



PREVENCIÓN, CONTROL DE INFECCIONES Y USO APROPIADO DE ANTIMICROBIANOS EN ATENCIÓN HOSPITALARIA

TEMA 7. LABORATORIO DE REFERENCIA PARA TIPADO MOLECULAR DE PATÓGENOS NOSOCOMIALES Y DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS DE INTERÉS SANITARIO EN ANDALUCÍA.

Módulo 1a. CONTROL DE INFECCIONES

TEMA 7: LABORATORIO DE REFERENCIA PARA TIPADO MOLECULAR DE PATÓGENOS NOSOCOMIALES Y DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS DE INTERÉS SANITARIO EN ANDALUCÍA.

Autores: Álvaro Pascual (Director), Lorena López Cerero, Felipe Fernández Cuenca y Jesús Rodríguez Baño.

Unidad Clínica intercentros de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Campus Macarena). HHUU Virgen Macarena-Virgen del Rocío. Sevilla.

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Las infecciones nosocomiales ocasionan un importante aumento de la morbilidad y mortalidad además de un incremento importante de los tiempos de estancia hospitalaria y de los costes asociados a la misma. En el año 2011, la prevalencia de infecciones nosocomiales en Andalucía fue de 7,4, frente al 7,1 en España y el 5,7 en el Hospital Universitario Virgen Macarena. Los datos históricos desde 2003 se detallan en la figura 1.

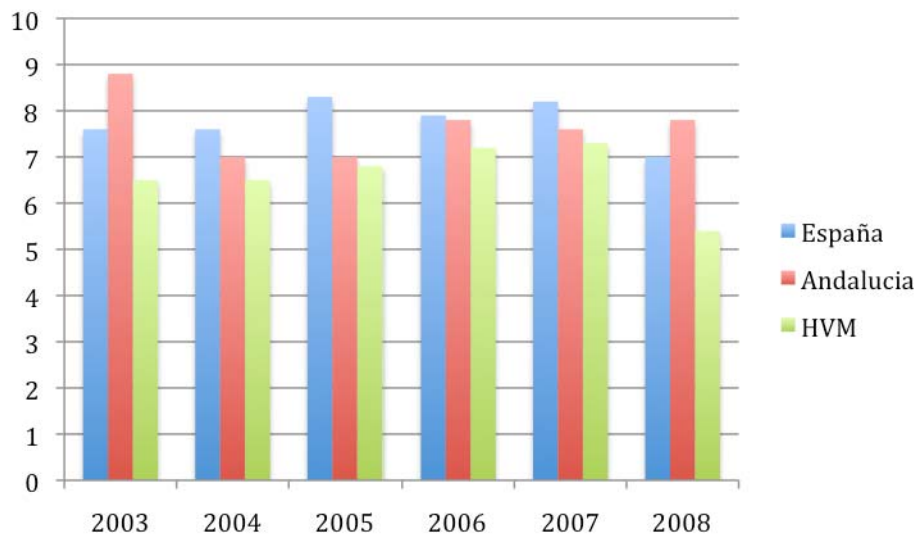


Figura 1. Comparación de la evolución de la prevalencia de infección nosocomial En España, Andalucía y en el Hospital Virgen Macarena.

Entre los agentes causales de las infecciones nosocomiales destaca el papel de las bacterias multirresistentes, particularmente *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), *Enterococcus spp* resistentes a glicopéptidos, enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas (CARB), enterobacterias hiperproductoras de betalactamasas de tipo AmpC cromosómicas o plasmídicas y bacilos gram negativos no fermentadores (*Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*) con resistencia a carbapenémicos mediada por carbapenemasas (MLB, oxacilinasas y carbapenemasas de clase A). Los datos de incidencia en nuestra comunidad para estos patógenos multirresistentes se detallan en las figuras 2, 3 y 4.

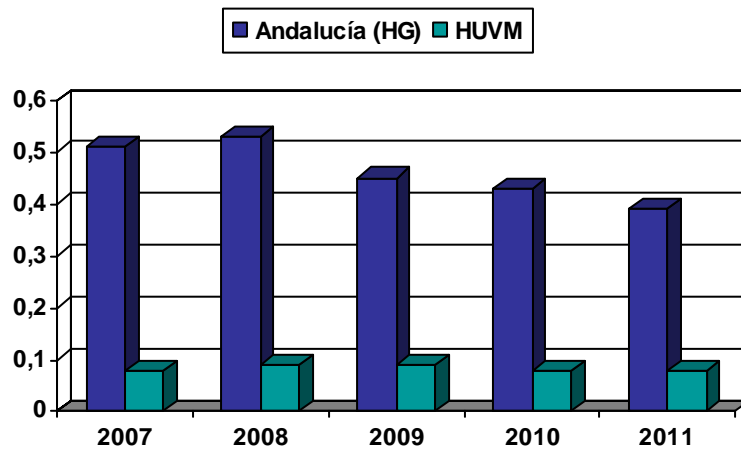


Figura 2. Incidencia de SARM (casos/1000 estancias). Fuente: Sistema de vigilancia de infección nosocomial en hospitales del Servicio Andaluz de Salud.

