



INFORME BREVE

Bacteriemia por *Anaerobiospirillum thomasi* con desenlace fatal



Edgardo R. Streitenberger^{a,*}, Claudio M. Chavez^b, Mabel S. Rizzo^c y Ariel I. Suarez^a

^a Departamento de Biología Molecular, IACA Laboratorios, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina

^b Departamento de Microbiología, IACA Laboratorios, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina

^c Departamento de Microbiología, Hospital Interzonal Dr. José Penna, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina

Recibido el 19 de junio de 2015; aceptado el 24 de julio de 2015

Disponible en Internet el 1 de diciembre de 2015

PALABRAS CLAVE

Anaerobiospirillum thomasi;
ARN ribosomal 16S;
Bacteriemia

KEYWORDS

Anaerobiospirillum thomasi;
16S ribosomal RNA;
Bacteremia

Resumen *Anaerobiospirillum thomasi* ha sido descrito como causante de diarrea en humanos, pero no se han informado bacteriemias asociadas a este organismo. En esta comunicación describimos el primer aislamiento de *A. thomasi* como causa de bacteriemia fatal en una paciente alcohólica.

© 2015 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Anaerobiospirillum thomasi bacteremia with fatal outcome

Abstract *Anaerobiospirillum thomasi* has been reported as a causative agent of diarrhea in humans; however no bacteremia associated with this pathogen has been described so far. We present here the first case of fatal *A. thomasi* bacteremia in an alcoholic patient.

© 2015 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

El género *Anaerobiospirillum* consiste en un grupo de bacilos gram negativos anaerobios espiralados, que comúnmente forma parte de la microbiota habitual intestinal de gatos, perros y humanos^{3,7}. En 1976, Davis *et al.*¹ aíslan por primera vez al microorganismo conocido como *Anaerobiospirillum*

succiniciproducens, hasta ese momento el único miembro del género *Anaerobiospirillum*. En 1997, Malnick⁸ propone *Anaerobiospirillum thomasi* como un nueva especie dentro de este género. Ocasionalmente, estos bacilos pueden infectar a humanos. En una revisión bibliográfica se encontraron 56 casos de infección en humanos⁵. Ambas especies fueron aisladas en materia fecal de pacientes con diarrea^{4,7}.

A. succiniciproducens ha sido descrito como agente causal de bacteriemias, generalmente en pacientes con algún

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: bmolecular@iaca.com.ar (E.R. Streitenberger).

grado de inmunodepresión^{5,9-11}. No existen casos descritos de bacteriemias por *A. thomasii*.

Se presenta el caso de una paciente de sexo femenino de 54 años, con antecedentes de enolismo de 30 años de evolución, fumadora, con internaciones previas por síndrome ascítico edematoso y poca adherencia al tratamiento. La paciente refirió haber comenzado 2 semanas antes de la consulta con aumento del perímetro abdominal, astenia, anorexia y somnolencia. Debido a una mala evolución se decidió la internación. A la admisión, la paciente se presentó afebril, con hipotensión, desorientación, abdomen globoso y depresible, y abundante catarsis diarreica. El examen de sangre mostró valores de urea, creatinina y electrolitos normales, hiperbilirrubinemia (6,7 mg%), hipoalbuminemia (23 g/l) e hiperamonemia (230 µg%), hematocrito 27%, hemoglobina 8,7 g/dl, recuento de blancos 17 000 por mm³, con 88% de neutrófilos, velocidad de sedimentación globular de 50 mm/h. Se tomaron 2 muestras de hemocultivo en frascos BacT/Alert FA (FAN Aerobic) y BacT/Alert FN (FAN Anaerobic) de bioMérieux antes del inicio del tratamiento con ampicilina sulbactam 1,5g/6h. La paciente continuó con mala evolución y falleció al cuarto día de internación.

Se detectó crecimiento bacteriano en las botellas anaeróbicas al segundo día de incubación usando el sistema de detección de microorganismos BacT/ALERT® 3D60 (bioMérieux). La coloración de Gram mostró la presencia de bacilos gram negativos con forma espiralada. El organismo se subcultivó en agar sangre y agar chocolate incubados a 35 °C en 5% de CO₂, y en agar Brucella suplementado con vitamina K y hemina, incubado a 35 °C en condiciones anaeróbicas (cámara AnaeroPouch System con generador AnaeroPouch-Anaero, Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.). Todos los subcultivos fueron negativos después de 10 días de incubación, por lo que se decidió realizar la identificación molecular de la bacteria por secuenciación del gen del ARN ribosomal 16S a partir de los frascos originales de FAN Anaerobic.

