



INFORME BREVE

***Dolosigranulum pigrum* en absceso corneal**

Karina L. Roitman^a, Marisa N. Almuzara^{b,c,*}, Mario Javier Fernández Rodríguez^a, Federico Basbus^d, Lucía Cipolla^e, Claudia M. Barberis^{b,c} y Carlos A. Vay^{b,c}

^a Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)-Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) Dr. Carlos G. Malbrán, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^b Departamento de Bioquímica Clínica, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

^c Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica INFIBIOC, Buenos Aires, Argentina

^d Departamento de Cirugía, División Oftalmología, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

^e Laboratorio de Bacteriología Especial, Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)-Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) Dr. Carlos G. Malbrán, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Recibido el 11 de febrero de 2021; aceptado el 3 de octubre de 2021

Disponible en Internet el 8 diciembre 2021

PALABRAS CLAVE

Dolosigranulum pigrum;
Absceso corneal

Resumen *Dolosigranulum pigrum* es un coco gram positivo, anaerobio facultativo, que forma parte de la microbiota oral y del tracto respiratorio superior. Aunque los reportes de infecciones por este microorganismo son escasos, se lo ha asociado a un amplio espectro de enfermedades infecciosas. Se describe el caso de un hombre adulto con un absceso corneal del que se aisló *D. pigrum*. El microorganismo fue identificado por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) y secuenciación del gen 16S ARNr. A su vez, se logró la identificación presuntiva mediante pruebas fenotípicas claves, como la disposición en racimos en la coloración de Gram, la prueba negativa de la catalasa, la producción de pirrolidónil arilamidasa y leucina aminopeptidasa, el crecimiento en NaCl al 6,5% y la hidrólisis de esculina. Los datos de la literatura y el presente caso respaldan la asociación del microorganismo con infecciones oculares, a menudo de curso destructivo, principalmente en pacientes de edad avanzada.

© 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.N. Almuzara).

KEYWORDS

Dolosigranulum
pigrum;
Corneal abscess

***Dolosigranulum pigrum* in corneal abscess**

Abstract *Dolosigranulum pigrum* is a gram-positive, facultatively anaerobic coccus, which is part of the oral and upper respiratory tract microbiota. Although reports of infections by this microorganism are scarce, it has been associated with a wide spectrum of infectious diseases. The case of an elderly man with a lower corneal abscess, in which *Dolosigranulum pigrum* was isolated, is described. The microorganism was identified by mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and by the sequencing of the 16S rRNA gene. Furthermore, the presumptive identification of the causative agent was achieved by using key phenotypic tests such as the cluster arrangement in Gram stain, the negative catalase test, the production of pyrrolidonyl arylamidase and leucine aminopeptidase activity, the growth in 6.5% NaCl and esculin hydrolysis. The data from the literature (and the present case) support the association of the microorganism with ocular infections, which often take a destructive course, mainly in elderly patients.

© 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/>).

El género *Dolosigranulum* está constituido por cocos gram positivos, anaerobios facultativos, catalasa negativa, que se disponen en pares, tétradas y racimos. Taxonómicamente, se ubica dentro de la familia *Carnobacteriaceae* y, hasta el momento, *Dolosigranulum pigrum* es la única especie del género².

Dolosigranulum fue descrito por primera vez en 1993 por Aguirre et al.¹ en muestras de tejido de médula espinal y de hisopado ocular. En dicho estudio se realizó el análisis comparativo de secuencias del gen 16S del ARNr de los aislamientos de ambos sitios. Los resultados demostraron que esta bacteria, hasta el momento desconocida, tenía características fenotípicas comunes con *Gemella*, pero difería de esta en la composición de su pared celular¹. El género exhibió el mayor porcentaje de similitud de secuencia del gen 16S del ARNr con *Aerococcus* y *Globicatella*, aunque fue genealógicamente diferente a ambos. A partir de la evidencia filogenética y las diferencias fenotípicas, se propuso la clasificación de estos dos aislamientos clínicos en un nuevo género denominado *Dolosigranulum*¹.

