



EL PAPEL CRÍTICO DEL LABORATORIO DE REFERENCIA DE MICROBIOLOGÍA EN EL PROGRAMA PIRASOA

Servicio de Microbiología
Hospital Universitario Virgen Macarena
Unidad Intercentros de Enfermedades Infecciosas,
Microbiología Clínica y Medicina Preventiva
Universidad de Sevilla



Programa PIRASOA

Programa integral de prevención y control de las infecciones

Relacionadas con la asistencia sanitaria y uso apropiado de los antimicrobianos

Secretaría General de Salud Pública, Inclusión Social y Calidad de Vida

Dirección General de Asistencia Sanitaria y Resultados en Salud

Dirección General de Calidad, Investigación, Desarrollo e Innovación

22 de febrero de 2013

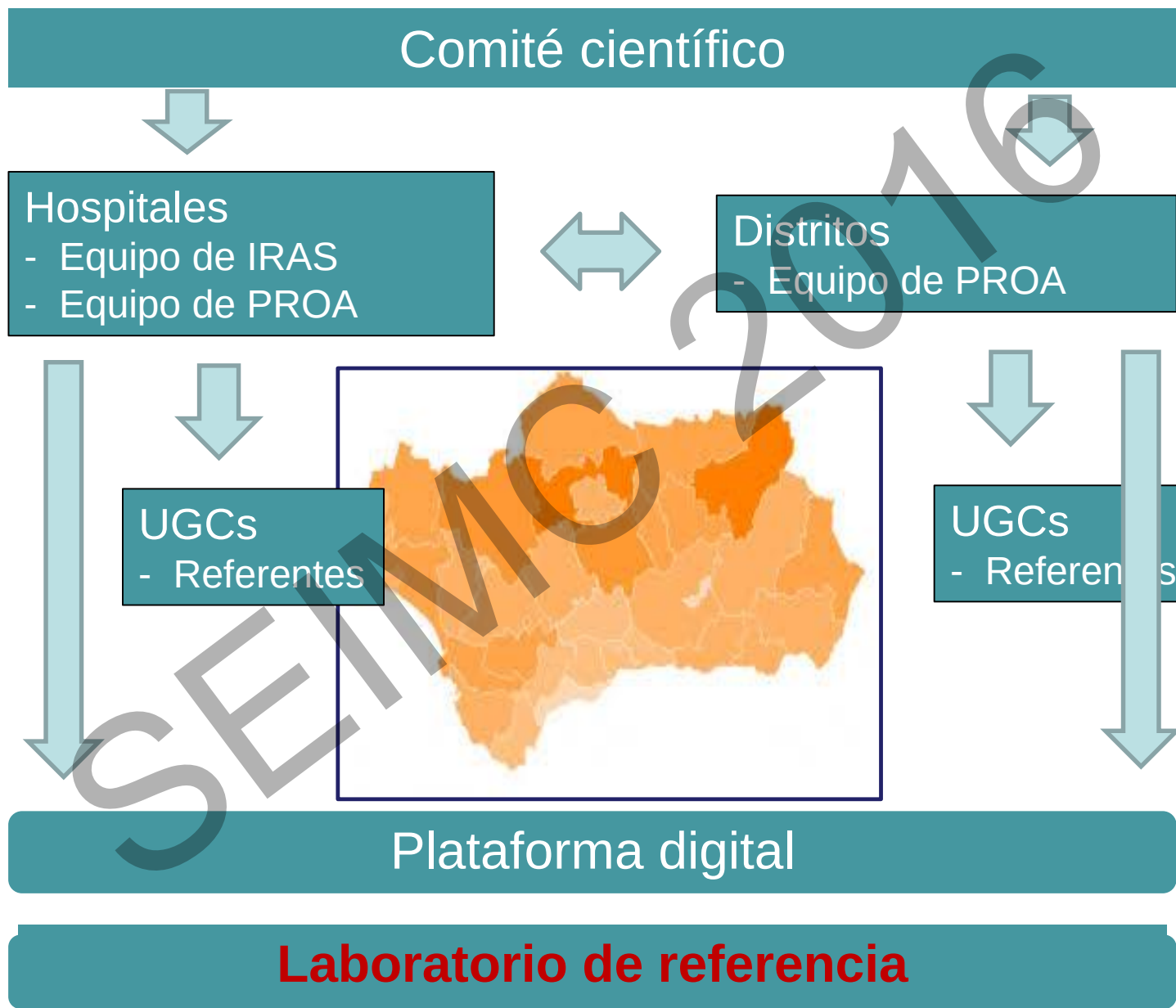
Definición

- Es un programa de calidad asistencial, para mejorar el pronóstico de los pacientes, reduciendo la mortalidad y las secuelas que producen las infecciones, en particular las relacionadas con la asistencia sanitaria (IRAS) y las causadas por las bacterias multirresistentes (BMR).
- Beneficio económico, por la reducción de los gastos directos que genera el diagnóstico y el tratamiento de los pacientes con IRAS y por BMR.

Objetivos generales

1. **Reducir la incidencia de IRAS** hasta alcanzar el nivel de los países europeos con mejores indicadores.
2. **Optimizar el uso de antimicrobianos** hasta alcanzar el nivel de los países europeos con mejores indicadores.

