

“*Aerococcus urinae*”: un patógeno poco frecuente en infecciones del tracto urinario, asociado a pacientes con patología urinaria subyacente

Aerococcus urinae: a rare pathogen in urinary tract infections, associated with patients with underlying urinary pathology

Pérez S., Recio JL, Peña A., Cabrera JL., Chueca N., García F.
Microbiología Clínica, Hospital Universitario San Cecilio. Granada

Resumen

Introducción: *Aerococcus urinae* es un patógeno urinario poco frecuente que ha sido asociado en la bibliografía a pacientes en la tercera edad, con patología urinaria subyacente. La mala identificación mediante pruebas bioquímicas convencionales, su baja tasa de aislamiento y la similar morfología con otros microorganismos considerados como flora normal en el tracto urinario, hacen de este microorganismo un gran desconocido.

El objetivo de este trabajo fue determinar la implicación clínica de *Aerococcus urinae* en pacientes con infección urinaria, estudiando la relación existente descrita en la bibliografía con pacientes en la tercera edad, con patología urinaria subyacente. Asimismo, debido a su infradiagnóstico en infección urinaria (ITU), se evaluó la utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker) como modelo diagnóstico confiable en el laboratorio de microbiología.

Material y métodos: Se realizó un estudio prospectivo en pacientes con infección urinaria desde mayo a septiembre de 2014. Se estudiaron los perfiles de sensibilidad a los antimicrobianos frecuentemente utilizados en infección urinaria. Se registraron los datos clínicos más importantes de los pacientes con un recuento positivo para *A. urinae*. **Resultados:** De las 9261 muestras de orina analizadas, 1513 muestras resultaron tener un recuento mayor a 100.000 UFC/mL. *A. urinae* fue aislado en 3 casos, y la identificación por MALDI-TOF fue fiable a nivel de género y especie (score ≥ 2), siendo contrastada mediante secuenciación ARNr 16S. Todos los pacientes que desarrollaron infección urinaria por *A. urinae*, fueron pacientes en la tercera edad con una patología subyacente, siendo en todos los casos este microorganismo resistente a trimetropim/sulfametoxazol.

Conclusiones: La implicación de *A. urinae* como patógeno urinario, en pacientes con patología urinaria de base, la dificultad en su diagnóstico, y la alta tasa de resistencia de este microorganismo a trimetropim/sulfametoxazol, hacen recomendable establecer una especial atención en los métodos diagnósticos utilizados.

Abstract

Introduction: *Aerococcus urinae* is an uncommon urinary tract pathogen that has been associated in the literature for older patients with underlying urinary pathology. Misidentification by conventional biochemical tests, their low rate of isolation and similar morphology to other microorganisms considered as normal flora in the urinary tract, makes this organism a great unknown.

The aim of this investigation is to determine the implication of *Aerococcus urinae* as the cause of urinary tract infections, studying the relationship described in literature in elderly patients with underlying urinary pathology.

Material and methods: A prospective study on patients with urinary infection, from May to September 2014 was performed. Urine-cultures with a significant bacteria and suspicious of *A. urinae*, were identified by means of MALDI-TOF system, and contrasted with ARNr 16S sequencing. Profiles of antimicrobial susceptibility frequently used in urinary tract infection were studied. Clinical data for patients with positive urine cultures for *A. urinae* were registered.

Result: 9261 urine samples were analyzed, 1513 samples had counts greater than 100,000 CFU / mL. *A. urinae* was isolated in 3 cases, and identification by MALDI-TOF was reliable genus and species level (score ≥ 2), being proven by sequencing 16S rRNA. All patients who developed urinary infection by *A. urinae* were elderly patients with underlying pathology, and this microorganism resistant to trimethoprim / sulfamethoxazole.

Conclusions: The *A. urinae* overt implication as urinary pathogen, the high rate of resistance of this organism to trimethoprim / sulfamethoxazole, and its difficulty to diagnose, urge to pay special attention to the diagnostic methods applied.

