



INFORME BREVE

Infecciones mamarias por *Corynebacterium kroppenstedtii*: comunicación de 4 casos



Nahuel Sanchez Eluchans^a, Claudia Barberis^a, Rosana Cittadini^b,
Ana María Ozuna Villca^b, María Florencia Veiga^a, Viviana Vilches^c, Carlos Vay^{a,b}
y Marisa Almuzara^{a,*}

^a Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Laboratorio de Bacteriología, Catedra de Microbiología Clínica, Hospital de Clínicas José de San Martín, Buenos Aires, Argentina

^b Laboratorio de Bacteriología Sanatorio Mater Dei, Buenos Aires, Argentina

^c Laboratorio de Bacteriología, Hospital Austral, Buenos Aires, Argentina

Recibido el 4 de septiembre de 2020; aceptado el 4 de enero de 2021

Disponible en Internet el 21 de febrero de 2021

PALABRAS CLAVE

Corynebacterium kroppenstedtii;
Infecciones
mamarias;
Mastitis
granulomatosa;
Especie lipofílica

Resumen *Corynebacterium kroppenstedtii* es un bacilo gram positivo no esporulado, inmóvil, fermentador de glucosa y lipofílico, que forma parte de la microbiota de la piel. En los últimos años se han comunicado numerosos aislamientos de esta especie, principalmente en infecciones mamarias, como abscesos y mastitis granulomatosa. Presentamos 4 casos de infecciones por *C. kroppenstedtii* aislado de muestras obtenidas por punción-aspiración de mama en mujeres. *C. kroppenstedtii* fue identificado por la metodología convencional y por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS). Evaluados por el método epsilon métrico, dichos aislados presentaron sensibilidad a penicilina, ceftriaxona, minociclina, ciprofloxacina y vancomicina, mientras que la sensibilidad a clindamicina y a trimetoprima/sulfametoxazol fue variable. Debido a la asociación de *C. kroppenstedtii* con infecciones mamarias, consideramos pertinente la identificación a nivel de especie de aquellas corinebacterias que se aíslan en esta localización, con el objeto de abordar el diagnóstico definitivo y ensayar la sensibilidad a los antimicrobianos, a fin de poder instaurar el tratamiento antibiótico adecuado.

© 2021 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/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: marisaalmuzara@gmail.com (M. Almuzara).

KEYWORDS

*Corynebacterium
kroppenstedtii*;
Breast infections;
Granulomatous
mastitis;
Lipophilic species

***Corynebacterium kroppenstedtii* breast infections: Report of four cases**

Abstract *Corynebacterium kroppenstedtii* is an immobile, non-sporulated, glucose-fermenting and lipophilic gram-positive rod of the skin microbiota. In recent years, numerous isolates of this species have been reported mainly in breast infections, such as abscesses and granulomatous mastitis. We present here four cases of *C. kroppenstedtii* infections isolated from breast aspiration samples in women. *C. kroppenstedtii* was identified by conventional methodology and mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Using the epsilon-metric method, these isolates showed susceptibility to penicillin, ceftriaxone, minocycline, ciprofloxacin, and vancomycin, and variable susceptibility to clindamycin and trimethoprim sulfamethoxazole. Due to the association of *C. kroppenstedtii* with mammary infections, the identification at the species level of those corynebacteria isolated from this location is highly advisable in order to reach the final diagnosis and to test the antimicrobial susceptibility in order to apply the appropriate antibiotic treatment.

© 2021 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/>).

Corynebacterium kroppenstedtii es un bacilo gram positivo, no esporulado, inmóvil y fermentador de glucosa, que fue identificado y caracterizado por primera vez en 1998 por Collins et al.⁴, quienes lo aislaron a partir del cultivo de esputo de una mujer de 82 años con enfermedad pulmonar. La mayoría de las especies del género *Corynebacterium* poseen en su pared celular ácidos grasos denominados ácidos micólicos. Sin embargo, *Corynebacterium kroppenstedtii* carece de ellos debido a la pérdida de algunos genes necesarios para su biosíntesis¹⁴, lo que le confiere la característica de lipofiliidad. En general, se encuentra en la piel formando parte de su microbiota habitual. Según estudios moleculares también se ha comunicado su localización, con mayor abundancia, en la piel de pacientes con rosácea¹³. Desde que Paviour et al.¹¹ describieron en 2002 *C. kroppenstedtii* como la especie de *Corynebacterium* aislada con mayor frecuencia en muestras obtenidas de mama de pacientes con mastitis, se han notificado numerosos aislamientos de esta especie en distintas afecciones mamarias, tales como abscesos y mastitis granulomatosa (MG)^{9,12}.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los aspectos microbiológicos y clínicos de *C. kroppenstedtii* aislados de muestras clínicas humanas en el curso del año 2019.

