

# BATTERIEMIE DA METHYLOBACTERIUM RADIOTOLERANS IN PAZIENTI EMODIALIZZATI

M. de Cal<sup>1</sup>, S. Cazzavillan<sup>2</sup>, D. Cruz<sup>1</sup>, F. Nalesso<sup>1</sup>, A. Brendolan<sup>1</sup>, M. Rasso<sup>3</sup>, C. Ronco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Ospedale San Bortolo, Vicenza

<sup>2</sup>Dipartimento di Anatomia Patologica, Ospedale San Bortolo, Vicenza

<sup>3</sup>Dipartimento di Microbiologia e Virologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza

## **Methylobacterium radiotolerans bacteremia in hemodialysis patients**

Central venous catheters (CVCs) play an important role in replacement therapy for patients with acute and chronic renal failure. Secondary infections due to central venous access are responsible for 48-73% of bacteremia in hemodialysis patients and are an important cause of morbidity and increased health costs for these patients. Episodes of unexplained fever were noted in hemodialysis patients in our center starting in October 2006. An investigation for causative microorganisms was conducted from October 2006 to April 2007. Bacterial DNA was extracted and amplified using universal primers for bacterial 16S. Amplification by multiple PCR was performed on the samples and the subsequent sequencing led to the identification of the microorganism of interest as belonging to *Methylobacterium radiotolerans*. We report the largest cluster of dialysis catheter-related bloodstream infections caused by *M. radiotolerans*, and describe the difficulties in the prompt and correct identification of these bacteria. Thirty-seven patients had positive cultures for *M. radiotolerans* from blood (2.7%) or CVC (29.7%) or both (67.6%). After removal and replacement of CVCs and antibiotic therapy and the strict application of an infection management protocol, there were no more fever episodes or cultures positive for *M. radiotolerans*. (*G Ital Nefrol* 2009; 26: 616-20)

Conflict of interest: None

### KEY WORDS:

Molecular biology, CVC, DNA, Haemodialysis patients, Infections, *Methylobacterium* spp.

### PAROLE CHIAVE:

Biologia molecolare, CVC, DNA, Emodializzati, Infezioni, *Methylobacterium* spp.

### ✉ Indirizzo degli Autori:

Dr. Massimo de Cal  
Dipartimento di Nefrologia, Dialisi e Trapianto  
Ospedale "San Bortolo"  
Via Rodolfi, 37  
36100 Vicenza  
e-mail: mamoo0@libero.it

## INTRODUZIONE

I cateteri venosi centrali (CVC) per emodialisi, sia tunnellizzati che non, svolgono un ruolo fondamentale nella terapia sostitutiva per i pazienti con insufficienza renale acuta e cronica (1).

Il posizionamento e la permanenza del CVC sono frequentemente gravate da complicanze infettive locali e sistemiche quali batteriemie e micosi. Queste costituiscono una delle maggiori cause di infezioni nosocomiali (2).

Infezioni correlate all'accesso venoso centrale, sono responsabili per il 48-73% delle batteriemie negli emodializzati (1) e rappresentano un'importante causa di morbilità e di aumento dei costi sanitari per questi pazienti (3).

La maggior parte delle colonizzazioni batteriche nei cateteri sono causate da cocchi Gram-positivi, con prevalenza relativa di stafilococchi coagulasi-negativi (4, 5), e sono dovute alla trasmissione da contatto e/o alla non conformità nell'esecuzione del protocollo da seguire per i trattamenti e/o per le manipolazioni e medicazioni del catetere. Oltre alle infezioni da Gram-positivi sono state riscontrate infezioni da batteri Gram-negativi nel 25-40% dei casi (5, 6) e circa la metà di queste riguardano batteri non fermentanti (3).

I criteri che definiscono un'infezione catetere-correlata sono:

- la presenza di colture positive nel sangue e/o nel CVC;
- la presenza di uno stato febbrile con brivido e tremori del paziente;

- l'assenza di altre fonti alternative di infezione basata su una valutazione clinica (7).

