



Diciembre 2021

Programas de Vigilancia Microbiológica. Centro Nacional de Microbiología.



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



Instituto
de Salud
Carlos III

Centro Nacional de Microbiología

Centro Nacional de Microbiología
Instituto de Salud Carlos III
Ministerio de Ciencia e Innovación

Monforte de Lemos, 5 – Pabellón 12
28029 MADRID (ESPAÑA)
Tel.: 91 822 24 97
Fax: 91 387 78 16

Catálogo general de publicaciones oficiales:

<https://cpage.mpr.gob.es/>

Para obtener este informe de forma gratuita en Internet:

<https://publicaciones.isciii.es/>

Publicación incluida en el programa editorial del Ministerio de Ciencia e Innovación.



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Edita: Instituto de Salud Carlos III

Ministerio de Ciencia e Innovación

Diseño y maquetación: Editorial MIC

N.I.P.O. pdf: 834210302

N.I.P.O. e-pub: 834210318

I.S.B.N.: No (Free online version)

Editores:

Juan Emilio Echevarría Mayo
Jesús Oteo Iglesias

Cita sugerida:

Echevarría Mayo, Juan Emilio; Oteo Iglesias, Jesús (Editores). Centro Nacional de Microbiología. Programas de Vigilancia Microbiológica. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2021

ÍNDICE

Prólogo	5
Programa de Enfermedad Meningocócica Invasiva	7
Programa de Listeriosis	14
Programa de Infección Gonocócica. Sensibilidad Antimicrobiana, 1991-2020	21
Programa de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	29
Programa de enfermedad invasiva por <i>Streptococcus pyogenes</i>	35
Programa de <i>Haemophilus influenzae</i>	41
Programa de Resistencia a Antibióticos	48
Programa de infecciones producidas por los estafilococos	56
Programa de infecciones entéricas bacterianas transmitidas por agua y alimentos	63
Programa de Legionelosis	74
Programa de infecciones causadas por especies toxigénicas del género <i>Corynebacterium</i>	81
Programa de resistencias en el complejo tuberculoso	88
Programa de micobacterias no tuberculosas	95
Programa de GRIPE	101
Programa de SARS-CoV-2	111
Programa de Enterovirus y Parálisis Flácida en menores de 15 años	118
Programa de Parotiditis	124
Programa de Sarampión y Rubeola	130
Enfermedades víricas transmitidas por vectores	138
Programa de Rabia	144
Programa de Variantes del Virus de la Hepatitis B de Impacto en Salud Pública y Estudio de Brotes de Hepatitis	151
Programa de Leishmaniasis Humana en el Area-9 de la Comunidad Autónoma de Madrid	156
Programa de la Enfermedad de Chagas	166
Programa de la Resistencia a los antifúngicos en España	173
Agradecimientos	180

Prólogo

El impacto de las enfermedades infecciosas sobre la salud del ser humano a lo largo de la historia ha sido enorme, generando miles de millones de muertes, una gran morbilidad y condicionando algunos de los procesos históricos que sin duda han conformado el momento actual.

Importantes avances socio-sanitarios como la introducción de los antimicrobianos, las campañas de vacunación o las mejoras higiénico-alimentarias, parecen haber reducido el peso relativo de las infecciones respecto a las enfermedades tumorales o las cardiovasculares, sobre todo en las sociedades occidentales. Sin embargo, las enfermedades infecciosas siguen siendo una amenaza sanitaria de primer orden, la pandemia por SARS-CoV-2 está siendo un duro recordatorio de ello. De hecho, todo ser humano sufre alguna infección a lo largo de su vida; infecciones como la tuberculosis, el SIDA, la malaria, entre otras muchas, generan grandes epidemias a nivel mundial; el aumento de la resistencia a antimicrobianos dificulta el tratamiento de infecciones que hasta hace poco se curaban con facilidad; y la aparición de variantes de microorganismos conocidos hace que algunas infecciones prevenibles por vacunación puedan reemerger. La lucha contra las enfermedades infecciosas debe pasar de forma ineludible por la acción decidida, coordinada y enérgica en diferentes frentes con los objetivos de mejorar el uso de terapias personalizadas, potenciar el diagnóstico precoz y de precisión, controlar su diseminación y, en general, reducir la carga de la infección. La implementación de medidas es imprescindible; pero, para que esta sea eficaz y rentable, debe ser guiada por el conocimiento previo del problema, un conocimiento lo más actualizado, real y completo posible; debe ser guiada por una vigilancia de calidad.

Las enfermedades infecciosas tienen la importante peculiaridad de que son producidas por seres que tienen la capacidad de reproducirse, transmitirse, mutar y adquirir genes externos de virulencia o de resistencia a antimicrobianos; es decir, son capaces de evolucionar y de hacerlo a gran velocidad. Este hecho condiciona su vigilancia, obligando a que lleve ineludiblemente aparejada una caracterización microbiológica de los agentes etiológicos de la infección. Más allá del conocimiento de la especie patógena, la determinación del clon o linaje específico, de los genes de virulencia o resistencia que porta, de su capacidad de diseminación y de producción de brotes, o de su capacidad de escapar a la acción de las vacunas son imprescindibles en la vigilancia de las enfermedades infecciosas.

Una de las principales actividades del Centro Nacional de Microbiología (CNM) se fundamenta en dar soporte al Sistema Nacional de Salud en el control y prevención de las enfermedades infecciosas, incluyendo la detección precoz de infecciones emergentes o infrecuentes, de nuevas variantes problemáticas de agentes infecciosos más comunes, y la caracterización de brotes. Todo ello forma parte de la vigilancia microbiológica, que en el CNM se estructura en torno a los Programas de Vigilancia que abordan la mayoría de los principales microorganismos patógenos para el ser humano.

Alineados con las recomendaciones del *European Center for Disease Control and Prevention*, el CNM tiene entre sus prioridades la integración de las nuevas tecnologías, como la secuenciación de genomas completos, en sus Programas de Vigilancia. Ejemplos recientes de su aplicación en el estudio de listeriosis, COVID-19 o infecciones por bacterias multi-resistentes marcan el camino de una vigilancia de nueva generación que permita realizar intervenciones de medicina de precisión para el control de las enfermedades infecciosas.

Este libro recoge en pequeñas “cápsulas” de unas pocas páginas la información condensada de los Programas de Vigilancia Microbiológica del CNM en los últimos años. Su lectura permite visualizar de forma integrada las peculiaridades microbiológicas que caracterizan a los principales patógenos infecciosos del país, así como conocer las amenazas sanitarias que más nos preocupan. Es una iniciativa que tendrá su continuidad en próximas ediciones, con periodicidad anual, lo que permitirá el seguimiento de las tendencias evolutivas.

Se trata de un libro de un innegable interés en el campo de la microbiología de las enfermedades infecciosas, que necesariamente debe complementarse con la visión epidemiológica, y que pone también de relevancia el papel del CNM y de sus Programas de Vigilancia Microbiológica en el desarrollo de Planes Nacionales contra determinados problemas sanitarios infecciosos que se están desarrollando en la actualidad. La vigilancia de las enfermedades infecciosas es clave para su control, y el abordaje multidisciplinar promovido en dichos Planes Nacionales es necesario.

En ese contexto, la generación e interpretación de datos microbiológicos de calidad basados en las nuevas tecnologías son sencillamente imprescindibles.

Jesús Oteo Iglesias

Programa de Enfermedad Meningocócica Invasiva

Informe elaborado por R. Abad, C. Navarro, E. Martín, C. García-Amil y J.A. Vázquez.

Unidad de *Neisseria*, *Listeria* y *Bordetella*. Laboratorio de Referencia e Investigación en Enfermedades Bacterianas Inmunoprevenibles. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad Meningocócica Invasiva (EMI) tiene como agente etiológico a *Neisseria meningitidis*, también conocida como meningococo. Es una enfermedad de baja prevalencia, que se presenta en forma de casos aislados, brotes y epidemias, pero que está asociada con una elevada mortalidad (aún con un tratamiento efectivo la mortalidad se sitúa en torno al 10%, y hasta un 20% de los supervivientes van a presentar secuelas severas tales como pérdida de audición, retraso cognitivo, retraso motor, amputaciones severas y cicatrices que van a precisar de cirugía estética). Es una enfermedad que sigue hoy día produciendo una gran ansiedad en la sociedad en general, así como específicamente entre los profesionales de la salud. En la Unión Europea, el *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) reflejó en 2018 (último año para el que hay datos accesibles) 3233 casos confirmados, lo que supone una tasa de 0,62 casos por cada 100000 habitantes. Ese mismo año España registró una tasa ligeramente superior de 0,82. En Europa se ha venido observando una tendencia a la baja en el número de casos desde el año 2000, aunque desde el año 2015 esa tendencia se ha estabilizado, incluso ha aumentado ligeramente en los últimos 4 años disponibles. Una figura muy similar se observa también en España.

Una de las principales características del meningococo es la presencia de una cápsula de polisacárido que ha permitido su clasificación en 12 serogrupos, de los que los más relevantes son el A, B, C, W, Y y X. El polisacárido capsular ha constituido la base para el desarrollo de vacunas (excepto en el caso del serogrupo B en el que las vacunas son de naturaleza proteica).

La EMI ha sido objeto de gran interés en Salud Pública por su dinámica impredecible, con aparición de ondas epidémicas de duración variable que en España han resultado en 5 ondas epidémicas desde que existen registros epidemiológicos. La primera se produjo en los años 40 del siglo XX, con una tasa máxima de 5 casos por 100000 habitantes; la segunda en los años 60 con una tasa similar; la tercera entre 1970 y 1974 con una tasa de 10; seguida de una cuarta entre los años 1979 y 1985 (la más importante cuantitativamente) en la que se alcanzó una tasa máxima de 13,2 en 1981; la quinta y última se produjo entre los años 1996 y 2000, con la tasa máxima de 5,8 casos por cada 100000 habitantes en 1997.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

Los datos de laboratorio son una parte fundamental para una correcta vigilancia de las enfermedades infecciosas. En el caso concreto de la EMI, los datos generados por la vigilancia de laboratorio son esenciales en vertientes diferentes:

- En una enfermedad grave como la EMI, en muchas ocasiones se instaura un tratamiento antibiótico antes de la toma de muestra, lo que favorece que el cultivo pueda ser negativo. El Laboratorio de Referencia de Meningococos (LRM) ofrece desde el año 2004 un protocolo de diagnóstico de PCR en tiempo real (RT-PCR) que permite informar si el agente patógeno es un meningococo, un neumococo, un haemophilus o una listeria en ausencia de crecimiento bacteriano. En el caso de tratarse de un meningococo se caracteriza, mediante otro protocolo de RT-PCR, el serogrupo asociado.
- La información de la distribución de serogrupos geográfica y temporalmente es básica en la toma de decisiones en intervenciones con vacunas.
- La información sobre el perfil correspondiente al genosubtipo fue en su momento una herramienta útil para el estudio de brotes y dinámica de poblaciones de meningococo, y actualmente es básica como parte de las recomendaciones de utilización de vacunas proteicas frente a serogrupo B.
- La llegada de nuevas metodologías moleculares de caracterización, fundamentalmente el *Multilocus Sequence Typing* (MLST) cuya utilización es recomendada por el ECDC, se ha mostrado básica en la prevención y control de la enfermedad. Esta metodología se ha venido utilizando por parte del LRM desde su aparición a principios de este siglo.
- En el momento actual, la vigilancia microbiológica de la EMI se realiza, por recomendación expresa del ECDC a través de la Secuenciación del Genoma Completo. Esto permite la inclusión de nuevos genes/proteínas en la caracterización, muchas veces asociado al desarrollo de nuevas vacunas. El LRM realiza esta vigilancia molecular desde 2017, incorporada ya en la caracterización de los aislados y comparte esa información con el ECDC a través de los protocolos establecidos.
- Por último, la vigilancia de la evolución de la susceptibilidad de los aislados de meningococo a los diferentes antibióticos utilizados tanto en el tratamiento como en la profilaxis de contactos forma parte de los objetivos de este programa desde su comienzo.

Así pues, de forma genérica, el propósito de este programa es llevar a cabo una vigilancia continuada de las cepas de *N. meningitidis* circulantes en España, en un contexto europeo, que nos permita tener un conocimiento detallado de sus características y evolución, proporcionando esta información microbiológica tanto al Sistema Nacional de Vigilancia como al *European Center for Diseases Control* (ECDC) a través de su programa de vigilancia de EMI. Adicionalmente, el programa ofrece una herramienta de diagnóstico/caracterización de muestras clínicas para su utilización por el Sistema Nacional de Salud (SNS).

DISEÑO DEL PROGRAMA

El programa está dirigido tanto al diagnóstico y caracterización de *N. meningitidis* en muestras clínicas como al estudio de cepas de meningococo procedentes de pacientes con EMI, y de otras patologías, y está abierto a la participación de todos los laboratorios de microbiología clínica y de salud pública del SNS, con el objetivo de tener una muestra lo más representativa posible de la población de cepas circulantes.

A nivel metodológico, actualmente el programa incluye, para cada tipo de muestra recibida:

- Muestras clínicas:
 - Determinación de la presencia de *N. meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Listeria monocytogenes* mediante un protocolo de RT-PCR.
 - En los casos positivos para *N. meningitidis* se procede a la determinación del serogrupo mediante protocolo de amplificación de genes capsulares por un protocolo de RT-PCR.
 - En los casos positivos se procede a la determinación del genosubtipo mediante amplificación y secuenciación las regiones variables VR1 y VR2 de la porina PorA de meningococo.
- Cepas de meningococo
 - Determinación del serogrupo/genogrupo en las cepas previamente aisladas en hospitales del SNS.
 - Determinación del genosubtipo mediante amplificación y secuenciación de las regiones variables de la porina PorA.
 - Caracterización molecular mediante Secuenciación del Genoma Completo, de la que se extrae la información de complejo clonal al que la cepa pertenece, así como el alelo de proteínas incluidas en las vacunas actualmente disponibles. Esta información se realiza por petición expresa, y las secuencias completas serán depositadas en un repositorio del ECDC en los próximos meses, cuando esté disponible el procedimiento.
 - Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante Etest frente a 6 antimicrobianos (rifampicina, ciprofloxacino, penicilina, ampicilina, cefotaxima y ceftriaxona).
 - Caracterización molecular de mecanismos de resistencia antimicrobiana mediante secuenciación del genoma completo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El LRM comenzó su actividad a finales de los años 70, respondiendo a una demanda del SNS debido a la mayor onda epidémica de EMI desde que se tienen datos. El laboratorio iniciaba en aquel momento la caracterización fenotípica de los aislados mediante perfiles de proteínas, y aunque la presencia del serotipo 2 parecía más abundante, los datos son difícilmente comparables con la serie histórica posterior por la utilización de metodología e incluso nomenclaturas diferentes. Ya en los años 90 se estableció un programa más asentado, en el que se buscó la representatividad de los datos generados.

