

Coinfección por *Aggregatibacter aphrophilus* y SARS-CoV-2 con desenlace fatal

► Mauro López^{1ac}, Mariana Vázquez^{1ac}, Paula Torano^{1a}, Héctor Izquierdo^{2bc}, Agustina Tkach^{1a*}

¹ Bioquímico/a.

² Médico.

^a Servicio de Laboratorio, Unidad de Bacteriología, Hospital Zonal General de Agudos "Dr. Lucio Meléndez", provincia de Buenos Aires, Argentina.

^b Unidad de Terapia Intensiva, Hospital Modular "María Eugenia Álvarez", Longchamps, provincia de Buenos Aires, Argentina.

^c División Análisis Clínicos, Unidad de Bacteriología. Hospital de Infecciosas Francisco Javier Muñiz, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

* Autora para correspondencia.

Resumen

Aggregatibacter aphrophilus es un cocobacilo gram negativo de requerimientos nutricionales exigentes, que obliga al microbiólogo a utilizar métodos de identificación no convencionales. Se comunica el caso de una paciente que fue internada con un cuadro clínico caracterizado por fiebre, cefalea y dificultad respiratoria por COVID-19. De las muestras de hemocultivos se rescataron colonias cocobacilares gram negativas de lento crecimiento, las cuales fueron finalmente identificadas como *A. aphrophilus* mediante MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*). Dado que en nuestro medio la identificación de este tipo de gérmenes es dificultosa, es fundamental y se recomienda formar una red de laboratorios que den respuesta a las necesidades diagnósticas y tecnológicas.

Palabras clave: *Aggregatibacter aphrophilus*; COVID-19; MALDI-TOF; HACEK; Red de laboratorios

Fatal outcome in coinfection by Aggregatibacter aphrophilus and SARS-CoV-2

Abstract

Aggregatibacter aphrophilus is a gram-negative coccobacillus with demanding nutritional requirements, which forces the microbiologist to use unconventional typification methods. The case of a patient who was admitted with a clinical history characterised by fever, headache and respiratory distress due to COVID-19 was reported. Slow-growing gram-negative coccobacillary colonies were recovered from the blood culture samples, which were finally typed as *A. aphrophilus* using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Identifying this organism is difficult in our setting. As it is considered essential, building a network of laboratories that give response to diagnostic and technological needs is highly recommended.

Keywords: *Aggregatibacter aphrophilus*; COVID-19; MALDI-TOF; HACEK; Laboratory network

Coinfecção por Aggregatibacter aphrophilus e SARS-CoV-2 com desfecho fatal

Resumo

Aggregatibacter aphrophilus é um cocobacilo gram-negativo com pedidos nutricionais exigentes, o que obriga o microbiologista a utilizar métodos de

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

tipagem não convencionais. É relatado o caso de um paciente que deu entrada com quadro clínico caracterizado por febre, cefaleia e desconforto respiratório devido à COVID-19. Colônias de cocobacilos gram-negativas de crescimento lento foram recuperadas das amostras de hemoculturas, que foram finalmente identificadas como *A. aphrophilus* usando MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry). Devido a que a identificação deste tipo de germes é difícil no nosso meio, considera-se essencial e se recomenda construir uma rede de laboratórios que respondam às necessidades diagnósticas e tecnológicas.

Palavras-chave: *Aggregatibacter aphrophilus*; COVID-19; MALDI-TOF; HACEK; Rede de laboratórios

Introducción

El nuevo género *Aggregatibacter* fue creado para la clasificación taxonómica de entidades microbianas que antes se clasificaban en los géneros *Haemophilus* y *Actinobacillus*; por lo tanto, *Haemophilus aphrophilus* fue renombrado como *Aggregatibacter aphrophilus*, *Haemophilus segnis* pasó a llamarse *Aggregatibacter segnis*, y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* pasó a llamarse *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (1).

