

Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında Nadir İzole Edilen Bir Etken: *Streptococcus uberis*

A Rarely Isolated Bacterium in Microbiology Laboratories: *Streptococcus uberis*

Canan ERYILDIZ¹, Şebnem BUKAVAZ¹, Şaban GÜRCAN¹, Osman HATİPOĞLU²

¹ Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne.

¹ Trakya University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Edirne, Turkey.

² Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Edirne.

² Trakya University Faculty of Medicine, Department of Chest Diseases, Edirne, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 27.09.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 07.12.2016

ÖZ

Streptococcus uberis, sığır mastitlerinin önemli bir kısmından sorumlu gram-pozitif bakteridir. Bakteri nadiren insan enfeksiyonları ile de ilişkili bulunmuştur. Konvansiyonel fenotipik yöntemler bakterinin tanımlamasında yetersiz olabilmekte ve mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakteri diğer streptokoklar ve enterokoklar ile karıştırılabilmektedir. Günümüzde, *S.uberis* izolatlarının doğru bir şekilde isimlendirilmesinde moleküler yöntemler önerilmektedir. Bu raporda *S.uberis*'in neden olduğu alt solunum yolu enfeksiyonu olgusu ve etkenin tanımlanmasında kullanılan mikrobiyolojik yöntemlerin sunulması amaçlanmıştır. Altmış altı yaşında akciğer yassı epitel hücreli kanser tanısı olan ve radyoterapi alan erkek hasta kontrol amaçlı hastanemize başvurmuştur. Çekilen akciğer grafisi sonrası "kaviter tümör, akciğer apsesi" ön tanılarıyla hastanemize yatırılmıştır. Yatışın ertesi günü alınan kan kültüründe üreme olmazken, balgam kültüründe hastanın oral lezyonlarına bağlı olduğu düşünülen *Candida albicans* üremesi saptanmıştır. Hastanın yatışından 2 hafta sonra hastada öksürük şikayeti olması ve oskültasyonda "tuber suflı" duyulması üzerine hastadan kültür için balgam örneği alınmıştır. Balgamın Gram boyama ile yapılan yayma mikroskopisinde bol lökosit ve gram-pozitif koklar görülmüş ve %5 koyun kanlı agar ve çikolata agarda *S.uberis* üremesi saptanmıştır. Bakteri tanımlaması ve antibiyotik duyarlılık testleri VITEK 2 (Biomerieux, Fransa) cihazında yapılmış ve matris ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) temelli VITEK MS cihazı ile yine *S.uberis* olarak tanımlanmıştır. İzolat ampicilin, eritromisin, klindamisin, levofloksasin, linezolid, penisilin, sefotaksim, seftriakson, tetrasiklin ve vankomisine duyarlı olarak bulunmuştur. 16S, 23S ribozomal RNA ve 16S-23S intergenik spacer gen bölgeleri özgül primerler ile çoğaltılmış ve parsiyel 16S rRNA polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ürünlerinin DNA dizi analizi 3500xL (Applied Biosystems, ABD) cihazı ile yapılmıştır. Parsiyel 16S rRNA gen dizileme sonucuna göre bakteri *S.uberis* olarak doğrulanmıştır. Sunulan olgu,

İletişim (Correspondence): Yrd. Doç. Dr. Canan Eryıldız, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 22100, Edirne, Türkiye.

Tel (Phone): +90 284 235 7641, E-posta (E-mail): cananeryildiz@gmail.com

bakteri tanımlamasının güncel mikrobiyolojik yöntemlerle yapılmış olması nedeniyle sınırlı sayıdaki insan enfeksiyonu raporlarına önemli katkı sağlamaktadır. *S.uberis*'in bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda klinik uyum varlığında fırsatçı bir patojen olabileceği düşünülmeli ve tanımlama için fenotipik bakteriyolojik yöntemlere ek olarak güncel diğer mikrobiyolojik yöntemlerden de yararlanılmalıdır.

Anahtar sözcükler: *Streptococcus uberis*; isimlendirme; alt solunum yolu enfeksiyonu.