Representatividad de la muestra recibida en el Programa

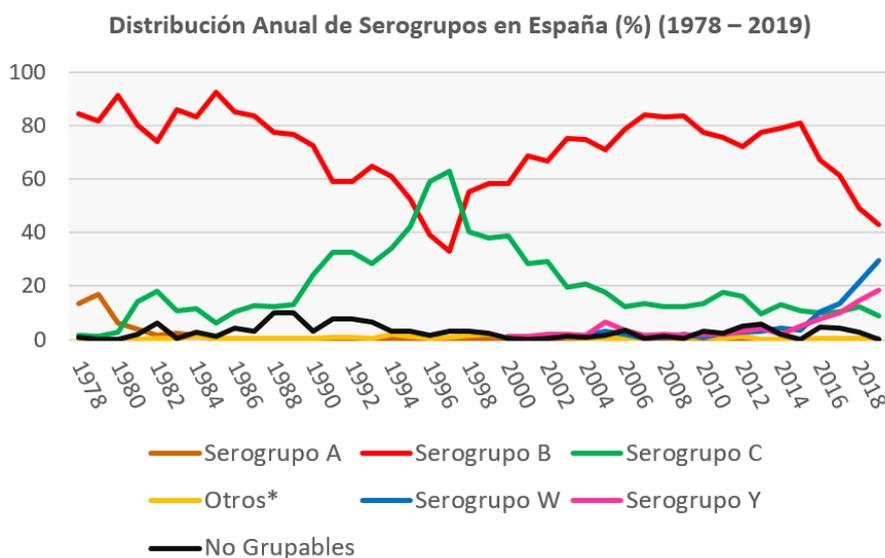
Si se analiza un periodo que va desde el año 2000 al 2010, se observa que el LRM recibió un 67% de los casos confirmados y declarados a RENAVE. Si hacemos ese mismo análisis desde 2015 a 2019, la representatividad se sitúa en torno al 72%.

Si se analiza el origen de las muestras, puede observarse como estas proceden de todas las CC.AA., incluyendo también las dos ciudades autónomas, por lo que la muestra tiene una aceptable representatividad geográfica.

Distribución de serogrupos

En la [Figura 1](#) puede verse cuál ha sido la evolución de los serogrupos desde el año 1978 hasta 2019. Si bien el serogrupo B ha sido mayoritario en casi todos los momentos de la serie histórica deben reseñarse varios momentos críticos en la misma:

- Desaparición del Serogrupo A al principio de los años 80 como ha sucedido en otros países europeos.
- Aumento de casos asociados al serogrupo C, que llegó a ser mayoritario en 1996 y 1997, y que condujo a intervenir, primero con vacuna de polisacárido purificado A+C, y posteriormente en el año 2000 con vacuna conjugada frente a serogrupo C que quedó incluida en los calendarios de las CC.AA.
- Aumento significativo del serogrupo W, acompañado en menor medida de un incremento del serogrupo Y a partir del año 2015 que condujo a la introducción de vacuna tetravalente conjugada ACWY en las CC.AA. como dosis de refuerzo en pre-adolescentes.

Figura 1. Evolución de los serogrupos de *Neisseria meningitidis* en España desde 1978 hasta 2019.

En todos los casos se ha constatado la eficacia de la información generada desde el LRM para la detección precoz de este tipo de eventos con implicaciones en Salud Pública.

Distribución de serosubtipos/genosubtipos

Si bien la metodología ha cambiado a lo largo de la serie histórica (inicialmente con anticuerpos monoclonales (serosubtipos) y posteriormente con secuenciación de dos regiones variables de PorA (genosubtipo)), la terminología es extrapolable y los resultados comparables. Se han producido cambios en el perfil de serosubtipos/genosubtipos en la serie histórica: Mientras que a principios de los años 90 las cepas P1.19, 15 (VR1: 19, VR2: 15) representaban casi un 50% de los casos de serogrupo B, el perfil correspondiente a VR1: 22 y VR2: 14, así como el 22, 9 aumentan a principios de este siglo, mientras que ha ido disminuyendo significativamente el 19, 15. En el momento actual, las cepas 22,14 suponen un 30% de las de serogrupo B y las 22,9 un 13% mientras que las 19,15 sólo suponen un 7%. Las cepas de serogrupo C eran mayoritariamente No subtipables (78%) hasta mediados de los años 90, aunque las 5, 2 alcanzaron más del 60% en la segunda mitad de los 90, y son las mayoritarias en el serogrupo C desde entonces. Este perfil de genosubtipo, 5,2, ha sido también el mayoritario en la onda epidémica asociada a serogrupo W entre las cepas de este serogrupo.

Distribución de Complejos Clonales (CCs)

De igual forma, se han producido cambios significativos en la distribución de los CCs, con el cc41/44 y el cc32 como los mayoritarios al principio de los estudios en los años 90, pero con un progresivo incremento en el cc213 y cc269 y un descenso de los primeros, de forma que actualmente un 35% de las cepas de serogrupo B son del cc213, y sólo un 5% pertenecen al cc41/44. El cc11 ha sido el mayoritario tanto para las cepas de serogrupo C como para las de serogrupo W.

Susceptibilidad frente a antimicrobianos

Durante los últimos años las cepas con una CMI a penicilina por encima de 0,25 mg/l (Resistentes para EUCAST), suponen en torno a un 10%. Sólo anecdóticamente aparecen cepas resistentes a rifampicina, mientras que la resistencia a ciprofloxacino se limita a muy pocos aislamientos cada año (uno, dos o ninguno). Las cepas siguen siendo susceptibles a ceftriaxona y cefotaxima, aunque las CMIs se van acercando paulatinamente a los puntos de corte para la resistencia, lo que obliga a mantener una estrecha vigilancia.

Adicionalmente el LRM ha participado activamente en el desarrollo y aplicación de métodos y algoritmos para predicción de coberturas vacunales con preparados proteicos, en estudio y resolución de brotes, en la encuesta nacional de seroprevalencia del Ministerio de Sanidad y en la organizada específicamente por la Generalitat de Cataluña, y analiza los antígenos vacunales de forma rutinaria informando de ello cuando se le solicita.

CONCLUSIONES

- En un contexto como el reseñado en este informe, y ante la presencia de diferentes vacunas disponibles, los datos de caracterización de las cepas de meningococo, la aplicación de técnicas moleculares de diagnóstico que permiten su caracterización en ausencia de cultivo, la vigilancia de la susceptibilidad a los antimicrobianos, y la determinación de la protección y/o respuesta inmune conferida por vacunación, que constituyen la base de la actividad del programa de vigilancia microbiológica de EMI, han mostrado su utilidad en la toma de decisiones en Salud Pública.
- La vigilancia de laboratorio ha permitido visualizar la dinámica continua de las cepas de *N. meningitidis*, y cómo un sistema basado en la actividad de caracterización en tiempo real permite predecir cambios con una mayor antelación, lo que redundará en una mayor eficacia de las medidas potenciales que puedan tomarse.
- La metodología actual para la caracterización de los aislados, basada en la Secuenciación del Genoma Completo permite seleccionar aquellos genes/antígenos que se quieran añadir en los esquemas y da una información intercambiable con otros laboratorios para poder hacer un adecuado seguimiento de las cepas circulantes.
- La dinámica y evolución de las cepas circulantes requiere de un seguimiento altamente sofisticado que sólo se alcanza con la utilización rutinaria de las últimas metodologías de caracterización molecular.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Berrón S, De La Fuente L, Martín E, Vázquez JA. Increasing incidence of meningococcal disease in Spain associated with a new variant of serogroup C. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998;17(2):85-89. doi: [10.1007/BF01682161](https://doi.org/10.1007/BF01682161).
2. Abad R, Medina V, Stella M, Boccadifuoco G, Comanducci M, Bambini S, Muzzi A, Vázquez JA. Predicted Strain Coverage of a New Meningococcal Multicomponent Vaccine (4CMenB) in Spain: Analysis of the Differences with Other European Countries. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150721. doi: [10.1371/journal.pone.0150721](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150721)
3. Abad R, Medina V, Fariñas MDC, Martínez-Martínez L, Bambini S, Dari A, Medini D, Pizza M, Vázquez JA. Potential impact of the 4CMenB vaccine on oropharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis*. *J Infect*. 2017;75(6):511-520. doi: [10.1016/j.jinf.2017.09.021](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.09.021).
4. McNeil LK, Donald RGK, Gribenko A, French R, Lambert N, Harris SL, Jones TR, Li S, Zlotnick G, Vogel U, Claus H, Abad R, Vazquez JA, Borrow R, Findlow J, Taha MK, Deghmane AE, Caugant DA, Kriz P, Musilek M, Wang X, Vuong J, Mayer LW, Pride MW, Jansen KU, Anderson AS. Predicting the Susceptibility of Meningococcal Serogroup B Isolates to Bactericidal Antibodies Elicited by Bivalent rLP2086, a Novel Prophylactic Vaccine. *mBio*. 2018; 9(2):e00036-18. doi: [10.1128/mBio.00036-18](https://doi.org/10.1128/mBio.00036-18).
5. Abad R, García-Amil C, Navarro C, Martín E, Martín-Díaz A, Vázquez JA. Molecular characterization of invasive serogroup B *Neisseria meningitidis* isolates from Spain during 2015-2018: Evolution of the vaccine antigen factor H binding protein (FHbp). *J Infect*. 2021;82(4):37-44. doi: [10.1016/j.jinf.2021.01.030](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.01.030).

Programa de Listeriosis

Informe elaborado por R. Abad, C. García-Amil, C. Navarro, E. Martín, y J.A. Vázquez.

Unidad de *Neisseria*, *Listeria* y *Bordetella*. Laboratorio de Referencia e Investigación en Enfermedades Bacterianas Inmunoprevenibles. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

INTRODUCCIÓN

La listeriosis es una enfermedad de transmisión alimentaria que puede afectar tanto al hombre como a numerosas especies animales, cuyo agente etiológico, en el caso de la listeriosis humana, es la bacteria *Listeria monocytogenes*. En general, se trata de una enfermedad que afecta principalmente a personas con un sistema inmunitario débil o alterado, siendo los principales grupos de riesgo mujeres embarazadas, recién nacidos, personas mayores y personas inmunodeprimidas.

Clínicamente, la listeriosis puede presentarse como listeriosis gastrointestinal no invasiva o como listeriosis invasiva. La listeriosis gastrointestinal generalmente se presenta en individuos inmunocompetentes tras la ingestión de grandes cantidades de la bacteria, en este caso el periodo de incubación es corto (24-48 horas) y los síntomas son los típicos de una gastroenteritis (diarrea, fiebre, cefalea) con una duración de entre 3-4 días. Sin embargo, la presentación más frecuente de esta enfermedad va a ser en su forma invasiva que es la que aparece en los grupos de riesgo, en este caso el periodo de incubación es muy variable (de 3 a 70 días) siendo el periodo medio de incubación de 3 semanas, y las manifestaciones clínicas más frecuentes son meningitis, sepsis, meningoencefalitis o romboencefalitis, y en el caso de las embarazadas, aunque la infección suele ser asintomática, puede tener grandes repercusiones para el feto como pueden ser aborto, muerte al nacer o parto prematuro de un neonato infectado.

Aunque la listeriosis es una enfermedad relativamente poco frecuente, con una tasa de incidencia de 0,47 casos por 100.000 habitantes (2.549 casos confirmados) en Europa y de 1.06 (432 casos confirmados) en España, según los últimos informes publicados por el *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) (1) y la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) (2), es también la enfermedad de transmisión alimentaria con mayor porcentaje de hospitalizaciones (97%) y mortalidad (15.6%) (1).

Actualmente, *L. monocytogenes* es considerado uno de los patógenos emergentes más importantes dentro de las enfermedades de transmisión alimentaria. Por un lado, se trata de un microorganismo ampliamente distribuido en la naturaleza, con unas características específicas que le permiten seguir creciendo y multiplicarse en condiciones adversas, lo que dificulta su control en la industria alimentaria pudiendo llegar a suponer un grave problema. Y, por otro lado, los cambios en los hábitos alimenticios de la población, que realiza un mayor consumo de alimentos ya preparados, así como el incremento del número de personas consideradas de alto riesgo, debido al envejecimiento de la población y al aumento de la expectativa de vida de los pacientes inmunodeprimidos, ha hecho que en las últimas décadas *L. monocytogenes* se haya convertido en un importante problema de salud pública.

La dificultad a la hora de relacionar diferentes casos clínicos entre sí (generalmente solo se ven afectados grupos específicos de la población) y vincularlos con una misma fuente de contaminación (largo periodo de incubación), ha puesto el foco en los programas de vigilancia microbiológica que resultan claves en el control de la enfermedad permitiendo no solo el estudio y caracterización de brotes sino también detectando e identificando estos brotes de manera temprana.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

Los datos de laboratorio son una parte fundamental para una correcta vigilancia de las enfermedades infecciosas, contribuyendo de manera importante a la hora de tomar decisiones en cuanto a la implementación de unas correctas medidas de control y prevención. En el caso concreto de la listeriosis, como ya se ha comentado previamente, esta vigilancia microbiológica cobra especial relevancia a la hora de llevar a cabo la identificación y caracterización de brotes, permitiendo además dar respuesta a las diferentes alertas o consultas realizadas tanto a nivel nacional como internacional.

De manera genérica, los objetivos del programa son:

- Proporcionar información microbiológica al Sistema Nacional de Vigilancia y al ECDC.
- Desarrollar y aplicar herramientas que permitan el diagnóstico molecular en ausencia de cultivo.
- Llevar a cabo la caracterización molecular de aislamientos clínicos, así como de aislamientos alimentarios y ambientales en el contexto de la investigación de un brote, a nivel de serovariedad, MLST y cgMLST.
- Identificación, estudio y caracterización de brotes.
- Mantenimiento de una base de datos a nivel nacional con información genómica de todos los aislamientos recibidos.

DISEÑO DEL PROGRAMA

El programa está dirigido tanto al diagnóstico molecular de listeriosis en muestras clínicas como al estudio y caracterización de aislados clínicos de *L. monocytogenes*, y está abierto a la participación de todos los laboratorios de microbiología clínica y de salud pública del Sistema Nacional de Salud, con el objetivo de tener una muestra lo más representativa posible de la población de cepas clínicas que permita detectar la aparición de brotes e identificar potenciales fuentes de contaminación de una manera temprana.