La formazione di biofilm microbico sulla superficie del biomateriale del dispositivo costituisce un elemento assai rilevante nel processo infettivo. I biofilm batterici possono, infatti, colonizzare qualsiasi superficie umida, come ad esempio i CVC (8, 9).

Occasionalmente questi aggregati batterici liberano singole cellule che si disperdono e si moltiplicano rapidamente colonizzando altri siti. I batteri inglobati nei biofilm sono estremamente resistenti anche ai trattamenti antibiotici.

## MATERIALI E METODI

L'investigazione epidemiologica è stata condotta su una serie di pazienti emodializzati nel periodo dall'Ottobre 2006 all'Aprile 2007 afferenti unicamente al nostro centro, sulla base del riscontro della presenza di sindromi febbrili.

Le colture da sangue o da catetere sono state effettuate in pazienti sintomatici e asintomatici durante il periodo di sorveglianza. Sono stati prelevati 10 mL di sangue da entrambi i lumi dei cateteri (venoso e arterioso) e da un sito venoso periferico.

Oltre ai campioni di sangue, sono stati inviati al laboratorio di Microbiologia i tamponi utilizzati per effettuare prelievi di materiale dal lume dei cateteri e i cateteri rimossi in condizioni asettiche.

Per eseguire le emocolture è stato utilizzato il sistema BacT/Alert 3D (BioMerieux SA, Marcy l'Etoile, Francia).

I centrifugati e i filtrati ottenuti sono stati seminati su più terreni, sia liquidi (BHI) che solidi (*Agar Sangue Columbia*, *Sabouraud*, *Schaedler*, *Mac Conkey* e *Agar Cioccolato*) a diverse gradazioni di temperatura (30 °C e 37 °C), in ambiente aerobio e anaerobio, e controllati giornalmente per un tempo superiore ad una settimana.

Le indagini microbiologiche nei CVC sono state effettuate mediante le tecniche di Maki (10) e di Cleri (11). La caratterizzazione biochimica dei microrganismi isolati è stata effettuata mediante l'utilizzo di gallerie identificative API 32C, API 20NE e API 32E (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francia). La valutazione della sensibilità agli antibiotici del microrganismo da identificare è stata effettuata con il metodo della diffusione da dischetto *Kirby-Bauer* (12) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Per individuare tutte le possibili origini dell'infezione sono state eseguite colture multiple ambientali.

L'acqua di dialisi è stata analizzata dal punto di vista microbiologico mediante filtrazione *standard* e ponendo la membrana in coltura, lasciando crescere su R2A agar a temperatura ambiente per 7 giorni.

La qualità delle acque viene routinamente valutata nel nostro centro mediante raccolta mensile di campioni e la possibile presenza di batteri e di endotossine nell'acqua vengono monitorati in base alle Linee Guida dell'*European Pharmacopoeia* (13) e della Società Italiana di Nefrologia (SIN).

Sono stati, inoltre, sottoposti ad indagini tutti gli strumenti e le attrezzature monouso utilizzati durante la sessione di dialisi e che venivano a contatto con i cateteri o con gli infermieri.

## INDAGINI BATTERIOLOGICHE MEDIANTE TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

Una volta accertata la presenza di microrganismi, il relativo DNA veniva estratto e amplificato.

Per amplificare il DNA di interesse sono stati impiegati:

- primer universali per il 16S batterico: 355F e 910R (che amplificano una regione di 540bp del gene 16S rRNA), 27F e 1492R (che amplificano il gene completo per rRNA) ed è stata utilizzata una coltura di *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA) come controllo positivo.

Il prodotto dell'amplificazione è stato estratto dal gel e purificato con *Wizard SV Gel e PCR Clean-up System* (Promega Corp., Madison, WI, USA) seguendo le istruzioni del produttore. I campioni sono stati sottoposti a sequenziamento utilizzando il kit *ABI Prism Big-Dye Terminator v1.1* (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA), con primer 910R per i batteri e ITS4 per i lieviti in un volume di reazione finale di 20 µL.