Se procedió a la extracción de ADN directamente a partir de la botella de hemocultivo. Se tomaron 400 µl de cada uno

de los frascos anaeróbicos. El ADN se purificó utilizando un sistema automatizado MagnaPure Compact (Roche), con un volumen final de elución de 50 µl.

El gen del ARNr 16S se amplificó mediante el empleo de los *primers* universales 16S *forward primer* y DG74 *reverse primer*, previamente descritos^{2,6}. El producto obtenido fue de aproximadamente 1200 pb, cubriendo desde la región variable V3 a la V9. La PCR se realizó en un termociclador Veriti (Applied Biosystems) usando los siguientes parámetros de ciclado: 95 °C 15 min, 30 ciclos de 94 °C 30 s, 55 °C 30 s y 72 °C 1 min, y una extensión final de 72 °C por 10 min. La amplificación se llevó a cabo usando el HotStarTaq Plus Master Mix Kit (QIAGEN), con una concentración final de la *master mix* de 1 ×, 0,5-5 ng de ADN y 0,5 µM de cada uno de los *primers*, en un volumen final de 25 µl.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% (Agarosa LE grado analítico, Promega) y las bandas se visualizaron al UV por tinción con bromuro de etidio.

Finalmente, los productos fueron purificados con el Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) y cuantificados con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

El producto de PCR purificado se secuenció en ambos sentidos usando el kit BigDye Terminator V1.1 de Applied Biosystem en un volumen final de 20 µl, con una dilución de la *master mix* de 0,125 ×, 1 µM del *primer* 16S y DG74 y 15 ng de producto de PCR. Los parámetros de ciclado fueron: 96 °C 1 min, 30 ciclos de 96 °C 10 s, 50 °C 5 s y 60 °C 4 min. Los productos de secuenciación se corrieron en un secuenciador automático ABI 3500 de Applied Biosystem y se analizaron mediante el programa Sequencing Analysis v5.4.

La secuencia obtenida (1130 nucleótidos) se comparó con secuencias conocidas de ARNr 16S contenidas en la base de datos GenBank, con el fin de identificar al microorganismo. Posteriormente, se construyó un árbol filogenético mediante el uso del programa Mega v5.05. Las secuencias se alinearon con Clustal W, se construyó el árbol mediante el algoritmo de Neighbor-Joining con un número de réplicas de 1000 empleando *Bacillus subtilis* como grupo externo.

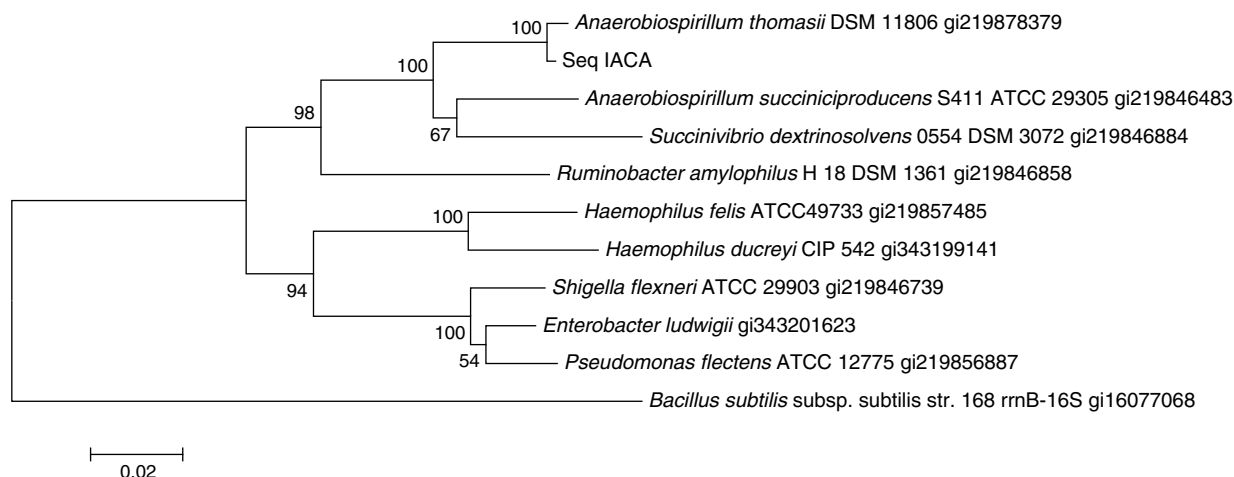


Figura 1 Dendrograma que muestra la relación filogenética entre la cepa hallada y un grupo de especies relacionadas. Seq IACA (cepa hallada). La línea inferior indica las distancias genéticas. La escala representa un 2% de sustitución nucleotídica esperada por sitio. A la derecha de cada microorganismo se indica el número de acceso GenBank de cada secuencia utilizada para construir este dendrograma.