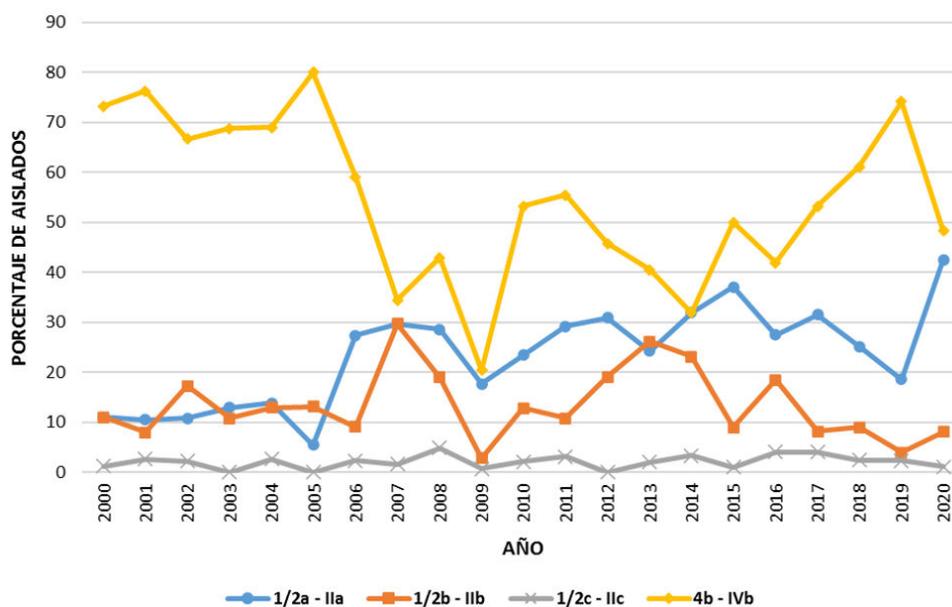
A nivel metodológico, actualmente el programa incluye:

- Determinación de la presencia de *L. monocytogenes* en muestras clínicas mediante PCR tiempo real basada en la utilización de sondas.
- Caracterización molecular de todos los aislados recibidos a nivel de serogrupo/serovariedad (5-plexPCR in silico), MLST (7 genes) y cgMLST (1701 genes).
- Identificación, estudio y caracterización de brotes, mediante secuenciación del genoma completo y análisis de diferencias siguiendo el esquema cgMLST de Ruppitsch.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El laboratorio comenzó a trabajar en el estudio y la caracterización de *L. monocytogenes* a principios de los años 90. Esta caracterización incluía inicialmente el serotipado, método de tipado fenotípico basado en la variabilidad de los antígenos somáticos (O) y flagelares (H) de *L. monocytogenes*, y la electroforesis en campo pulsado (PFGE) para el estudio de brotes. Aunque hasta el momento se han descrito 13 serotipos o serovariedades diferentes, solo 4 de ellas (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) son responsables de la mayoría (más del 98%) de los casos clínicos de listeriosis en humanos. A partir de 2013 el laboratorio incorporó un método de tipado molecular alternativo al serotipado, basado en la presencia de genes específicos en cada una de estas serovariedades, mediante una PCR múltiple que permite clasificar las cepas de *L. monocytogenes* en 5 grupos (IIa, IIb, IIc, IVb y L) (3). La distribución anual de los serotipos-grupos encontrados entre los aislados humanos recibidos en el laboratorio desde el año 2000 (n=2337) se muestra en la [Figura 1](#), siendo el 4b-IVb el más prevalente (56,8%, n=1328) seguido del 1/2a-IIa (22,3%, n=522), datos que coinciden con lo detectado a nivel europeo donde el serogrupo IVb es también el más notificado (4) y el que se asocia con la mayoría de los brotes declarados.

Figura 1. Distribución de los aislados clínicos de *Listeria monocytogenes* recibidos en el CNM por serotipo-grupo y año, 2000-2020.



Desde que en el año 2014 la listeriosis comenzara a notificarse como enfermedad de declaración obligatoria (EDO) (hasta entonces los casos de listeriosis eran notificados de manera voluntaria a la RENAVE a través del Sistema de Información Microbiológica (SIM)), la representatividad del programa ha ido variando en función del año y las CCAA (Tabla 1). En 2019 el CNM recibió el 87,3% (n=441) de los 505 casos notificados por la RENAVE al ECDC través de TESSY (*The European Surveillance System*) (4), sin embargo, este porcentaje es bastante superior a lo recibido en años anteriores (Tabla 1), probablemente como consecuencia del brote declarado en Andalucía en 2019 que motivó el envío de un mayor número de aislados para estudiar su potencial relación con el mismo. A nivel de CCAA, todas ellas están en mayor o menor medida representadas en el programa (Tabla 1), con la excepción de las Ciudades Autónomas de Ceuta y Melilla de las que no se dispone de ningún aislado.

Uno de los principales objetivos del programa es la identificación y el estudio de brotes, para ello, la caracterización de los aislados a nivel de serotipo-grupo, aunque puede resultar útil como paso preliminar en el estudio de brotes permitiendo hacer una primera clasificación de los aislados, no es suficiente, y es necesario aplicar otros métodos de tipado con mayor poder de discriminación. Uno de los más utilizados ha sido la electroforesis en campo pulsado (PFGE), sin embargo, las dificultades que ofrece a la hora de comparar e intercambiar resultados entre diferentes laboratorios limitan mucho su utilización, lo que ha llevado a la búsqueda de métodos alternativos que permitan una mejor y más amplia vigilancia. En este sentido, el laboratorio desarrolló un esquema de tipado basado en la secuenciación de 7 genes constitutivos (MLST) para la caracterización de *L. monocytogenes* (6) que permite clasificar las cepas en secuencia tipos (ST), los cuales se van a agrupar en diferentes complejos clonales (CC).

Este esquema de tipado se empezó a incluir progresivamente en el programa desde el año 2012 y actualmente se aplica a todos los aislados recibidos. Entre los 935 aislados analizados entre 2012-2020 se han identificado 60 STs diferentes agrupados en 43 CCs, siendo el CC388 y el CC1 los mayoritarios (n=242 (25,9%) y n=217 (23,2%), respectivamente), ambos asociados con el serotipo-grupo IVb. Atendiendo a su distribución anual, mientras que la mayoría (92,6%) de aislados del CC388 se corresponden con aislados del año 2019 relacionados con el brote de Andalucía, el CC1 es el CC más prevalente desde el año 2016 suponiendo entre el 20 y el 40% de los casos anualmente. Los CC8, CC87 y CC9 son los CC más prevalentes entre las cepas de serotipo-grupo IIa, IIb y IIc, respectivamente.

Desde el 2016, con el objetivo de mejorar la vigilancia de la listeriosis, y siguiendo las recomendaciones del ECDC, se implementó un nuevo sistema de vigilancia microbiológica basado en la secuenciación de genomas completos (7). De tal manera que actualmente todos los aislados recibidos de *L. monocytogenes*, procedentes del Sistema Nacional de Salud, son secuenciados a nivel de genoma completo. A partir de esta información genómica se realiza un análisis individualizado de cada uno de los aislados incluyendo su caracterización a nivel de genogrupo, ST y CC (MLST, 7 genes) y clúster tipo (CT) (cgMLST, 1701 genes). Y se realiza también un análisis comparativo con todos los genomas disponibles en la base de datos del laboratorio con el objetivo de identificar aislados genómicamente relacionados que se agrupen en un mismo clúster. Este análisis comparativo ha permitido la identificación de 41 clústers entre 2016 y 2020, de los cuales solo 5 habían sido dados de alta como brote: Clúster IIb/ST-87_1 (brote 1063/16_País Vasco), clúster IVb/ST-6_3 (brote 1007/18_Comunidad de Madrid), clúster IVb/ST-1_15 (brote 1107/18_Castilla la Mancha), clúster IVb/ST-1_1 (brote 1119/18_C. de Madrid) y clúster IVb/ST-388_1 (brote 1075/19_Andalucía).

El programa incluye también el análisis de aislamientos alimentarios y ambientales de *L. monocytogenes* en el contexto de la investigación de brotes, en este sentido de los 113 aislados alimentarios/ambientales analizados desde 2016 la secuenciación genómica ha permitido relacionar 66 de ellos con 255 casos clínicos en 8 de los clústers identificados. Entre estos 8 clústers se encuentran: el clúster IVb/ST-388_1 que se corresponde con el extenso brote de listeriosis declarado en Andalucía en el verano de 2019 y que incluye 41 aislamientos alimentarios de origen cárnico, 2 de superficie y 224 de casos clínicos; el clúster IIb/ST-87_5 que se corresponde con una de las otras dos alertas alimentarias declaradas en Andalucía simultáneamente al primer brote y que incluye 9 aislamientos alimentarios de origen cárnico y 4 aislamientos clínicos; el clúster IVb/ST-1_16 que relaciona genómicamente 8 aislamientos clínicos con la alerta alimentaria Ref. 2019/179; el clúster IVb/ST-1_12 que agrupa 8 casos clínicos con un aislamiento alimentario de origen cárnico obtenido en el ámbito doméstico, el clúster IIb/ST-3_1 que agrupa 4 aislamientos clínicos con 1 alimentario obtenido de un control rutinario; el clúster IIa/ST-155_5 con 2 aislamientos clínicos y 2 alimentarios relacionados también con la alerta alimentaria Ref. 2019/179; el clúster IVb/ST-217_1 que relaciona un caso clínico con 5 aislamientos alimentarios obtenidos de diferentes lotes de queso de una misma fábrica; y el clúster IIb/ST-224_1 que incluye 4 aislamientos clínicos y 3 alimentarios de origen cárnico.

Esta información, además de ser transmitida tanto a la RENAVE como a los Servicios de Salud Pública de las diferentes CCAA, es compartida a nivel europeo a través del Sistema de Vigilancia Europeo (TESSy) del ECDC con el objetivo de poder relacionar aislados de diferentes países. Esto ha permitido la identificación de 29 clústers inter-países con implicación de aislados españoles, de los cuales 7 están actualmente en investigación.

CONCLUSIONES

- La dificultad a la hora de rastrear potenciales fuentes de contaminación y vincular los casos de listeriosis, debido a su largo periodo de incubación y grupos de riesgo específicos, pone de manifiesto la necesidad de realizar una vigilancia microbiológica que permita vincular los casos clínicos y estudiar las cadenas de transmisión en base a las características de los aislados de *L. monocytogenes*.
- La mayoría de los casos de listeriosis en España, al igual que lo que ocurre a nivel europeo, son producidos por cepas de serotipo-grupo IVb pertenecientes al CC1.
- Con el objetivo de mejorar la vigilancia de esta enfermedad emergente en los últimos años se ha llevado a cabo la implementación de un sistema de vigilancia basado en la secuenciación de genomas completos.
- La utilización de la secuenciación genómica ha permitido detectar un mayor número de clústers/brotos no solo a nivel local/nacional (41 entre 2016 y 2020) y establecer su vinculación con potenciales fuentes de contaminación (con alimentos de origen cárnico en 6 clúster, de origen lácteo en 1 y crustáceos en otro), sino también a nivel europeo (actualmente 7 en investigación).
- Para explotar el potencial de la secuenciación genómica como herramienta de vigilancia es necesario aplicarla de manera rutinaria, en tiempo real y sobre el mayor número de aislados disponibles. En este sentido sería importante mantener la representatividad del programa al menos en el 87% alcanzado en 2019.
- Otro aspecto que resultaría de gran utilidad a la hora de estudiar brotes y cadenas de transmisión sería poder contar con una base de datos genómica de aislados alimentarios/ambientales con la que poder cruzar los datos de los casos clínicos

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2019;17(12):5926, 276 pp.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>.
2. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Informe epidemiológico de listeriosis. Casos notificados a la RENAVE en los años 2015-2018.
https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/resultados%20vigilancia/Informe_listeriosis-RENAVE_28082019.pdf
3. Doumith M, Jacquet C, Gerner-Smidt P, Graves LM, Loncarevic S, Mathisen T, Morvan A, Salcedo C, Torpdahl M, Vazquez JA, Martin P. Multicenter validation of a multiplex PCR assay for differentiating the major *Listeria monocytogenes* serovars 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b: toward an international standard. *J Food Prot.* 2005;68(12):2648-50.
doi: [10.4315/0362-028x-68.12.2648](https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.12.2648).
4. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Surveillance Atlas of Infectious Diseases. Stockholm, Sweden: ECDC; 2019.
Available from: <http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>.
5. Centro Nacional de Epidemiología. CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la Vigilancia Epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual 2014. Madrid, 2016.
6. Salcedo C, Arreaza L, Alcalá B, de la Fuente L, Vázquez JA. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. *J Clin Microbiol.* 2003;41(2):757-62.
doi: [10.1128/JCM.41.2.757-762.2003](https://doi.org/10.1128/JCM.41.2.757-762.2003).
7. Van Walle I, Björkman JT, Cormican M, Dallman T, Mossong J, Moura A, Pietzka A, Ruppitsch W, Takkinen J; European Listeria Wgs Typing Group. Retrospective validation of whole genome sequencing-enhanced surveillance of listeriosis in Europe, 2010 to 2015. *Euro Surveill.* 2018;23(33):1700798.
doi: [10.2807/1560-7917.ES.2018.23.33.1700798](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.33.1700798).

Programa de Infección Gonocócica. Sensibilidad Antimicrobiana, 1991-2020

Informe elaborado por R. Abad, E. Martín, C. García-Amil, C. Navarro y J.A. Vázquez.

Unidad de *Neisseria*, *Listeria* y *Bordetella*. Laboratorio de Referencia e Investigación en Enfermedades Bacterianas Inmunoprevenibles. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

INTRODUCCIÓN

La infección gonocócica (IG), cuyo agente etiológico es la bacteria *Neisseria gonorrhoeae*, es la segunda infección de transmisión sexual (ITS) de etiología bacteriana más prevalente a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que cada año se producen en el mundo 87 millones de nuevos casos de IG en población entre 15-49 años de edad (1). En Europa, según el último informe del ECDC, en 2018 se notificaron un total de 100.673 casos de IG (tasa de notificación: 26,4 casos por 100.000 habitantes), lo que supone un incremento del 22% con respecto al año anterior (2), incremento que se viene observando de una manera continuada en los últimos 10 años. Esta tendencia ascendente se observa también en España desde el año 2001, y de una manera más pronunciada desde 2013. En 2019 se declararon en España un total de 12.359 casos de IG (tasa de incidencia: 28,88 casos por 100.000 habitantes) (3).

Actualmente, la IG constituye un importante problema de Salud Pública, no solo por su magnitud y el progresivo incremento de su incidencia, sino fundamentalmente debido al riesgo creciente de IG intratable, poniendo de manifiesto la necesidad de medidas de control inmediatas, tal y como ha sido reflejado por la OMS en el *Plan de acción mundial para controlar la propagación y el impacto de la resistencia de N. gonorrhoeae a los antimicrobianos* integrado en su programa de vigilancia de las ITS (4).

Tras la llegada de los primeros antibióticos a principios del siglo XX, *N. gonorrhoeae* ha ido desarrollando resistencias a todos aquellos que se han ido utilizando para combatirla: penicilinas, sulfonamidas, tetraciclinas, quinolonas, macrólidos, e incluso cefalosporinas de última generación (5), lo que ha llevado a la aparición y dispersión de cepas multirresistentes a nivel mundial. Esto, sumado a la ausencia de nuevos antibióticos activos frente a este microorganismo, hace pensar en la IG intratable como en una realidad cercana, enfatizando la necesidad de llevar a cabo programas de vigilancia microbiológica que nos permitan detectar de manera precoz la aparición de estas resistencias, contribuyendo así a la actualización de las guías clínicas de tratamiento y evitando la propagación de estas cepas multirresistentes.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

Los datos de laboratorio son una parte fundamental para una correcta vigilancia de las enfermedades infecciosas, contribuyendo de manera importante a la toma de decisiones en cuanto a la implementación de unas correctas medidas de control y prevención. En el caso de la IG, esta vigilancia microbiológica cobra una especial relevancia en el aspecto de la resistencia antimicrobiana dada la elevada capacidad de *N. gonorrhoeae* para desarrollar resistencias.