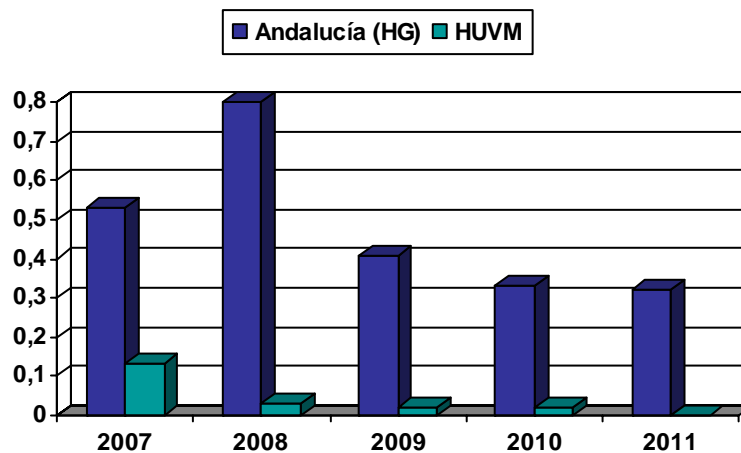


Figura 3. Incidencia de *A. baumannii* (casos/1000 estancias). Fuente: Sistema de vigilancia de infección nosocomial en hospitales del Servicio Andaluz de Salud.

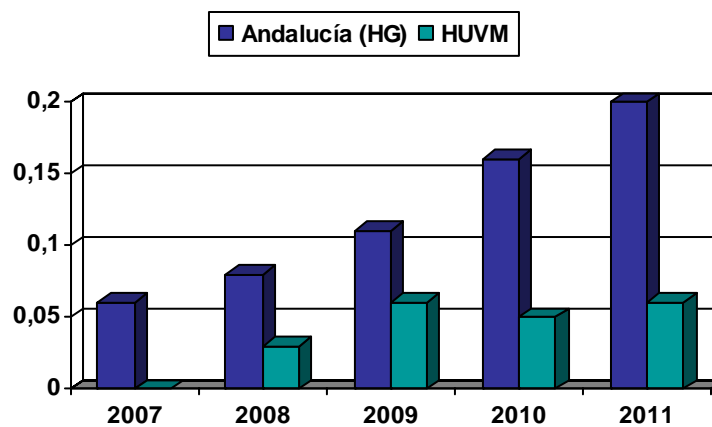


Figura 4. Incidencia de *K. pneumoniae* productor de BLEE (casos/1000 estancias). Fuente: Sistema de vigilancia de infección nosocomial en hospitales del Servicio Andaluz de Salud.

Estos microorganismos multirresistentes causan brotes epidémicos de infección nosocomial (*K. pneumoniae* productor de BLEE, etc) o situaciones de endemia con la implicación de diferentes clones del mismo microorganismo (SARM, *A. baumannii*, etc). Es especialmente preocupante la aparición de brotes causados por enterobacterias productoras de carbapenemasas, que ya se han descrito en varios centros andaluces. Estos brotes se asocian a una alta mortalidad y para las que las alternativas terapéuticas son muy limitadas o nulas.

Para la vigilancia y control de estos brotes, además de una adecuada investigación de la epidemiología clínica, es necesario conocer la relación clonal de los microorganismos aislados, de tal manera que nos permita conocer cual es la fuente de infección y las vías de transmisión involucradas, así como la extensión del problema, discriminando los pacientes relacionados de los que no lo están. El conocimiento de estos datos nos permitirá poner en marcha las medidas adecuadas para eliminar los reservorios y evitar su diseminación.

Las técnicas de Biología Molecular han supuesto un avance extraordinario en el campo de las Ciencias de la Salud. En el caso concreto de la Microbiología Clínica las principales aplicaciones de la Biología Molecular se centran en la identificación de microorganismos, detección de genes de resistencia o mutaciones asociadas a resistencia antimicrobiana, caracterización de los elementos móviles implicados y el tipado molecular o genotipado. Estos tres aspectos se suelen abordar en el laboratorio de Microbiología clásico mediante el uso de métodos fenotípicos, que tienen la ventaja de ser habitualmente más económicos que los métodos moleculares, y no requieren demasiada experiencia para su utilización. Sin embargo, los métodos fenotípicos tienen muy poca capacidad de discriminación en el estudio de brotes epidémicos o situaciones de alta endemia en los hospitales.