La comparación de la secuencia obtenida con secuencias de referencia depositadas en la base de datos GenBank mostró un 99% de identidad (1121 concordancias sobre 1130 bases comparadas) entre el microorganismo hallado y *A. thomasi* cepa DSM 11806 y un 94% de similitud (1058 de 1130 comparaciones) con *A. succiniciproducens* cepa S411.

En la [figura 1](#) puede observarse la relación filogenética existente entre la cepa aislada y las 2 especies que forman parte del género *Anaerobiospirillum*. Como se aprecia, el microorganismo hallado forma un *cluster* con *A. thomasi*, con un valor de *bootstrap* de 100%, mientras que *A. succiniciproducens* se encuentra en un *cluster* diferente. De acuerdo con los criterios de interpretación propuestos por el *Clinical and Laboratory Standard Institute*¹², la secuenciación parcial del gen del ARNr 16S es una herramienta efectiva para la identificación de microorganismos anaerobios gram negativos. Estas guías establecen que la obtención de un porcentaje de similitud $\geq 99\%$ con más de un 0,8% de separación entre especies permite informar con seguridad género y especie. La cepa secuenciada mostró un 99% similitud con *A. thomasi* y un 5% de separación con *A. succiniciproducens*, la otra especie del género.

La abundante catarsis diarreaica presentada por la paciente y los signos y síntomas de infección gastrointestinal que acompañaron a la bacteriemia indican que el portal primario de entrada de esta bacteria fue el tracto gastrointestinal⁹. Por otro lado, la condición subyacente de alcoholismo crónico ha sido descrita como un factor que predispone al desarrollo de bacteriemia por este género⁸. En el paciente estudiado, el pobre estado nutricional, la disrupción de la integridad de la mucosa gastrointestinal y la ascitis podrían haber sido importantes mecanismos que facilitaron la infección. No hay publicados estudios de sensibilidad a antibióticos por tratarse de una infección poco común, por lo que aún no se ha establecido una terapia óptima.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Davis CP, Cleven D, Brown J, Balish E. *Anaerobiospirillum*, a new genus of spiral-shaped bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1976;26:498–504.
2. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*. 1994;32:335–51.
3. Hippe H, Hagelstein A, Kramer I, Swiderski J, Stackebrandt E. Phylogenetic analysis of *Formivibrio citricus*, *Propionivibrio dicarboxylicus*, *Anaerobiospirillum thomasi*, *Succinimonas amylolytica* and *Succinivibrio dextrinosolvens* and proposal of *Succinivibrionaceae* fam. *Int J Syst Bacteriol*. 1999;49:779–82.
4. Kelesidis T, Bard JD, Humphries R, Ward K, Lewinski M, Uslam DZ. First report of treatment of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* bloodstream infection with levofloxacin. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1970–3.
5. Kelesidis T. Bloodstream infection with *Anaerobiospirillum succiniciproducens*: A potentially lethal infection. *South Med J*. 2011;104:205–14.
6. Kommedal O, Kvella K, Skjastad R, Langeland N, Wiker HG. Direct 16S rRNA gene sequencing from clinical specimens, with special focus on polybacterial samples and interpretation of mixed DNA chromatograms. *J Clin Microbiol*. 2009;47:3562–3568.
7. Malnick H, Williams K, Ebosie JP, Levy AS. Description of a medium for isolating *Anaerobiospirillum* spp., a possible cause of zoonotic disease, from diarrheal feces and blood of humans and use of the medium in a survey of human, canine, and feline feces. *J Clin Microbiol*. 1990;28:1380–4.
8. Malnick H. *Anaerobiospirillum thomasi* sp. nov., an anaerobic spiral bacterium isolated from the feces of cats and dogs and from diarrheal feces of humans, and emendation of the genus *Anaerobiospirillum*. *Int J Syst Bacteriol*. 1997;47:381–4.
9. Pienaar C, Kruger AJ, Venter EC, Pitout JDD. *Anaerobiospirillum succiniciproducens* bacteraemia. *J Clin Pathol*. 2003;56:316–8.
10. Secchi C, Cantarelli VV, de Souza Pereira F, Chaer Wolf HH, Zenobini Brodt TC, Amaro MCO, Inamine E. Fatal bacteremia due to *Anaerobiospirillum succiniciproducens*: First description in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2005;9:169–72.
11. Tee W, Korman TM, Waters MJ, Macphee A, Jenney A, Joyce L, Dyal-Smith ML. Three cases of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* bacteriemia confirmed by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol*. 1998;36:1209–13.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Interpretative criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing: 2008, MM18-A Vol. 18 No 12. Wayne, PA. EE. UU.