De una manera genérica, el propósito de este programa es llevar a cabo una vigilancia continuada de las cepas de *N. gonorrhoeae* circulantes en España, en un contexto europeo, que nos permita tener un conocimiento detallado de sus características y evolución, proporcionando esta información microbiológica tanto al Sistema Nacional de Vigilancia como al *European Center for Diseases Control* (ECDC) a través del *European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme* (Euro-GASP).

DISEÑO DEL PROGRAMA

El programa está dirigido al estudio de aislados de *N. gonorrhoeae* procedentes de sujetos con cualquier tipo de IG, y está abierto a la participación de todos los laboratorios de microbiología clínica y de salud pública del Sistema Nacional de Salud, con el objetivo de tener una muestra lo más representativa posible de la población de cepas circulantes.

A nivel metodológico, actualmente el programa incluye:

- Determinación de la serovariedad mediante co-aglutinación con anticuerpos monoclonales específicos.
- Genotipado mediante NG-MAST (*Neisseria gonorrhoeae* - *MultiAntigen Sequence Typing*).
- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante Etest frente a 8 antimicrobianos (Penicilina, Tetraciclina, Ciprofloxacino, Cefixima, Ceftriaxona, Espectinomicina, Gentamicina y Azitromicina).
- Caracterización molecular de mecanismos de resistencia antimicrobiana mediante secuenciación del genoma completo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El CNM lleva realizando la vigilancia microbiológica de la IG desde principios de los años 90. Teniendo en cuenta el número de casos notificados (probables más confirmados) por la RENAVE (3), en 2019 el CNM recibió el 7,7% (n=947) de los 12.359 casos notificados, porcentaje similar a lo recibido en los últimos 7 años (Tabla 1). Para conocer la cobertura real del programa (porcentaje de aislados de *N. gonorrhoeae* recibidos a través del programa de vigilancia microbiológica del total de aislados realizados) sería necesario conocer, por un lado, el número de casos confirmados y, por otro, cuántos de esos casos confirmados lo han sido por aislamiento de la bacteria. En el caso de la IG, actualmente las técnicas de diagnóstico más utilizadas son las técnicas de detección de ácidos nucleicos (TAANs) que no requieren el aislamiento de la bacteria. Según el último informe disponible del Sistema de Información Microbiológica (SIM) que sí recoge información sobre el tipo de diagnóstico, de los 3.905 casos notificados a través del SIM en 2017 solo el 27,2% (n=1.063) fueron diagnosticados por aislamiento (6). Por lo tanto, asumiendo que todos los casos notificados en 2019 por la RENAVE son casos confirmados y que aproximadamente solo el 30% lo han sido por aislamiento (n=3.708), los 947 aislados recibidos en el CNM podrían suponer el 25,5% del total de aislamientos realizados.

En cuanto a la representatividad, ésta varía en función de las CCAA (Tabla 2). Teniendo en cuenta la totalidad de los casos notificados por la RENAVE (3) en los últimos 4 años (2016-2019), Navarra, Asturias y Galicia serían las CCAA mejor representadas (el programa recibe más del 60% de los casos de IG notificados en estas CCAA), seguidas de Castilla la Mancha, Castilla y León, Madrid e Islas Canarias (se reciben entre el 10-40% de los casos notificados por estas CCAA); menos representadas estarían Cataluña, C. Valenciana, Extremadura y Andalucía (<10%). Del resto de CCAA (Aragón, Islas Baleares, Cantabria, Murcia, País Vasco, La Rioja, Ceuta y Melilla) no se dispone de ningún aislamiento por lo que no estarían representadas.

En el año 2019 se recibieron a través del programa un total de 947 aislados de *N. gonorrhoeae* procedentes de 11 CCAA (Tabla 2), de los cuales el 86% (n=814) eran casos de IG en hombres y el 14% en mujeres. Aunque la mayoría de los aislados recibidos fueron obtenidos de muestras genitales (n=880, 92,9%), un 4,2% (n=40) y un 1,3% (n=12) de los aislados procedían de muestras anorrectales y faríngeas, respectivamente (Tabla 1).

El presente informe se centra solo en los resultados obtenidos de la vigilancia de la sensibilidad antimicrobiana en *N. gonorrhoeae* entre 1991 y 2020.

Tabla 1. Características de los aislados de *Neisseria gonorrhoeae* recibidos en el CNN, 1991-2020.

	N° Casos		Aislados recibidos CNM							
	Notificados RENAVE (3)	Total N (%) ^{a)}	Sexo			Aislamiento				
			Hombre	Mujer	Desconocido	Genital	Faringeo	Anorrectal	Otros	Desconocido
			N (%)	N (%)	N	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N
1991	ND ^{b)}	266 (–)	ND	ND	ND	169 (97,1)	0	2 (1,1)	3 (1,7)	92
1992	ND	211 (–)	ND	ND	ND	152 (99,3)	0	1 (0,7)	0	58
1993	ND	101 (–)	ND	ND	ND	75 (74,3)	1 (1,3)	0	0	25
1994	ND	54 (–)	ND	ND	ND	35 (97,2)	0	0	1 (2,8)	18
1995	4.599	67 (1,5)	ND	ND	ND	28 (90,3)	1 (3,2)	2 (6,5)	0	36
1996	3.951	72 (1,8)	27 (79,4)	7 (20,6)	38	49 (87,5)	3 (1,9)	3 (1,9)	1 (0,6)	16
1997	2.352	56 (2,4)	13 (72,2)	5 (27,8)	38	19 (76,0)	0	4 (16,0)	2 (8,0)	31
1998	2.169	38 (1,8)	26 (86,7)	4 (13,3)	8	27 (87,1)	1 (3,2)	1 (3,2)	2 (6,5)	7
1999	1.469	87 (5,9)	41 (82,0)	9 (18,0)	37	40 (81,6)	4 (4,6)	3 (6,1)	2 (4,1)	38
2000	1.045	78 (7,5)	58 (78,4)	16 (21,6)	4	77 (98,7)	1 (1,3)	0	0	0
2001	805	90 (11,2)	79 (91,9)	7 (8,1)	4	81 (95,3)	0	0	4 (4,7)	5
2002	833	153 (18,4)	90 (88,2)	12 (11,8)	51	94 (93,1)	1 (1,0)	1 (1,0)	5 (4,9)	52
2003	1.069	106 (9,9)	78 (78,8)	21 (21,2)	7	98 (98,0)	1 (1,0)	1 (1,0)	0	6
2004	980	210 (20,4)	107 (89,2)	13 (10,8)	90	103 (91,2)	3 (2,7)	5 (4,4)	2 (1,8)	97
2005	1.155	160 (13,9)	136 (86,1)	22 (13,9)	2	145 (92,9)	3 (1,9)	3 (1,9)	5 (3,2)	4
2006	1.423	214 (15,0)	186 (88,2)	25 (11,8)	3	189 (93,6)	2 (1,0)	2 (1,0)	9 (4,4)	12
2007	1.698	388 (22,9)	342 (90,0)	38 (10,0)	8	356 (95,2)	1 (0,3)	4 (1,0)	13 (3,5)	14
2008	1.897	349 (18,4)	301 (87,5)	43 (12,5)	5	318 (94,1)	3 (0,9)	5 (1,5)	12 (3,6)	11
2009	1.954	499 (25,5)	435 (87,7)	61 (12,3)	3	397 (83,4)	22 (4,6)	52 (10,9)	5 (1,1)	23
2010	2.306	525 (22,8)	479 (91,2)	46 (8,8)	0	362 (86,2)	14 (3,3)	43 (10,2)	1 (0,2)	105
2011	2.640	319 (12,1)	290 (90,9)	29 (9,1)	0	286 (89,7)	1 (0,3)	27 (8,5)	5 (1,6)	0
2012	3.044	219 (7,2)	190 (87,2)	28 (12,8)	1	211 (96,3)	0	3 (1,4)	5 (2,3)	0
2013	3.315	290 (8,7)	252 (86,9)	38 (13,1)	0	281 (96,9)	0	7 (2,4)	2 (0,7)	0
2014	4.562	405 (8,9)	361 (89,1)	44 (10,9)	0	388 (95,8)	5 (1,2)	5 (1,2)	7 (1,7)	0
2015	5.170	443 (8,6)	384 (86,7)	59 (13,3)	0	421 (95,0)	5 (1,1)	13 (2,9)	4 (0,9)	0
2016	6.353	483 (7,6)	424 (87,8)	59 (12,2)	0	449 (93,0)	13 (2,7)	14 (2,9)	7 (1,4)	0
2017	8.753	539 (6,2)	469 (87,0)	70 (13,0)	0	499 (92,6)	17 (3,2)	20 (3,7)	3 (0,6)	0
2018	11.070	790 (7,1)	695 (88,0)	95 (12,0)	0	717 (90,8)	24 (3,0)	41 (5,2)	8 (1,0)	0
2019	12.359	947 (7,7)	814 (86,0)	132 (13,9)	1	880 (92,9)	12 (1,3)	40 (4,2)	15 (1,6)	0
2020	ND	373 (–)	301 (80,7)	72 (19,3)	0	312 (83,6)	20 (5,4)	33 (8,8)	8 (2,1)	0

a) Proporción de aislados recibidos en el CNM del total de casos notificados (probables + confirmados) a la RENAVE (3).

b) ND: Información No Disponible.

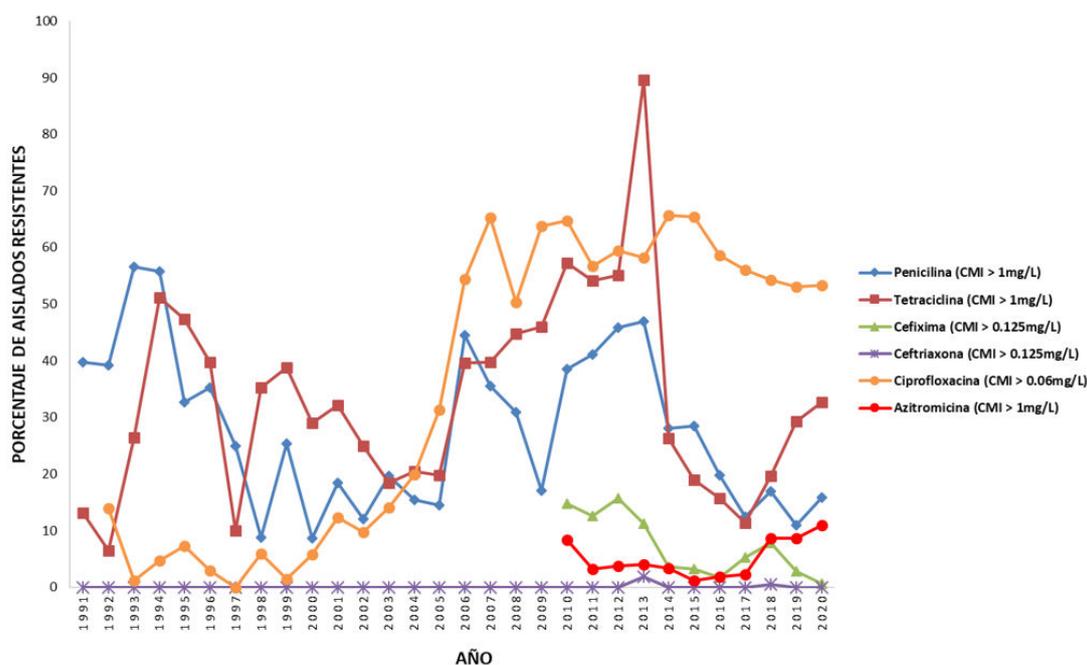
Tabla 2. Aislados de *Neisseria gonorrhoeae* recibidos vs casos de IG notificados por CCAA, 2016-2019.

	2016		2017		2018		2019	
	RENAVE	CNM N (%)						
Andalucía	724	57 (7,9)	741	50 (6,7)	889	102 (11,5)	1259	94 (7,5)
Aragón	80	0	103	3 (2,9)	136	0	261	0
Asturias	73	71 (97,3)	64	39 (60,9)	-	84	-	77
Baleares	292	0	485	0	486	0	424	0
Canarias	182	1 (0,5)	225	0	260	17 (6,5)	450	54 (12,0)
Cantabria	27	0	64	0	48	0	-	0
Castilla la Mancha	52	9 (17,3)	87	13 (14,9)	152	37 (24,3)	212	67 (31,6)
Castilla y León	87	14 (16,1)	80	20 (25,0)	107	18 (16,8)	129	30 (23,3)
Cataluña	2.154	32 (1,5)	3.614	29 (0,8)	4.601	49 (1,1)	5.727	69 (1,2)
C. Valenciana	633	29 (4,6)	762	24 (3,1)	936	24 (2,6)	1.415	43 (3,0)
Extremadura	45	6 (13,3)	35	1 (2,9)	61	2 (3,3)	55	2 (3,6)
Galicia	148	55 (37,2)	178	67 (37,6)	213	137 (64,3)	-	125
Madrid	1.515	153 (10,1)	1.853	192 (10,4)	2.618	197 (7,5)	1.357	271 (20,0)
Murcia	30	0	36	0	58	0	121	0
Navarra	61	56 (91,8)	108	100 (92,6)	146	123 (84,2)	165	115 (69,7)
País Vasco	219	0	290	0	316	0	739	0
La Rioja	28	0	25	0	37	0	42	0
Ceuta	0	0	3	0	3	0	2	0
Melilla	3	0	0	0	3	0	1	0

RENAVE: Número de casos de IG notificados por la RENAVE (3).

CNM: Número de aislados de *N. gonorrhoeae* recibidos en el CNM (N) y proporción de aislados recibidos del total de casos notificados (%).

La evolución de la resistencia a penicilina, tetraciclina, cefixima, ceftriaxona, ciprofloxacino y azitromicina, siguiendo los actuales criterios del EUCAST (7), se muestra en la Figura 1.

Figura 1. Porcentaje de aislados resistentes* de *Neisseria gonorrhoeae* por antibiótico y año, 1991-2020.

*Según criterios actuales del EUCAST (4).

Para el resto de antibióticos incluidos en el estudio (espectinomicina y gentamicina) apenas se encontraron resistencias: 3 aislados en el caso de la espectinomicina y 1 para gentamicina.

En general, aunque los datos de resistencia a penicilina y tetraciclina muestran una gran variabilidad en el tiempo, en el caso de la penicilina se puede observar una tendencia descendente desde el año 2013, pasando de un 47% de aislados resistentes (n=126, de 268 aislados analizados) a un 11% (n=85, de 774 aislados analizados) en 2019. Mientras que, en el caso de la tetraciclina, esa tendencia descendente que también se observa desde 2013 alcanza su punto más bajo en 2017, pasando de un 89,6% de aislados resistentes (n=240, de 268 aislados analizados) en 2013 a un 11,4% (n=54, de 538 aislados analizados) en 2017, produciéndose en estos últimos años un cambio de tendencia y alcanzándose un 29,3% de aislados resistentes (n=227, de 774 aislados analizados) en 2019.