ABSTRACT

Streptococcus uberis is a gram-positive bacterium that is mostly responsible for mastitis in cattle. The bacterium rarely has been associated with human infections. Conventional phenotypic methods can be inadequate for the identification of *S.uberis*; and in microbiology laboratories *S.uberis* is confused with the other streptococci and enterococci isolates. Recently, molecular methods are recommended for the accurate identification of *S.uberis* isolates. The aim of this report is to present a lower respiratory tract infection case caused by *S.uberis* and the microbiological methods for identification of this bacterium. A 66-year-old male patient with squamous cell lung cancer who received radiotherapy was admitted in our hospital for the control. According to the chest X-Ray, patient was hospitalized with the prediagnosis of "cavitary tumor, pulmonary abscess". In the first day of the hospitalization, blood and sputum cultures were drawn. Blood culture was negative, however, *Candida albicans* was isolated in the sputum culture and it was estimated to be due to oral lesions. After two weeks from the hospitalization, sputum sample was taken from the patient since he had abnormal respiratory sounds and cough complaint. In the Gram stained smear of the sputum there were abundant leucocytes and gram-positive cocci, and *S.uberis* was isolated in both 5% sheep blood and chocolate agar media. Bacterial identification and antibiotic susceptibility tests were performed by VITEK 2 (Biomérieux, France) and also, the bacterium was identified by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) based VITEK MS system as *S.uberis*. The isolate was determined susceptible to ampicillin, erythromycin, clindamycin, levofloxacin, linezolid, penicillin, cefotaxime, ceftriaxone, tetracycline and vancomycin. 16S, 23S ribosomal RNA and 16S-23S intergenic spacer gene regions were amplified with specific primers and partial DNA sequence analysis of 16S rRNA polymerase chain reaction (PCR) products were performed by 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). According to the partial 16S rRNA gene sequencing results, bacterium was confirmed as *S.uberis*. This report makes a significant contribution to the number of case reports of human infections caused by *S.uberis* as the identification was performed by current microbiological methods in our case. In conclusion, *S.uberis* should be evaluated as an opportunistic pathogen among the immunosuppressed patients and in addition to phenotypic bacteriological methods, the other recent microbiological methods should also be utilized for the identification.

Keywords: *Streptococcus uberis*; identification; lower respiratory tract infection.

GİRİŞ

Streptococcus uberis, Streptococcaceae ailesinde bulunan gram-pozitif bakteri olup sığırlarda kolonize olan önemli bir mastit etkenidir. Bakteri hayvanların ağız, tonsilla, mide, deri, genital ve solunum yoluna, meme başı ve kanallarına, feçes ve yaralara yerleşebilmektedir¹. *S.uberis* insanlarda periodontal dokularda da tanımlanmıştır². Bakteri birincil olarak hayvanlardan izole edilmekle birlikte, insanlarda da enfeksiyon etkeni olarak nadiren bildirilmiştir. Ancak klinik örneklerden izolasyon sıklığı tanımlamadaki kısıtlılıklardan dolayı henüz tam olarak bilinmemektedir^{3,4}. *S.uberis*'in isimlendirilmesi; bakterinin kültür ve morfolojik özellikleri, biyokimyasal testler ve enzim aktivitesinin

belirlenmesine dayanmaktadır. *S.uberis*'in diğer streptokoklar ve enterokoklardan ayırımı için çeşitli ticari sistemler de bulunmaktadır. *S.uberis* izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması ve çeşitli özelliklerinin belirlenmesi amacıyla günümüzde PCR temelli moleküler yöntemler kullanılmaktadır⁵. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında sık rastlanmayan ve konvansiyonel fenotipik yöntemlerle tanımlamanın yetersiz kalması nedeniyle, etkenlerin genotipik yöntemler gibi özgül diğer yöntemlerle de doğrulanması gerekmektedir⁶. Bu çalışmada, insan enfeksiyonlarından nadiren izole edilen *S.uberis* türünün neden olduğu alt solunum yolu enfeksiyonu olgusu ve etkenin doğrulanmasında kullanılan mikrobiyolojik yöntemler sunulmuştur.