Palabras clave: Infección del tracto urinario, patología urinaria subyacente, *aerococcus urinae*, trimetropim-sulfametoxazol, MALDI-TOF

Keywords: Urinary tract infection, underlying urinary pathology, *aerococcus urinae*, difficult diagnose, trimetropim-sulfamethoxazole, MALDI-TOF

INTRODUCCIÓN

La implementación de la espectrometría de masas MS MALDI-TOF® Autoflex III (Bruker Daltonics) (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) en el diagnóstico etiológico en el laboratorio de microbiología, ha permitido la identificación de nuevos microorganismos de difícil diagnóstico a través de métodos tradicionales. Este es el caso de *Aerococcus urinae* (1), microorganismo que se ha relacionado con bacteriemia, endocarditis, infección urinaria, pielonefritis, meningitis, infección de piel y partes blandas, espondilodiscitis, linfadenitis, artritis y peritonitis. Actualmente este género engloba a 8 especies diferentes; *Aerococcus viridans*, *A. urinaeequi*, *A. christensenii*, *A. urinaehominis*, *A. sanguinicola*, *A. suis*, *A. vaginalis* y *A. urinae*, siendo esta la principal especie causante de ITU.

La identificación clásica, mediante sistemas convencionales basados en características bioquímicas, es a menudo errónea (2,3), por lo que probablemente este microorganismo, causante de diferentes infecciones en el ser humano, se pueda estar infradiagnosticando.

Por todo ello, el objetivo de este estudio se centro en demostrar la implicación clínica real de *A. urinae* como agente causante de infección urinaria a través de la espectrometría de masas MALDI-TOF, la técnica permite la detección del tiempo de vuelo mediante un detector de iones TOF (Time-Of-Flight) para las diferentes biomoléculas del microorganismo. La ionización producida por la irradiación de un laser pulsado sobre estas biomoléculas permite medir el tiempo de vuelo generándose un espectro representado como la intensidad de los iones frente a la relación masa/carga (m/z) que es comparado con una amplia librería de espectros de referencia generados para otros microorganismos. Se obtiene un score de identificación de 0 a 3 en función de la fiabilidad en la identificación obtenida (identificación fiable a nivel de género y especie score ≥ 2 , identificación fiable únicamente a nivel de género score de 1.7 a 1.9, identificación no fiable score <1.7). Asimismo, la identificación fue comparada con otras técnicas de diagnóstico clásico que utilizan pruebas bioquímicas, como Api 20 Strep® (Biomérieux) o WIDER® (Soria Melguizo). La lectura automatizada mediante el sistema WIDER utiliza para la identificación de microorganismos e interpretación de la sensibilidad antibiótica, un analizador de imágenes por visión artificial. Los paneles para lectura automática incorporan diferentes pruebas bioquímicas en diferentes pocillos y distintas concentraciones de diferentes antibióticos para el estudio de la concentración mínima inhibitoria (CMI). La identificación utiliza pruebas convencionales y cromogénicas modificadas y se basa en la detección de cambios de PH, utilización de sustratos y crecimiento en presencia de agentes antimicrobianos después de 16-48 horas de incubación a 35°C.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron de forma prospectiva, todas las orinas recibidas en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada (España), desde Mayo a Septiembre de 2014. En este periodo se analizaron 9261 muestras de orina, a las cuales se le solicitaba la realización de urocultivo. Inicialmente se realizó un screening de orina basado en citometría de flujo mediante el sistema UF1000i, para el recuento de leucocitos, bacterias y levaduras en orina. Todas las muestras que resultaron positivas para cualquiera de estos parámetros fueron inoculadas en agar sangre (AS) y agar MacConkey y se incubaron a 37°C durante 18-24 horas, para posterior recuento.

Todos los aislamientos con un recuento mayor a 100.000 UFC/mL, en las que se aislaba una colonia alfa-hemolítica en cultivo puro, se sometieron a identificación directa de la colonia, por espectrometría de masas MALDI-TOF, añadiéndose 1µl de matriz (ácido-alfa-ciano-4-hidroxicinámico) para la realización de una lectura automatizada en el sistema MALDI-TOF, el cual posee un software (FlexAnalysis Biotyper 3.3), para el análisis de los diferentes espectros (perfiles proteínicos con rango de masas de 100-1000 Da). Asimismo, los aislados fueron contrastados con secuenciación ARNr 16S. Además, todas las muestras en las que fue aislado *A. urinae*, fueron identificadas de forma paralela a nivel de especie mediante WIDER y Api 20 Strep®.