Estructura y organización



Apoyo institucional

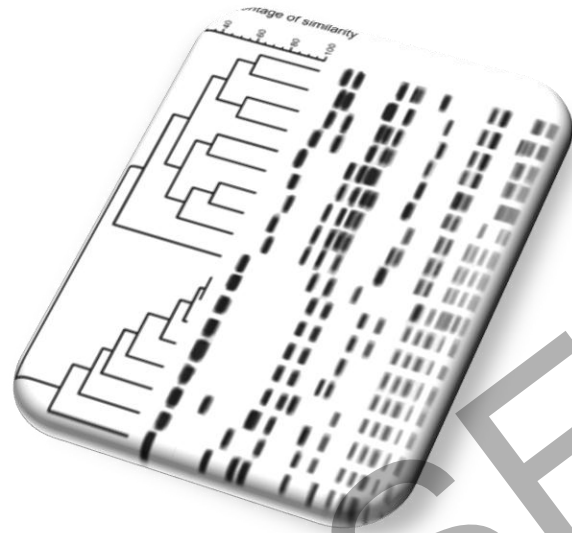
Objetivos del programa PIRASOA:

- CONTRATO PROGRAMA del SAS con los Distritos y Hospitales
- ACUERDOS DE GESTIÓN de los Distritos y Hospitales con las UGC

Laboratorio PIRASOA

Antecedentes

1. Reconocimiento como laboratorio de referencia (UPRA) en noviembre de 2013.
2. Finalidad: tipado molecular de bacterias MR y ofrecer información relevante en tiempo real para el control de brotes producidos por bacterias MR.





Objetivos (I)

- ❑ Servir de apoyo al Programa PIRASOA en la detección, investigación y control de brotes por bacterias MR.
- ❑ Determinar la relación clonal de los aislamientos de patógenos nosocomiales MR mediante la combinación de pruebas fenotípicas y genotípicas en tiempo suficiente para poder tomar medidas de control adecuadas.
- ❑ 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.



Objetivos (II)

- ❑ Identificación y seguimiento de clones de microorganismos MR que circulen en centros hospitalarios de la Comunidad.
- ❑ Creación de una base de datos con los genotipos de interés.
- ❑ Servir de centro centinela para la detección de nuevos mecanismos de resistencia en patógenos nosocomiales o de la comunidad.



Metodología

- ❑ Detección de mecanismos de resistencia:
 - Marcadores fenotípicos
 - Marcadores genotípicos: PCR +/-
secuenciación
- ❑ Identificación molecular:
 - REP-PCR, PFGE, MLST, Secuenciación
 - Base de datos históricas

Flujo de trabajo



Primer paso

Solicitud de estudios

Recepción de aislados

RESISTENCIA

Pruebas de sensibilidad

Test rápidos

PCR de genes diana

TIPADO

PFGE

MLST

Comparación con bases de datos

INFORME

Preliminar

Definitivo

PFGE

Normalización

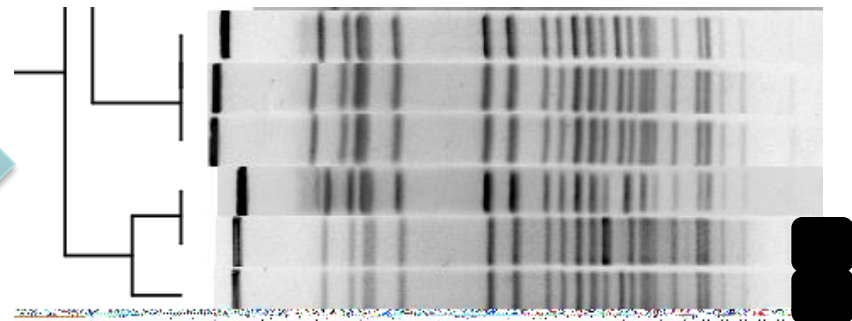
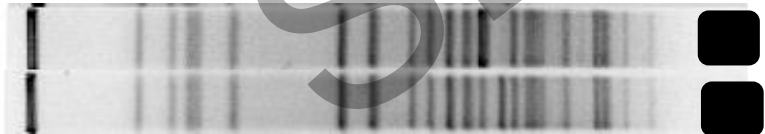
Comparación con perfiles
previos

MLST

**Perfiles de la
base de datos
de Andalucía**

Nuevos aislados

Comparación con previos





Tiempos de respuesta

- Informe preliminar: < 10 días
- Informe final: < 21 días
 - Estos tiempos pueden variar de acuerdo a la complejidad del brote

Introducción

El día 16 de julio de 2012 se recibieron 33 aislados multiresistentes del Hospital XXX procedentes de 14 pacientes (1-7 aislados por paciente) y el 13 de agosto otros 15 de 14 pacientes. Los aislados procedían de sangre, exudados, muestras respiratorias, orinas, catéter y otros tipos de muestras, recuperados entre 19/06/2012 y el 07/08/12. Se procedió al análisis de la relación clonal entre los aislados y determinar los mecanismos de resistencia.

Métodos y resultados

Análisis del caso índice (nº aislado 257)

- El aislado índice identificaba como *K. pneumoniae* (WIDER, Soria Melguizo, y API 20E, BioMérieux) y mostraba resistencia a amoxicilina/clavulánico, piperacilina/tazobactam, cefalotina, cefuroxima, ceftazidima, cefotaxima, cefepime, aztreonam, imipenem, meropenem, ertapenem, tobramicina, amikacina, nitrofurantoina, ácido nalidixico, ciprofloxacina, cotrimoxazol y colistina. Tres aislados más mostraban el mismo fenotipo. Hay 3 aislados más recientes que son resistentes a fosfomicina.
- Los resultados de CMI mediante etest fueron:

Antibiótico	Aislado (CMI en mg/l)			
	257	276	280	281
Ceftazidima	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R
Cefotaxima	>32 R	>32 R	>32 R	>32 R
Cefepime	96 R	128 R	96 R	96 R
Piperacilina/tazobactam	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R
Ertapenem	>32 R	>32 R	>32 R	>32 R
Imipenem	32 R	>32 R	>32 R	24 R
Meropenem	>32 R	>32 R	>32 R	>32 R
Gentamicina	2 S	2 S	2 S	2 S
Tobramicina	24 R	24 R	32 R	24 R
Tetraciclina	96 R	96 R	48 R	96 R
Colistina	12 R	12 R	16 R	16 R
Tigeciclina	8	4	1,5	4

- El test de Hodge fue positivo con ertapenem en agar Mueller Hinton con y sin cloxacilina (Figura 1).
- Los resultados de las PCR con cebadores específicos para grupo fueron:
 - positivo: SHV-11 (no BLEE), TEM-1 (no BLEE) y KPC-3
 - negativo: CTX-M-1, CTX-M-9, GES, IMI, NMC, SME, SPM, VIM, GIM, OXA-48, NDM, CIT, DHA, ACC, EBC Y FOX

Elaborado por Lorena López Cerero
Fecha: 24/08/12
Página 1 de 3

Análisis de la relación clonal

Se seleccionó un aislado por paciente (28), excepto de un paciente que tenía un aislado sensible y otro con perfil semejante al caso índice y se compararon mediante *Xba*I PFGE. El dendograma se generó mediante el índice de Dice con 0,5% de optimización y 0,90% de tolerancia de posición de bandas.