A. aphrophilus forma parte de la microbiota orofaríngea y es un cocobacilo gram negativo, de colonias no hemolíticas, exigente, catalasa negativo, dependiente de CO₂, que requiere, en ocasiones, factor X para su crecimiento. Perteneció al grupo HACEK [*Haemophilus parainfluenzae*, *Aggregatibacter* spp. (*A. actinomycetemcomitans*, *A. aphrophilus*, *A. paraphrophilus* y *A. segnis*), *Cardiobacterium* spp. (*C. hominis*, *C. valvarum*), *Eikenella corrodens*, y *Kingella* spp. (*K. kingae*, *K. denitrificans*)], y anteriormente era conocido como *Haemophilus aphrophilus* (2) (3).

Aunque su patogenicidad es limitada, son responsables del 1 al 3% de todas las endocarditis infecciosas. La endocarditis por HACEK afecta principalmente a pacientes con cardiopatía subyacente o con válvulas protésicas, y se caracteriza por un curso insidioso, con un retraso medio en el diagnóstico de un mes (*Haemophilus* spp.) a tres meses (*Aggregatibacter* y *Cardiobacterium* spp.) (3). Además, originan abscesos hepáticos, infecciones de hueso y articulaciones, endoftalmitis, meningitis, celulitis, pericarditis, bacteriemia, linfadenitis cervical, celulitis facial y empiema. También se han informado casos raros de abscesos cerebrales, usualmente asociados a contacto con perros, pobre higiene dental o procedimientos odontológicos (2).

El objetivo de esta presentación es describir un caso clínico de coinfección fatal de *A. aphrophilus* y SARS-CoV-2, y demostrar la importancia del trabajo en red para los laboratorios de baja complejidad.

Presentación del caso

Se recibió en la consulta de la guardia del Hospital Modular de Longchamps una paciente de sexo feme-

nino de 55 años de edad, con antecedentes de asma bronquial sin seguimiento, diabetes tipo 2 y sobrepeso. Al examen físico se evidenció que la paciente estaba lúcida, en mal estado general, hiperdinámica, hemodinámicamente compensada y taquipneica, con regular mecánica ventilatoria que requirió ventilación no invasiva mediante cánula de alto flujo. Los análisis del laboratorio clínico revelaron leucocitosis de 20 100 células/mm³ con predominio de polimorfonucleares de un 93%, hiperglucemia de 496 mg/dL. Radiológicamente presentó infiltrados radiopacos heterogéneos bibasales con broncograma aéreo. Al ingreso en el Hospital Modular se realizó un *test* rápido antigénico para SARS-CoV-2 en una muestra de hisopado nasofaríngeo, el que resultó ser negativo. La paciente evolucionó con *shock* séptico y requerimiento de asistencia ventilatoria mecánica. Se tomaron muestras de sangre, orina y secreciones respiratorias y se inició tratamiento con ampicilina-sulbactam y claritromicina de forma empírica. La paciente fue derivada al HZGA Meléndez con diagnóstico presuntivo de *shock* séptico secundario a neumonía grave adquirida de la comunidad y sospecha de infección aguda por SARS-CoV-2. En esta institución se le realizó una toma de aspirado traqueal para la búsqueda del genoma del virus SARS-CoV-2 mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuyo resultado fue positivo. El cuerpo médico decidió escalar el tratamiento empírico a imipenem más vancomicina. Finalmente la paciente falleció por disfunción multiorgánica.

Materiales y Métodos

Se recibieron en la Unidad de Bacteriología desde el Hospital Modular dos pares de muestras de hemocultivos de la paciente, tomadas en botellas de anaerobiosis y aerobiosis, las cuales fueron incubadas hasta su positividad a 37 °C en el sistema BacT-ALERT 3D (bioMérieux); el tiempo promedio de positividad de las cuatro botellas resultó ser de un día. La coloración de Gram de los hemocultivos reveló cocobacilos negativos en todas las botellas, las mismas se subcultivaron en agar sangre ovina al 5% y agar chocolate, ambos medios incubados en una atmósfera de CO₂ al 5%. En todos los

casos se obtuvo el aislamiento de colonias puntiformes de lento crecimiento. Con las escasas pruebas manuales realizadas se pudo establecer que todos los aislamientos eran cocobacilos gram negativos catalasa negativos. Se pretendió identificar las cepas de forma automatizada mediante el sistema VITEK 2 (bioMérieux) sin obtenerse resultados concluyentes con las tarjetas BN, como era de esperar. Se derivó la cepa a la Unidad de Bacteriología del HIFJ Muñiz, con el fin de realizarle un método proteómico, basado en la tecnología MALDI-TOF MS (VITEK MS bioMérieux), el cual la identificó como *A. aphrophilus* con un porcentaje de probabilidad del 99%. Debido a la labilidad de la cepa, no se logró determinar su sensibilidad a los antibióticos.