OLGU SUNUMU

Altmış altı yaşında, tarım-hayvancılıkla uğraşan ve köyde yaşayan erkek hastaya hastanemize yatışından yaklaşık 1 ay öncesinde akciğer yassı epitel hücreli kanser tanısı konulmuştur. Beş gün öncesinde, radyoterapi sırasında gelişen solunum yetmezliği nedeniyle özel bir hastanenin yoğun bakım ünitesine yatışı yapılarak hastadan balgam kültürü numunesi alınmış, 4 gün sonra piperasilin-tazobaktam ve siprofloksasin tedavisi ile göğüs hastalıkları polikliniğine kontrole çağrılarak taburcu edilmiştir. Hastanemiz göğüs hastalıkları polikliniğine başvuran hasta, çekilen grafi sonrası "kaviter tümör, akciğer apsesi" ön tanılarıyla hastanemiz göğüs hastalıkları servisine yatırıldı. Beş gün önce alınan balgam kültüründe *Haemophilus influenzae* tip B üremesi saptanması üzerine piperasilin-tazobaktam ve siprofloksasin tedavisine devam edilerek tedavi 14 güne tamamlandı. Yatışın ertesi günü alınan kan kültüründe üreme olmazken balgam kültüründe yüksek lökosit ve epitel oranları ile birlikte *Candida albicans* üremesi saptandı. Maya üremesinin hastanın ağız lezyonlarına bağlı olduğu düşünülerek hastaya nistatin grubu oral solüsyon başlandı. Piperasilin-tazobaktam ve siprofloksasin tedavisinin kesilmesinden bir hafta sonra öksürük şikayeti başlayan hastanın oskültasyonunda akciğerde "tuber sufl" mevcuttu. Hastadan balgam kültürü için numune alınarak laboratuvara gönderildi ve hastaya ampirik olarak meropenem başlandı.

Balgam yaymasının Gram boyamasında; bol lökosit ve gram-pozitif kok görüldü. %5 koyun kanlı agar ve çikolata agara yapılan ekimlerde hakim bir gram-pozitif kok üremesi saptandı. Balgam kültüründe üreyen bakterinin tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri VITEK 2 (Biomerieux, Fransa) cihazında yapıldı. Bakteri *S.uberis* olarak tanımlandı. Antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo I'de gösterilmektedir. İzolatın, matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) yöntemiyle VITEK MS (Biomerieux, Fransa) cihazında yapılan tanımlama işlemi de aynı şekilde *S.uberis* olarak sonuçlandı. Daha sonra bakterinin DNA izolasyonu ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep izolasyon kiti (ZymoResearch, ABD) ile yapıldı ve ICycler (BioRad, ABD) ısısal döngü cihazında PCR işlemi uygulandı. PCR'de *S.uberis* için 16S ileri-CGCA TGACAATAGGGTACA, 16S geri-GCCTTTAACTTCAGACTTATCA; 23S ileri-CGTATTTAAATTGACTTTAGCC, 23S geri-AATTTCTCCGCTACCCAC; 16S-23S IS ileri-TAAGGAACACGTTGGTTAAG, 16S-23S IS geri-TCCAGTCCTTAGACCTTCT olmak üzere üç farklı bölgeyi hedef alan primerler ve *Enterococcus* spp. için 16S rRNA ileri-TACTGACAAACCATTTCATGATG, geri-AACTTCGTCACCAACGCGAAC primerleri kullanıldı^{7,8}.

PCR sonunda ürünler %1.5'lik agaroz jelde 100V'da 45 dakika süreyle yürütüldü. *S.uberis* için kullanılan üç farklı primer çifti ile sırasıyla yaklaşık 450 bp, 450 bp ve 330 bp büyüklüğünde PCR bantları görülürken *Enterococcus* spp.'ye özgü primerler kullanılarak yapılan PCR'de ise herhangi bir banda rastlanmadı. Ardından parsiyel 16S rRNA PCR ürünlerinin dizi analizi MedSanTek (İstanbul, Türkiye) firması tarafından 3500xL (Applied Biosystems, ABD) genetik analizör cihazıyla yapıldı. Sonuçlar DNA Dragon v1.6 ve Chromas Lite v2.0 programları kullanılarak değerlendirildi. Verilerin GenBank ve Avrupa Nükleotid Arşivi'ndeki diziler ile karşılaştırması sonucunda *S.uberis* ile uyumlu olduğu saptandı. *S.uberis* izole edilen balgam kültüründen dört gün sonra hastadan tekrar alınan balgam örneği laboratuvara gönderildi. Balgamın boyama sonucu yapılan mikroskopik incelemesinde, bol lökosit ve gram-negatif koklar görüldü. Kültürde *S.uberis* üremezken, meropenem dirençli *Acinetobacter baumannii* üredi. Hastada klinik olarak kötüleşme olmaması, kan lökosit ve C-reaktif protein değerlerinde düşüş saptanması üzerine antibiyotik tedavisinde değişiklik yapılmadı. Meropenem 16. günde kesilerek hasta taburcu edildi ve poliklinik takibine alındı.