Veintisiete de los aislados presentaban una similitud del 99,5% (0 bandas de diferencia) y los números de aislado 259 y 300 son diferentes (60% de similitud con los anteriores) (Figura 2). El análisis mediante MLST identificó el clon como ST512, que ya ha sido identificado en Israel como productor de KPC-3 (Warburg et al. JAC 2012).

Del paciente FRACUSLUQ se habían recuperado 2 aislados, uno sensible de exudado (259), diferente al perfil del brote, y otro multiresistente de orina (280), idéntico al caso índice. El paciente AGUGARPED (300/359) colonizado/infectado por otro clon distinto al caso índice.

Análisis del caso 300/359

Son dos aislados de *K. pneumoniae* diferentes genéticamente del caso índice y que, además, no producen KPC-3. Tienen fenotipo de betalactamasa de espectro ampliado y valores de CMI a carbapenémicos $\leq$ 1 mg/l. Son dos aislados productores de enzimas tipo OXA-48 y del grupo CTX-M-1, ambas pendientes de caracterización por secuenciación.

Conclusiones preliminares

- 27 pacientes están colonizados/infectados por el mismo clon que produce una carbapenemasa tipo KPC, KPC-3, y dos betalactamasas de amplio espectro tipo 2b, TEM-1 y SHV-11. Este clon es únicamente sensible a gentamicina y fosfomicina, aunque se han detectado algunos casos en que los que ha aparecido resistencia a fosfomicina.
- El clon posiblemente pertenece a un ST ya identificado en Israel como clon hipertransmisible local productor de KPC-3, el ST512, cuyo clon parental se sospecha que es ST258. Este clon se ha detectado también en Papua, Italia, junto con ST258 (Richter et al. Gut Pathogens 2012).
- Además, se ha identificado un paciente colonizado/infectado por un aislado no relacionado genéticamente con el brote y productor de OXA-48 y una betalactamasa de espectro extendido del grupo CTX-M-1.

Elaborado por Lorena López Cerero
Fecha: 24/08/12
Página 2 de 3

Figura 1. Test de Hodge para ertapenem del aislado índice

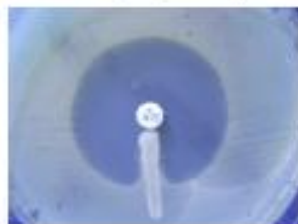
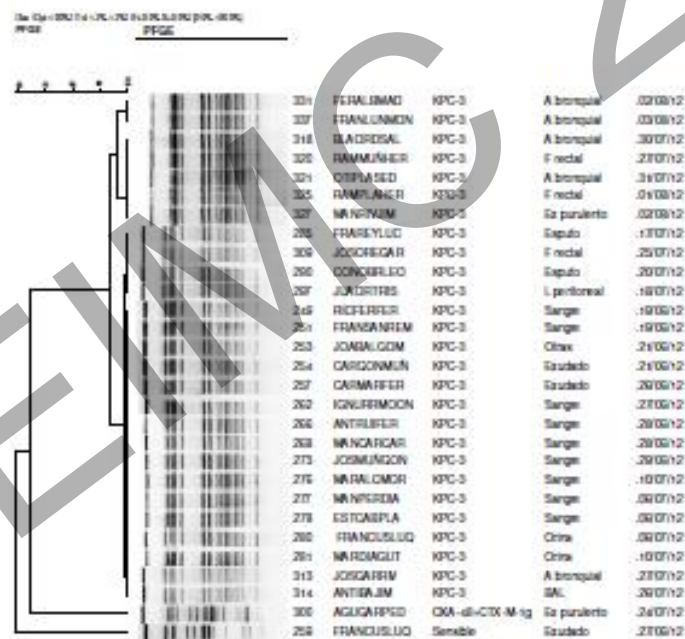


Figura 2. Dendograma de los 14 aislados mediante *Xba*I PFGE



Actividad

Octubre 2013-Diciembre 2015

Año	Aislados	Episodios	Aislados/ episodio	Centros
2013	9	2	4.5	2
2014	164	57	2.8	21
2015	297	99	3	22

	2014	2015
	185	297
Enterobacteriaceae		
<i>K. pneumoniae</i>	93	171
<i>K. oxytoca</i>	2	4
Others	17	32
No fermentadores		
<i>A. baumannii</i>	54	64
<i>P. aeruginosa</i>	7	15
Others	6	0
Gram positivos		
<i>Staphylococcus spp</i>	6	2
<i>E. faecium</i>	0	3

Microorganismos

Incremento 60%

Determinantes de resistencia

Especies/determinante	2014	2015
<i>K. pneumoniae</i>	93	171
BLEE	10	66
Carbapenemasa	51	78
Carbapenemasa+BLEE	20	19
Carbapenemasa+BLEE+pAmpc	0	1
pAmpC	11	4
Carbapenemasa y BLEE negativo	1	3

Determinantes de Resistencia

Especies	2014	2015
<i>A. baumannii</i>	54	64
OXA-23	38	32
OXA-58	15	24
OXA-24/40	1	8