Casos clínicos

En el período de un año (2019) se estudiaron en el Servicio de Bacteriología del Hospital de Clínicas de la Ciudad de Buenos Aires 4 aislados de *C. kroppenstedtii* (2 provenientes de pacientes atendidos en ese hospital y otros 2 de pacientes atendidos en centros privados) recuperados de muestras obtenidas por punción-aspiración de mama de pacientes de sexo femenino, con edades comprendidas entre 26 y 36 años. Estas mujeres presentaban lesiones nodulares, compatibles con un proceso inflamatorio agudo (en 2 de los casos) o crónico en una de las mamas, que no remitieron a pesar del tratamiento antibiótico empírico. Los 4 casos requirieron, además, drenaje quirúrgico. En 3 de las 4 pacientes las lesiones mamarias fueron diagnosticadas como

abscesos, uno de ellos asociado a la lactancia, mientras que en la cuarta paciente el diagnóstico por anatomía patológica fue el de mastitis granulomatosa (tabla 1).

El examen en fresco de las muestras mostró la presencia de abundante reacción inflamatoria, y en 2 de los 4 casos, en la coloración de Gram, se observaron bacilos gram positivos difteroides. Las muestras fueron cultivadas en agar base Columbia suplementado con 5% de sangre y en agar chocolate (bioMérieux), con incubación en atmósfera enriquecida con 5% de CO₂ a 35°C y en agar Brucella incubado en atmósfera anaerobia; como medio de enriquecimiento se usó el caldo tioglicolato (Britania, Argentina). Los aislados fueron obtenidos a partir del cultivo primario en los medios señalados después de 72 horas de incubación, como colonias muy pequeñas, de menos de 0,5 mm de diámetro, grisáceas, opacas, de borde entero. El desarrollo se vio favorecido por el agregado de 1% de Tween 80 al medio de cultivo. No se obtuvo desarrollo de bacterias anaerobias estrictas. El cultivo para micobacterias y el cultivo micológico fueron negativos. Los aislados fueron identificados por la metodología convencional de acuerdo con el esquema de Funke y Bernard⁷, y por espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF MS (BrukerDaltonik®, Bremen, Alemania). Las pruebas diferenciales entre CK y otras especies del mismo género que hidrolizan la esculina se muestran en la tabla 2. La combinación de la prueba de hidrólisis de esculina positiva, con la ausencia de actividad de beta glucuronidasa, junto con el carácter lipofílico del microorganismo (es decir, la constatación de que el crecimiento bacteriano se vio favorecido por la presencia de lípidos en el medio de cultivo), fueron claves para diferenciar *C. kroppenstedtii* de las otras especies.

Se determinó la sensibilidad antibiótica por el método epsilon-métrico (Etest, bioMérieux, Solna, Suecia) en agar Mueller Hinton adicionado del 5% de sangre ovina (bioMérieux), con incubación a 35°C en atmósfera con 5% de CO₂ para los siguientes antibióticos: penicilina, ceftriaxona, ciprofloxacin, minociclina, clindamicina, trimetoprima/sulfametoxazol y vancomicina; como puntos de

Tabla 1 Principales datos clínicos de los casos estudiados

	Paciente A	Paciente B	Paciente C	Paciente D
Edad (años)	26	27	33	36
Embarazos	G3P3	s/d	G1P1	s/d
Lactancia	Sí	No	No	No
Prótesis mamaria	No	No	No	No
Motivo de ingreso	Nódulo eritematoso	Nódulo eritematoso	Mastitis a repetición	Absceso
Tratamiento antibiótico empírico	Amoxicilina	AMC	AMC	AMC y TMS
Diagnóstico definitivo	Absceso	Mastitis granulomatosa crónica	Absceso	Absceso
Tratamiento antibiótico dirigido	Clindamicina	Minociclina	Clindamicina luego ciprofloxacina	s/d

AMC: amoxicilina-clavulánico; G: gestas; P: partos; s/d: sin datos; TMS: trimetoprima/sulfametoxazol.