D. pigrum forma parte de la microbiota de la cavidad oral y del tracto respiratorio superior^{2,8}. Este microorganismo ha emergido como un potencial patógeno oportunista en humanos y, aunque son escasas las publicaciones y su incidencia es desconocida, ha sido reportado en un amplio espectro de enfermedades infecciosas, incluyendo neumonía nosocomial, septicemia, neumonía asociada a respirador⁵, colecistitis aguda, sinovitis, pancreatitis y artritis asociada a biomaterial^{4,7}. Se ha identificado también en infecciones oculares en casos de córnea neurotrópica, blefaritis, queratitis y conjuntivitis^{9,12,13}. Presentamos un caso clínico de un absceso corneal por *D. pigrum* con el fin de ampliar la información acerca del rol de este microorganismo como agente causal de procesos infecciosos. El presente estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital de Clínicas José de San Martín.

Un hombre de 70 años inmunocompetente, hipertenso, concurrió al Servicio de Oftalmología del Hospital por retracción de párpado superior derecho. Como antecedentes, refería dos cirugías en otro centro oftalmológico por tumora-

ción en ojo derecho. Al momento de la consulta presentaba un ectropión cicatricial y exposición córneo-conjuntival con lagofthalmos (imposibilidad de lograr el cierre completo de los párpados), razón por la cual sufría una queratitis por exposición. Se realizaron dos aplicaciones de ácido hialurónico, que no produjeron mejoría del cuadro, por lo que se programó una tarsorrafia (proceso que consiste en reducir la apertura de los párpados suturando temporalmente sus bordes). Antes de dicha práctica el paciente sufrió un accidente de tránsito, con lesiones que agravaron el lagofthalmos y ocasionaron retracción de ambos párpados por herida en la mejilla derecha. Tres meses después de la cirugía regresó al hospital y se constató la presencia de un absceso corneal inferior en el ojo derecho. Se tomó material para cultivo por raspado corneal, que fue remitido al Laboratorio de Bacteriología. Posteriormente se inició tratamiento empírico con colirios de cefalexina cada 12 horas, vancomicina cada 4 horas y eritromicina cada 6 horas por 7 días, con muy buena evolución. En la coloración de Gram no se observaron bacterias. Se cultivó en agar sangre y en agar chocolate a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. A las 24 horas de incubación desarrollaron colonias puntiformes de diferente tamaño, lo que sugería un cultivo mixto. A las 48 horas se observaron colonias de aspecto homogéneo, alfa-hemolíticas, grisáceas, que se asemejaban a colonias de estreptococos del grupo *viridans*. La morfología en medio líquido mostró cocos gram positivos dispuestos en tétradas y grupos. La identificación como *Dolosigranulum pigrum* fue realizada por espectrometría de masas MALDI-TOF MS (BrukerDaltonik®, Bremen, Alemania), con un score de 2,172. Ningún otro microorganismo fue aislado en forma concomitante. La confirmación de la identificación fenotípica del aislado se realizó por amplificación y posterior secuenciación del gen 16S del ARNr utilizando los *primers* descriptos por Weisburg et al.¹⁵. Los productos de PCR fueron secuenciados utilizando el equipo Big Dye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) y analizados en el secuenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems). El alineamiento de las secuencias se realizó con el algoritmo BLASTN (versión 2.0; *National Center for*

Tabla 1 Características diferenciales de cocos gram positivos catalasa negativa y sensibles a vancomicina, que se disponen en grupos

Especies	PYR	LAP	NaCl 6,5%	Hidrólisis de esculina	Crecimiento en anaerobiosis
<i>Dolosigranulum pigrum</i>	+	+	+	(+)	+
<i>Gemella</i> spp.	+	+	—	—	+
<i>Facklamia languida</i>	+	+	+	—	+
<i>Alloiococcus otitidis</i>	+	+	+	v	—
<i>Helcococcus kunzii</i>	+	—	+	+	+
<i>Aerococcus viridans</i>	+	—	+	v	+
<i>Aerococcus urinae</i>	—	+	+	v	+

PYR: pirrolidónil arilamidasa; LAP: leucina aminopeptidasa; v: variable; —: negativo; +: positivo; (+): positivo tardío.

Fuente: Adaptado de Christensen y Ruoff².