Especies	2014	2015
Otras Enterobacteriaceae	17	36
BLEE	1	7
Hiper OXY	1	0
Carbapenemasa	2	11
Carbapenemasa+BLEE	0	1
Negativo	4	23

Center	2014	2015
H. San Cecilio	27	0
H. Reina Sofia	22	32
H. Virgen de la Victoria	37	18
H. Alto Guadalquivir Andujar	14	24
H. San Juan de Dios	3	30
H. Jerez	7	31
H. Costa del Sol	7	25
H. Regional de Málaga	9	6
H. Virgen Macarena	6	22
H. Valme	3	49
H. Virgen del Rocio	0	13
H. Virgen de las Nieves	5	13
H. de la Línea	5	4
H. la Inmaculada Nuerca-Overa	2	3
H. Serrania Malaga	2	4
HARE Puente Genil	5	2
H. Infanta Margarita Cabra	0	9
H. Montilla	2	0
H. Pozoblanco	1	0
H. Riotinto	1	0
HARE Guadiato	3	1
H. Alcala la Real	1	0
H Utrera	0	3
H. Linares	0	2
H. Torrecárdenas	0	6

**Aislados
/Hospital**

K. pneumoniae

Clones relevantes

- Productores de Carbapenemasas
 - **KPC-3**
 - ST512 (n = 45)
 - ST258 (n = 5)
 - **OXA-48 +CTX-M-15**
 - ST15 (n = 7)
 - ST11 (n = 5)
 - ST405 (n = 1)* producer of OXA-245+CTX-M-15
- Productores de BLEEs
 - **CTX-M-15**
 - ST307 (n = 23)*
 - ST405 (n = 7)
 - **CTX-M-15+SHV-2a**
 - ST25 (n = 8)*
 - **SHV-2**
 - ST870 (n = 10)*

*circunscritos a un solo centro

Diseminación de *K. pneumoniae* productora de KPC en la cuenca mediterránea



Woodford, J Antimicrob Chemother 2008; Kitchel, Antimicrob Agents Chemother 2009; Samuelsen, J Antimicrob Agents Chemother 2009; Baraniak, Antimicrob Agents Chemother 2009; Pounaras J Antimicrob 2009; Warburg, J Antimicrob Chemother 2012; López-Cerero, Int J Antimicrob Agents 2015

Map of the Iberian Peninsula showing the spread of the 1918 influenza pandemic from Italy. The map highlights the routes of the virus, starting from Italy and moving through the Mediterranean coast of Spain and Portugal. Key locations marked include Sevilla, Córdoba, and Málaga. The map also shows the dates of the pandemic's arrival in various regions: April 2012 (Sevilla), April 2013 (Córdoba), February 2014 (Málaga), and April 2014 (Almería).

August 2012
Córdoba
Transfer from Italy

Abril, 2013
Cabra

Febrero, 2014
Montilla

Abril, 2014
Pozoblanco

Mayo, 2014
Sevilla

Mayo, 2014
Jerez

Agosto, 2014
Alcala la Real

Agosto, 2014,
Peñarroya-Pueblonuevo

Diciembre, 2014
Puente Genil

Febrero, 2015
Andujar

***K. pneumoniae* ST512 KPC-3 en 2015**

Centro	Periodo de los aislados
H alto Guadalquivir Andujar	Febrero 2015 Mayo 2015 Agosto 2015
H Infanta Margarita (Cabra)	Septiembre 2015
H SAS Jerez	Enero-abril 2015
HARE del Guadiato	Julio 2015

Aparición de *K. pneumoniae* ST258 productor de KPC-3

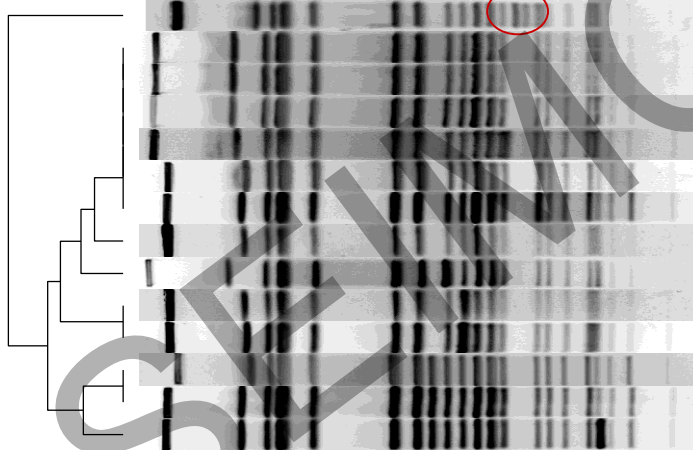
- ST258 una variante alélica de ST512

ST	gapA	infB	mdh	pgi	phoE	rpoB	tonB
258	3	3	1	1	1	1	79
512	54	1	1	1	1	1	79

Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
PFGE EC 25922

PFGE EC 25922

80 85 90 95 100



Nº

Ref	Muestra	Fecha	Origen	Centro	clon
257	exudate	26/06/12	caso 1	H U Reina Sofia	ST512
2015096	Orina	27/02/15	2251724883	H de Jerez	ST512
2015097	Orina	05/03/15	3033002200	H de Jerez	ST512
2015102	F rectal	05/03/15	3031724847	H de Jerez	ST512
2015194	F rectal	25/02/15	20-1031	H U Reina Sofia	ST512
2015317	Orina	20/11/15	70320	H Virgen de las Nieves	ST258
2015351	F rectal	14/12/15	81042	H Virgen de las Nieves	ST258
2015255-1	F rectal	16/09/15	14315	H Infanta Margarita	ST512
2015089	Orina	25/10/15	10234882005	H de Jerez	ST512
2015256	F rectal	17/09/15	14392	H Infanta Margarita	ST512
2015258	Cama BOX-5	22/09/15	14640	H Infanta Margarita	ST512
2015339	Sangre	05/12/15	5051246	H Virgen de las Nieves	ST258
2015350	F rectal	11/12/15	81056	H Virgen de las Nieves	ST258
2015352	F rectal	09/12/15	79692	H Virgen de las Nieves	ST258