En el caso del ciprofloxacino, la resistencia aumenta rápidamente entre los años 2002 y 2007, pasando de 9,7% aislados resistentes (n=12, de 124 aislados analizados) en 2002 a 65,3% (n=220, de 337 aislados analizados) en 2007, manteniéndose en estos niveles hasta 2015, cuando empieza a observarse un descenso paulatino que actualmente (2019) se encuentra en un 53% (n=410, de 774 aislados analizados).

A lo largo del periodo de tiempo analizado (1991-2020) se han detectado 8 aislados con resistencia a ceftriaxona, 5 de ellos aislados en 2013 en la Comunidad Valenciana (n=3), Asturias (n=1) y Castilla y León (n=1), y 3 aislados en Madrid en 2018. Todos ellos mostraron también resistencia a penicilina, tetraciclina, cefixima y ciprofloxacino, siendo uno de los aislados valencianos extremadamente resistente al presentar también resistencia a azitromicina (Tabla 3).

Tabla 3. Aislados con resistencia a ceftriaxona (CMI > 0,125 mg/L), 1991-2020.

Año	CCAA	ST (NG-MAST)	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (mg/L)					
			Ceftriaxona	Cefixima	Azitromicina	Penicilina	Tetraciclina	Ciprofloxacina
2013	Asturias	ST-1407	0,25 (R)	0,25 (R)	0,5 (S)	4 (R)	32 (R)	32 (R)
2013	C y León	ST-4706	0,5 (R)	0,25 (R)	1 (R)	4 (R)	32 (R)	32 (R)
2013	Valencia	ST-1407	0,25 (R)	0,5 (R)	0,5 (S)	2 (R)	32 (R)	32 (R)
2013	Valencia	ST-1407	0,25 (R)	0,5 (R)	0,5 (S)	4 (R)	>32 (R)	32 (R)
2013	Valencia	ST-8921	0,25 (R)	0,5 (R)	2 (R)	4 (R)	>32 (R)	32 (R)
2018	Madrid	ST-16942	0,19 (R)	0,19 (R)	0,38 (S)	1,5 (R)	1,5 (R)	8 (R)
2018	Madrid	ST-16942	0,19 (R)	0,25 (R)	0,5 (S)	2 (R)	2 (R)	>32 (R)
2018	Madrid	ST-3435	0,5 (R)	1,5 (R)	0,25 (S)	1,5 (R)	1,5 (R)	>32 (R)

R: Resistente; S: Sensible (Actuales criterios EUCAST (4))

En 2010 se incluyó en el programa de vigilancia el estudio de sensibilidad a cefixima y azitromicina. En el caso de la cefixima, aunque en 2010 se identificó un 14,8% de aislados resistentes (n=12, de 81 aislados analizados) estos valores han ido disminuyendo situándose en 2019 en un 2,8% (n=22, de 774 aislados analizados). Resulta especialmente preocupante el aumento del porcentaje de aislados con una CMI > 1mg/L (EUCAST ECOFF) para azitromicina observado en los últimos años, situándose en 2019 en un 8,7% (n=67, de 774 aislados analizados), detectándose entre 2017 y 2020 4 aislados con “alto nivel de resistencia a azitromicina” (CMI ≥ 256 mg/L) en Asturias (2017), Navarra (2018 y 2020) y Madrid (2019) (Tabla 4).

Tabla 4. Aislados con alto nivel de resistencia a azitromicina (CMI ≥ 256 mg/L), 1991-2020.

Año	CCAA	ST (NG-MAST)	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (mg/L)					
			Ceftriaxona	Cefixima	Azitromicina	Penicilina	Tetraciclina	Ciprofloxacina
2017	Asturias	ST-16418	0,023 (S)	<0,016 (S)	256 (R)	>32 (R)	32 (R)	2 (R)
2018	Navarra	ST-3935	0,023 (S)	0,023 (S)	256 (R)	0,25 (I)	1 (I)	0,5 (R)
2019	Madrid	ST-12304	<0,016 (S)	<0,016 (S)	>256 (R)	0,38 (I)	2 (R)	0,012 (S)
2020	Navarra	ST-3935	<0,016 (S)	0,016 (S)	>256 (R)	0,38 (I)	1 (I)	0,008 (S)

R: Resistente; I: Sensible, cuando se incrementa la exposición; S: Sensible (Actuales criterios EUCAST (4))

ND: Información No Disponible.

CONCLUSIONES

- Aunque la cobertura del programa ha sido muy variable en el tiempo, desde el año 2012 se reciben aislados de *N. gonorrhoeae* de entre el 6,2% y el 8,9% del total de casos de IG notificados por la RENAVE.
- A nivel de CCAA, la representatividad es muy variable, siendo en los últimos años Navarra, Asturias y Galicia las CCAA con mayor representatividad; a través del programa se reciben aislamientos de más del 60% de los casos de IG notificados en estas CCAA.
- Sería necesario disponer de los datos de confirmación microbiológica (del total de casos notificados cuantos han sido confirmados) así como del método diagnóstico utilizado (del total de casos confirmados cuantos lo han sido por aislamiento) para poder evaluar y mejorar la cobertura y representatividad del programa. Esto es especialmente importante para poder detectar la aparición de nuevas resistencias de manera temprana.
- En 2019 se observa una disminución de la resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro, cefixima y ceftriaxona, actualmente la última opción de tratamiento empírico de primera línea de la IG. La resistencia a cefixima pasó de un 7,8% en 2018 a un 2,8% en 2019, y no se detectó ningún aislado con resistencia a ceftriaxona en comparación con los 3 detectados en 2018.

- En el caso de la azitromicina, en 2018 se produjo un incremento significativo en el número de aislados por encima del ECOFF (8,6%) que se mantiene en 2019 (8,7%). Este aumento, sumado a la detección de aislados con altos niveles de resistencia a azitromicina, resulta especialmente preocupante, ya que actualmente el tratamiento de elección recomendado para la IG es la combinación de azitromicina y ceftriaxona como terapia dual.
- En el control de la IG, la monitorización continua y exhaustiva de la resistencia antimicrobiana resulta clave para poder ajustar las guías de tratamiento y evitar la propagación de estas resistencias.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Rowley J, Vander Hoorn S, Korenromp E, Low N, Unemo M, Abu-Raddad LJ, et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. Bull World Health Organ. 2019;97(8):548-562P.
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Gonorrhoea. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC; 2020.
3. Unidad de vigilancia de VIH, ITS y hepatitis B y C. Vigilancia epidemiológica de las infecciones de transmisión sexual, 2019. Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III/Plan Nacional sobre el Sida, Dirección General de Salud Pública; 2021.
4. Unemo M, Lahra MM, Cole M, Galarza P, Ndowa F, Martin I, Dillon JR, Ramon-Pardo P, Bolan G, Wi T. World Health Organization Global Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program (WHO GASP): review of new data and evidence to inform international collaborative actions and research efforts. Sex Health. 2019;16(5):412-425. doi: [10.1071/SH19023](https://doi.org/10.1071/SH19023).
5. Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. Clin Microbiol Rev. 2014;27(3):587-613. doi: [10.1128/CMR.00010-14](https://doi.org/10.1128/CMR.00010-14).
6. Sistema de Información Microbiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Informe anual del Sistema de Información Microbiológica 2017. Madrid, 2020.
7. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, 2021. <http://www.eucast.org>.

Programa de *Streptococcus pneumoniae*

Informe elaborado por M. Domenech, J. Sempere, M. Llamosí, M.D. Vicioso, I. del Río, B. López-Ruiz, F. González-Camacho, A Fenoll, J. Yuste*.

Laboratorio de Referencia e Investigación en Enfermedades Bacterianas Prevenibles por Vacunación. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

*CIBER de Enfermedades Respiratorias. CIBERES.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas del tracto respiratorio inferior se asocian a elevadas tasas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, siendo *Streptococcus pneumoniae* (neumococo), la principal bacteria responsable de estas patologías. Neumococo es la principal causa de neumonía bacteriana adquirida en la comunidad, otitis media aguda y meningitis no epidémica, afectando principalmente a la población pediátrica menor de 5 años y a los adultos por encima de los 60 años de edad. La prevención de la enfermedad neumocócica invasiva (ENI) es uno de los mayores desafíos en salud pública ya que la incidencia de la enfermedad es muy elevada a pesar de que existan vacunas y al uso de antibióticos. Actualmente hay descritos hasta 101 serotipos diferentes basados en la composición del polisacárido capsular, lo que dificulta por un lado la caracterización de los aislados clínicos y por otro, el control de la enfermedad mediante las actuales vacunas basadas en el polisacárido capsular. Esto se debe a que tras el uso sistemático de las actuales vacunas, suelen aumentar los casos producidos por serotipos no-vacunales lo que se conoce como fenómeno de reemplazo de serotipos. Es por ello, que la vigilancia epidemiológica de esta enfermedad es necesaria y de gran utilidad en Salud Pública para poder identificar cuáles son los serotipos más prevalentes que circulan en España y así establecer la posible cobertura teórica que podrían ofrecer las actuales y futuras vacunas frente a neumococo.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

La ENI suele estar asociada a elevadas tasas de incidencia y hospitalización en la población pediátrica y adulta. Esto supone un elevado gasto sanitario, lo que justifica que el Ministerio de Sanidad recomiende la vacunación frente a neumococo en el calendario vacunal pediátrico y de adultos. La elevada variabilidad de este microorganismo, con más de 100 serotipos descritos, y la limitación en cuanto al número máximo de serotipos potencialmente prevenibles por vacunación por las actuales vacunas, justifica que la vigilancia epidemiológica de este microorganismo sea considerada de gran relevancia en Salud Pública para conocer el posible impacto de las actuales y futuras vacunas.

Por todo lo anterior, los principales objetivos de este programa se describen a continuación:

- Determinar la situación epidemiológica de la enfermedad neumocócica invasiva en España.
- Analizar el impacto de los actuales programas de vacunación pediátrica y del adulto frente a neumococo en la incidencia de enfermedad producida por serotipos vacunales.
- Identificar de forma precoz el aumento de casos de ENI producida por serotipos no vacunales, así como la aparición de casos producidas por aislados clínicos de serotipos incluidos en las actuales vacunas, que puedan estar asociados a fallo vacunal.
- Caracterizar la resistencia antibiótica en las cepas circulantes de neumococo y analizar el impacto de la vacunación en el control de la resistencia antibiótica.

DISEÑO DEL PROGRAMA

La confirmación de neumococo de todas las muestras recibidas procedentes de los diferentes hospitales es fundamental para poder establecer un criterio correcto de identificación de *S. pneumoniae*. Esto se hace mediante diferentes técnicas microbiológicas entre las que se incluye la sensibilidad a optoquina, la reacción de Quellung y la lisis en desoxicolato sódico.

La determinación del serotipo se realiza mediante la técnica de inmunoblot y también mediante PCR-secuenciación de genes capsulares.

Por último, se caracteriza la sensibilidad antibiótica para conocer el nivel de resistencia antimicrobiana de los aislados clínicos de neumococo que circulan por España con el fin de identificar posibles serotipos emergentes asociados a resistencia antibiótica.

Durante el periodo 2009-2019 se han caracterizado 25.443 aislados clínicos invasivos de neumococo.

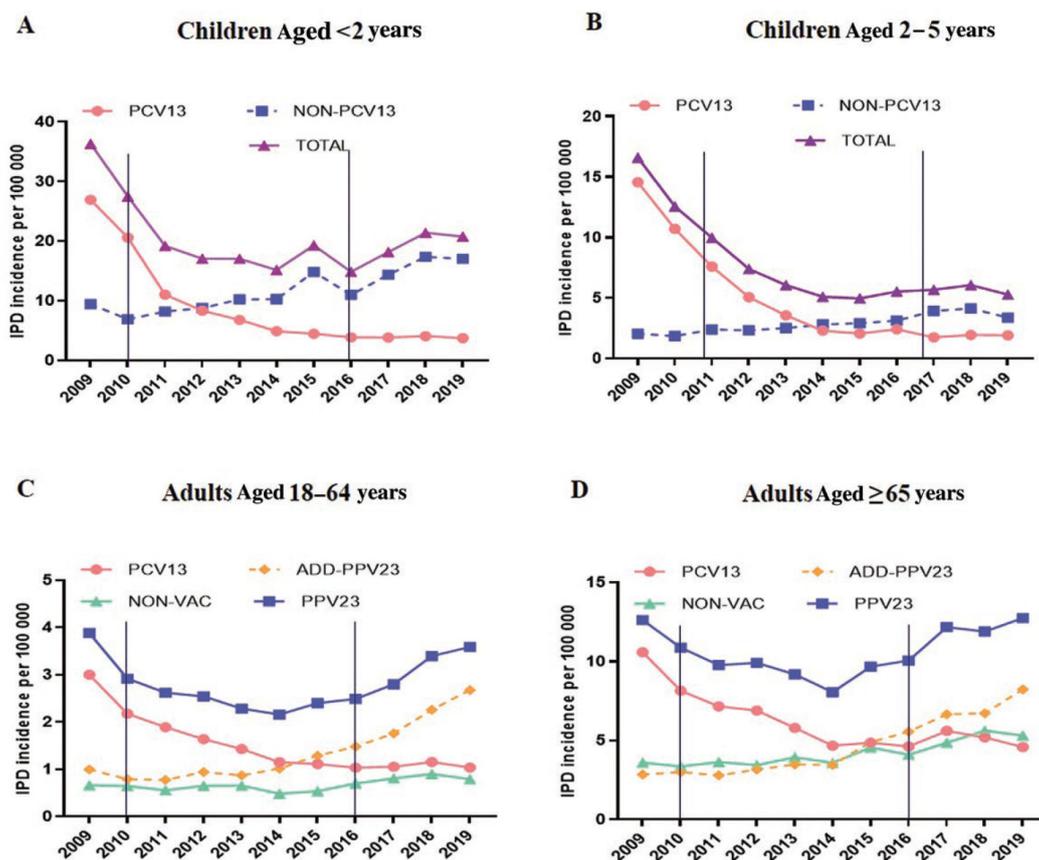
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evolución de la ENI en población pediátrica y adulta

En niños menores de 2 años, la incidencia por serotipos incluidos en la vacuna conjugada 13-valente (PCV13) disminuyeron de 54,23 casos por 100.000 habitantes en el periodo pre-PCV13 (año 2009) a 7,33 casos en el último periodo 2018-2019 (IRR: 0,19; IC 95%: 0,16-0,23) demostrando una reducción del 89% de los casos de ENI comparando 2009 *vs* 2019 (Figura 1). La incidencia por serotipos no-PCV13 aumentó de 13,10 casos en 2009 a 20,76 casos en 2018-2019 (IRR: 1,84; IC 95%: 1,50-2,24) (Figura 1).