Biotechnology Information) y se compararon con secuencias de cepas de referencia disponibles en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). La secuencia obtenida presentó un 99,71% de similitud con la secuencia de la cepa tipo *D. pigrum* ATCC 51524 y fue depositada en la base de datos de GenBank bajo el número de acceso MT396713.1. El microorganismo también se identificó por la metodología convencional². Las pruebas bioquímicas de primera línea revelaron la presencia de un microorganismo catalasa negativa, sensible a la vancomicina, con actividad de leucina aminopeptidasa y de pirrolidónil arilamidasa.

En cuanto al crecimiento en caldo con cloruro de sodio (NaCl), una prueba de primera línea², el microorganismo creció pobremente en caldo tripticasa soya con 6,5% de NaCl, pero mostró buen crecimiento en caldo NaCl de Facklam (caldo tripticasa soya con 6% de NaCl, 0,5% de glucosa y púrpura de bromocresol como indicador). *D. pigrum* exige su diferenciación de otros géneros y especies de cocos que también se agrupan y son catalasa negativa, como *Gemella*, *Alloiococcus*, *Facklamia languida*, *Helcococcus kunzii* y *Aerococcus* spp. Las pruebas diferenciales se muestran en la tabla 1.

Dado que *D. pigrum* comparte características fenotípicas con otras especies relacionadas (tabla 1), la identificación definitiva por pruebas bioquímicas convencionales es dificultosa. Además, pruebas claves como el crecimiento en caldo con 6,5% de NaCl y la hidrólisis de la esculina son de positividad tardía y pueden interpretarse como negativas, ya que generalmente ambas son descartadas antes de los 15 días de incubación. En este sentido, la literatura avala que con una incubación prolongada de hasta 2 semanas la mayoría de los aislamientos dan la prueba positiva^{6,8}. Esto demuestra que es necesario recurrir a métodos alternativos, como la espectrometría de masas o la secuenciación del gen 16S del ARNr, para una identificación confiable^{6,8}.

La prueba de sensibilidad antibiótica fue realizada en agar Mueller Hinton suplementado con sangre ovina al 5% (Laboratorio Argentino, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina) por el método epsilométrico (Etest bioMérieux, Solna, Suecia). Los antibióticos ensayados y los resultados obtenidos (en µg/ml) se detallan a continuación: penicilina, 0,002; vancomicina, 0,016, y ceftriaxona, 0,003. El aislado resultó sensible a los antimicrobianos ensayados utilizando los puntos de corte establecidos por el CLSI para *Gemella*

spp³, dado que no existen puntos de corte propios para el género *Dolosigranulum*.

Cuando se produce una brecha en la superficie corneal, como en el presente caso, los microorganismos pueden ganar acceso al estroma, multiplicarse y, si superan los mecanismos locales de defensa, producir un absceso corneal^{10,14}. El factor de riesgo más importante es el uso de lentes de contacto, especialmente las de uso extendido. Otras circunstancias predisponentes son traumatismos de córnea, cuerpos extraños corneales, erosiones corneales recurrentes, sequedad ocular, entropión, ectropión e inmunosupresión local o sistémica^{10,14}. La etiología más frecuente de los abscesos corneales es la bacteriana. Las bacterias más comúnmente responsables son *Staphylococcus aureus*, así como estafilococos coagulasa negativos, estreptococos, *Pseudomonas aeruginosa* y enterobacterias de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Proteus*^{10,14}. Por su parte, la incidencia de la etiología fúngica, aunque mucho menos frecuente que la bacteriana, ha crecido a lo largo de los años, probablemente relacionada con el abuso en la utilización de antibióticos y corticoides tópicos^{10,14}. Con baja frecuencia, *D. pigrum* también ha sido reportado como agente etiológico de infecciones oculares en la literatura^{9,12,13}.

La identificación fenotípica de los cocos gram positivos catalasa negativa por pruebas bioquímicas convencionales no es laboriosa, pero la identificación de *D. pigrum* puede requerir varios días, dado que la incubación de la esculina y del caldo hipersalado puede extenderse hasta 2 semanas⁴. La espectrometría de masas y los métodos moleculares a través de la amplificación por PCR y secuenciación del gen 16S del ARNr son óptimos para la identificación rápida y confiable, aunque no son aún de disponibilidad masiva¹². Según los datos recomendados por el fabricante del equipo para MALDI-TOF (Bruker Daltonics), es necesario un score $\geq 2,0$ para la identificación a nivel de especie¹¹.