El perfil de sensibilidad a antimicrobianos se realizó mediante E-Test en Müller-Hinton (MH), utilizando un inóculo de 0.5 McF.

A todos los pacientes diagnosticados clínicamente con infección urinaria por *A. urinae* se les registraron los siguientes datos clínicos: edad, sexo, antecedentes generales, presencia de patología urinaria subyacente, síndrome miccional, leucocitos y nitritos en orina, tratamiento antibiótico y evolución clínica.

RESULTADOS

De las 9261 muestras de orina analizadas, 1513 muestras resultaron tener un recuento mayor a 100.000 UFC/mL. *A. urinae* fue aislado en 3 casos. La colonia fue identificada en todos los casos mediante Api 20 Strep® como *Aerococcus viridans* tipo 2, mientras que mediante el sistema Wider® se identificó como *Streptococcus anginosus*. La identificación mediante espectrometría de masas MALDI-TOF como *A. urinae* fue contrastada con secuenciación ARNr 16S en todos los casos.

Los datos clínicos quedan reflejados en la tabla 1. Todos los pacientes mostraron una evolución clínica favorable, al tratamiento.

Caso clínico	Caso 1	Caso 2	Caso 3
Edad (Años)	62	77	78
Sexo (V/M)	V	V	M
Cuadro clínico (P/NP)			
Síndrome miccional	P	P	p
Patología urinaria subyacente	P(a)	P(b)	P(c)
Patología cardiovascular	P(d)	P(e)	P(f)
Nº Leucocitos/ μ L	965	102	60.7
Nitritos(POS/NEG)	NEG	NEG	NEG
Nº Bacterias/ μ L	11231.7	42131.2	32123.2
CMI(mg/L)			
Penicilina	<0.016	<0.016	<0.016
Fosfomicina	3	8	3
Trimetropim-Sulfametoxazol	>32	>32	>32
Gentamicina	3	4	3
Ciprofloxacina	1	3	1
Tratamiento antibiótico	FOS	AMX/CLAV	CIP

V: Varón; M: Mujer; P: Presencia; NP: No presencia; POS: Positivo; NEG: Negativo; R: Resistente; S: Sensible; AMX/CLAV: Amoxicilina-Clavulánico; FOS: Fosfomicina; CIP: Ciprofloxacina; ND: No descrito; (a): Estenosis uretral; (b): Hiperplasia benigna de próstata; (c): Pérdida del control vesical; (d): Hipertensión arterial; (e): Hipertensión arterial con cardiopatía hipertensiva que desencadena en ictus; (f): Cardiopatía hipertensiva.

Tabla 1. Resumen de los 3 casos con urocultivo con recuento positivo para *Aerococcus urinae*.

DISCUSIÓN

La implicación de *A. urinae* como agente causante de ITUs (2,4,5,6,7), está ampliamente referida en la literatura. Sin embargo, se ha asociado a una baja prevalencia, y los estudios muestran que *A. urinae* presenta una tasa de aislamiento de todas las muestras enviadas al laboratorio que varía entre un 0.25 – 0.8 % 8, hecho que con mucha probabilidad se deba a un infradiagnóstico microbiológico, ya que la utilización de técnicas clásicas basadas en características bioquímicas no son siempre concluyentes (2,3).

Resulta cuanto menos llamativa, la relación etiológica de *A. urinae* reflejada en la bibliografía con pacientes en la tercera edad, que a su vez, presentan con gran frecuencia cuadros hipertensivos con una patología urinaria subyacente (2,4,5,6,9,10). En nuestro estudio todos nuestros pacientes eran pacientes en la tercera edad y presentaban una patología urinaria subyacente. Recientemente ha sido demostrada la implicación de *A. urinae* en la formación de biopelículas en sangre (11), hecho que pone de manifiesto en estos pacientes un posible riesgo de endocarditis infecciosa.