En niños de 2-5 años de edad, la incidencia por serotipos PCV13 disminuyó de 11,06 casos en 2009 a 1,82 en 2018-2019 (IRR: 0,15; IC 95%: 0,12-0,20) lo que supone una reducción del 87% de los casos de ENI comparando 2009 y 2019. La incidencia por serotipos no-PCV13 fue menos pronunciada en este grupo de edad con una incidencia de 1,46 en 2009 y 3,2 en el último periodo 2018-2019 (IRR: 2,29; IC 95%: 1,52-3,46) (Figura 1). En general, estos resultados confirman que la introducción de la vacuna PCV13 en población pediátrica, redujo de forma progresiva, la incidencia de ENI en niños, aunque también se aprecia un cierto aumento de casos por serotipos no-PCV13 sobre todo en los últimos años.

Figura 1. Tendencias de ENI en España en población pediátrica y adulta durante el periodo 2009-2019. Las líneas verticales indican los años en los que se introdujo la vacuna PCV13 en mercado privado (año 2010) y en el calendario vacunal pediátrico (año 2016). Los datos muestran las tasas de incidencia para la población de 0-2 años (A), 2-<5 años (B), 18-64 años (C) y el grupo de 65 años y de mayor edad (D). PCV13 representa los casos de ENI debido a serotipos incluidos en la vacuna conjugada 13-valente (línea rosa con puntos). NON-PCV13 representa los casos de ENI no incluidos en la vacuna conjugada 13-valente (línea azul discontinua de cuadrados). El total de serotipos representa todos los casos de ENI en ese grupo de población (línea morada con triángulos). Add-PPV23 representa los casos de ENI de serotipos incluidos en la vacuna polisacarídica 23-valente, pero no en la PCV13 (línea naranja discontinua con rombos). NON-VAC representa todos los casos de ENI debido a serotipos que no están incluidos en ninguna de las vacunas (línea verde con triángulos). PPV23 representa los casos de ENI de serotipos incluidos en la vacuna polisacarídica 23-valente (línea azul con cuadrados).



Extraídos de: De Miguel et al. *Clin Infect Dis*. 2020;ciaa1483. doi: 10.1093/cid/ciaa1483.

En adultos, la carga de enfermedad por todos los serotipos permaneció constante para el grupo de edad de 18-64 años y fue moderadamente alta para los adultos de 65 años y de mayor edad cuando se compara el periodo 2009 con el 2018-2019 (Figura 1). Los casos por serotipos PCV13 disminuyeron hasta un 74% en los adultos de 18-64 años (IRR: 0,37; IC 95%: 0,34-0,42) y un 58% en adultos \geq 65 años (IRR: 0,47; IC 95%: 0,42-0,52) comparando 2009 *vs* el periodo 2018-19 (Figura 1). En adultos, la introducción de la vacuna PCV13 en el año 2010 y luego en 2016 en calendario vacunal, fue una estrategia eficaz para reducir la enfermedad del adulto en todas las edades, confirmando un importante efecto de inmunidad indirecta.

La incidencia por serotipos incluidos en la vacuna polisacáridica 23-valente (PPV23), disminuyó hasta el año 2014 (periodo intermedio), principalmente debido al efecto de inmunidad indirecta por la vacunación pediátrica. Sin embargo, en los últimos años, se observa un aumento progresivo de casos alcanzando una incidencia similar en 2019 a la del año 2009 por estos serotipos, a pesar del uso de esta vacuna PPV23 en población adulta (Figura 1). La incidencia por serotipos adicionales de la vacuna PPV23 (aquellos incluidos en PPV23, pero no en PCV13), muestran un aumento progresivo que se ha acentuado en los últimos años.

La ENI por serotipos no-vacunales en población adulta muestra una tendencia estable en población de 18-64 años de edad y un cierto aumento en población \geq 65 años, cuando se compara el periodo pre-vacunal (2009) con la situación del 2018-2019 (IRR: 1,56; IC 95%: 1,35-1,80) (Figura 1).

Distribución de serotipos en población pediátrica y adulta

En población pediátrica, el 80% de los casos fueron causados por serotipos PCV13 en el periodo pre-vacunal (año 2009), disminuyendo de 491 casos en 2009 hasta 65 casos en 2019, lo que demuestra la gran contribución de la vacuna PCV13 para controlar la carga de enfermedad en niños. Entre los serotipos no-PCV13, el serotipo 24F fue el más frecuente en todos los periodos analizados, observándose un aumento por serotipo 8 en los últimos años.

En adultos de 18-64 años de edad, los casos de ENI por serotipos PCV13 disminuyeron desde el 68% (822 casos) en 2009 al 24% (200 casos) en 2019 confirmando el efecto de inmunidad indirecta por la vacunación pediátrica, siendo el serotipo 3 el principal serotipo dentro de los incluidos en la vacuna PCV13. Es destacable el aumento de casos por serotipos adicionales de la PPV23, sobre todo gracias al incremento del serotipo 8 (5,9% en 2009 *vs* 30% en 2019), seguido por los serotipos 12F, 9N y 22F. Los casos por serotipos no-vacunales, permanecen constantes en este grupo de edad.

En adultos de 65 años y mayor edad, los casos de ENI por serotipos PCV13 disminuyeron del 66% (742 casos) en 2009 al 25% (313 casos) en 2019, demostrándose efecto de inmunidad indirecta gracias a la vacunación pediátrica. Los serotipos 3 y 19A fueron los dos más frecuentes dentro de los serotipos PCV13 en todos los periodos analizados, observando, además, un aumento de casos por serotipos adicionales de la vacuna PPV23 (principalmente el serotipo 8). El aumento de casos por serotipo 8 es preocupante, con un incremento del 3% (73 casos) en 2009 al 19% (232 casos) en 2019.

Otros serotipos que han aumentado en los últimos años son el 22F (5,3%, 66 casos) y el 12F (4,6%, 57 casos). En general, los casos de ENI por serotipos 3 y 8 se asociaron a un 32% de los casos de ENI en este grupo de edad. Los serotipos no-vacunales, también aumentaron del 17% en 2009 al 30% en 2019, siendo los serotipos 15A (4%), 6C (3,8%), y 16F (3,4%) entre los más frecuentes en 2019.

Aumento de aislados clínicos no-PCV13 asociados a resistencia antibiótica

En los últimos años se aprecia un aumento de casos de ENI por aislados clínicos que no están incluidos en la vacuna PCV13 y que muestran resistencia a los antibióticos β -lactámicos. Entre estos serotipos destacan el 24F, que suele asociarse a pacientes pediátricos, y el 11^a, del que hemos descrito hasta 3 genotipos diferentes (ST62, ST838 y ST6521), los dos últimos relacionados con altos niveles de resistencia a amoxicilina y cefotaxima. De los 3 genotipos, el ST6521 mostró una elevada capacidad para evadir la inmunidad del complemento y la fagocitosis y para formar biofilms lo que podría favorecer su aumento en infecciones crónicas respiratorias como las neumonías recurrentes que son características en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

CONCLUSIONES

- El uso de la vacuna PCV13 ha logrado reducir los casos de ENI por serotipos vacunales no solo en población pediátrica vacunada sino también en población adulta gracias al fenómeno de inmunidad indirecta.
- En los últimos años se aprecia un aumento moderado de casos en población pediátrica por serotipos no incluidos en la vacuna PCV13, siendo el serotipo 24F el más frecuente en la actualidad.
- En población adulta sigue existiendo una elevada carga de enfermedad por serotipos incluidos en la vacuna PCV13, observándose un aumento muy marcado por serotipos específicos de la vacuna PPV23 de los que destacan el 8 y el 22F.
- Existe un aumento de casos por cepas resistentes a antibióticos producido por serotipos no incluidos en la vacuna conjugada y con elevado potencial de patogenicidad al evadir de forma eficiente el sistema inmune.
- Desde la perspectiva de Salud Pública, es fundamental continuar con la labor de vigilancia epidemiológica de la ENI para poder evaluar la posible eficacia de las actuales y futuras vacunas antineumocócicas.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Fenoll A, Granizo JJ, Giménez MJ, Yuste J, Aguilar L. Secular trends (1990-2013) in serotypes and associated non-susceptibility of *S. pneumoniae* isolates causing invasive disease in the pre-/post-era of pneumococcal conjugate vaccines in Spanish regions without universal paediatric pneumococcal vaccination. *Vaccine*. 2015;33(42):5691-5699. doi: [10.1016/j.vaccine.2015.08.009](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.08.009).
2. Aguinagalde L, Corsini B, Domenech A, Domenech M, Cámara J, Ardanuy C, García E, Liñares J, Fenoll A, Yuste J. Emergence of Amoxicillin-Resistant Variants of Spain9V-ST156 Pneumococci Expressing Serotype 11A Correlates with Their Ability to Evade the Host Immune Response. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137565. doi: [10.1371/journal.pone.0137565](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137565).
3. González-Díaz A, Cámara J, Ercibengoa M, Cercenado E, Larrosa N, Quesada MD, Fontanals D, Cubero M, Marimón JM, Yuste J, Ardanuy C. Emerging non-13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) serotypes causing adult invasive pneumococcal disease in the late-PCV13 period in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(6):753-759. doi: [10.1016/j.cmi.2019.10.034](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.10.034).
4. Sempere J, de Miguel S, González-Camacho F, Yuste J, Domenech M. Clinical Relevance and Molecular Pathogenesis of the Emerging Serotypes 22F and 33F of *Streptococcus pneumoniae* in Spain. *Front Microbiol*. 2020;11:309. doi: [10.3389/fmicb.2020.00309](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00309).
5. de Miguel S, Domenech M, González-Camacho F, Sempere J, Vicioso D, Sanz JC, García Comas L, Ardanuy C, Fenoll A, Yuste J. Nationwide trends of invasive pneumococcal disease in Spain (2009-2019) in children and adults during the pneumococcal conjugate vaccine era. *Clin Infect Dis*. 2020:ciaa1483. doi: [10.1093/cid/ciaa1483](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1483).

Programa de enfermedad invasiva por *Streptococcus pyogenes*

Informe elaborado por P. Villalón.

Laboratorio de Referencia e Investigación en Taxonomía Bacteriana y Tuberculosis. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

INTRODUCCIÓN

Streptococcus pyogenes o estreptococo del grupo A (SGA) es una bacteria que causa una gran variedad de cuadros clínicos, desde infecciones superficiales como faringitis e impétigo, hasta infecciones invasivas graves como celulitis, neumonía, artritis, fascitis necrotizante, bacteriemia y sepsis, entre otras. La producción de exotoxinas que actúan como superantígenos provoca los cuadros clínicos de escarlatina, fascitis necrotizante y síndrome del shock tóxico estreptocócico (SSTS), este último con una tasa de mortalidad frecuentemente superior al 40%. El SGA también produce secuelas inmunológicas, las más habituales son la glomerulonefritis aguda postestreptocócica y la fiebre reumática aguda que puede evolucionar a enfermedad cardíaca reumática.

La incidencia de la enfermedad invasiva por el SGA varía en función de las condiciones socioeconómicas, siendo más baja en los países más desarrollados (2,5/100.000 habitantes). A escala global, el SGA es la novena causa de mortalidad infecciosa y el conjunto de las enfermedades graves causadas por esta bacteria son responsables al menos de 517.000 muertes/año.

La clasificación microbiológica del SGA se basa en la tipificación del gen *emm* que codifica la proteína M de superficie, considerada un factor de virulencia principal. La vigilancia microbiológica de los aislados invasivos se realiza en el Centro Nacional de Microbiología desde 1994 aunque la enfermedad invasiva por el SGA no sea de declaración obligatoria en España.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

Justificación: la tipificación microbiológica de los aislados de *S. pyogenes* es necesaria para conocer las características de la población bacteriana que causa enfermedad invasiva en España, su evolución en el tiempo y también para detectar precozmente cualquier cambio que pueda tener repercusión en la Salud Pública.

Objetivos:

- Conocer los principales *emm* tipos (serotipos) circulantes.
- Determinar el perfil de genes de exotoxinas de las cepas circulantes.
- Conocer la susceptibilidad a antibióticos utilizados para el tratamiento y control de la infección.

DISEÑO DEL PROGRAMA

Sujetos del estudio:

- Casos humanos de infección invasiva con aislamiento del SGA. Se incluyen también los cuadros clínicos mediados por toxinas y producidos por secuelas inmunológicas.
- Casos humanos de infección asociados a brotes con aislamiento del SGA. Las cepas a estudiar se seleccionarán previamente con criterios clínicos y epidemiológicos.

Participantes: los laboratorios de microbiología hospitalaria de la red pública y privada, y los laboratorios de salud pública de las CCAA.

Formulario específico: se cumplimenta en su totalidad y sin imprecisiones. Se aportan además todos los datos clínicos y epidemiológicos importantes para documentar los casos (cuadro clínico, puerta de entrada de la infección, factores predisponentes, shock tóxico, *exitus*, etc).

Tipos de muestra y condiciones de envío: aislados de *S. pyogenes* causantes de enfermedad invasiva. Se requiere cultivo crecido y ausente de contaminación. Las condiciones de envío deben cumplir las normas de bioseguridad y cada placa/tubo debe estar correctamente sellada. Las muestras deben ser enviadas a temperatura ambiente.

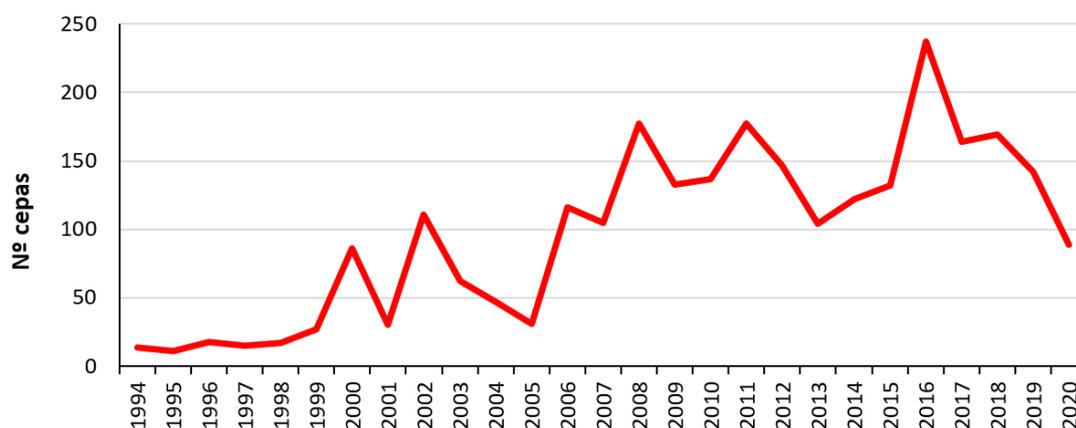
Ensayos de tipificación y metodología: la tipificación básica del SGA incluye *emm* tipo, perfil de genes de exotoxinas y antibiograma.

- *emm* tipo: secuenciación e identificación con la base de datos del CDC.
- Genes de exotoxinas *speA*, *speB*, *speC*, *speF*, *speG*, *speH*, *speJ*, *smeZ* y *ssa*: PCR multiplex.
- Sensibilidad a antimicrobianos:
 - Penicilina, tetraciclina, eritromicina y clindamicina: E-test.
 - Fenotipo de resistencia a macrólidos: test de doble disco de eritromicina y clindamicina. En aislados resistentes a eritromicina.
 - Estudio de genes de resistencia a tetraciclina y macrólidos (*tet*, *msr*, *mef*, *erm*): PCR. En estudios previamente concertados.
- Grupo de Lancefield: aglutinación con látex. En los casos que sea necesario.
- MLST: secuenciación de siete loci (<https://pubmlst.org/>). En casos epidemiológicamente justificados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El programa de vigilancia de la infección invasiva por *S. pyogenes* ha ido creciendo y adaptándose a los cambios metodológicos experimentados en los laboratorios de microbiología. En el periodo 1994-2020 (26 años) se analizaron 2620 aislados invasivos.