Discusión y Conclusiones

Los gérmenes exigentes poseen requerimientos nutricionales que obligan al microbiólogo a utilizar medios de cultivos altamente nutritivos y tiempos prolongados de incubación para lograr su rescate. Resulta dificultosa la identificación rápida de este tipo de gérmenes con pruebas de laboratorio sencillas, con lo cual sería importante establecer una red de laboratorios que subsane las deficiencias tecnológicas y de recursos para lograr su identificación.

La identificación fenotípica de bacilos gram negativos exigentes como *A. aphrophilus* puede resultar en ciertas ocasiones un desafío, pero no es imposible realizarla en un laboratorio de baja complejidad. La identificación de este microorganismo cocobacilar gram negativo fermentador puede comenzar con pruebas de catalasa negativa y oxidasa negativa o positiva. Posteriormente, se realizan las siguientes pruebas: lactosa (positiva), esculina e indol (negativos) y dependencia de factores V o X para su desarrollo (variable) (4). Existen micrométodos manuales cualitativos que permiten la identificación de la cepa en estudio en el día (5), como así también tarjetas de identificación para equipos automatizados, en el caso de VITEK 2 las tarjetas NH (6), aunque estas últimas requieren de un equipo e interfaz, como también sucede con la espectrometría de masas y los métodos moleculares. En cuanto a costos, se ha informado que la espectrometría de masas no sólo llegó al laboratorio de microbiología para acortar tiempos de devolución de resultados, sino también para disminuir los costos (7). Es por ello que creemos indispensable que los laboratorios públicos puedan trabajar en red a fin de tener acceso a los métodos rápidos por medio de derivaciones a laboratorios de referencia, ya que si bien los costos de las pruebas individualmente resultan ser menores con metodologías como la de MALDI-TOF, no todos los laboratorios tienen la posibilidad de adquirir el equipamiento.

Si bien no se han encontrado informes de coinfección de *A. aphrophilus* y SARS-CoV-2, gracias al estudio

realizado por Soffritti *et al.*, se sabe que ha habido un aumento significativo de bacterias periodontopatógenas en pacientes con COVID-19 (8). Por esto consideramos probable el hecho de la coinfección respiratoria SARS-CoV-2 con *A. aphrophilus* preexistente a la internación, a pesar de la falla en el rescate bacteriológico en muestras respiratorias, dada la exigencia nutricional de *A. aphrophilus* para su desarrollo.

Se han publicado casos de artritis séptica, abscesos cerebrales y endocarditis causadas por *A. aphrophilus* (2) (9) (10) (11). Un estudio observacional de Bapat *et al.*, registró un 85,2% de supervivencia en una serie de 27 casos de enfermedad invasiva por el género *Aggregatibacter* (12).

Si bien en este caso no pudieron realizarse pruebas de sensibilidad, cabe aclarar que el método recomendado es el de dilución en un medio de cultivo apto para el crecimiento de gérmenes exigentes, como el caldo Mueller Hinton con 2,5-5% de agar sangre lisada equina v/v, probando como primera línea de antibióticos ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, ceftriaxona o cefotaxima, ciprofloxacina o levofloxacina, imipenem o meropenem y trimetoprima-sulfametoxazol, a 35 °C de 24 a 48 h de incubación en atmósfera con 5% de CO₂. Se han descrito miembros del grupo HACEK resistentes a la ampicilina y a la penicilina debido a la presencia de beta-lactamasas, como así también resistentes a macrólidos y aminoglucósidos (13).