Aparición de un pulsotipo idéntico a aislados del clon ST512, pero pertenecientes al clon ST258 en H. Virgen de las Nieves noviembre-diciembre de 2015

K. pneumoniae ST405 productor de CTX-M-15

Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
PFGE EC 25922

PFGE EC 25922

60 65 70 75 80 85 90 95 100



1er brote Neonatología
H Virgen de las Nieves
2013

Brote en la comunidad
de Madrid

2º brote Neonatología
H Torrecárdenas
2015

K. pneumoniae productor de OXA-48+CTX-M-15

ST15

4/2014 H Virgen de la Victoria

6/2014 H S Juan de Dios

10/2014 H Regional Malaga

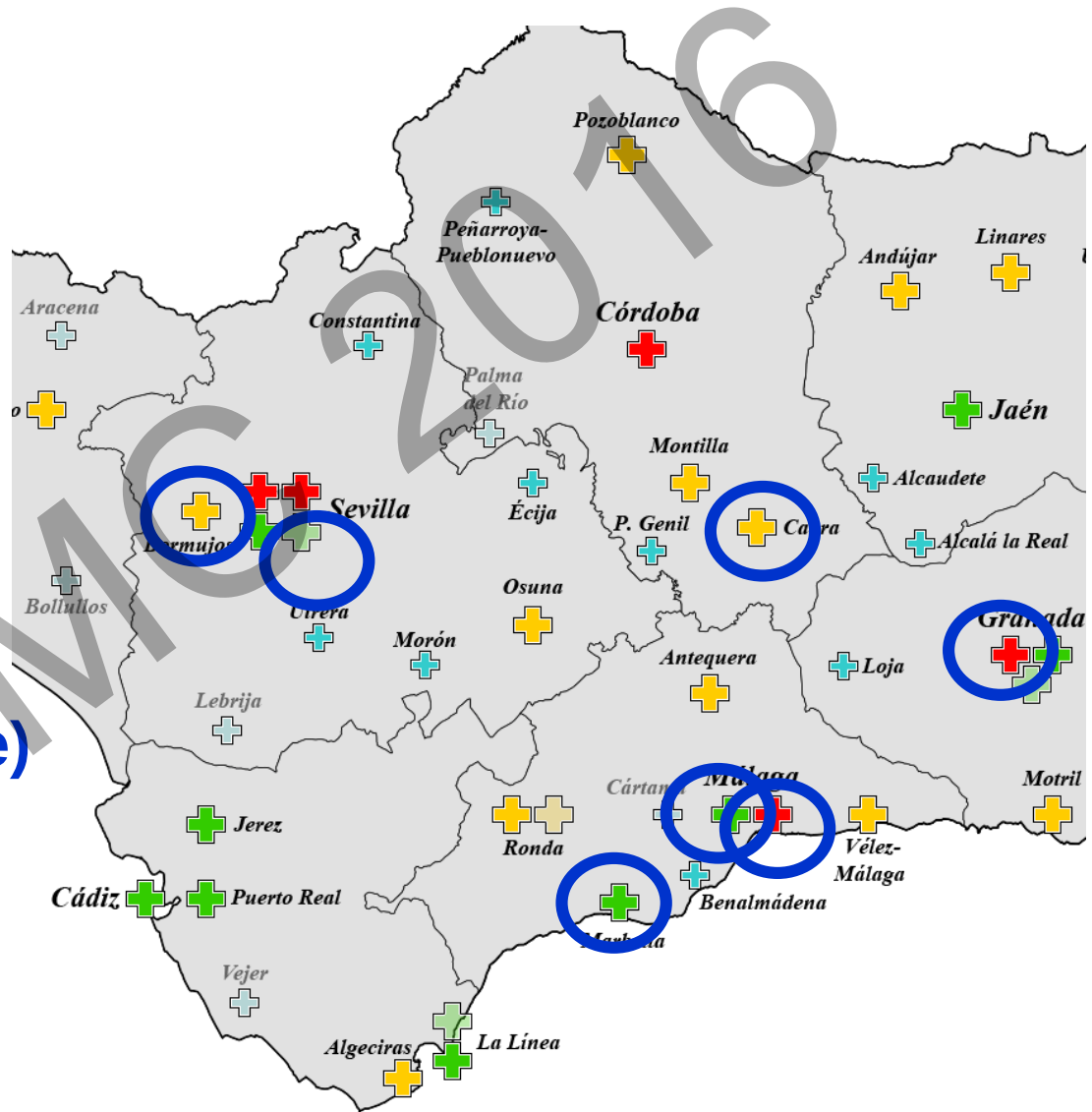
5/2015 H Virgen de las Nieves

10/2015 H Valme

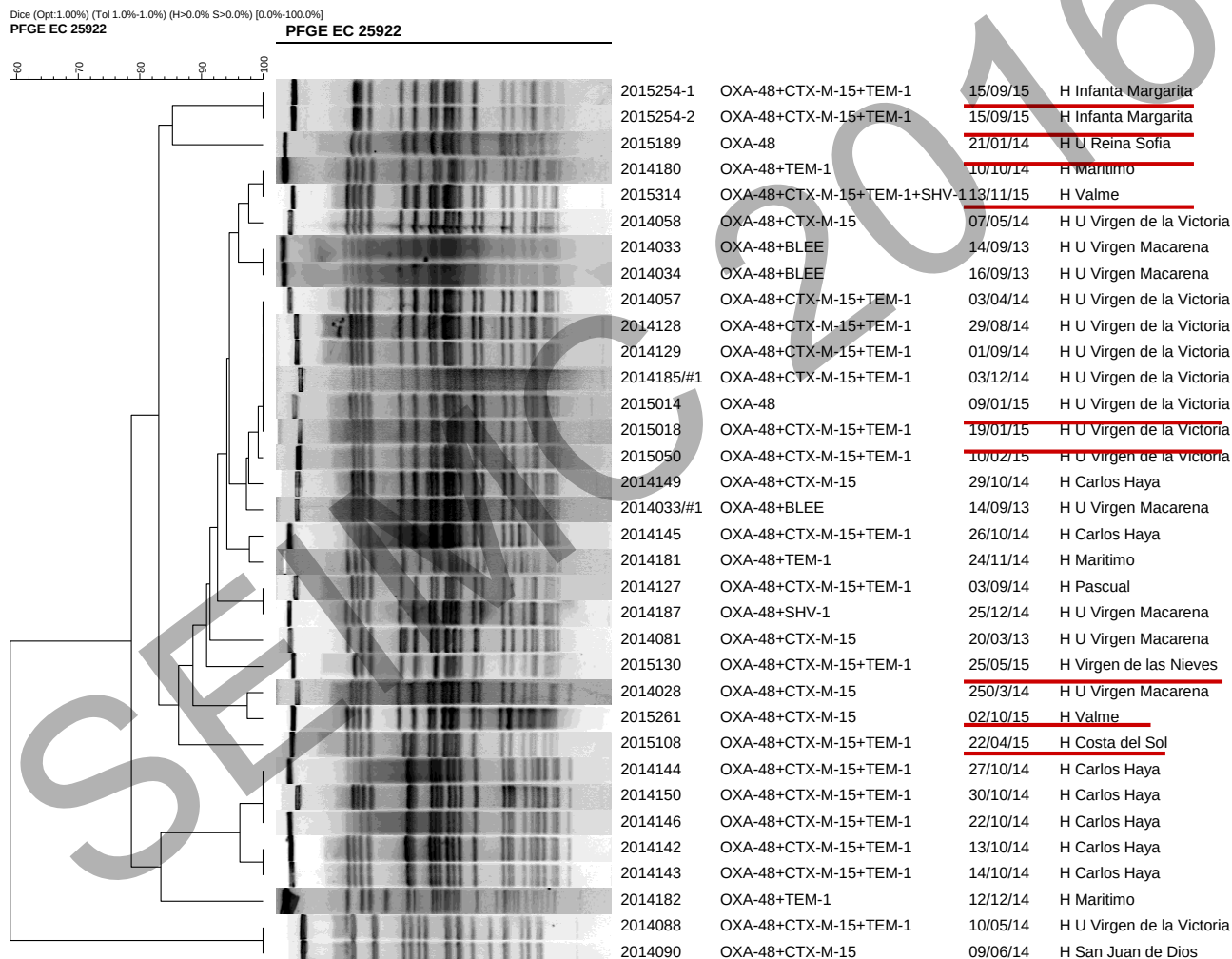
9/2015 H Infanta Margarita

ST431 (ST15 variante)

