

Pseudoclavibacter spp.'nin Etken Olduğu Enfektif Endokardit Olgusu

A case of Infective Endocarditis Caused by *Pseudoclavibacter* species

Canan ERYILDIZ¹(ID), Habibe Tülin ELMASLAR MERT²(ID), Kıymet TABAKÇIOĞLU³(ID)

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, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Edirne.

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

³ Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Edirne

³ Trakya University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Edirne, Turkey.

Makale Atfı: Eryıldız C, Elmaslar Mert HT, Tabakçioğlu K. *Pseudoclavibacter* spp.'nin etken olduğu enfektif endokardit olgusu. *Mikrobiyol Bul* 2022;56(1):133-138.

ÖZ

Enfektif endokardit çoğunlukla stafilokok, streptokok ve enterokok gibi bakterilerin neden olduğu bir enfeksiyon hastalığıdır. Bu olgu raporunda *Pseudoclavibacter* cinsi bakterinin etken olarak değerlendirildiği bir enfektif endokardit olgusu sunulmuştur. Kilo kaybı, halsizlik ve bel ağrısı şikayetleri ile hastanemize başvuran ve dokuz yıl öncesinde geçirilmiş mitral kapak operasyonu öyküsü bulunan 66 yaşında kadın hastanın fizik muayenesinde 2/6 üfürüm saptanmıştır. Kan kültürü alınıp vankomisin (1 x 1 gr/gün, iv) ve gentamisin (3 x 80 mg/gün, iv) tedavisi başlanmıştır. Otomatize kan kültür cihazında (Bact/Alert, bioMérieux, Fransa) inkübasyonun ikinci gününde gram-pozitif basil üremesi saptanmıştır. Ateş yüksekliği devam eden hastada çekilen pozitron emisyon tomografisi/bilgisayarlı tomografide (PET/CT) mitral kapak lojunda fokal artmış tutulum enfektif endokardit lehine yorumlanmıştır. Cerrahi açıdan çok yüksek riskli olarak değerlendirilen hastanın vankomisin tedavisi 42 güne tamamlanarak taburcu edilmiştir. Bakteri isimlendirmesi için DNA izolasyonu ticari bir kit (Invitrogen PureLink Genomic DNA Mini Kit; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, ABD) ile yapılmış ve universal primerler 27F ve 1492R kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. PCR ürünlerinin dizi analizi ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı ve BigDye Terminator v3.1 Cycle dizileme kiti (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak yapılmıştır. İzolata ait 1366 baz çifti (bp) uzunluğundaki dizinin "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) programıyla GenBank'ta bulunan diziler ile karşılaştırılması sonucunda %99 oranında *Gulosibacter* spp. (Erişim No. LR884222, benzerlik; 1365/1366 bp) ve *Pseudoclavibacter* spp. (erişim no. FJ375951, benzerlik; 1364/1366 bp) ile uyumlu olduğu saptanmıştır. Oksidaz pozitif olan bakteriye ait nitrat redüksiyon testinin olumsuz sonuçlanması üzerine bakteri *Pseudoclavibacter* spp. olarak değerlendirilmiştir. Disk difüzyon yöntemiyle araştırılan linezolid duyarlı, klindamisin ve tetrasiklin dirençli, gradiyent şerit test yöntemiyle araştırılan penisilin [minimum inhibitör konsantrasyon (MİK)= 0.002 µg/ml], vankomisin (MİK= 0.25 µg/ml) ve rifampisin (MİK= 0.003 µg/ml) duyarlı, siprofloksasin (MİK= 0.25 µg/ml) ise artmış dozda duyarlı olarak bulunmuştur. *Pseudoclavibacter*, Microbacteriaceae ailesi üyesi olan sporsuz, hareketsiz ve katalaz pozitif

İletişim (Correspondence): Dr. Canan Eryıldız, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 22030, Edirne, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 (284) 235 76 41, **E-posta (E-mail):** cananeryildiz@gmail.com

aerobik gram-pozitif basil şeklinde bir mikroorganizmadır. *Pseudoclavibacter* türlerinin etken olarak tanımlandığı sınırlı sayıda olgu bildirilmiştir. Bu olgu raporunda, farklı zamanlarda alınan altı şişe kan kültüründe aynı etkenin üremiş olması ve PET-CT/PET-BT’de artmış fokal tutulumun endokardit lehine yorumlanması nedeniyle üreme gösteren gram-pozitif basil etken olarak kabul edilmiştir. Bildiğimiz kadarıyla sunulan olgu, *Pseudoclavibacter* kaynaklı ikinci enfektif endokardit olgusudur. Sonuç olarak, yapay kalp kapağı bulunan hastalarda klinik uyum varlığında gram-pozitif basillerin etken olabileceği göz ardı edilmemeli ve tanımlamada farklı mikrobiyolojik yöntemlerden yararlanılmalıdır.

