

Caso clínico

Ántrax fatal: primer caso humano documentado en Argentina de meningitis y bacteriemia

Valeria Manias^{a,*}, Alicia Nagel^a, Analía Mollerach^a, María Alejandra Mendosa^a, Claudia Ramos^a, Susana Morano^a, María Elena Nardín^a, Andrea Nepote^b, Diego Sauka^c, Graciela Benintende^c, Ramón Noseda^d, Emilce de los Angeles Méndez^a

^aSección de Microbiología. Laboratorio Central Hospital J. M. Cullen, Santa Fe. Argentina. ^bLaboratorio Central de la Provincia de Santa Fe. Argentina. ^cLaboratorio Insumos Bacterianos. Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola INTA, Castelar, Buenos Aires. Argentina. ^dLaboratorio Azul Diagnóstico S.A, Azul, Provincia de Buenos Aires. Argentina.

Recibido 12 de enero de 2017; aceptado 12 de septiembre de 2017

Resumen: El ántrax es una zoonosis causada por *Bacillus anthracis*. En humanos produce infecciones cutáneas, respiratorias, gastrointestinales y con menor frecuencia meningitis. Se reporta el primer caso en Argentina de meningitis y bacteriemia por *B. anthracis*. Se trata de un paciente adulto que comenzó con síntomas gripales e inflamación de ganglios axilares. A las 48 h ingresó al hospital con depresión del sistema nervioso central y traumatismo toracoabdominal derecho. La TAC reveló en el hemisferio cerebral izquierdo una masa bien definida. El paciente fue tratado empíricamente con meropenem y vancomicina. Falleció a las 48 h por shock refractario y paro cardiorrespiratorio. En los cultivos de las muestras de sangre y de líquido cefalorraquídeo se obtuvo desarrollo bacteriano el cual no fue posible identificar mediante pruebas bioquímicas. El aislamiento se derivó a centros de referencia donde se confirmó a nivel molecular el agente etiológico: *B. anthracis*. Este caso destaca la importancia de evaluar, en áreas endémicas, los factores epidemiológicos, ya que la presencia de síntomas gripales y ganglios inflamados en un paciente, puede enmascarar cuadros graves de meningitis y bacteriemia con desenlace fatal.

Palabras clave: ántrax, meningitis, bacteriemia, *Bacillus anthracis*.

Fatal anthrax: first human case with meningitis and bacteremia documented in Argentina

Abstract: Anthrax is a zoonosis caused by *Bacillus anthracis*. In humans produces skin, respiratory, gastrointestinal infections and, less frequently, meningitis. The first case in Argentina of meningitis and bacteremia due to *B. anthracis* is reported. He was an adult patient who started with flu-like symptoms and axillary lymph node inflammation which was treated as outpatient. Forty-eight hours later he was admitted to the hospital with depression of the central nervous system and thoracoabdominal trauma. The CT scan revealed a well defined mass in the left cerebral hemisphere. The patient was treated empirically with meropenem and vancomycin. He died at 48 hours due to refractory shock and cardiorespiratory arrest. Blood and cerebrospinal fluid cultures were positive for bacterial growth, but could not be identified by biochemical tests. Isolates were derived to laboratory reference centers where the etiological agent *B. anthracis* was confirmed by molecular means. This case highlights the importance of considering epidemiological factors in endemic areas, since the presence of flu-like symptoms and swollen lymph nodes in a patient can be announcing a meningitis and a bacteremia with fatal outcome.

Keywords: anthrax, meningitis, bacteremia, *Bacillus anthracis*.

* Correspondencia:
E-mail: valeriamanias@yahoo.com.ar

Introducción

El ántrax humano o carbunco se ha clasificado tradicionalmente en ántrax no industrial, adquirido por contacto con animales infectados o sus carcasas después de la muerte del animal, e industrial, cuando se debe al

procesamiento fabril de lanas, cueros, huesos u otros productos animales [1]. Además, se conoce que algunas aves rapaces y carroñeras, que consumen animales muertos por carbunco, pueden dispersarlo al transportar las esporas en sus cuerpos, picos y plumas; también se ha demostrado que las materias fecales de algunas de estas aves rapaces

pueden dispersar las esporas [2].