Los laboratorios asistenciales de Microbiología Clínica no suelen disponer de la infraestructura y los recursos necesarios para aplicar esta metodología de forma rutinaria, por lo que se tiende a solicitar los servicios que se ofrecen en centros de referencia, como por ejemplo el Centro Nacional de Microbiología (CNM) del Instituto de Salud Carlos III. El papel del CNM en este tipo de estudios no está claro, lo que determina frecuentemente un tiempo de respuesta prolongado y por lo tanto una escasa rentabilidad para su aplicación en el plano asistencial.

La experiencia de la Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica del Hospital Universitario Virgen Macarena en la vigilancia y control de infecciones nosocomiales por microorganismos multirresistentes es reconocida a nivel autonómico, nacional e internacional y queda avalada por el importante número de publicaciones científicas de calidad. Su experiencia ha sido avalada por los resultados obtenidos en nuestro centro al comparar los datos con los mismos a nivel autonómico o nacional (figuras 1 a 4). La propuesta que formulamos es poner la experiencia de nuestro centro al servicio del Servicio Público de Salud de la Comunidad Andaluza y crear de esta forma un laboratorio de referencia y una consultoría experta para la actuación en el control de microorganismos multirresistentes (endemia y brotes), con tiempos de respuesta optimizados, para a) el tipado molecular de los principales patógenos nosocomiales multirresistentes y b) la determinación de los mecanismos de resistencia involucrados en los mismos.

La creación en Andalucía de un centro o laboratorio de referencia de detección de resistencias genotípicas y de genotipado de patógenos nosocomiales multirresistentes, asociado a la consultoría de control, permitirá:

1. Facilitar información esencial para los centros sobre las características de los brotes o situaciones endémicas que permita la puesta en marcha de un programa de control específico.

2. Disponer de información de la evolución de las resistencias a antimicrobianos y de la potencial diseminación de clones multirresistentes entre diferentes centros de la Comunidad.
3. Ayudar al control de la transmisión de microorganismos multirresistentes mediante la detección de reservorios y mecanismos de transmisión, la aplicación coste-efectiva de medidas de control priorizadas y el seguimiento de las mismas.
4. Disminuir la morbi-mortalidad asociada a este tipo de brotes, los costes de atención hospitalaria y en resumen mejorar la calidad asistencial de los ciudadanos atendidos en el sistema público de Salud.

OBJETIVOS

1. Objetivos del Laboratorio de Referencia:

1. Determinar la relación clonal de los aislamientos de patógenos nosocomiales multirresistentes mediante la combinación de pruebas fenotípicas y genotípicas en tiempo suficiente para poder tomar medidas de control adecuadas.
2. Estudio fenotípico y genotípico de los mecanismos de resistencia de patógenos nosocomiales de interés y que puedan favorecer el desarrollo de medidas terapéuticas y/o preventivas.
3. Identificación y seguimiento de clones de microorganismos multirresistentes que circulen en centros hospitalarios de la Comunidad.
4. Creación de una base de datos con los genotipos de interés.
5. Servir de centro centinela para la detección de nuevos mecanismos de resistencia en patógenos nosocomiales.
6. Ofrecer información relevante sobre tipo y número de aislados a enviar en función de la situación de cada centro.

2. Objetivos del servicio de consultoría de control serían:

1. Colaborar con los profesionales de cada centro en la caracterización de la epidemiología clínica de la situación epidemiológica
2. Proporcionar información sobre los métodos de vigilancia y control más adecuados y coste efectivos en cada situación epidemiológica.
3. Colaborar a la evaluación in situ la situación y ayudar a la puesta en marcha de las medidas y al seguimiento de las mismas.

CARTERA DE SERVICIOS

1. Laboratorio de Referencia

A continuación relacionamos la cartera de servicio básica. Una vez en funcionamiento, la cartera de servicios se iría implementando con otros microorganismos de interés sanitarios (*Clostridium difficile*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida* spp, hongos filamentosos, etc).

1.1. Resistencia a antimicrobianos

1. Detección de resistencia a oxacilina (SARM) en *S. aureus*.
2. Detección e identificación de genes de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) tipo TEM, SHV y CTX-M, más frecuentes en nuestro entorno, en enterobacterias y particularmente en *E. coli* y *K. pneumoniae*.
3. Detección e identificación de genes de AmpC plasmídicas (FOX, DHA, CMY, etc.).