4/2015 H Costa del Sol



K. pneumoniae ST15 productor de OXA-48 + CTX-M-15



K. pneumoniae productor de CTX-M-15 +/- OXA-48 grupo

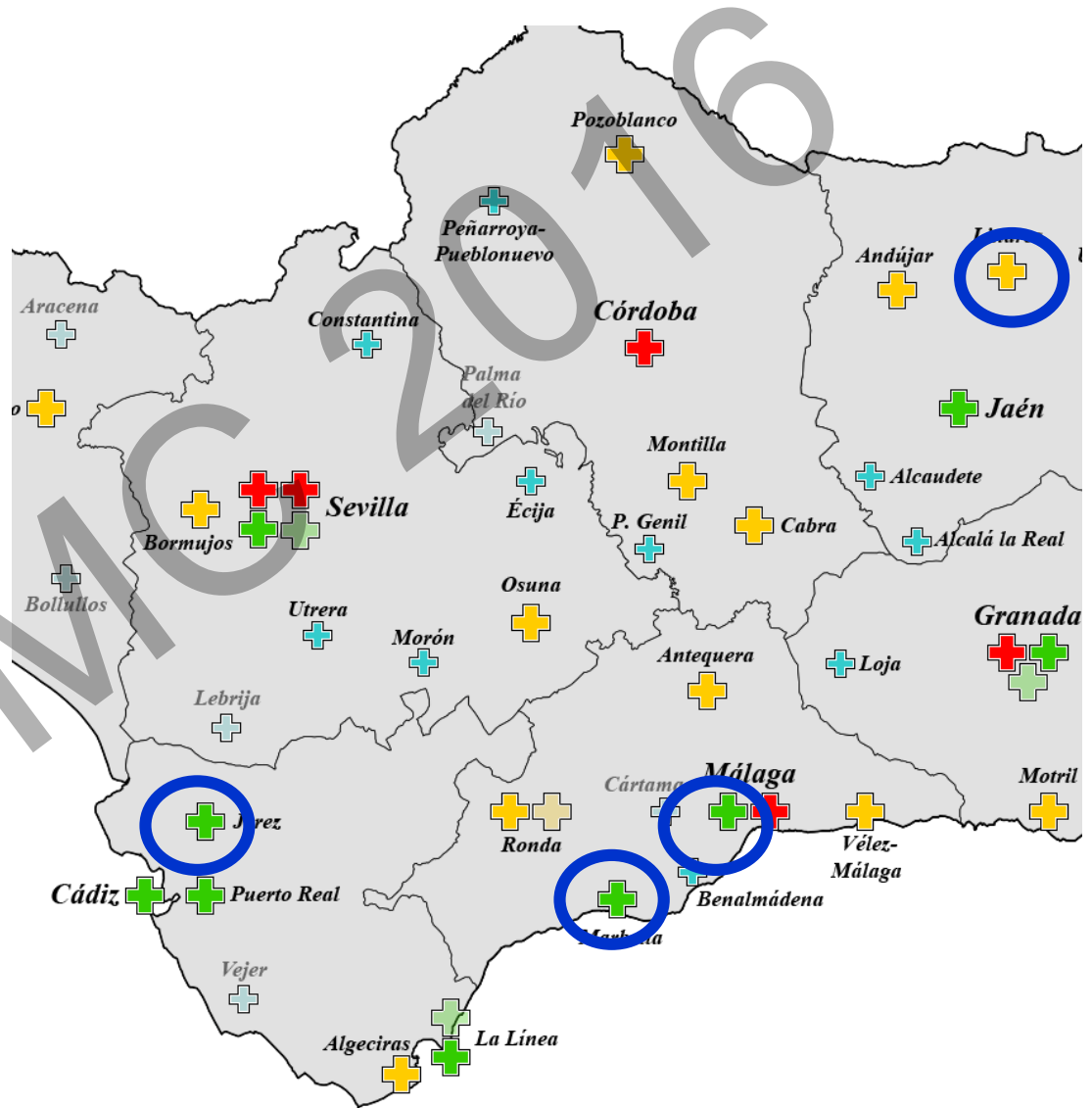
ST11

5/2014 H Jerez

9/2014 H Virgen de la Victoria

3/2015 H Costa del sol

9/2015 H Linares



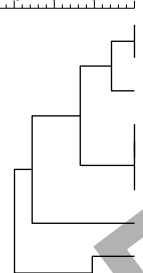
K. pneumoniae ST11 productor de CTX-M-15 +/- OXA-48 grupo

Dice (Opt:1.00%) (Tot: 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

PFGE EC 25922

PFGE EC 25922

60 65 70 75 80 85 90 95 100



2015013	OXA-48+CTX-M-15	30/12/14	H U Virgen de la Victoria
2015015	OXA-48+CTX-M-15	<u>13/01/15</u>	<u>H U Virgen de la Victoria</u>
2014124	CTX-M-1	20/07/14	H U Virgen de la Victoria
2014126	OXA-48+CTX-M-15	01/08/14	H Pascual
2015067	OXA-48+CTX-M-15	<u>02/03/15</u>	<u>H Costa del Sol</u>
242	OXA-48+CTX-M-15	02/2012	H U Virgen de la Victoria
2015083	OXA-245+CTX-M-15	<u>02/04/15</u>	<u>H Costa del Sol</u>
2014086	OXA-48+CTX-M-15	02/05/14	H de Jerez
2015259	OXA-48+CTX-M-15	<u>23/09/15</u>	<u>H Linares</u>