Aunque actualmente no existe un comité que establezca puntos de corte de sensibilidad antibiótica para *A. urinae*, ésta debe inferirse utilizando puntos de corte establecidos para estreptococos del grupo viridans (12). *A. urinae* se considera con alta frecuencia sensible a penicilina en concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) inferiores a 0.25 mg/L y todos nuestros aislados tuvieron una CMI inferior a 0.16 mg/L. Asimismo, como ocurre en el caso de los estreptococos del grupo viridans, el uso de un aminoglucósido en monoterapia, para tratar a especies de este género, es poco efectivo. Sin embargo, el uso combinado con un β -lactámico, en cepas con bajos niveles de resistencia a gentamicina (CMI < 128 mg/L) aumenta su actividad, debido a la acción sinérgica de ambos (13). En todos nuestros aislados existió una resistencia de bajo nivel a gentamicina (1-3 mg/L). Otros antibióticos como la fosfomicina, utilizada con frecuencia en las infecciones del tracto urinario, demostraron ser efectivos. Nuestros aislados tuvieron un bajo nivel de resistencia a fosfomicina (CMI entre 3-8 mg/L), estando descrita en la bibliografía una CMI 90 de todos los aislados de *A. urinae* en torno a 32 mg/L, utilizando como punto de corte el establecido para enterobacterias (debido a la inexistencia de puntos de corte para estreptococos del grupo viridans) (14). En consonancia con otros estudios publicados, *A. urinae* presentó una alta resistencia a fluoroquinolonas, todos nuestros aislados tuvieron una CMI por encima de 1 (1-3 mg/L), siendo sensible con CMIs inferiores a 0.5 mg/L (12). Un tratamiento antibiótico alternativo en pacientes alérgicos a penicilinas o a fluoroquinolonas, como trimetropim-sulfametoxazol, recomendado por la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de Estados Unidos y la Sociedad Europea de Microbiología y Enfermedades Infecciosas para cistitis o pielonefritis (15), podría desencadenar con alta probabilidad un fracaso terapéutico. *A. urinae* presenta con gran frecuencia resistencia a éste antibiótico. *A. urinae* presentó una CMI por encima del límite de detección de resistencia mediante E-Test (CMI > 32 mg/L) en todos nuestros aislados. Por consiguiente, la amoxicilina o fosfomicina como terapia alternativa (12) serían antibióticos adecuados en el tratamiento de las infecciones urinarias por *A. urinae*.

En nuestro estudio destacamos la mala identificación bioquímica a nivel de especie realizada por el sistema API 20 Strep[®], mediante el cual todos los aislamientos confirmados como *A. urinae* se clasificaron como *Aerococcus viridans* tipo 2, o los sistemas automatizados tipo Wider[®] que lo identifican como *Streptococcus anginosus*. Ninguno de estos sistemas contemplaba codificación numérica para la identificación de *A. urinae*. Debido a ello, recomendamos que, tras una sospecha de aislamiento se realice una tinción de Gram, pues a diferencia de otros Estreptococos del grupo viridans, *A. urinae* conforma agregados en tétradas. Para una identificación final más exhaustiva a nivel de especie existen pruebas bioquímicas diferenciales de *A. urinae* descritas en la bibliografía, *A. urinae* es LAP positivo y PYR negativo, siendo estas dos pruebas bioquímicas claves en

el diagnóstico diferencial con otros Estreptococos alfa-hemolíticos como *A. viridans* tipo 2 o *S. anginosus*.

La baja prevalencia que se ha descrito para este microorganismo puede también deberse a que, a su vez *A. urinae* guarda una gran similitud en el diagnóstico a primera vista con otras colonias consideradas microbiota habitual del tracto genitourinario, por lo que subrayamos que su identificación podría estar siendo subestimada en la mayor parte de los laboratorios de microbiología clínica.