4. Detección de mutaciones en los genes que regulan la expresión de los enzimas AmpC cromosómicos.
5. Detección de hiperproducción de genes OXY en *K. oxytoca* con resistencia a cefalosporinas de tercera generación.
6. Detección e identificación de genes de beta-lactamasas que hidrolizan carbapenems (carbapenemasas):
 - a) Oxacilinasas de *A. baumannii*.
 - b) Carbapenemasas tipo IMP, VIM, OXA-48, NDM y KPC (*A. baumannii*, *P. aeruginosa* y enterobacterias).
7. Sobreexpresión de bombas de expulsión activa: MexABOprM (*P. aeruginosa*), adeABC (*A. baumannii*).
8. Detección de genes *vanA* y *vanB* en aislados de *Enterococcus* spp
9. Detección de *cfr* en aislados de *Staphylococcus* resistentes a linezolid
10. Identificación de elementos genéticos móviles implicados en la resistencia a antimicrobianos (plásmidos, integrones, transposones y secuencias de inserción).

1.2. Tipado molecular o Genotipado

1. *E. coli* y *Klebsiella* spp con fenotipo productor de BLEE, AmpC plasmídica ó CARB.
2. *Serratia marcescens* y *Enterobacter* spp multirresistente
3. *K. oxytoca* hiperproductor de OXY
4. *A. baumannii* y *P. aeruginosa* multirresistente.
5. *S. aureus* resistente a metilina o a linezolid.
6. *Enterococcus* spp resistente a glicopéptidos

2. Consultoría de control.

1. Consultoría online, telefónica o presencial
2. Visitas al centro previa solicitud del mismo
3. Colaboración en el diseño de actividades de control y formativas

METODOLOGIA

1. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

1.1. Detección de resistencia a metilina o a linezolid en *S. aureus*

Amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR múltiple y detección de los productos de PCR mediante visualización en gel de agarosa. El informe definitivo incluirá los resultados de la secuenciación de estos genes.

1.2 Detección de genes *vanA* y *vanB* de *Enterococcus*

Detección mediante PCR convencional. El informe definitivo incluirá los resultados de la secuenciación de estos genes.

1.3. Detección e identificación de genes de BLEE (tipo TEM, SHV y CTX-M), AmpC plasmídicas, betalactamasas OXY, Oxacilinasas, Metallo-beta-lactamasas y carbapenemasas KPC, OXA-48, IMP, VIM, NDM

Se realizará mediante amplificación de ácidos nucleicos por PCR convencional y PCR en tiempo real (Informe preliminar); y secuenciación de los productos de PCR (Informe definitivo).



1.4. Identificación de elementos genéticos móviles asociados con genes de resistencia antimicrobiana.

El estudio de plásmidos se realizará mediante lisis alcalina (miniprep y maxiprep), digestión del ADN plasmídico con S1 nucleasa y posteriormente con enzimas de restricción y electroforesis en campo pulsado. En el caso de plásmidos de enterobacterias se caracterizarán el grupo de incompatibilidad por PCR convencional y el subtipo mediante MLST plasmídico (grupos I1, N, HI2) o por secuenciación del replicon (grupo F). La identificación de secuencias de inserción, integrones y transposones se realizará mediante PCR usando cebadores específicos de cada elemento genético.

2. TIPADO MOLECULAR

2.1. Infecciones esporádicas de interés: Electroforesis en campo pulsado (PFGE).

2.2. Situaciones de brote o epidemia: rep-PCR ó AP-PCR (método rápido) y PFGE (confirmación). En caso de requerirse se usará además el método de MLST.

OPERATIVA

Cada centro hospitalario de Andalucía que requiera los servicios del laboratorio contactará previamente con la unidad por teléfono (955008288, Dr. Fernández Cuenca, ó 955008138, Dra. López Cerero) o mediante correo electrónico (felipefc@us.es; llopez@us.es) para poder hacer una evaluación previa de la situación que nos permita establecer una estrategia adecuada. En caso de brotes se determinará el número y tipo de aislados a enviar.

Recepción de muestras: de 8:00 a 20:00 de Lunes a Viernes. En situación de brote se ampliará el horario de recepción de muestras según se acuerde con los centros implicados.

Envío de muestras: medio de transporte Amies o Stuart sin refrigerar mediante los sistemas de mensajería habilitados en cada centro para el envío de microorganismos.

Se requerirá una breve descripción epidemiológica de la situación que motiva el envío de las muestras, en base a un formulario específico.

EMISIÓN DE INFORMES

La emisión de los informes dependerá del número de microorganismos y de las características de cada brote o epidemia. En los casos que así lo requieran se emitirán 2 informes uno preliminar y otro definitivo. Los tiempos medios máximos de emisión serán:

- ✓ Informe preliminar: a los 7 días de la recepción de la muestra.
- ✓ Informe definitivo: a los 21 días de la recepción de la muestra.

Estos tiempos se verán sujetos a modificaciones en función de la complejidad del brote y el número de aislados a estudiar.

SE INFORMARÁ OPORTUNAMENTE A TODOS LOS CENTROS DE LA FECHA DE LA PUESTA EN MARCHA DEL LABORATORIO