Anahtar kelimeler: *Pseudoclavibacter*; enfektif endokardit; 16S rRNA gen dizileme.

ABSTRACT

Infective endocarditis is an infectious disease usually caused by bacteria, including streptococci, staphylococci, and enterococci. In this report, a case of infective endocarditis in which *Pseudoclavibacter* spp. detected as the causative agent was presented. A 66-year-old female patient was admitted to our hospital with weight loss, malaise, and lumbar pain. A 2/6 murmur was detected in the physical examination of the patient, who had a history of mitral valve surgery nine years earlier. Blood sample was collected for culture and vancomycin [1 g/24 hours, intravenously (IV)] and gentamicin (80 mg/8 hours, IV) therapy were started. Gram-positive bacilli were detected on the second day of incubation in the blood culture bottle incubated in the BacT/ALERT 3D microbial detection system (bioMerieux, France). High uptake in the focal area of the mitral valve on positron emission tomography-computerized tomography (PET-CT) was interpreted as infective endocarditis. The patient was considered to be at very high risk for surgery and she was discharged after the vancomycin treatment completed for 42 days. For bacterial identification, DNA was isolated using a commercial kit (Invitrogen PureLink Genomic DNA Mini Kit; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), and the 16S rRNA gene was amplified by a polymerase chain reaction (PCR) assay using universal primers 27F and 1492R. Sequence analysis of the PCR product was carried out on an Applied Biosystems 3730XL DNA Analyzer with an Applied Biosystems BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). A 1366 bp long sequence of the isolate was analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) in GenBank and the sequence was 99% compatible with *Gulosibacter* spp. (GenBank sequence ID: LR884222.1, identity 1365/1366 bp) and *Pseudoclavibacter* spp. (GenBank sequence ID: FJ375951.1, identity 1364/1366 bp). Upon the negative result of nitrate reduction test of bacterium that was oxidase-positive, the bacterium was considered as *Pseudoclavibacter* spp. Linezolid, clindamycin, and tetracycline susceptibilities were determined by using the disc diffusion method. The isolate was susceptible to linezolid and resistant to clindamycin and tetracycline. It was also susceptible to penicillin [minimum inhibitory concentration (MIC) = 0.002 µg/ml], vancomycin (MIC= 0.25 µg/ml), and rifampicin (MIC= 0.003 µg/ml) and was categorized as “susceptible, increased exposure” to ciprofloxacin (MIC= 0.25 µg/ml), as determined by using a gradient strip test. *Pseudoclavibacter* species are non-spore-forming, non-motile, catalase-positive, aerobic gram-positive bacilli belonging to the Microbacteriaceae family. A limited number of clinical cases due to *Pseudoclavibacter* species have been reported. In the present case, gram-positive bacilli were considered to be the causative agent of infective endocarditis because of the growth of the same bacteria in six bottles of blood cultures taken at different times and increased focal involvement on PET-CT. To our knowledge, this is the second reported case of infective endocarditis due to *Pseudoclavibacter* species. In conclusion, in cases of clinical compliance in patients with prosthetic heart valves, gram-positive bacilli should be considered causative agents of infective endocarditis and in such cases, a range of microbiological assays should be used for identification.

Keywords: *Pseudoclavibacter*; infective endocarditis; 16S rRNA gene sequencing.

GİRİŞ

Enfektif endokardit, kalbin endokardiyal yüzeyinin enfeksiyonu olup kalp kapakları, konjenital kardiyovasküler lezyonlar ve kalpteki prostetik materyalin tutulumu ile seyreden bir hastalıktır¹. Enfektif endokarditte etken, sıklıkla stafilokok, streptokok ve entero-

koklardır ancak daha düşük oranda olmakla birlikte diğer mikroorganizmalar da enfektif endokardite yol açabilmektedir. Etken mikroorganizmalar altta yatan hastalıklar, yapay kapak varlığı, enfeksiyon kaynağı gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir^{2,3}. Enfektif endokarditin klinik görünümü özgül olmayıp farklılık gösterebilmektedir. Nedeni bilinmeyen sepsis veya risk faktörlerinin varlığında ateşı olan hastalarda enfektif endokardit düşünölmelidir. Sepsisin belirtileri, mikrobiyal virölans ve konağın bağışıklık yanıtı gibi faktörlere bağlı olarak halsizlikten şoka kadar deđişebilmektedir⁴. Bu olgu raporunda gram-pozitif bir basil olan *Pseudoclavibacter*'in etken olarak değerlendirildiği bir enfektif endokardit olgusu sunulmuştur.