I prodotti delle reazioni sono stati purificati con colonne *Centri-Sep* (Princeton Separation, Inc., Adelphia, NJ, USA) per rimuovere le terminazioni in eccesso prima del sequenziamento automatico con l'analizzatore genetico *ABI Prism 310* (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA) con polimero POP-6.

La sequenza nucleotidica del 16S rRNA del campione isolato è stata allineata a sequenze simili utilizzando CLUSTAL W 1.81 (14).

Le sequenze 16S sono state ottenute attraverso le ricerche sul database GenBank NCBI con BLASTN (15).

## RISULTATI

All'inizio dell'indagine la percentuale di pazienti portatori di CVC su un totale di 92 dializzati era del 26.1%. Tale percentuale risultava più elevata del normale per problemi contingenti relativi alla tipologia della popolazione in quel momento trattata. I pazienti portatori di CVC, per trattamento dialitico, che presentavano episodi di febbre post-dialitica, sono stati sotto-

posti alle descritte indagini microbiologiche a partire dal periodo Ottobre-Novembre 2006.

Nell'arco di 10 giorni gli episodi febbrili si sono confermati e sono aumentati di numero interessando, durante il mese di Dicembre, 13 pazienti su 24 portatori di CVC.

In molti pazienti è stato notato che l'insorgenza della febbre si manifestava circa 2-3 ore dopo la seduta dialitica. Altri invece sviluppavano la febbre nella seconda metà della sessione di dialisi e, qualche ora dopo il trattamento dialitico, i pazienti non presentavano più febbre.

Tutti i pazienti sono stati ripetutamente sottoposti a controllo per emocolture pre- e post-dialitiche. I prelievi sono stati eseguiti dalla vena periferica e dalle due uscite del CVC come descritto. Per circa un mese, le colture eseguite in modo tradizionale sono risultate negative.

Alla fine di Dicembre nei campioni, incubati a 30 °C per una settimana su terreni solidi in *Sabouraud Dextrose agar*, si sono evidenziate delle piccole colonie rosa.

L'esame microscopico rivelava la presenza di bacilli Gram-negativi che, però, non si sviluppavano in coltura su terreno solido come di norma.

Le amplificazioni mediante PCR multiple mediante primer universali per il 16S batterico condotte sui campioni hanno portato all'amplificazione del DNA del microorganismo.

Il prodotto dell'amplificazione è stato sottoposto a sequenziamento e la sequenza nucleotidica del 16S rRNA del campione isolato è stata allineata a sequenze simili utilizzando CLUSTAL W 1.81. Al microorganismo ignoto è stata assegnata la sigla OSB1.

Questa sequenza corrispondeva per il 99.8% alla sequenza 16S del *Methylobacterium radiotolerans* DSM1819 (AB175640).

È stata quindi possibile l'identificazione del microorganismo, responsabile dell'infezione dei cateteri nei pazienti emodializzati, come appartenente a *M. radiotolerans*.

La caratterizzazione biochimica dei microrganismi isolati mediante l'utilizzo di gallerie identificative API 20NE non ha portato a un risultato certo a causa della lenta crescita del microorganismo.

È stata determinata in tutti gli stipiti di *M. radiotolerans* isolati la suscettibilità agli antibiotici con il metodo Kirby-Bauer; i ceppi di *M. radiotolerans* sono risultati resistenti alla gentamicina, al trimetoprim/sulfametossazolo, all'ampicillina e al meropenem e sensibili invece alla piperacillina/tazobactam, all'amikacina, all'imipenem e alla ciprofloxacina.

Nel corso dell'epidemia (periodo di osservazione Ottobre 2006-Febbraio 2007) tutti i 37 pazienti con CVC (31 tunnellizzati e 6 non tunnellizzati), utilizzati almeno una volta per il trattamento dialitico, hanno

presentato colture positive per *M. radiotolerans* o a partire dal sangue (2.7%) o dal CVC (29.7%) o da entrambi (67.6%).