Existen tres formas clínicas de esta infección según la vía de adquisición: cutánea, por ingestión y por inhalación. La meningitis por ántrax puede desarrollarse como una complicación severa de cualquiera de estas tres formas [3,4]. El ántrax cutáneo se presenta después de lesiones leves en la piel o por picaduras de insectos, formándose una pequeña pápula que se ulcera produciendo al final una escara negruzca. El ántrax intestinal puede manifestarse con lesiones bucales, principalmente en lengua y amígdalas, o produciendo úlceras a lo largo del tracto digestivo en su forma gastrointestinal. El ántrax pulmonar se produce por inhalación de las esporas, que posteriormente son ingeridas por los macrófagos pulmonares. La enfermedad comienza con síntomas semejantes a los de una gripe severa y luego evoluciona rápidamente hasta producir un estado de shock, en el cual muere el 95 % de los afectados [3]. La meningoencefalitis por ántrax se caracteriza por presentar manifestaciones clínicas que incluyen malestar, cefalea intensa, mareos, fiebre, anorexia, vómitos, crisis convulsivas, agitación, desorientación y delirio. El líquido cefalorraquídeo (LCR) frecuentemente es hemorrágico y suele contener abundantes bacterias. El estado de coma se instala rápidamente. Raramente se realiza el diagnóstico antes del fallecimiento del paciente [5,6].

Las cepas virulentas de *Bacillus anthracis* producen toxinas y son capsuladas. Estas cepas poseen dos plásmidos relacionados con la virulencia, el plásmido pXO1, que codifica las toxinas, y el plásmido pXO2, que codifica la cápsula. Si bien actualmente el carbunco está controlado por los rigurosos esquemas de vacunación, continúa siendo endémico en algunas áreas del mundo, como es Argentina [7].

El objetivo de este trabajo fue describir el primer caso humano de meningitis y bacteriemia con desenlace fatal causado por *B. anthracis* en Argentina.

Caso clínico

Paciente masculino de 43 años de edad, residente de una zona rural de nuestro país (Departamento Las Colonias, provincia de Santa Fe, Argentina), caracterizada por condiciones ambientales y edafológicas del suelo que influyen sobre el mantenimiento y desarrollo del *B. anthracis* [8].

En abril de 2014 fue evaluado, en primera instancia, en su lugar de origen por presentar sintomatología gripal e inflamación de ganglios axilares. Inició tratamiento empírico con amoxicilina más ácido clavulánico.

A los dos días de tratamiento, ingresó al servicio de guardias y urgencias del Hospital "Dr. José M. Cullen" de la ciudad de Santa Fe en estado de coma, con depresión del sistema nervioso central. Se constató traumatismo toraco-abdominal derecho, como consecuencia de una caída de su propia altura, y una pequeña laceración en un dedo. Fue trasladado de inmediato al servicio de terapia intensiva sin respuesta ocular ni verbal pero con respuesta motora

reactiva, vía aérea limpia, hemodinámicamente estable y abdomen blando en hipocondrio derecho (Glasgow 6/15). Se ordena asistencia respiratoria mecánica y estudios complementarios de laboratorio y de diagnóstico por imágenes. Se indicó tratamiento empírico con meropenem (2 gr/día) y vancomicina (1 gr/día). La radiografía de tórax mostró derrame pleural derecho y la tomografía axial computarizada (TAC) abdominal reveló líquido libre perihepático. La TAC de cráneo mostró una masa bien definida en el lóbulo occipital izquierdo.

Los resultados de laboratorio se muestran en la tabla 1. Las muestras de sangre para hemocultivos fueron monitoreadas mediante Bactec™ 9120 ((Becton Dickinson and Company, Maryland, USA), obteniéndose crecimiento a las 24 h de incubación. El cultivo del LCR se procesó según los métodos convencionales [9]. En la coloración de Gram se observaron 1-2 leucocitos/campo de 1000X y bacilos largos grampositivos agrupados en cadenas (Figura

Tabla 1. Resultados de los estudios de laboratorio realizados.