OLGU SUNUMU

Kilo kaybı, halsizlik ve bel ağrısı şikayetleriyle hastanemize başvuran 66 yaşında kadın hastanın öyküsünde dokuz yıl öncesinde geçirilmiş mitral kapak operasyonu bulunmaktaydı. On beş gün önce dış merkezde çekilen tüm vücut kemik sintigrafisi lomber spondilodiskit ile uyumlu bulunan hastanın fizik muayenesinde 2/6 üfürüm saptanması üzerine spondilodiskit ve enfektif endokardit ön tanılarıyla yatışı yapıldı. Hastanın laboratuvar tetkiklerinde lökosit sayısı 10.200/mm³ (referans aralığı= 3.980-10.040/mm³) ve C-reaktif protein (CRP) değeri 6.48 mg/dl (referans aralığı= 0-0.5 mg/dl) idi. İki şişe aerob kan kültürü alınıp vankomisin (1 x 1 gr/gün, iv) ve gentamisin (3 x 80 mg/gün, iv) tedavisi başlandı. Otomatize kan kültür cihazının (Bact/Alert, bioMérieux, Fransa) inkübasyonun ikinci gününde sinyal vermesi üzerine kan kültür şişesinden yayma hazırlanıp Gram boyama yapıldı ve korineform yapıda gram-pozitif basiller gözlemlendi. Kan kültür örneği %5 koyun kanlı ağara ekildi ve ertesi gün gram-pozitif basil üremesi saptandı. Tedavi altında ateş yüksekliği devam eden hastadan, yatışının üçüncü gününde alınan kan kültüründe de benzer üreme göröldü. Çekilen pozitron emisyon tomografisi/bilgisayarlı tomografide (PET-CT) mitral kapak lojunda fokal alanda artmış tutulum enfektif endokardit lehine yorumlandı. Cerrahi açıdan çok yüksek riskli olarak değerlendirilen hastanın vankomisin tedavisi 42 güne tamamlandı ve klinik tabloda düzelme olması üzerine hasta taburcu edildi.

Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) temelli VITEK MS, v3.2 (bioMérieux, Fransa) sistemi ile isimlendirilemeyen bakterinin ticari bir kit (Invitrogen PureLink Genomic DNA Mini Kit; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, ABD) ile DNA izolasyonu yapıldı. Üniversal primerler (27F; 5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' ve 1492R; 5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çođaltıldı⁵. PCR ürünleri ticari bir kit (PureLink PCR purification kit; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, ABD) ile üreticinin önerileri doğrultusunda saflaştırıldı. PCR ürünlerinin dizi analizi ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, ABD) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle dizileme kiti (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak yapıldı. Elde edilen kromatogram dosyaları ProSeq v2 ve BioEdit programlarıyla analiz edildi.

İzolata ait 1366 bp uzunluğundaki dizinin BLAST programı ile GenBank'ta bulunan diziler ile karşılaştırılması sonucunda %99 oranında *Gulosibacter* spp. (erişim no: LR884222, benzerlik; 1365/1366 bp) ve *Pseudoclavibacter* spp. (erişim no: FJ375951, benzerlik; 1364/1366 bp) ile uyumlu olduğu saptandı. Klinik izolata ait DNA dizisinin 935. nükleotiti adenin olarak belirlenirken bu pozisyona denk gelen nükleotitin her iki referans dizide de guanin olduğu görüldü. İzolata ait dizinin 1051. pozisyonunda guanin bulunurken FJ375951 dizisinde bu nükleotide karşılık gelen dizide R (adenin ya da guanin) olduğu görüldü. Oksidaz pozitif olan bakteriye ait nitrat redüksiyonu deneyinin olumsuz sonuçlanması üzerine bakteri *Pseudoclavibacter* spp. olarak değerlendirildi^{6,7}. Bakterinin antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek için disk difüzyon testi, Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)] kılavuzunda *Corynebacterium* türleri için belirtilen öneriler doğrultusunda yapıldı⁸. Gradyent şerit testi için ise üretici firma (bioMérieux, Fransa) önerilerine uyuldu. EUCAST eşik değerler tablosunda *Pseudoclavibacter* yer olmadığından *Corynebacterium* türlerine ait eşik değerlere göre antimikrobiyal duyarlılık testleri yorumlandı⁸. Buna göre disk difüzyon yöntemiyle izolat linezolid duyarlı, klindamisin ve tetrasiklin dirençli, gradyent şerit test yöntemiyle araştırılan penisilin (MİK= 0.002 µg/ml), vankomisin (MİK= 0.25 µg/ml) ve rifampisin (MİK= 0.003 µg/ml) duyarlı, siprofloksasin (MİK= 0.25 µg/ml) ise artmış dozda duyarlı olarak bulundu.