Si trattava di 15 pazienti femmine (41%) e 22 maschi (59%) con età media di 59.3 anni (26-88).

Tutti i cateteri sono stati sostituiti e ad 8 pazienti è stato sostituito il catetere più di una volta per la presenza di colture positive successive alla sostituzione. Sette pazienti, pur avendo colture da sangue e da CVC positive per *M. radiotolerans*, non hanno mai presentato episodi febbrili.

Non è stato inoltre riscontrato alcun legame tra paziente-postazione dialisi, né tra paziente-infermerie, né paziente-macchina da dialisi.

Va tuttavia rilevato che positività per *M. radiotolerans* sono state trovate sui segmenti di tubo che collegano la rete idrica con le apparecchiature. Probabilmente, l'acqua ultrapura utilizzata nei processi dialitici non era del tutto sterile e ha causato la colonizzazione da parte di *M. radiotolerans* non solo nelle apparecchiature da dialisi ma anche nei CVC dei pazienti.

Dopo la rimozione e sostituzione del catetere e la terapia antibiotica mediante ciprofloxacina e la rigorosa applicazione di un protocollo per la gestione dell'epidemia, non si sono più verificati episodi febbrili né colture positive per *M. radiotolerans*.

## DISCUSSIONE

Il genere *Methylobacterium* (Mhb) comprende un gruppo di bastoncini Gram-negativi, aerobi obbligati (16, 17).

Le specie di *Methylobacterium* appartengono alla sottoclasse Alfa-2 dei proteobatteri, con specie diverse che cambiano continuamente tassonomia. Attualmente a questo gruppo appartengono circa 24 specie, la maggior parte delle quali descritte solo negli ultimi 10 anni, ma molte sono ancora designate come gruppo di coccoidi rosa e alcuni laboratori identificano *Methylobacterium spp.* solo a livello del genere.

Molti ceppi di *Methylobacterium* presentano resistenze alle sostanze tossiche, tra le quali i detergenti (18) e i disinfettanti (19, 20). Alcuni, isolati dai sistemi idrici degli ospedali, hanno mostrato un'alta resistenza al cloro (21).

La propensione a formare biofilm permette a *Methylobacterium spp.* di creare delle nicchie ecologiche nei sistemi trattamento acque da dialisi e nelle apparecchiature mediche.

Ad oggi sono stati descritti in letteratura 36 casi di infezioni da *Methylobacterium spp.*, di cui 29 esaminati e riportati da Sanders (22), e 7 da altri Autori (23-25).

I cateteri venosi centrali erano responsabili delle infe-

zioni da *Methylobacterium spp.* in 6 dei 36 casi (23), e solamente un caso dei 36 riguardava l'infezione di un catetere per l'emodialisi (25).

Nel nostro centro, dopo la rimozione e sostituzione del catetere e la terapia antibiotica non si sono più verificati episodi febbrili né colture positive per *M. radiotolerans*.

Le infezioni da *Methylobacterium spp.* mostrano in genere un esordio sub-acuto e un decorso naturale, e la rimozione del catetere è spesso sufficiente per controllare l'infezione (23).

Questo dato è in linea con i nostri risultati, anche se il ruolo degli antibiotici, somministrati durante l'epidemia, non è del tutto chiaro.

Nel nostro studio i ceppi di *M. radiotolerans* sono risultati resistenti alla gentamicina, al trimetoprim/sulfametossazolo, all'ampicillina e al meropenem e sensibili invece alla piperacillina/tazobactam, all'amikacina, all'imipenem e alla ciprofloxacina.

Una valutazione comparativa tra le recenti pubblicazioni e i risultati da noi ottenuti ha confermato la resistenza al trimetoprim-sulfametossazolo (23, 24) e al meropenem e la sensibilità all'imipenem; la discordanza nella suscettibilità ai carbapenemici è tipica per *Methylobacterium spp.* e viene proposta nell'identificazione fenotipica preliminare (26).