A. baumannii productor de OXA-23

ST2

2/2014 H. San Cecilio

6/2014 H S J Dios

10/2014 H V Victoria

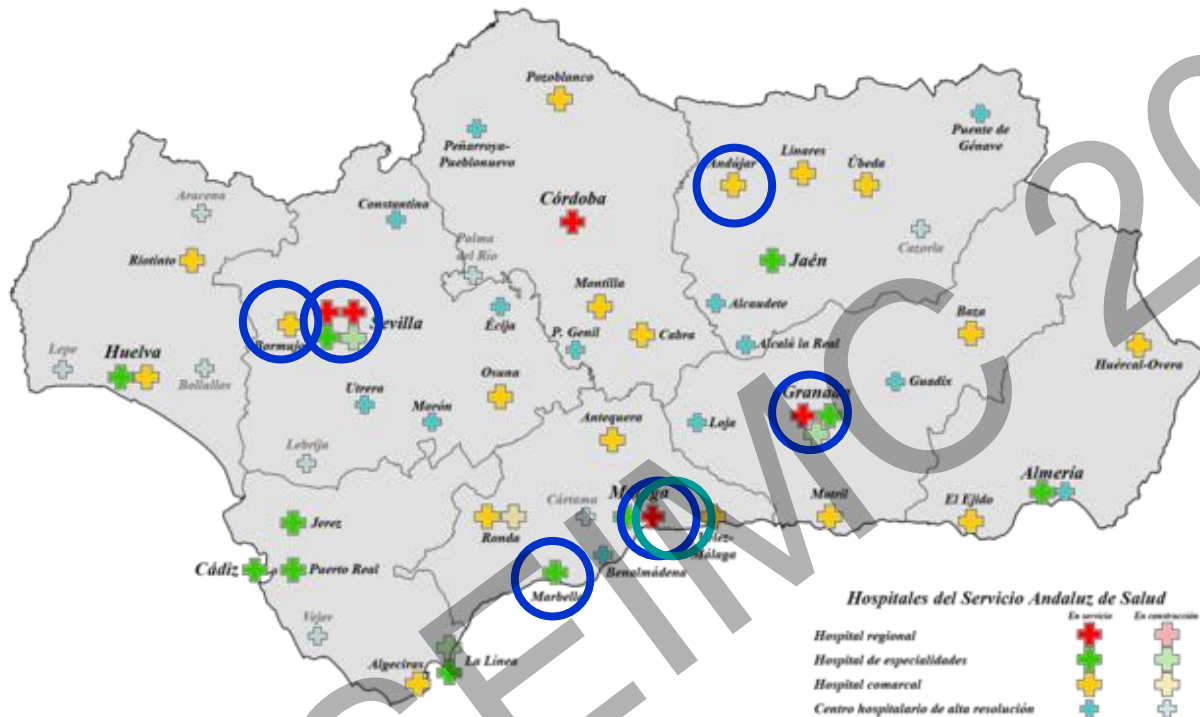
12/2014 H V Macarena

3/2015 H A G Andújar

9/2015 H Costa Sol

ST85

7/2014 H V Victoria



A. baumannii productor de OXA-24/40

ST2

6/2014 H S J Dios

2/2014 H V Macarena



A. baumannii productor de OXA-58

ST2

3/2015 H Regional Malaga

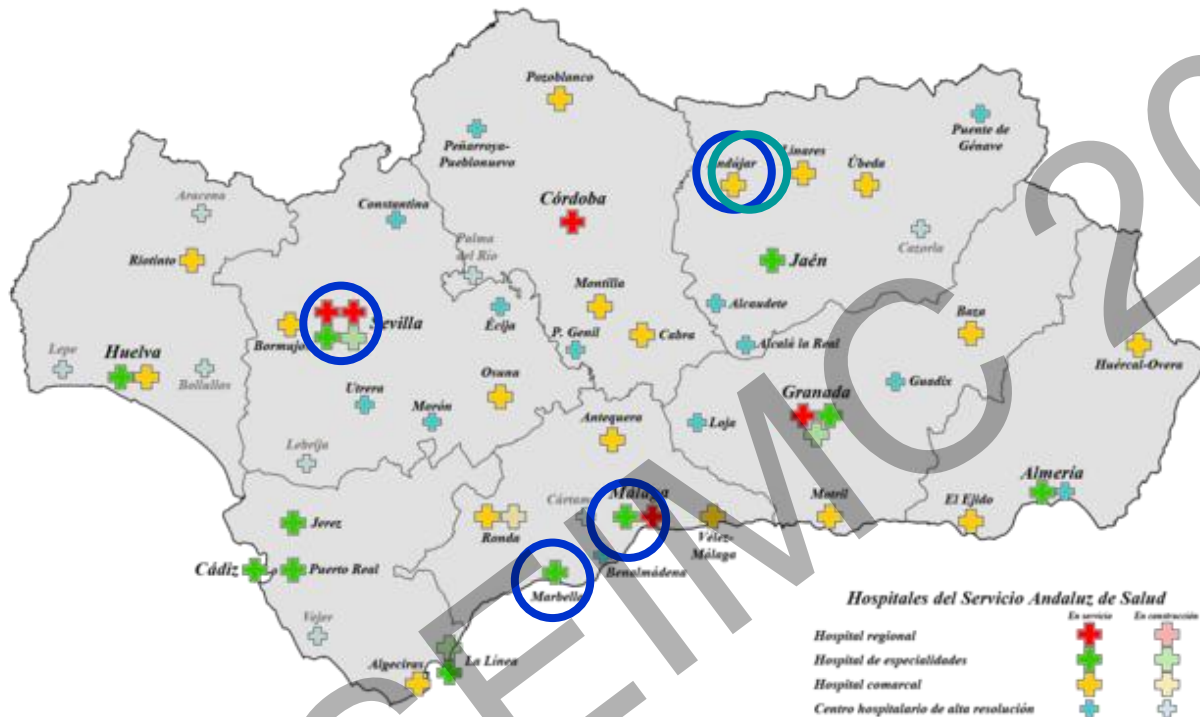
3/2015 H A G Andújar

8/2015 H Costa del Sol

2/2015 H Virgen Macarena

ST98

2/2014 H A G Andujar



Isolation of multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca* carrying *bla*_{IMP-8}, associated with OXY hyperproduction, in the intensive care unit of a community hospital in Spain

M. Carmen Conejo^{1*}, M. Carmen Domínguez²,
Lorena López-Cerero^{1,3}, Lara Serrano³,
Jesús Rodríguez-Baño^{4,5} and Alvaro Pascual^{1,3}

ORIGINAL ARTICLE

10.1111/1469-0691.12288

Wastewater drainage system as an occult reservoir in a protracted clonal outbreak due to metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella oxytoca*

S. Vergara-López¹, M. C. Domínguez², M. C. Conejo³, Á. Pascual^{3,4} and J. Rodríguez-Baño^{4,5}

1) Internal Medicine Service, Hospital La Merced, 2) Laboratory of Microbiology, Hospital La Merced, Osuna, Seville, 3) Department of Microbiology, University of Seville, 4) Infectious Diseases and Clinical Microbiology Unit, University Hospital Virgen Macarena and 5) Department of Medicine, University of Seville, Seville, Spain

Characterisation of the first ongoing outbreak due to KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST512) in Spain



Lorena López-Cerero^{a,*}, Pilar Egea^a, Irene Gracia-Ahufinger^b,
Marcelino González-Padilla^b, Fernando Rodríguez-López^{b,c}, Jesús Rodríguez-Baño^a,