TARTIŞMA

Enfektif endokardit, tanı ve tedavisinde yaşanan güçlüklerin yanı sıra yüksek morbidite ve mortaliteye sahip olması nedeniyle önemli bir enfeksiyon hastalığıdır. Enfektif endokardite yol açan mikroorganizmaların tanımlanması, hastalığın tanısı ve uygun antimikrobiyal tedavinin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir³.

Pseudoclavibacter türleri, Microbacteriaceae ailesi üyesi olan gram-pozitif, sporsuz, hareketsiz ve katalaz pozitif, aerobik korineform basillerdir. *Pseudoclavibacter*, diğer bir Microbacteriaceae üyesi *Gulosibacter* ile filogenetik olarak yakın ilişkilidir^{6,9}. İzole ettiğimiz bakterinin 16S rRNA gen dizisi *Pseudoclavibacter* ve *Gulosibacter*'e benzer olarak bulunmuş ve tanımlamada biyokimyasal testlerden yararlanmıştı. Her iki cinse ait tanımlanan türlerin özellikleri incelendiğinde, *Gulosibacter* türlerinin nitrat redüksiyonunun pozitif, *Pseudoclavibacter* türlerinin ise negatif olduğu görülmüştür. Oksidaz reaksiyonunun ise *Gulosibacter*'de pozitif iken *Pseudoclavibacter*'de türlere göre değişkenlik gösterdiği ifade edilmektedir^{6,7,9}. Hastadan izole edilen oksidaz pozitif bakterinin nitrat redüksiyon testi negatif bulunmuş ve bakteri *Pseudoclavibacter* spp. olarak değerlendirilmiştir.

Pseudoclavibacter bitki ve toprak gibi çeşitli çevresel kaynaklardan izole edilmiştir⁹⁻¹³. *Pseudoclavibacter* türlerinin etken olarak tanımlandığı sınırlı sayıda olgu bildirilmiştir. Lemaitre ve arkadaşlarının¹⁴ cilt altı sürüntü örneğinden izole ettikleri bakterinin 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda %99 oranında *Pseudoclavibacter* spp. ile benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir (GenBank Erişim No. FJ375951). Diğer bir olguda ise kronik obs-