Existen técnicas de identificación de microorganismos cada vez más potentes, como la espectrometría de masas MALDI-TOF, avaladas en la bibliografía⁸ por ser herramientas eficaces en la identificación rápida si se trata de microorganismos de difícil diagnóstico. Actualmente, la espectrometría de masas MALDI-TOF esta teniendo cada vez una mayor presencia en el diagnóstico microbiológico de rutina en hospitales de referencia, debido a su gran rapidez, sensibilidad y especificidad. En nuestro estudio todos nuestros aislados fueron filiados de manera correcta mediante ésta técnica, con un score de identificación > de 2 y confirmados como *A. urinae* mediante PCR.

CONCLUSIONES

En resumen, presentamos la primera serie descrita de 3 casos clínicos de infección urinaria por *A. urinae* en España, presentando una prevalencia del 0,001%. Creemos que pese a su baja tasa de aislamiento, se deben extremar las precauciones para no subestimar la presencia de este microorganismo como agente causante de ITU, y recomendamos la tecnología MALDI-TOF como la mejor herramienta para su identificación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Christensen JJ, Korner B, Casals JB, Pringler N. *Aerococcus*-like organisms: use of antibiograms for diagnostic and taxonomic purposes. *J Antimicrob Chemother.* 1996;38:253-8.
- Cattoir V, Kobal A, Legrand P. *Aerococcus urinae* and *Aerococcus sanguinicola*, two frequently misidentified uropathogens. *Scand J Infect Dis.* 2010; 42:775-80.
- Grude N, Jenkins A, Tveten Y, Kristiansen B-E. Identification of *Aerococcus urinae* in urine samples. *Clin Microbiol Infect.* 2003; 9:976-9.
- Schuur PM, Kasteren ME, Sabbe L, Vos MC, Janssens MM, Buiting AG. Urinary tract infections with *Aerococcus urinae* in the south of The Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1997; 16:871-5.
- Sierra-Hoffman M, Watkins K, Jinadatha C, Fader R, Carpenter JL. Clinical significance of *Aerococcus urinae*: a retrospective review. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005; 53:289-92.
- Shelton-Dodge K, Vetter EA, Kohner PC, Nyre LM, Patel R. Clinical significance and antimicrobial susceptibilities of *Aerococcus sanguinicola* and *Aerococcus urinae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 70:448-51.
- Murray TS, Muldrew KL, Finkelstein R, Hampton L, Edberg SC, Cappello M. Acute pyelonephritis caused by *Aerococcus urinae* in a 12-year-old boy. *Pediatr Infect Dis J.* 2008 ; 27:760-2.
- Rasmussen M. *Aerococci* and *aerococcal* infections. *J Infect.* 2013; 66: 467-74.
- Christensen JJ, Vibits H, Ursing J, Korner B. *Aerococcus*-

- like organism, a newly recognized potential urinary tract pathogen. *J Clin Microbiol.* 1991; 29:1049–53.
10. Christensen JJ, Korner B, Kjaergaard H. *Aerococcus*-like organism--an unnoticed urinary tract pathogen. *APMIS.* 1989; 97:539–46.
 11. Shannon O, Mörgelin M, Rasmussen M. Platelet activation and biofilm formation by *Aerococcus* *urinae*, an endocarditis-causing pathogen. *Infect Immun.* 2010; 78:4268–75.
 12. Rasmussen, M. *Aerococcus*: an increasingly acknowledged human pathogen. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2015. doi:10.1016/j.cmi.2015.09.026.
 13. Skov, R., Christensen, J. J., Korner, B., Frimodt-Møller, N. & Espersen, F. In vitro antimicrobial susceptibility of *Aerococcus* *urinae* to 14 antibiotics, and time-kill curves for penicillin, gentamicin and vancomycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 48:653–658
 14. Hirzel, C. et al. In vitro susceptibility of *Aerococcus* *urinae* isolates to antibiotics used for uncomplicated urinary tract infection. *J. Infect.* 2015; 71:395–397
 15. Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG, Moran GJ, Nicolle LE, Raz R, Schaeffer AJ, Soper DE . International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Infect Dis.* 2011;52:e103–120.