Figura 1. Distribución anual (1994-2020) de las cepas invasivas de *S. pyogenes* estudiadas por el programa de vigilancia del CNM.



Este informe muestra el análisis de 1983 aislados del periodo 2007-2020 (14 años), ya que es desde el 2007 cuando se observa una consolidación en el nº de cepas recibidas. El 59,1% de los aislados del 2020 son anteriores al 14 de marzo, desde entonces se ha registrado un descenso importante en el nº de muestras recibidas que esperamos se normalice con la resolución de la pandemia de COVID-19.

La participación por CCAA fue desigual; las más representadas fueron País Vasco y Madrid, mientras que Asturias y Cantabria no tuvieron representación. Las edades extremas fueron las más representadas, el 22,3% de los casos tenían 0-4 años y el 19,0% eran mayores de 75 años. La mayoría de los aislados de *S. pyogenes* se obtuvieron de sangre (n=976, 49,2%), y el cuadro clínico más frecuente fue la sepsis (571, 28,8%). La puerta de entrada de la infección más común fue cutánea (512, 25,8%), seguida de respiratoria (453, 22,8%), aunque fue desconocida en el 51,3% de los casos.

Se detectaron 60 *emm* tipos en total. La [tabla 1](#) muestra los datos más relevantes de los 12 *emm* tipos más frecuentes (≥ 35 aislados). Se indican las asociaciones estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los *emm* tipos y la edad de los casos y la puerta de entrada de la infección.

Tabla 1. Características de los 12 *emm* tipos principales detectados en infecciones invasivas por *S. pyogenes*, España, 2007-2020

<i>emm</i> tipo	Cepas ^a		Edad ^b (años)	Puerta entrada ^b	Infección ^c		Exotoxinas ^c	
	n	%			Tipo	%	Genes	%
<i>emm1</i>	474	23,9	0-4	Respiratoria	Sep Neu	28,9 15,8	<i>A-G-J-Z</i>	69,8
<i>emm3</i>	210	10,6	0-14	Respiratoria	Esc Sep	35,7 27,1	<i>A-G-ssa</i>	73,8
<i>emm4</i>	161	8,1	0-14	Respiratoria	Esc Sep	30,4 21,7	<i>C-Z-ssa</i>	73,9
<i>emm6</i>	107	5,4	5-14	Respiratoria	Sep Esc	27,1 14,0	<i>C-G-H</i>	56,1
<i>emm11</i>	63	3,2	≥ 75	Cutánea	Sep Cel	34,9 31,7	<i>C-G-H</i>	77,8
<i>emm12</i>	115	5,8	0-4	No detectada	Sep Neu	29,6 13,9	<i>G-H</i>	47,8
<i>emm22</i>	36	1,8	15-39	Respiratoria	Sep Cel	25,0 22,2	<i>A-G-ssa</i>	44,4
<i>emm28</i>	97	4,9	No detectada	Cutánea	Sep Cel	35,1 19,6	<i>C-G-J</i>	62,9
<i>emm75</i>	83	4,2	No detectada	No detectada	Sep Cel	22,9 13,3	<i>C-G</i>	62,7
<i>emm77</i>	81	4,1	≥ 65	Cutánea	Sep IHQ	28,4 19,8	<i>C</i>	61,7
<i>emm87</i>	90	4,5	No detectada	No detectada	Sep Esc	26,7 25,6	<i>C-G-J-Z-ssa</i>	33,3
<i>emm89</i>	221	11,1	≥ 75	Cutánea	Sep Cel	34,4 25,8	<i>C-G</i>	65,6

Tabla adaptada de Villalón *et al* [4]. Cel, celulitis; Esc, escarlatina; IHQ, infección herida quirúrgica; Neu, neumonía; Sep, sepsis.

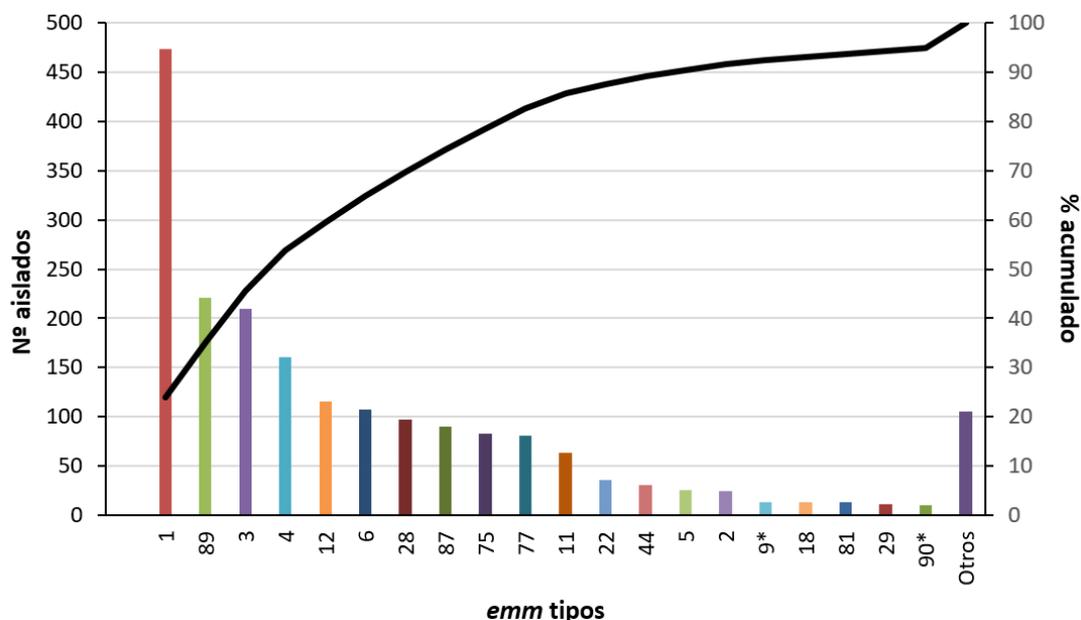
^a n, número de cepas; %, porcentaje del total de cepas (N = 1983); ^b Se muestran sólo las asociaciones estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$); ^c Se indican los tipos de infección y perfiles de genes de exotoxinas más frecuentes para cada *emm* tipo.

La mayor limitación del programa de vigilancia tiene su origen en que la enfermedad invasiva por el SGA no es de notificación obligatoria en España y, por tanto, la participación es voluntaria. Esto genera un sesgo en el origen geográfico y edad de la muestra; con un reparto geográfico heterogéneo y una sobrerrepresentación de los casos infantiles de 0-4 años. La gran fortaleza del programa, sin embargo, radica en la información microbiológica que aporta; los datos que ofrece son esenciales para conocer la situación de esta enfermedad en España y para detectar posibles cambios en su evolución.

La distribución de los principales *emm* tipos detectados en España fue similar a la observada en otros países de nivel socioeconómico equiparable. La vacuna 30-valente frente a *S. pyogenes* (en fase de ensayo clínico) cubriría al menos el 95% de los aislados del periodo 2007-2020 (Figura 2). *emm1* fue el *emm* tipo más frecuente y se asoció con infecciones graves como neumonía, fascitis necrotizante y SSTs. *emm3*, *emm4* y *emm87* presentaron asociación con escarlatina; *emm28* con fiebre puerperal y *emm6* con mastoiditis.

emm11, *emm77* y *emm89* presentaron una marcada asociación con celulitis y otras infecciones cutáneas. *emm89* era excepcional hasta el 2007, desde entonces aumentó bruscamente su prevalencia y actualmente es la segunda causa de infección invasiva por el SGA.

Figura 2. Cobertura de la vacuna 30-valente en España, 2007-2020. El diagrama de barras muestra el nº de aislados de los 18 *emm* tipos más frecuentes (≥ 10 aislados). El diagrama lineal muestra el porcentaje acumulado de los *emm* tipos representados. Los asteriscos marcan los *emm* tipos no incluidos en la vacuna. Adaptado de Villalón *et al.* [4]



Se detectaron > 100 perfiles genéticos de exotoxinas. Sin embargo, cada *emm* tipo se asoció con determinados perfiles (tabla 1), constituyendo estos últimos un complemento importante en la tipificación de los aislados. El gen *ssa* fue el más prevalente en los casos de escarlatina, sobre todo producidos por *emm3*, *emm4* y *emm87*. Los aislados de *emm1* portadores de *speA*, *speJ* y *smeZ* se asociaron con los casos más graves de neumonía, fascitis necrotizante y SSTS aunque desconocemos el papel que ejercieron las exotoxinas en la gravedad de estos cuadros clínicos.

Todos los aislados fueron sensibles a penicilina. La resistencia a tetraciclina fue la más común (237, 12,0%), seguida de la resistencia a eritromicina (175, 8,8%) y clindamicina (83, 4,2%). En los periodos 2007-2011, 2012-2016 y 2017-2020 las tasas de resistencia a tetraciclina fueron 17,6, 7,5 y 10,7% respectivamente; mientras que las tasas de resistencia a eritromicina fueron 13,0, 5,5 y 8,0%; y las de clindamicina 6,9, 2,6 y 2,9%. La resistencia sólo a eritromicina se agrupó mayoritariamente en determinados clones de *emm4*, *emm12* y *emm28*; mientras que la resistencia combinada a eritromicina y tetraciclina se concentró en *emm11* y *emm77*. En general, las tasas de resistencia decrecieron a lo largo del periodo estudiado, aunque se detectó un repunte en los últimos años. Es necesario continuar la actividad de vigilancia para un mejor conocimiento de las tendencias en la evolución de la resistencia.

CONCLUSIONES

- *emm1* y *emm89* son actualmente las dos causas principales de enfermedad invasiva por el SGA en España. *emm1* portador de los genes de virulencia *speA*, *speJ* y *smeZ* se asocia con algunos de los cuadros clínicos más graves.
- *emm1*, *emm3*, *emm4* y *emm6* se asocian mayoritariamente con infecciones de origen respiratorio en la población pediátrica.
- *emm11*, *emm77* y *emm89* se asocian preferentemente con infecciones de origen cutáneo en la población ≥ 75 años.
- Los aislados invasivos del SGA son fundamentalmente sensibles a los antibióticos analizados. Las tasas de resistencia a tetraciclina, eritromicina y clindamicina disminuyeron durante el periodo estudiado. La resistencia aislada a eritromicina se agrupa en *emm4*, *emm12* y *emm28*. La resistencia combinada a eritromicina y tetraciclina se concentra en *emm11* y *emm77*.
- La administración de la vacuna 30-valente en España cubriría la gran mayoría de los aislados invasivos del SGA.
- La vigilancia continua de la enfermedad invasiva por el SGA es necesaria para detectar de forma temprana cualquier cambio que se pueda producir en la población bacteriana circulante, así como para tomar a tiempo las medidas de prevención y control oportunas.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Carapetis JR, Steer AC, Mullholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:685-694. doi: [10.1016/S1473-3099\(05\)70267-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70267-X).
2. Lamagni TL, Darenberg J, Luca-Harari B, Siljander T, Efstratiou A, Henriques-Normark B, et al. Epidemiology of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2359-2367. doi: [10.1128/JCM.00422-08](https://doi.org/10.1128/JCM.00422-08).
3. Luca-Harari B, Darenberg J, Neal S, Siljander T, Strakova L, Tanna A et al. Clinical and microbiological characteristics of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:1155-1165. doi: [10.1128/JCM.02155-08](https://doi.org/10.1128/JCM.02155-08)
4. Villalón P, Sáez-Nieto JA, Rubio-López V, Medina-Pascual MJ, Garrido N, Carrasco G, Pino-Rosa S, Valdezate S. Invasive *Streptococcus pyogenes* disease in Spain: a microbiological and epidemiological study covering the period 2007-2019. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021;40:2295-2303. doi: [10.1007/s10096-021-04279-2](https://doi.org/10.1007/s10096-021-04279-2).

Programa de *Haemophilus influenzae*

Informe elaborado por M. Pérez Vázquez*†#, B. Aracil García*†#, V. Bautista Sánchez, N. Lara Fuella, J. Campos, J. Oteo Iglesias*†#.

Laboratorio de Referencia e Investigación en Resistencia a Antibióticos e Infecciones Relacionadas con la Asistencia Sanitaria. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

*Red Española de Investigación en Patología infecciosa. REIPI.

†Red de Laboratorios para la Vigilancia de Microorganismos Resistentes. RedlabRA.

#CIBER de Enfermedades Infecciosas. CIBERINFEC.

INTRODUCCIÓN

Haemophilus influenzae (Hi) es una bacteria patógena (cocobacilo gramnegativo) que causa enfermedad invasiva (meningitis y sepsis) e infecciones de las mucosas, sobre todo del tracto respiratorio. Las cepas de Hi se dividen en capsuladas o no capsuladas (no tipificables) en función de la producción o no de una cápsula polisacárida. Las cepas capsuladas se pueden clasificar en serotipos (a, b, c, d, e, f), y clásicamente se han asociado a infecciones invasivas; mientras que las no capsuladas se han relacionado con infecciones menos graves que afectan principalmente a las vías respiratorias.

H. influenzae serotipo b (Hib) ha sido el principal patógeno de esta especie y causa frecuente de enfermedad invasiva, manteniéndose como la causa más común de meningitis bacteriana en niños de dos meses a cinco años en aquellos países donde no existen programas de vacunación adecuados.

Desde la década de 1980 se dispone de una vacuna eficaz y segura frente a Hib, y la mayoría de los Estados miembros de la UE, incluida España, la han incluido en sus programas de inmunización con una excelente cobertura. La vacunación contra Hib ha reducido drásticamente la tasa de enfermedad invasiva por Hib en niños pequeños.

La vacunación frente a Hib ha generado un escenario diferente y cambiante en el perfil de la infección por esta especie caracterizado por el descenso en la incidencia de enfermedad invasiva por Hib en niños, la aparición progresiva de cepas capsuladas patógenas de otros serotipos (sobre todo el f y el e, pero muy recientemente también el a), y aumento de la patología invasiva en adultos debido, en su mayor parte, a cepas no capsuladas.

Además, la creciente prevalencia de fenotipos resistentes a los antibióticos reportados en este patógeno limita la elección de un tratamiento antibiótico adecuado. Los estudios de vigilancia de antibióticos son necesarios para determinar las tendencias en los patrones de susceptibilidad nacionales, regionales y locales y para orientar eficazmente la terapia antimicrobiana empírica.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

Aunque el éxito de la vacunación contra Hib es evidente, y mantener una alta cobertura de vacunación en niños es esencial para garantizar la protección de todos los grupos de edad, la vigilancia de los casos de enfermedad invasiva por Hib es también clave para detectar los posibles fallos vacunales, así como núcleos de población susceptibles no correctamente inmunizados. La caracterización molecular de las cepas implicadas en estos casos es clave para dirigir las medidas hacia su control.