Sangre periférica	
Leucocitos	40,32 x 10 ³ /mm ³
Hemáties	5 x 10 ⁶ /mm ³
Hematocrito	44,50 %
Hemoglobina	12,4 g/dL
Plaquetas	115 x 10 ³ /mm ³
Lactato	3,2 mmol/L
pH	7,33
pCO ₂	37,2 mmHg
pO ₂	97,7 mmHg
Exceso de base (EB)	5,9 mEq/L
Bicarbonato	19,2 mEq/L
SO ₂	97,10 %
Cultivo para gérmenes comunes	Positivo (24 horas)
Serología para Hepatitis B, C y sífilis	Negativas
LCR	
pH	6,87
Color	Xantocrómico
Aspecto	Turbio
Recuento celular	Leucocitos 4500/mm ³ (52% PMN, 48% MN) Hemáties 3/mm ³
Glucorraquia	11 mg %
Proteinorraquia	1.900 mg %
Lactato	19,1 mmol/L
Cultivo para gérmenes comunes	Positivo (24 horas)



Figura 1. Coloración de Gram del líquido cefalorraquídeo. Bacilos largos grampositivos agrupados en cadenas (1000X).

1). En todas las muestras se obtuvo desarrollo de colonias grandes, opacas, sin pigmento y de bordes irregulares; la coloración de Gram reveló bacilos grampositivos esporulados, que fueron identificados mediante el método automatizado BD Phoenix™ System (Becton Dickinson and Company, Maryland, USA) como *B. thuringiensis*. Se realizaron pruebas bioquímicas adicionales para confirmar esta identificación como producción de catalasa y la arginina decarboxilasa (positivas) y motilidad (negativa).

Ante la ausencia de resultados definitivos, el aislado se derivó al Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola de INTA-Castelar, donde se verificó que el aislamiento no correspondía a *B. thuringiensis*, y ante la sospecha de que se tratara de *B. anthracis*, el estudio se continuó en el Laboratorio Azul Diagnóstico, S.A., Azul, Provincia de Buenos Aires, donde se realizaron pruebas de identificación molecular.

La extracción de ADN genómico se realizó por ebullición durante 10 minutos a 100 °C, a partir de una suspensión al 0,5 Mc Farland de un cultivo de 24 h del aislado en buffer Tris, que posteriormente se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos para eliminar restos celulares. El sobrenadante fue trasvasado a un tubo nuevo y almacenado a -20 °C hasta

su utilización en la reacción de amplificación. Se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para amplificar el gen *pagA*, que codifica al antígeno protector en el plásmido pXO1 y el gen *capA* del operón *cap*, que codifica la biosíntesis de la cápsula en el plásmido pXO2 (Tabla 2). Se incluyó un control negativo, donde el templado de ADN se reemplazó por agua y como control positivo se utilizó una cepa de *B. anthracis* obtenida de cultivos puros de aislamientos procedentes de animales, perteneciente al Laboratorio Azul Diagnóstico, S.A. Para el control de ADN se amplificó una región parcial del gen 16S del ARN ribosomal de la cepa control de *B. anthracis* (tamaño del fragmento esperado: 639 bp) y el ADN de una cepa de *Staphylococcus aureus*. El ADN del aislado de la muestra clínica se procesó por duplicado. Los oligonucleótidos y el protocolo de PCR usados fueron los recomendados por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) [7,10,11].