Alvaro Pascual^{a,d}

International Journal of Antimicrobial Agents 44 (2014) 538–540

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dkw137

Characterization of an outbreak due to CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* lacking the *bla*_{OXA-48} gene belonging to clone ST405 in a neonatal unit in southern Spain

Jesús Machuca¹, Lorena López-Cerero^{1*},
Felipe Fernández-Cuenca¹, Irene Gracia-Ahufinger²,
Guillermo Ruiz-Carrascoso³, Fernando Rodríguez-López²
and Álvaro Pascual^{1,4}

¹Unidad intercentros de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen Macarena, Seville, Spain; ²Unidad de Microbiología Clínica, Hospital Universitario Reina Sofía-IMIBIC-Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain; ³Unidad de Microbiología Clínica, Hospital Universitario La Paz-IdiPaz, Madrid, Spain; ⁴Department of Microbiology, University of Seville, Seville, Spain

Agradecimientos



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD





Cartera de Servicios (I)

Resistencia a antimicrobianos

- Detección de resistencia a oxacilina (SARM) en *Staphylococcus aureus*.
- Detección de resistencia a vancomicina en *Enterococcus spp.*
- 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.
- Detección e identificación de genes de AmpC plasmídicas y cromosómicas.
- Detección e identificación de genes de beta-lactamasas que hidrolizan carbapenems (carbapenemasas).



Cartera de Servicios (II)

Tipado molecular o Genotipado

- Enterobacterias productoras de BLEE o carbapanemasas.
- Otras enterobacterias multirresistentes
- *Acinetobacter baumannii*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *S. aureus* resistente a meticilina.
- *Enterococcus* resistente a vancomicina