En el presente caso se logró la identificación de *A. aphrophilus* gracias a la utilización de medios de cultivo adecuados, la comunicación interdisciplinaria y el establecimiento de una red de laboratorios informal que respondió ante las necesidades diagnósticas.

Agradecimientos

Los autores agradecen la gentileza de la Unidad de Bacteriología del HIFJ Muñiz en la recepción y procesamiento de la cepa en cuestión.

Fuentes de financiación

El presente trabajo fue realizado sin haberse recibido una financiación específica.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

Bioq. AGUSTINA TKACH
Servicio de Laboratorio, Unidad de Bacteriología,
Hospital Zonal General de Agudos Dr. Lucio Meléndez,
Presidente Perón 859, Adrogué, provincia de Buenos Aires,
Argentina.
Correo electrónico: agustinadt@gmail.com

Referencias bibliográficas

1. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006 Sep; 56 (Pt 9): 2135-46.
2. Valdés RE, Moreno F, Aguilar LE, Guinto G. Absceso cerebral causado por *Aggregatibacter aphrophilus*. *An Med (Mex)* 2015; 60 (4): 278-82.
3. Revest M, Egmann G, Cattoir V, Tattevin P. HACEK endocarditis: state-of-the-art. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2016; 14: 523-30.
4. Vay CA, Almuzara MN. Bacilos gram negativos del grupo HACEK (ACEKS) y microorganismos relacionados. En: Lopardo H, Predari S, Vay C, editores. *Manual de microbiología clínica de la Asociación Argentina de Microbiología*. Vol I. Bacterias de importancia clínica. Parte II. Capítulo IIc.4.2. Buenos Aires, Argentina: Asociación Argentina de Microbiología. 2017. p. 60-99.
5. Leiva J, del Pozo J. Bacilos gramnegativos de crecimiento lento: grupo HACEK, *Capnocytophaga* y *Pasteurella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2017; 35 (Supl 3): 29-43.
6. Rennie R, Brosnikoff C, Shokoples S, Reller L, Mirrett S, Janda W, *et al.* Multicenter evaluation of the new Vitek 2 *Neisseria-Haemophilus* identification card. *J Clin Microbiol* 2008 Aug; 46 (8): 2681-5.
7. El-Bouri K, Johnston S, Rees E, Thomas I, Bome-Manathoko N, Jones C, *et al.* Comparison of bacterial identification by MALDI-TOF mass spectrometry and conventional diagnostic microbiology methods: agreement, speed and cost implications. *Br J Biomed Sci* 2012; 69 (2): 47-55.
8. Soffritti I, D'Accolti M, Fabbri C, Passaro A, Manfredini R, Zuliani G, *et al.* Oral microbiome dysbiosis is associated with symptoms severity and local immune/inflammatory response in COVID-19 patients: a cross-sectional study. *Front Microbiol* 2021; 12: 687513.
9. Prestifilippo AN, Chajud AS, Mobilia L, Boleas M, Almará A, Piedrabuena M, *et al.* Artritis séptica por *Aggregatibacter aphrophilus*: presentación de un caso. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Córdoba* 2019; 76 (1): 52-5.
10. Azharuddin M, Munshi LB, Dwivedi S, Diaz MAA. Septic arthritis: a case of *Haemophilus – Aggregatibacter aphrophilus*. *Am J Infect Dis Microbiol* 2016; 4 (4): 72-3.
11. Hirano K, Tokui T, Inagaki M, Fujii T, Maze Y, Toyoshima H. *Aggregatibacter aphrophilus* infective endocarditis confirmed by broad-range PCR diagnosis: a case report. *Int J Surg Case Rep* 2017; 31: 150-3.
12. Bapat A, Lucey O, Eckersley M, Ciesielczuk H, Ranasinghe S, Lambourne J. Invasive *Aggregatibacter* infection: shedding light on a rare pathogen in a retrospective cohort analysis. *J Med Microbiol* 2022 Dec; 71 (12).
13. CLSI. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*. 3rd ed. CLSI guideline M45. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.

Recibido: 29 de mayo de 2023

Aceptado: 14 de agosto de 2023