El análisis de los productos de amplificación se realizó por electroforesis en un gel de agarosa en presencia de 0,5 µg/mL de bromuro de etidio. Se analizaron alícuotas de

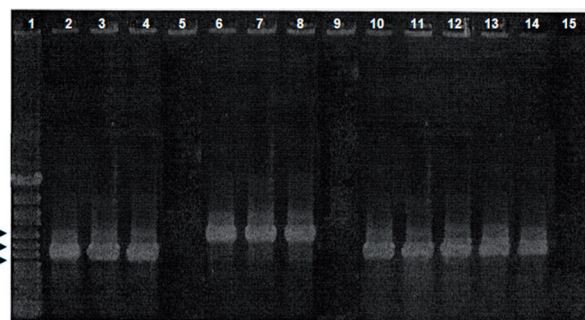


Figura 2. Productos de amplificación de los genes *pagA* (plásmido pXO1) y *capA* (plásmido pXO2). Carril 1: Marcador de PM 1 Kb. Carriles 2, 3 y 4: amplificación del plásmido pXO1 (596bp) → Carril 2: cepa *B. anthracis* Laboratorio Azul Diagnóstico, S.A.; carriles 3 y 4: cepa en estudio. Carril 5: control negativo. Carriles 6, 7 y 8: amplificación del plásmido pXO2 (846bp) → Carril 6: cepa *B. anthracis* Laboratorio Azul Diagnóstico, S.A.; carriles 7 y 8: cepa en estudio. Carril 9: control negativo. Carril 10: ADN de región parcial del gen 16S del ARNr (639bp). Carriles 11 y 12: cepa en estudio. Carriles 13 y 14: ADN *S. aureus*. Carril 15: control negativo.

10 µL de los amplicones a 10 V/cm por espacio de 1 hora. Finalizada la electroforesis, los gels fueron visualizados en un transiluminador UV. Las imágenes resultantes se registraron mediante cámara digital utilizando un filtro naranja. La corrida se realizó en presencia de un marcador

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados y tamaño de los fragmentos para la amplificación de los genes *pagA* y *capA* de los plásmidos pXO1 y pXO2, respectivamente.

Gen blanco	Cebador	Secuencias (5' - 3')	Tamaño fragmento	Nº acceso GenBank
Plásmido pXO1 gen <i>pagA</i>	PA5:	TCCTAACAC TAACGAAGTCG	596pb	AF306782
	PA8:	GAGGTAGAAGGATATACGGT		
Plásmido pXO2 gen <i>capA</i>	CAP1234:	CTGAGCCATTAATCGATATG	846pb	AF188935
	CAP1301:	TCCCACTTACGTAATCTGAG		

de tamaño molecular de 1 Kb (Cien Marker) (Figura 2).

Los amplicones fueron purificados y enviados para su secuenciación al Instituto de Biotecnología (INTA, Castelar). La secuencia consenso, obtenida a partir del ADN de la muestra clínica, fue de 841 pb, la cual se analizó y comparó con las bases de datos existentes en la web. En diferentes situaciones (confirmación de la identidad y especificidad de los oligonucleótidos cebadores utilizados, análisis de los resultados de reacciones de secuenciación de ADN) se recurrió a las utilidades de los programas Blast® 2 sequences 2.2.14 (Align two sequences) y Blastn® disponibles en la página web del NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), y del programa NTISuite (Version 6.0.3). El análisis correspondió a una secuencia parcial del gen 16S del ARNr de *Bacillus* sp., la cual está indizada bajo el número MF479274 en la base de datos del GenBank.

Como el resultado no fue concluyente, se consideró la inoculación en animales como complemento para la recuperación de *B. anthracis*. Se realizaron entonces estudios en animales de laboratorio bajo condiciones apropiadas de cuidado y mantenimiento, con personal calificado para tal fin [12]. Se utilizaron 3 ratones albinos suizos de la cepa CF1, procedentes del Laboratorio del Instituto Charles Rivers (Charles River Institute Laboratory), reproducidos por endocria en el bioterio del Laboratorio Azul Diagnóstico S.A., de los cuales se inocularon dos, quedando uno como testigo. Se inyectaron 0,3 cm³ de una suspensión del cultivo del aislado, con una densidad igual a 0,5 Mc Farland, en forma subcutánea. Los animales se controlaron cada 2 h, muriendo por “muerte súbita” a las 32 h de la inoculación. La necropsia reveló hepatoesplenomegalia manifiesta y sangre incoagulable, observándose en el punto de inoculación edema gelatinoso sanguinolento. Del bazo se logró aislar nuevamente por retrocultivo *B. anthracis* [13,14].