Tabla 2 Especies de *Corynebacterium* que hidrolizan la esculina

	<i>C. kroppenstedtii</i>	<i>C. pyruviciproducens</i>	<i>C. glucuronolyticum</i>	<i>C. durum</i>	<i>C. matruchotii</i>	<i>C. phoceense</i>
Metabolismo	F	F	F	F	F	F
Lipofilicidad	+	v	v	—	—	—
Beta-glucuronidasa	—	+	+	—	—	ND
CAMP	—	v	+	—	—	ND
Urea	—	v	v	v	—	—
FAL	—	+	v	—	—	+

F: fermentativo; FAL: fosfatasa alcalina; ND: no determinado.

Tabla 3 Sensibilidad antibiótica de los aislados ensayados

	Paciente A		Paciente B		Paciente C		Paciente D	
	CIM (μg/ml)	Categoría ^a	CIM (μg/ml)	Categoría ^a	CIM (μg/ml)	Categoría ^a	CIM (μg/ml)	Categoría ^a
Penicilina	0,125	S	0,064	S	0,19	I	0,25	I
Ceftriaxona	0,25	S	0,064	S	0,5	S	0,5	S
Ciprofloxacina	0,094	S	0,094	S	0,094	S	0,064	S
Clindamicina	0,064	S	> 256	R	0,064	S	> 256	R
Trimetoprima	0,5	S	8	R	0,19	S	> 32	R
Sulfameto-xazol								
Vancomicina	0,75	S	0,5	S	0,5	S	0,25	S
Minociclina	0,25	S	0,5	S	0,19	S	0,25	S

R: resistente; S: sensible.

^a De acuerdo con los puntos de corte establecidos por el CLSI.

corte fueron usados aquellos establecidos por el CLSI para *Corynebacterium* spp. y géneros corineformes relacionados³. La lectura fue efectuada después de 48 horas de incubación. De acuerdo con estos puntos de corte todos los aislados fueron sensibles a penicilina, ceftriaxona, ciprofloxacina, minociclina y vancomicina, mientras que la sensibilidad a clindamicina y a trimetoprima/sulfametoxazol (TMS) fue variable (tabla 3).

La asociación de CK con la MG fue descrita por primera vez en 2002 en mujeres de la Polinesia, en su mayoría

jóvenes, con mastitis lobar granulomatosa histológicamente comprobada¹¹. Desde entonces numerosos estudios han avalado la asociación de CK con procesos inflamatorios o infecciosos mamarios, tanto agudos como crónicos, en mujeres en edad fértil^{6,9-11,15}. Uno de los 4 casos descritos correspondió a una paciente de 27 años que presentaba una placa eritematosa en la mama izquierda de 7 meses de evolución, la cual progresó a un absceso, a pesar del tratamiento antibiótico empírico con amoxicilina-clavulánico, y cuyo diagnóstico definitivo por anatomía patológica fue mastitis crónica granulomatosa. El diagnóstico diferen-

cial de la MG con otros procesos granulomatosos como tuberculosis, granulomatosis de Wegener y sarcoidosis, e incluso con otras afecciones como el cáncer de mama, resulta muchas veces dificultoso.

Un diagnóstico preciso y oportuno de la MG junto con el aislamiento e identificación de *C. kroppenstedtii* es de suma importancia, dado que los regímenes de tratamiento antibiótico empírico a menudo son ineficaces, ya sea porque se utilizan antibióticos que son hidrófilos y se distribuyen pobremente en tejidos ricos en lípidos, como en el caso del lecho mamario⁵, o porque la cepa involucrada puede presentar resistencia a los antibióticos administrados⁶. Sin embargo, el tratamiento antibiótico dirigido a menudo no es suficiente y se requiere intervención quirúrgica para la resolución del cuadro^{5,11}.