TARTIŞMA

S.uberis sığırlarda kommensal olarak bulunabilen, aynı zamanda enfeksiyon yapabilme yeteneğine sahip bir bakteridir. Tüm dünyada sığır mastitlerinin en önemli etkenlerinden biridir^{1,9}. Ward ve arkadaşları¹ *S.uberis*'in çevre koşullarına adapte olabilen fırsatçı bir patojen olduğu yönünde çeşitli veriler sunmuştur. Bakteri esas olarak hayvan patojeni olmakla birlikte insanlarda da enfeksiyon yapabilmektedir. Ancak *S.uberis*'in tanımlanmasında kullanılan yöntemlerin sınırlı olması ve *Enterococcus* spp. ile ayrımının tam olarak yapılamaması nedeniyle bu bakterinin etken olduğu insan enfeksiyonlarının belirtilenden daha yüksek sayıda olduğu tahmin edilmektedir^{6,10}. Bakteri tanımlamasının çeşitli fenotipik mikrobiyolojik testler kullanılarak yapıldığı çalışmalarda *S.uberis*'in %6-8 oranında doğru olarak isimlendirilemediği tespit edilmiştir^{5,11}.

Tablo 1. VITEK-2 Cihazı ile Bulunan MİK Değerlerine göre *Streptococcus uberis*'in Antibiyotik Duyarlılıkları

Antibiyotik ismi	MİK (µg/ml)	Test sonucu
Ampisilin	≤ 0.25	Duyarlı
Eritromisin	≤ 0.12	Duyarlı
Klindamisin	≤ 0.25	Duyarlı
Levofloksasin	0.5	Duyarlı
Linezolid	≤ 2	Duyarlı
Penisilin	≤ 0.06	Duyarlı
Sefotaksim	≤ 0.12	Duyarlı
Seftriakson	≤ 0.12	Duyarlı
Tetrasiklin	≤ 0.25	Duyarlı
Vankomisin	0.5	Duyarlı

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu.

Sarkar ve arkadaşları¹² üç erişkin hastada akut komplike olmayan bakteriyel pnömoni etkeni olarak hastaların kanlarından izole ettikleri ve API 20S Streptococcus sistemini (Analytab Products) kullanarak tanımladıkları *S.uberis*'i bildirmişlerdir. Lazinska ve arkadaşları¹³ renal transplantasyon sonrası hastaların bakteriyolojik olarak idrar analizlerini yapmış ve bir olguda API 20 Strep System (bioMerieux, Fransa) sistemi kullanılarak *S.uberis* saptamıştır. Velez-Montaya ve arkadaşları¹⁴ 2010 yılında *S.uberis*'in etken olduğu ilk insan intraoküler enfeksiyonunu bildirmişlerdir. Ancak, bakteri tanımlama yönteminin belirtilmemiş olması nedeniyle tam olarak bu bakterinin gözü tutan bir patojen olarak tanımlanamayacağı düşünülmektedir¹⁰. Mao ve arkadaşlarının¹⁵ pnömoniye bağlı akut solunum sıkıntısı sendromlu böbrek transplantasyonu yapılmış hastaların solunum yolu örneklerinden izole edilen bakteriler ile ilgili geriye dönük olarak yaptığı çalışmada, VITEK-2 sistemi (bioMerieux, Fransa) ile yapılan tanımlama sonucunda bir hastada *S.uberis* saptanmıştır. Valentiny ve arkadaşları⁹ bir hemodiyaliz hastasında, düşme sonucu ayağında oluşan yaradan alınan sürüntü örneğinde ve kan kültüründe *Staphylococcus aureus* ve *S.uberis* üremesi tespit etmişler, amputasyon sonrası alınan derin sürüntü örneğinde de yine aynı bakterileri saptamışlardır. Bakteri tanımlamasında MALDI-TOF ve süperoksit dismutaz A gen dizileme yöntemlerini kullanmışlardır.

