA) besiyerinde olduğu gösterilmiştir; ancak bu çalışmada insan kanı kullanılmamıştır<sup>6</sup>.

*A.haemolyticum* üremesi için çeşitli seçici besiyerleri de önerilmektedir. Brenwald ve arkadaşlarının<sup>3</sup> çalışmasında, mupirosin içeren besiyerinin normal florayı baskılayarak *A.haemolyticum*'um üremesini artırdığı saptanmıştır. Wat ve arkadaşlarının<sup>7</sup> yaptıkları bir başka çalışmada da, %3.5 tuz içeren koyun kanlı TSA besiyerinin benzer şekilde florayı baskılayarak A, C, G grubu beta-hemolitik streptokokların ve *A.haemolyticum*'un üremelerini kolaylaştırdığı bildirilmiştir.

Yurt dışında yapılan çeşitli çalışmalarda *A.haemolyticum* sıklığı %0.5-3 olarak bildirilmiştir<sup>9,10</sup>. Ülkemizde ise 1531 tonsillofarenjitli olgunun incelendiği bir çalışmada 5 (%0.3) hastada *A.haemolyticum* izole edilmiştir<sup>11</sup>. Bizim çalışmamızda, ilkbahar/yaz dönemindeki beş aylık süre içinde tonsillofarenjitli çocuk hastaların boğaz kültürlerinde *A.haemolyticum* saptanma oranı %2 (7/355) olmuş ve suşların tümü 24 saat içinde insan kanlı agardan izole edilmiştir. Sonuç olarak, mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin boğaz kültürlerinin değerlendirilmesinde *A.haemolyticum*'um atlanmaması için, aynı veya farklı petrielerde koyun kanlı besiyeri ile beraber insan kanlı besiyerinin de kullanılmasının yararlı olacağı düşünülmüştür.

## KAYNAKLAR

1. Kılıç S. *Arcanobacterium haemolyticum*: Genel Özellikleri, infeksiyonları, laboratuvar tanı ve tedavisi. Türk Hij Den Biyol Derg 2000; 57(1): 39-54.
2. Değirmenci S, Güven F, Köksal F, Uygur N, Say A, Samastı M. Farenjit ve döküntü ile başvuran bir çocukta bakteriyel bir patojen: *Arcanobacterium haemolyticum*. ANKEM 2007; 21(2): 95-7.
3. Brenwald NP, Teare EL, Mountfort LK. Selective medium for isolating *Arcanobacterium haemolyticum*. J Clin Pathol 1990; 43(7): 610.
4. Volante M, Corina L, Contucci AM, Calò L, Artuso A. *Arcanobacterium haemolyticum*: two case reports. Acta Otorhinolaryngol Ital 2008; 28(3): 144-6.
5. Cummings LA, Wu WK, Larson AM. Effects of media, atmosphere, and incubation time on colonial morphology of *Arcanobacterium haemolyticum*. J Clin Microbiol 2010; 31(12): 3223-6.
6. García-de-la-Fuente C, Campo-Esquisabel AB, Unda F, Ruiz de Alegría C, Benito N, Martínez-Martínez L. Comparison of different culture media and growth conditions for recognition of *Arcanobacterium haemolyticum*. Diagn Microbiol Infect Dis 2008; 61(2): 232-4.
7. Wat LL, Fleming CA, Hodges DS, Krishnan C. Selective medium for isolation of *Arcanobacterium haemolyticum* and *Streptococcus pyogenes*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1991; 10(5): 443-6.

8. Mehta CL. *Arcanobacterium haemolyticum*. J Am Acad Dermatol 2003; 48(2): 298-9.
9. Linder R. Rhodococcus equi and *Arcanobacterium haemolyticum*: two "coryneform" bacteria increasingly recognized as agents of human infection. Emerg Infect Dis 1997; 3(2): 145-53.
10. Carlson P, Renkonen OV, Kontiainen S. *Arcanobacterium haemolyticum* and streptococcal pharyngitis. Scand J Infect Dis 1994; 26(3): 283-7.
11. Arikan S, Erguven S, Gunalp A. Isolation, in vitro anti-microbial susceptibility and penicillin tolerance of *Arcanobacterium haemolyticum* in a Turkish university hospital. Zentralbl Bakteriol 1997; 286(4): 487-93.