Por el carácter lipofílico de *C. kroppenstedtii*, y porque se ha evidenciado su presencia dentro de vacuolas lipídicas en biopsias de mama de pacientes con MG⁵, sería aconsejable el tratamiento con antibióticos que posean un elevado volumen de distribución y penetren bien en los tejidos, como ciprofloxacina, doxiciclina, linezolid, clindamicina y TMS⁵. Cabe señalar que 2 de los 4 aislamientos de CK que presentamos (tabla 3) fueron resistentes a estos 2 últimos antibióticos. Fernández et al.⁷ han comunicado que la resistencia a macrólidos y lincosamidas podría deberse a la presencia del gen *ermX*. Los 2 aislados que presentaron resistencia a eritromicina fueron también resistentes a clindamicina, con ausencia total de halo de inhibición alrededor de ambos discos, por lo que se pudo inferir que ambos aislados presentaron un fenotipo MLSb constitutivo. Según datos bibliográficos, la resistencia a sulfamidas podría atribuirse a la presencia del gen *sul*⁶.

Varios estudios han informado de que los aislados de CK son sensibles a la mayoría de los antibióticos. Sin embargo, se ha descrito resistencia a penicilina, imipenem, eritromicina, clindamicina y TMS^{10,15}.

Pese a su naturaleza lipofílica, la cual muchas veces dificulta su aislamiento e identificación, *C. kroppenstedtii* es la especie de *Corynebacterium* que ha sido notificada con mayor frecuencia en afecciones mamarias como abscesos y MG, por lo que aconsejamos la incubación prolongada de los medios de aislamiento primario (agar sangre y agar chocolate, por lo menos 7 días y, en caso de observarse bacilos gram positivos difteroides en la coloración de Gram, adicionar una placa de agar sangre con Tween 80 0,1-1%, a fin de estimular su desarrollo). Otras especies, entre ellas algunas lipofílicas, como *C. tuberculostearicum* y *C. accolens*, y otras no lipofílicas como *C. amycolatum*, *C. striatum* y *C. minutissimum*^{12,15}, también han sido descritas en infecciones mamarias. En cuanto a la identificación por pruebas bioquímicas convencionales, la hidrólisis de esculina nos permitió diferenciar *C. kroppenstedtii* de estas otras especies de *Corynebacterium*, ninguna de las cuales hidroliza la esculina^{11,12}. En este contexto, resaltamos que dicha prueba debe ser adicionada de Tween 80 para visualizar el crecimiento y viraje del medio en el caso de las especies lipofílicas.

Aunque la identificación fue posible mediante pruebas bioquímicas tradicionales, la EM presentó una clara ventaja respecto de esta metodología y permitió establecer de manera rápida la identificación a nivel de especie. De acuerdo con los resultados obtenidos previamente por

nuestro grupo de trabajo², y a los comunicados por otros autores, la identificación por EM permite identificar los bacilos gram positivos más comúnmente aislados en el laboratorio de microbiología, y constituye una alternativa rápida, simple y eficaz a la secuenciación de gen 16S del ARNr^{1,2,5,14}. Al respecto, Barberis et al. han demostrado que la obtención de un *score* $\geq 1,7$ con MALDI-TOF MS es suficiente para identificar a nivel de especie el género *Corynebacterium* y otros géneros relacionados².

El uso de esta y otras nuevas metodologías, como la detección directa en muestras clínicas amplificando mediante PCR y luego secuenciando una región del 16S ARNr⁸, probablemente hayan influido en el aumento de los casos de infecciones por esta especie publicados en la literatura¹⁴ en los últimos años.

Debido a la asociación de *C. kroppenstedtii* con la MG y con la formación de abscesos mamarios, consideramos que los microbiólogos deberían estar en alerta frente a muestras de punción o tejido mamario en las que se observan bacilos gram positivos en la coloración de Gram, o incluso en aquellas con reacción inflamatoria y examen directo negativo, y deberían proceder a incubar los medios de aislamiento primario hasta 7 días e, idealmente, suplementarlos con Tween 80 para favorecer el desarrollo de este microorganismo, dada su naturaleza lipofílica. De ese modo es posible abordar el diagnóstico definitivo y ensayar luego la sensibilidad a los antimicrobianos, con el fin de instaurar el tratamiento antibiótico más adecuado.