Sunduğumuz olguda bakteri tanımlaması için VITEK2 sistemi, PCR ve DNA dizi analizi yöntemleri kullanılmış ve her üç yöntemle de aynı sonuç elde edilmiştir. Güncel bakteriyolojik tekniklerle bakteri tanımlamasının yapılması açısından çalışmamız önem taşımaktadır. Akciğer neoplazmi olan ve radyoterapi alan hastanın solunum yolu örneğinde üretilen *S.uberis*'in etken olarak değerlendirilmesinde; klinik yakınma ve fizik muayene bulguları, köyde yaşam ve hayvancılık öyküsünün bulunmasının yanı sıra numunenin Gram boyamasında bol lökosit, gram-pozitif kok görülmesi de katkı sağlamaktadır. Bununla birlikte, *S.uberis*'in insan periodontal dokusunda bulunabilmesi nedeniyle bakterinin hastanın oral mikrobiyota üyesi olarak bulunduğu ya da fırsatçı bir enfeksiyona yol açtığı ayrımını net bir şekilde yapmak güçtür. Ancak, daha önceden bildirilen *S.uberis* enfeksiyonlarının çoğunda olduğu gibi sunduğumuz olguda da bağışıklık sistemini baskılayan bir durum söz konusudur. Bu durum, hastada fırsatçı bir enfeksiyon olabileceğini desteklemektedir.

Sonuç olarak, *S.uberis* bağışıklık sistemini baskılayıcı hastalığı olan ya da tedavi alan hastalarda klinik uyum varlığında alt solunum yolu enfeksiyonuna yol açabilen fırsatçı bir patojen olarak düşünülmeli ve tanımlama farklı mikrobiyolojik yöntemlerle doğrulanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Ward PN, Holden MT, Leigh JA, et al. Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. BMC Genomics 2009; 28: 10:54.
2. Haffajee AD, Socransky SS. Attachment level changes in destructive periodontal diseases. J Clin Periodontol 1986; 13(5): 461-75.
3. Zadoks RN, Gillespie BE, Barkema HW, Sampimon OC, Oliver SP, Schukken YH. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. Epidemiol Infect 2003; 130(2): 335-49.

4. Kocagöz S. Viridans streptokoklar, s: 2024-30. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (ed), Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2008, 3. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
5. Odierno L, Calvino L, Traversa P, Lasagno M, Bogni C, Reinoso E. Conventional identification of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis in Argentinean dairy herds. J Dairy Sci 2006; 89(10): 3886-90.
6. Di Domenico EG, Toma L, Prignano G, et al. Misidentification of *Streptococcus uberis* as a human pathogen: a case report and literature review. Int J Infect Dis 2015; 33: 79-81.
7. Hassan AA, Khan IU, Abdulmawjood A, Lammler C. Evaluation of PCR methods for rapid identification and differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. J Clin Microbiol 2001; 39(4):1618-21.
8. Haghighi Karsidani S, Soltani M, Nikbakhat-Brojeni G, Ghasemi M, Skall H. Molecular epidemiology of zoonotic streptococcosis/lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) aquaculture in Iran. Iran J Microbiol 2010; 2(4): 198-209.
9. Valentiny C, Dirschmid H, Lhotta K. *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* forefoot and blood stream co-infection in a haemodialysis patient: a case report. BMC Nephrol 2015; 16: 73.
10. Toma L, Di Domenico EG, Prignano G, Ensoli F. Comment on "Intravitreal ampicillin sodium for antibiotic-resistant endophthalmitis: *Streptococcus uberis* first human intraocular infection report". J Ophthalmol 2014; 2014: 395-480.
11. Raemy A, Meylan M, Casati S, et al. Phenotypic and genotypic identification of streptococci and related bacteria isolated from bovine intramammary infections. Acta Vet Scand 2013; 55: 53.
12. Sarkar TK, Murarka RS, Gilardi GL. Primary *Streptococcus viridans* pneumonia. Chest 1989; 96(4): 831-4.
13. Lazinska B, Cizek M, Rokosz A, Sawicka-Grzelak A, Paczek L, Luczak M. Bacteriological urinalysis in patients after renal transplantation. Pol J Microbiol 2005; 54(4): 317-21.
14. Velez-Montoya R, Rascón-Vargas D, Mieler WF, Fromow-Guerra J, Morales-Canton V. Intravitreal ampicillin sodium for antibiotic-resistant endophthalmitis: *Streptococcus uberis* first human intraocular infection report. J Ophthalmol 2010. doi: 10.1155/2010/169739.
15. Mao P, Wan QQ, Ye QF. Bacteria isolated from respiratory tract specimens of renal recipients with acute respiratory distress syndrome due to pneumonia: Epidemiology and susceptibility of the strains. Transplant Proc 2015; 47(10): 2865-9.