Se determinó la sensibilidad a los antimicrobianos penicilina, ampicilina, ciprofloxacina, tetraciclina, gentamicina, cloranfenicol, eritromicina y trimetoprim sulfametoxazol, utilizando la técnica de difusión con discos de papel según la técnica de Kirby y Bauer de acuerdo a las recomendaciones del Comité Nacional para Estándares Clínicos y de Laboratorio (NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards) [15] resultando resistente sólo a trimetoprim sulfametoxazol.

Tanto la muestra como la cepa aislada se manipularon en cabina de bioseguridad clase 2, y se realizó la notificación inmediata del caso al Departamento de Zoonosis y Epidemiología de la Provincia de Santa Fe.

El paciente evolucionó con midriasis bilateral arreactiva sin reflejos neurológicos. Se le realizó un electroencefalograma, el cual evidenció trazado plano y se diagnosticó muerte encefálica. Finalmente el paciente falleció dentro de las 48 h del ingreso al hospital a causa de shock refractario y paro cardiorrespiratorio.

Discusión y conclusiones

Este caso coincide con el publicado por Ossa y col [16] quienes describieron 5 casos de ántrax en personas con antecedentes de haber trabajado con ganado vacuno muerto por causa desconocida, donde una de ellas presentó meningitis hemorrágica pero sin signos meníngeos. También concuerda con las publicaciones de Gürçan *et al* [17] y Ponce *et al* [18] con respecto al inmediato desenlace fatal de los pacientes, a pesar de haber sido tratados con la terapia antimicrobiana específica.

El paciente de este caso no presentó ninguna lesión ulcerosa, lo que difiere de lo documentado por Maguiña *et al* [19] y Ponce *et al* [18], donde los casos reportados comenzaron con necrosis central de heridas cutáneas.

No se pudo determinar con certeza la puerta de entrada de las esporas, aunque el paciente presentaba una pequeña laceración en un dedo. Dado que el paciente se dedicaba al cuidado de ganado vacuno, y había manipulado cueros para la fabricación de lazos, se consideró también la posible inhalación de esporas como vía de entrada.

La meningitis por ántrax es usualmente secundaria a la septicemia [8]; sin embargo, en este caso no se pudo aseverar que se tratara de una meningitis primaria, debido a que si bien el paciente ingresó con depresión del sensorio, la bacteria también se aisló en hemocultivo.

La situación epidemiológica del carbunco rural en Argentina no ha variado entre 1977-2015 [20], pero han disminuido considerablemente los casos de carbunco dérmico debido al control sanitario, diagnósticos confiables y vacunación eficiente y económica. Mientras no se tomen medidas eficaces tales como: vacunación sistematizada obligatoria, eliminación de cadáveres en forma adecuada y evaluación de indicadores epidemiológicos que monitoreen la evolución de la enfermedad, no se podrá controlar y eventualmente erradicar el carbunco rural en la Argentina. Se deben sustentar estas acciones en el tiempo para observar sus logros epidemiológicos [21]. Hasta el momento, no se han encontrado en nuestro país registros de meningitis o bacteriemia por *B. anthracis*, razón que ameritó el reporte de este caso.

Un hecho a destacar es que la meningitis por *B. anthracis* es hemorrágica y extremadamente rara [5], y debe ser diferenciada de la hemorragia subaracnoidea por un accidente cerebrovascular; tomando en cuenta que la TAC no distingue la causa de la hemorragia, no se debería descartar la realización de una punción lumbar para evitar diagnósticos erróneos.

Se rescata en este caso la importancia de la anamnesis respecto a los factores epidemiológicos de los pacientes para sospechar la existencia de infección por este agente, principalmente en meningitis y bacteriemias, dada la gravedad del cuadro clínico.

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Fabián Tedeschi la desinteresada

colaboración prestada en la corrección final del manuscrito.