Financiación

El presente trabajo ha sido financiado con fondos del Proyecto UBACYT 2018 Modalidad I: Código 20020170100109BA.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Alibi S, Ferjani A, Gaillot O, Marzouk M, Courcol R, Boukadida J. Identification of clinically relevant *Corynebacterium* strains by Api Coryne. MALDI-TOF-mass spectrometry and molecular approaches. *Pathol Biol (Paris)*. 2015;63:153–7.
2. Barberis C, Almuzara M, Join-Lambert O, Ramírez MS, Fagioli A, Vay C. Comparison of the Bruker MALDI-TOF mass spectrometry system and conventional phenotypic methods for identification of Gram-positive rods. *PLoS One*. 2014;9:e106303, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0106303>, eCollection 2014.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. 2015, M45, 3rd ed. Wayne, PA.
4. Collins MD, Falsen E, Akervall E, Sjöden B, Alvarez A. *Corynebacterium kroppenstedtii* sp. nov., a novel corynebacterium that does not contain mycolic acids. *Int J Syst Bacteriol*. 1998;48:1449–54.
5. Dobinson HC, Anderson TP, Chambers ST, Doogue MP, Seaward L, Werno AM. Antimicrobial treatment options for granulomatous mastitis caused by *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol*. 2015;53:2895–9.
6. Fernández-Natal I, Rodríguez-Lázaro D, Marrodán-Ciordia T, Sáez-Nieto JA, Valdezate S, Rodríguez-Pollán H, Tauch A,

- Soriano F. Characterization and antimicrobial susceptibility of one antibiotic-sensitive and one multidrug-resistant *Corynebacterium kroppenstedtii* strain isolated from patients with granulomatous mastitis. *New Microbes New Infect.* 2016;14:93–7.
7. Funke G, Bernard KA. Coryneform gram-positive rods. En: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editores. *Manual of clinical microbiology*. Washington DC: ASM Press; 2011. p. 413–42.
8. Hagemann JB, Essig A, Herrmann M, Liebold A, Quader MA. Early prosthetic valve endocarditis caused by *Corynebacterium kroppenstedtii*. *Int J Med Microbiol.* 2015;305:957–9.
9. Johnson MG, Leal S, Plongla R, Leone PA, Gilligan PH. Closing the brief case: recurrent granulomatous mastitis due to *Corynebacterium kroppenstedtii*. *J Clin Microbiol.* 2016;54:2212.
10. Kutsuna S, Mezaki K, Nagamatsu M, Kunitatsu J, Yamamoto K, Fujiya Y, et al. Two cases of granulomatous mastitis caused by *Corynebacterium kroppenstedtii* infection in nulliparous young women with hyperprolactinemia. *Intern Med.* 2015;54:1815–8.
11. Paviour S, Musaad S, Roberts S, Taylor G, Taylor S, Shore K, et al. *Corynebacterium* species isolated from patients with mastitis. *Clin Infect Dis.* 2002;35:1434–40.
12. Poojary I, Kurian AVAJ, Devapriya JDMAT. *Corynebacterium* species causing breast abscesses among patients attending a tertiary care hospital in Chennai, South India. *Infect Dis (Lond).* 2017;49:528–31.
13. Rainer BM, Thompson KG, Antonescu C, Florea L, Mongodin EF, Bui J, et al. Characterization and analysis of the skin microbiota in rosacea: A case-control study. *Am J Clin Dermatol.* 2020;21:139–47.
14. Tauch A, Fernández-Natal I, Soriano F. A microbiological and clinical review on *Corynebacterium kroppenstedtii*. *Int J Infect Dis.* 2016;48:33–9.
15. Taylor GB, Paviour SD, Musaad S, Jones WO, Holland DJ. A clinic pathological review of 34 cases of inflammatory breast disease showing an association between corynebacteria infection and granulomatous mastitis. *Pathology.* 2003;35:109–19.