trüktif akciğer hastalığı olan bir hastanın kanından izole edilen bakteri yine 16S rRNA gen dizileme ile *Pseudoclavibacter bifida* olarak tanımlanmıştır¹⁵. Ayuthaya ve arkadaşları¹⁶ ise *Pseudoclavibacter*'e bağlı bir otitis media olgusu bildirmiştir. Pailhoriès ve arkadaşları, mitral kapak operasyonu öyküsü bulunan bir hastadan izole ettikleri bakteriyi 16S rRNA gen dizi analizi (GenBank erişim no: KJ662671) ile tanımlamış ve *Pseudoclavibacter* spp.'nin etken olduğu ilk endokardit olgusunu bildirmişlerdir¹⁷. Mages ve arkadaşları ise klinik örneklerde karşılaşılan *Arthrobacter* spp. ve *Arthrobacter* benzeri bakterilerin dağılımını araştırdıkları bir çalışmada¹⁸ aort kapağından izole edilen bir bakteriyi *Pseudoclavibacter* spp. olarak isimlendirmişlerdir (GenBank Erişim No: EU086820). Sunulan olguda üç farklı zamanda alınan ikişer şişe kan kültüründe aynı etkenin üremesi ve PET-CT'de artmış fokal tutulumun endokarditi işaret etmesi nedeniyle üreyen gram-pozitif basil etken olarak kabul edilmiştir. Bildiğimiz kadarıyla sunulan olgu, *Pseudoclavibacter* kaynaklı ikinci enfektif endokardit olgusudur. İzole edilen bakteri, rutin fenotipik yöntemlerle isimlendirilemediğinden 16S rRNA gen dizi analizi ve ek fenotipik testler yapılarak cins düzeyinde tanımlanmıştır. Sonuç olarak, yapay kalp kapağı bulunan hastalarda klinik uyum varlığında kan kültüründe üreyen gram-pozitif basillerin etken olabileceği göz ardı edilmemeli ve izolatan mikrobiyolojik olarak tanımlanmasında fenotipik ve moleküler mikrobiyolojik yöntemler birlikte kullanılmalıdır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Akova M, Çetinkaya Şardan Y. Enfektif endokardit, miyokardit, perikardit, pp: 1003-23. In: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2008, 3rd ed. Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul.
2. Cahill TJ, Baddour LM, Habib G, Hoen B, Salaun E, Pettersson GB, et al. Challenges in infective endocarditis. J Am Coll Cardiol 2017; 69(3): 325-44.
3. Şimşek Yavuz S. İnfektif endokardit: güncel bilgiler. Klimik Derg 2015; 28: 46-67.
4. Cahill TJ, Prendergast BD. Infective endocarditis. Lancet 2016; 387(10021): 882-93.
5. Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. pp: 115-75. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds). Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Wiley: New York, 1991.
6. Manaia CM, Nogales B, Weiss N, Nunes OC. *Gulosibacter molinativorax* gen. nov., sp. nov., a molinate-degrading bacterium, and classification of '*Brevibacterium helvolum*' DSM 20419 as *Pseudoclavibacter helvolum* gen. nov., sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2004; 54(3): 783-9.
7. Park MH, Traiwan J, Jung MY, Kim W. *Gulosibacter chungangensis* sp. nov., an actinomycete isolated from a marine sediment, and emended description of the genus *Gulosibacter*. Int J Syst Evol Microbiol 2012; 62(Pt 5):1055-60.
8. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, 2021.
9. Du J, Singh H, Yang JE, Shik Yin C, Kook M, Yu H, et al. *Pseudoclavibacter terrae* sp. nov. isolated from rhizosphere soil of *Ophiopogon japonicus*. Int J Syst Evol Microbiol 2015; 65(11): 4202-7.
10. Kim MK, Jung HY. *Pseudoclavibacter soli* sp. nov., a {beta}-glucosidase-producing bacterium. Int J Syst Evol Microbiol 2009; 59(Pt 4): 835-8.

11. Cho SL, Jung MY, Park MH, Chang YH, Yoon JH, Myung SC, et al. *Pseudoclavibacter chungangensis* sp. nov., isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010; 60(Pt 7): 1672-7.
12. Srinivasan S, Kim HS, Kim MK, Lee M. *Pseudoclavibacter caeni* sp. nov., isolated from sludge of a sewage disposal plant. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012; 62(Pt 4): 786-90.
13. Li YQ, Li L, Fu YS, Cui ZQ, Duan YQ, Salam N, et al. *Pseudoclavibacter endophyticus* sp. nov., isolated from roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66(3): 1287-92.
14. Lemaitre F, Stein A, Raoult D, Drancourt M. *Pseudoclavibacter*-like subcutaneous infection: a case report. *J Med Case Rep* 2011; 5: 468.
15. Oyaert M, De Baere T, Breyne J, De Laere E, Mariën S, Waets P, et al. First case of *Pseudoclavibacter bifida* bacteremia in an immunocompromised host with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J Clin Microbiol* 2013; 51(6): 1973-6.
16. Ayuthaya SIN, Leelaporn A, Kiratisin P, Oberdorfer P. *Pseudoclavibacter* otitis media in a 3-year-old boy with pulmonary and spinal tuberculosis. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(17): e709.
17. Pailhoriès H, Lemarié C, Quinqueneau C, Eveillard M, Baufreton C, Rouleau F, et al. First report of endocarditis caused by a *Pseudoclavibacter* species. *J Clin Microbiol* 2014; 52(9): 3465-7.
18. Mages IS, Frodl R, Bernard KA, Funke G. Identities of *Arthrobacter* spp. and *Arthrobacter*-like bacteria encountered in human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2008; 46(9): 2980-6.