Referencias

- World Health Organization. World Organization for Animal Health. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Anthrax in humans and animals. 4th edition. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2008. Disponible en: <http://www.who.int/csr/resources/publications/AnthraxGuidelines2008/en/>. Acceso Abril de 2017.
- Saggese MD, Nosedá RP, Uhart MM, Sharon LD, Ferreyra H, Romano MC, *et al.* First detection of *Bacillus anthracis* in feces of free-ranging raptors from Central Argentina. *J Wildl Dis.* 2007; 43:136-41.
- Molineri AI, Signorini ML, Tarabla HD. Conocimiento de las vías de transmisión de las zoonosis y de las especies afectadas entre los trabajadores rurales. *Rev Argent Microbiol.* 2014; 46:7-13.
- Carrada-Bravo T. Antrax: diagnóstico, patogenia, prevención y tratamientos. Avances recientes y perspectivas. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2001; 14:233-48.
- Sejvar JJ, Tenover FC, Stephens DS. Management of anthrax meningitis. *Lancet Infect Dis.* 2005; 5:287-95.
- Khoddami M, Shirvani F, Esmaeili J, Beladimogaddam N. Two rare presentations of fatal anthrax: meningeal and intestinal. *Arch Iran Med.* 2010; 13:432-5.
- Pavan ME, Cairó F. Estudio molecular de cepas argentinas de *Bacillus anthracis*. *Rev Argent Microbiol.* 2007; 39:77-80.
- Rojas MC, Vázquez PM, Verdier M, Nosedá R. Componentes del paisaje que favorecen la aparición de carbunco en la Pampa deprimida. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2011; 30:897-909.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology.* 9th edition. Washington, DC: ASM Press; 2007.
- Ogawa H, Fujikura D, Ohnuma M, Ohnishi N, Hang'ombe BM, Mimuro H, *et al.* A novel multiplex PCR discriminates *Bacillus anthracis* and its genetically related strains from other *Bacillus cereus* group species. *PLoS ONE.* 2015; 10(3):e0122004. doi:10.1371/journal.pone.0122004.
- World Organization for Animal Health. Chapter 2.1.1. Anthrax. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2017.* Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.01_ANTHRAX.pdf. Acceso abril 2017.
- Committee for the update of the guide for the care and use of laboratory animals. Institute for Laboratory Animal Research. Division on Earth and Life Studies. Guide for the care and use of laboratory animals of the Institute of Laboratory Animal Research. Washington, DC: The National Academies Press; 2011. Disponible en: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>. Acceso abril 2017.
- Nosedá RP, Mock M, Leux M, Cordeviola JM, Fiscalini B, Bigalli C, *y col.* Carbunco bovino: su infección al humano, diagnóstico por métodos tradicionales y caracterización molecular (PCR). *Vet Argent.* 2002; 19:581-90.
- Jackson PJ, Walthers EA, Kalif AS, Richmond KL, Adair DM, Hill KK, *et al.* Characterization of the variable-number tandem repeats in *vrrA* from different *Bacillus anthracis* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63:1400-5.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 7th ed. Document M100-S13. Wayne PA, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2003.
- Ossa AG, Schneider CH, Araya CJ, Agüero SS. Carbunco meníngeo y cutáneo en una región agrícola. *Rev Chil Infectol.* 2001; 18:300-3.
- Gürçan S, Akata F, Kuloğlu F, Erdoğan S, Tuğrul M. Meningitis due to *Bacillus anthracis*. *Yonsei Med J.* 2005; 46:159-60.
- Ponce M, Mendoza A, Seas C. A 45-year-old farmer with an ulcerative rash, shock, and hemorrhagic meningitis. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 85:792.
- Maguiña C, Flores Del Pozo J, Terashima A, Gotuzzo E, Guerra H, Vidal JE, *et al.* Cutaneous anthrax in Lima, Peru: retrospective analysis of 71 cases, including four with a meningoencephalic complication. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2005; 47:25-30.
- Nosedá RP. Situación del carbunco rural en la Argentina 2015. *Boletín Asociación Argentina de Microbiología.* 2016; 212:15-18.
- Bales ME, Dannenberg AL, Brachman PS, Kaufmann AF, Klatsky PC, Ashford DA. Epidemiologic response to anthrax outbreaks: field investigations, 1950–2001. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8:1163-74.