Gli stipiti di *M. radiotolerans* da noi isolati si sono dimostrati resistenti alla gentamicina e tale risultato non era stato ancora descritto in letteratura.

Nonostante le apparecchiature più efficienti introdotte di recente, la completa rimozione di microrganismi dai circuiti dell'acqua di dialisi risulta comunque assai difficile da ottenersi.

Contrariamente ai contaminanti chimici, infatti, la rimozione di batteri e di endotossine dal sistema del trattamento acque non è in grado di garantire la costante purezza delle acque nel circuito di dialisi. L'acqua ultrapura utilizzata nei processi dialitici, quindi, non può essere considerata sterile. Per questo motivo viene richiesto un alto livello di sorveglianza per monitorare le concentrazioni batteriche e i livelli di endotossine presenti nelle acque.

## CONCLUSIONI

Questo studio descrive per la prima volta un'infezione dei CVC in pazienti emodializzati dovuta a *M. radiotolerans*, e le difficoltà riscontrate nella corretta e precisa identificazione di questi batteri.

La contaminazione nei circuiti dell'acqua dell'Unità di Emodialisi prima, e la successiva contaminazione dei CVC dei pazienti, sembra essere stata la causa più probabile.

Per i pazienti emodializzati, ai quali sia stato ap-

plicato un CVC, diventa di fondamentale importanza una regolare e più specifica sorveglianza, mediante indagini microbiologiche, della flora presente nei circuiti delle acque di dialisi.

Le indagini diagnostiche "tradizionali", come le indagini sierologiche o colturali, rivestono ancora un importante ruolo nella pratica clinica, ma vengono sempre più affiancate da tecniche molecolari in quanto l'identificazione precisa di un microrganismo nella microbiologia clinica è fondamentale per l'impostazione di una corretta terapia e nel monitoraggio dell'infezione.

Tutti i batteri e i funghi possiedono, infatti, una specifica copia genetica per rRNA, che presenta sequenze conservate, e che può essere usata per l'identificazione e la tassonomia.

Sequenziamenti parziali del gene per rRNA vengono infatti sempre più utilizzati in clinica per l'identificazione microbica e sono particolarmente utili nei pazienti immunocompromessi o nei casi in cui l'identificazione o la risposta agli antibiotici siano in contraddizione con i dati clinici.

## RIASSUNTO

*I cateteri venosi centrali (CVC) svolgono un ruolo fondamentale nella terapia sostitutiva per i pazienti con insufficienza renale acuta e cronica. Infezioni correlate all'accesso venoso centrale sono responsabili per il 48-73% delle batteriemie negli emodializzati e rappresentano un'importante causa di morbilità e di aumento dei costi sanitari per questi pazienti. Nel periodo dall'Ottobre 2006 all'Aprile 2007, è stata condotta un'indagine epidemiologica su una serie di pazienti emodializzati, afferenti al nostro centro, che presentavano sindromi febbrili. Accertata la presenza di microrganismi, è stato estratto e amplificato il relativo DNA mediante PCR multiple con primer universali per il 16S batterico; i successivi sequenziamenti hanno portato all'identificazione del microrganismo come appartenente a *Methylobacterium radiotolerans*. In questo studio viene descritta un'infezione dei CVC sia tunnelizzati che non tunnelizzati in 37 pazienti emodializzati dovuta a *M. radiotolerans*. Nel corso dell'epidemia i pazienti hanno presentato colture positive per *M. radiotolerans* o a partire dal sangue (2.7%) o dal CVC (29.7%) o da entrambi (67.6%). Dopo rimozione e sostituzione del catetere, terapia antibiotica e la rigorosa applicazione di un protocollo per la gestione dell'epidemia, non si sono più verificati episodi febbrili né colture positive per *M. radiotolerans*.*

## DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

## BIBLIOGRAFIA

1. Nassar GM, Ayus JC. Infectious complications of the hemodialysis access. *Kidney Int* 2001; 60: 1-13.
2. Degl'Innocenti L, Belli CMC, Bocchetti M, et al. Esperienze sulle setticemie da batteri Gram positivi e miceti correlate all'uso di cateteri endovascolari. *Il Patologo clinico* 2004; 9: 318-20.
3. Katneni R, Hedayati SS. Central venous catheter-related bacteremia in chronic hemodialysis patients: epidemiology and evidence-based management. *Nat Clin Pract Nephrol* 2007; 3: 256-66.
4. Marr KA. Staphylococcus aureus bacteremia in patients undergoing hemodialysis. *Semin Dial* 2000; 13: 23-9.
5. Saxena AK, Panhotra BR, Al-Mulhim AS. Vascular access related infections in hemodialysis patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2005; 16: 46-71.
6. Allon M. Current management of vascular access. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 786-800. Epub 2007 May 30.
7. Castagnola E, Garaventa A, Viscoli C, et al. Changing pattern of pathogens causing broviac catheter-related bacteraemias in children with cancer. *J Hosp Infect* 1995; 29: 129-33.
8. Diskin CJ, Stokes TJ, Dansby LM, Radcliff L, Carter TB. Is systemic heparin a risk factor for catheter-related sepsis in dialysis patients? An evaluation of various biofilm and traditional risk factors. *Nephron Clin Pract* 2007; 107: c128-32. Epub 2007 Oct 22.
9. Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* 2006; 6: 979-86.
10. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter related infections. *N Engl J Med* 1977; 296: 1305-9.
11. Cleri DJ, Corrado ML, Seligman SJ. Quantitative culture of intravenous catheters and other intravascular inserts. *J Infect Dis* 1980; 141: 781-6.
12. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45: 493-6.
13. European Pharmacopoeia, edition 2002.
14. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4673-80.
15. [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast)
16. Gallego V, García MT, Ventosa A. *Methylobacterium variabile* sp. nov., a methylotrophic bacterium isolated from an aquatic environment. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005; 55: 1429-33.
17. Gallego V, García MT, Ventosa A. *Methylobacterium hispanicum* sp. nov., and *Methylobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from drinking water. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005; 55: 281-7.
18. De Marco P, Pacheco CC, Figueiredo AR, Moradas-Ferreira P. Novel pollutant-resistant methylotrophic bacteria for use in bioremediation. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 234: 75-80.
19. Bore E, Langsrud S. Characterization of micro-organisms isolated from dairy industry after cleaning and fogging disinfection with alkyl amine and peracetic acid. *J Appl Microbiol* 2005; 98: 96-105.
20. Flournoy DJ, Petrone RL, Voith DW. A pseudo-outbreak of *Methylobacterium mesophilica* isolated from patients undergoing bronchoscopy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 240-3.
21. Hiraishi A, Furuhashi K, Matsumoto A, Koike KA, Fukuyama M, Tabuchi K. Phenotypic and genetic diversity of chlorine-resistant *Methylobacterium* strains isolated from various environments. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 2099-107.
22. Sanders JW, Martin JW, Hooke M, Hooke J. *Methylobacterium mesophylicum* infection: case report and literature review of an unusual opportunistic pathogen. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 936-8.
23. Lee CH, Tang YF, Liu JW. Underdiagnosis of urinary tract infection caused by *Methylobacterium* species with current standard processing of urine culture and its clinical implications. *J Med Microbiol* 2004; 53: 755-9.
24. Engler C, Norton R. Recurrent *Methylobacterium mesophilicum* sepsis associated with haemodialysis. *Pathology* 2001; 33: 536-7.
25. Hornei B, Luneberg E, Schmidt-Rotte H, et al. Systemic infection of an immunocompromised patient with *Methylobacterium zatmanii*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 248-50.
26. Zaharatos GJ, Dascal A, Miller MA. Discordant carbapenem susceptibility in *Methylobacterium* species and its application as a method for phenotypic identification. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2037-8.