En relación con la sensibilidad antibiótica, los 27 aislados de *D. pigrum* ensayados por Laclaire y Facklam⁸ fueron sensibles a vancomicina y a los antibióticos beta-lactámicos (como el aislado de nuestro caso), a levofloxacina, rifampicina, clindamicina y tetraciclina, mientras que el 52% presentaron resistencia a eritromicina.

En conclusión, la correcta identificación del agente causal y el tratamiento antibiótico adecuado son siempre fundamentales para la resolución de todo absceso corneal. En este caso, el microorganismo pudo ser identificado

en forma rápida por espectrometría de masas, pero solo presuntivamente por pruebas bioquímicas convencionales. *D. pigrum* es un patógeno potencial para los humanos; sin embargo, su incidencia es desconocida por la dificultad de llegar a nivel de especie, por lo que podría estar subdiagnosticado. Los datos de la literatura y el presente caso respaldan el papel de esta bacteria como agente causal de infecciones oculares^{9,12,13}, a menudo de curso progresivo y destructivo, principalmente en pacientes de edad avanzada¹².

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.

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. Aguirre M, Morrison D, Cookson BD, Gay FW, Collins MD. Phenotypic and phylogenetic characterization of some *Gemella*-like organisms from human infections: Description of *Dolosigranulum pigrum* gen. nov., sp. nov. *J Appl Bacteriol.* 1993;75:608–12.
2. Christensen J, Ruoff K. General approaches to identification of aerobic gram-positive cocci. En: Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Richter S, Warnock D, editores. *Manual of Clinical Microbiology.* 11th edition. Washington DC: ASM Press; 2015. p. 350–3.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria.* 3rd edition Wayne, PA, EE.UU.: M45-A2; 2015.
4. Hall GS, Gordon S, Schroeder S, Smith K, Anthony K, Procop W. Case of synovitis potentially caused by *Dolosigranulum pigrum*. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1202–3.
5. Hoedemaekers A, Schülin T, Tonk B, Melchers W, Sturm P. Ventilator-associated pneumonia caused by *Dolosigranulum pigrum*. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3461–2.
6. Johnsen B, Rønning EJ, Onken A, Figved W, Jenum PA. *Dolosigranulum pigrum* causing biomaterial-associated arthritis. *APMIS.* 2010;119:85–7.
7. Lin J-C, Hou S-J, Huang L-U, Sun J-R, Chang W-K, Lu J-J. Acute cholecystitis accompanied by acute pancreatitis potentially caused by *Dolosigranulum pigrum*. *J Clin Microbiol.* 2006;44:298–9.
8. Laclaire L, Facklam R. Antimicrobial susceptibility and clinical sources of *Dolosigranulum pigrum* cultures. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:2001–3.
9. Monera-Lucas CE, Tarazona-Jaimes CP, Escolano-Serrano J, Martínez-Toldos JJ. Bilateral keratitis secondary to *Dolosigranulum pigrum* infection in a patient with HIV Infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2020, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2020.10.017>.
10. Nicola F. Queratitis infecciosa no viral: factores predisponentes, agentes etiológicos y diagnóstico de laboratorio. *Rev Argent Microbiol.* 2005;37:229–39.
11. Rocca MF, Prieto M, Almuzara M, Barberis C, Vay C, Viñes MP. Manual de interpretación de resultados de MALDI-TOF (Bruker Daltonics): Alternativas para la identificación de microorganismos. Buenos Aires: ANLIS; UBA; 2019 [consultado 1 Abr 2020]. Disponible en: <http://sgc.anlis.gob.ar/handle/123456789/614>.
12. Sampo M, Ghazouani O, Cadiou D, Trichet E, Hoffart L, Drancourt M. *Dolosigranulum pigrum* keratitis: A three-case series. *BMC Ophthalmol.* 2013;13:31.
13. Venkateswaran N, Kalsow C, Hindman H. Phlyctenular keratoconjunctivitis associated with *Dolosigranulum pigrum*. *Ocul Immunol Inflamm.* 2014;22:242–5.
14. Wainsztein R. Abscesos corneales. En: Chiaradía P, editor. *La córnea en apuros.* Ediciones Científicas Argentinas; 2006. p. 65–73.
15. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane LD. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991;173:697–703.