El creciente reconocimiento de Hi no capsulado como un patógeno invasivo importante justifica la vigilancia continua y la caracterización genética de las cepas implicadas para evaluar su diversidad genética, la presencia de brotes y la adquisición de determinantes de resistencia. Además, la emergencia de otros serotipos (e, f, a) requiere de una continua monitorización de las tendencias evolutivas de las infecciones que producen para prevenir una posible diseminación. En este sentido, y alineado con las prioridades del ECDC que considera la vigilancia de este microorganismo de gran relevancia en Salud Pública, el Programa de Vigilancia de *H. influenzae* del Centro Nacional de Microbiología (PVHi-CNM) aporta información microbiológica y molecular a la vigilancia de la enfermedad por Hi que permite la detección de cambios en la epidemiología, dirigir precozmente las intervenciones preventivas a implementar y optimizar los tratamientos antibióticos empíricos.

Por todo lo anterior, los principales objetivos de este programa son los que se describen a continuación:

- Conocer y vigilar los serotipos y clones de Hi circulantes causantes de enfermedad invasiva.
- Conocer y vigilar el aumento creciente de la morbilidad y mortalidad de la enfermedad invasiva y no invasiva en niños y adultos por Hi no capsulado.
- Conocer y vigilar la susceptibilidad a los antibióticos utilizados para el tratamiento y control de la infección; así como determinar los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos utilizados para tratar la enfermedad invasiva y respiratoria.
- Conocer y vigilar los casos de fallo vacunal de la vacuna contra Hib.
- Conocer y vigilar la posible emergencia de otros serotipos capsulares no incluidos en la vacuna conjugada anti-Hib.
- Cooperar con el CNE-ISCIII, las CCAA y el ECDC para la mejora de la cobertura y del conocimiento de la enfermedad causada por Hi de declaración no obligatoria.

DISEÑO DEL PROGRAMA

El PVHi-CNM está dirigido al estudio y caracterización de cepas de *Hi* procedentes de infecciones invasivas, y de otro tipo de infecciones, y está abierto a la participación de todos los laboratorios de microbiología clínica y de salud pública del SNS, con el objetivo de tener una muestra lo más representativa posible de la población de cepas circulantes.

El PVHi-CNM trabaja con cepas bacterianas procedentes de humanos; la inclusión de cepas bacterianas en el PVRA-CNM debe cumplir unas mínimas recomendaciones generales para garantizar su calidad, representatividad e intercomparabilidad.

A nivel metodológico, actualmente el programa incluye las siguientes determinaciones:

- Métodos fenotípicos y genotípicos para la identificación bacteriana.
- Determinación del serotipo por métodos fenotípicos y genotípicos.
- Determinación de sensibilidad a antibióticos mediante criterios EUCAST y lectura interpretada del antibiograma.
- Caracterización genotípica de los mecanismos emergentes de resistencia, incluyendo resistencia a betalactámicos y otras familias de antibióticos, mediante PCR y secuenciación de genes específicos y mediante secuenciación de genomas completos.
- Estudio de la estructura poblacional de cepas causantes de enfermedad invasiva, así como caracterización de brotes, mediante secuenciación genómica masiva [estudios de SNPs, *Multilocus Sequence-Typing* (MLST), y *core genome MLST* (cgMLST)]

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre los años 2014-2020, el PVHi-CNM estudió un total de 2385 cepas de *Haemophilus* spp. implicadas en infecciones de humanos; la media de cepas por año en el intervalo 2014-2019 fue de 371,7, mientras que en el 2020 se produjo una reducción significativa del número de cepas recibidas (155) debido al impacto de la COVID-19. Los aislamientos procedieron de 132 hospitales distribuidos entre 46 provincias y las dos ciudades autónomas españolas.

El 49,1% (1172) de las cepas se aislaron de muestras de sangre (1002), LCR (102) u otros líquidos estériles o biopsias de órganos internos (68); el 28,1% (670) procedían de muestras respiratorias, el 13,4% (320) de exudados conjuntivales u otras muestras oculares, el 2,3% (56) de exudados de heridas y muestras cutáneas, el 2,3% (54) de muestras urogenitales, y el 4,7% (113) de otras localizaciones.

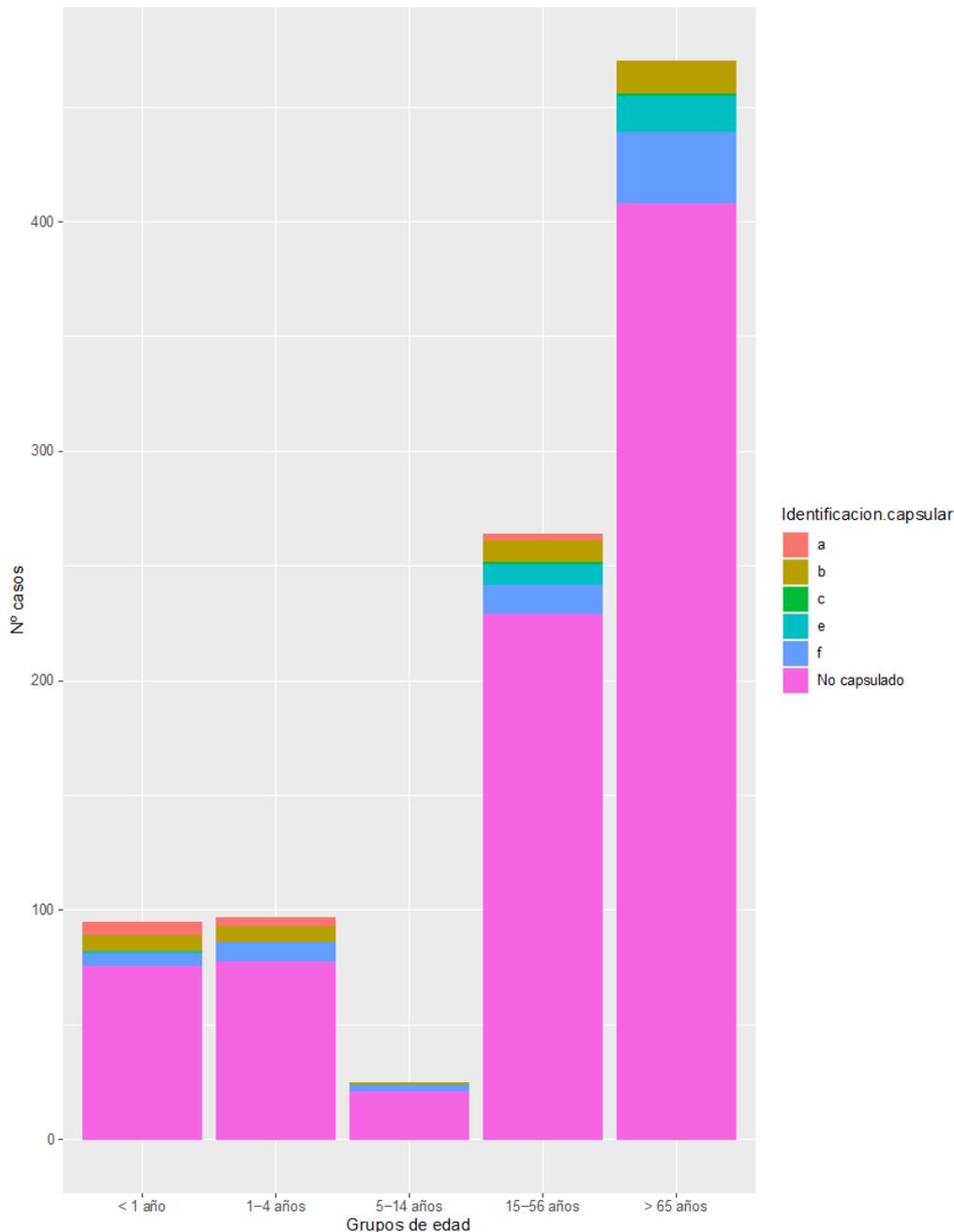
La mayor parte de ellas correspondieron a la especie *H. influenzae* (2118; 88,8%), que se clasificaron, según serotipos, en 1937 (91,4%) cepas no capsuladas, 73 (3,4%) del serotipo f, 47 (2,2%) del serotipo b, 36 (1,7%) del serotipo e, 21 (1%) del serotipo a, 3 (0,14%) del serotipo c y una (0,05%) del serotipo d. El resto de aislamientos pertenecieron a otras especies, principalmente *Haemophilus parainfluenzae* (267; 11,2%).

El 100% de las cepas de Hib estudiadas produjeron infecciones invasivas, representando el 4% (47/1172) del total de las cepas de Hi implicadas en enfermedad invasiva que se estudiaron durante 2014-2020. La edad media de los pacientes infectados por Hib fue de 38,1 años, pero presentó una distribución bimodal con un 40,4% de casos en niños menores de 4 años y un 38,3% en pacientes mayores de 65 años.

Considerando las cepas de Hi implicadas en infecciones invasivas, las tendencias evolutivas por serotipos mostraron un aumento del serotipo a del 0,7% en 2015 (respecto al total de cepas invasivas de ese año) al 3,5% en 2019 (P=0,009), y un descenso del serotipo e del 4,6% en 2015 al 1,7% en 2019 (P=0,03). El serotipo f se mantuvo durante el periodo de estudio como el más prevalente dentro de las cepas capsuladas, con un 5,9% entre los dos primeros años (2015-2016) y un 6,3% en los tres últimos (2017-2019). Cabe destacar la importancia de las cepas no capsuladas en infecciones invasivas, un 85,6% de las cepas recibidas por producir este tipo de infecciones fueron no capsuladas, lo que corresponde a una media de 162 casos anuales.

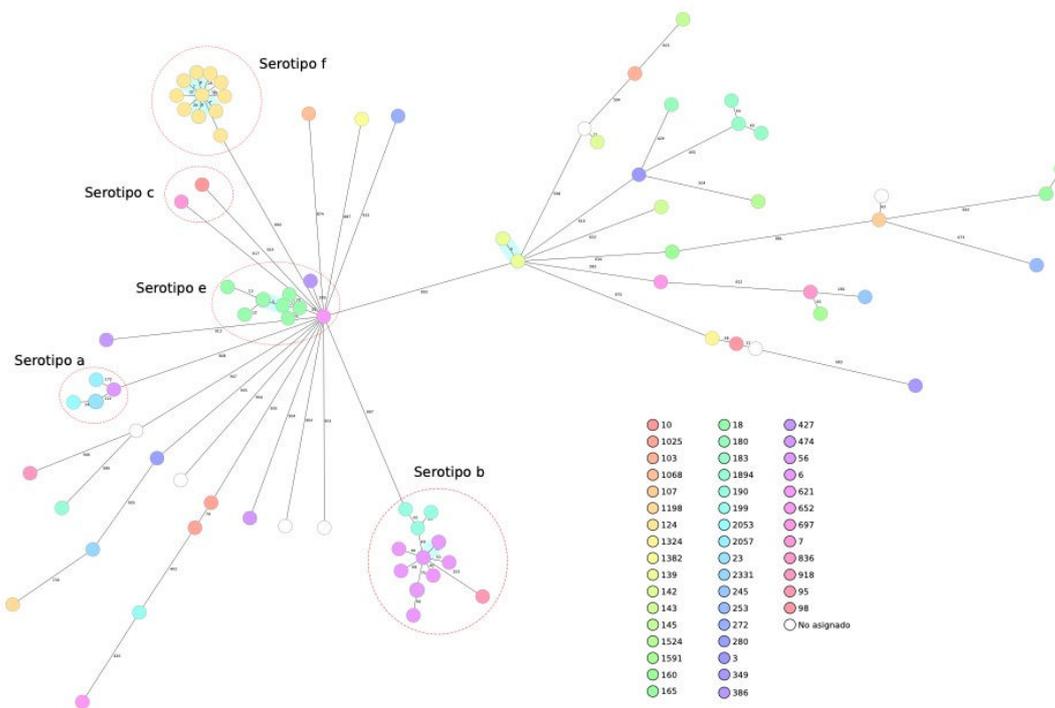
En el análisis de la edad de los pacientes con patología invasiva por Hi en el periodo 2015 a 2019, observamos que las cepas no capsuladas se detectan principalmente en pacientes mayores de 65 años seguido de niños menores de 4 años. El mayor número de casos debidos al serotipo b se presenta en niños menores de cuatro años, seguido de pacientes mayores de 65 años. No se han observado casos de serotipo a en pacientes mayores de 65 años. Los serotipos e y f causan patología sobre todo en pacientes mayores de 65 años.

Figura 1. Distribución de casos de patología invasiva debida a *Haemophilus influenzae* no capsulado y capsulado según las edades de los pacientes (2015-2019).



Los estudios realizados por secuenciación de genomas completos en todas las cepas de *H. influenzae* capsuladas y en una selección de cepas no capsuladas, todas ellas procedentes de pacientes con patologías invasivas y aisladas en el año 2019, nos muestran la estructura poblacional que se refleja en la [Figura 2](#). Cuando analizamos la variabilidad de la población aplicando un índice de diversidad simple (SDI) (Gasteimer P et al), observamos que las cepas no capsuladas presentan una mayor variabilidad en comparación con las cepas capsuladas (SDI: 88,6 % en cepas no capsuladas frente a SDI: 34,14% en cepas capsuladas). La distribución de STs según serotipos nos muestra que los STs más frecuentes fueron ST6 en cepas de serotipo b, ST124 en cepas de serotipo f y ST18 en cepas del serotipo e ([Figura 2](#)).

Figura 2. Minimum spanning tree que representa la estructura poblacional de 85 cepas de *Haemophilus influenzae* responsables de patología invasiva en el año 2019. El esquema de cgMLST utilizado contiene 1026 genes y ha sido diseñado utilizando la totalidad de genomas completos de *Haemophilus influenzae* disponibles en el NCBI. Los círculos rojos indican el tipo de capsula, las cepas que no están englobadas en ningún círculo son no capsuladas. Los colores representan el ST.



En cuanto a la resistencia a antibióticos, la disminución de sensibilidad combinada a amoxicilina/ácido clavulánico y cefuroxima ($\text{CMI} \geq 2$ mg/L en ambos casos) aumentó en cepas invasivas de Hi del 2,6% en 2015 al 4,8% en 2019; este perfil fenotípico es un buen indicador de la resistencia a antibióticos β -lactámicos por modificación de la PBP3. La resistencia a ciprofloxacino también se incrementó desde el 0,6% en 2015 al 2,2% en 2019. En ambos casos, todas las cepas resistentes fueron no capsuladas. Cabe destacar la aparición de cepas con resistencia a cefotaxima ($n=7$; $\text{CMI} = 0,25-0,5$ mg/L) por su posible repercusión clínica en la eficacia de tratamientos empíricos.

CONCLUSIONES

- La mayoría de los casos de enfermedad invasiva estudiados se deben a HiNT
- La mayor parte de los casos se producen en pacientes adultos (> 65 años).
- El serotipo b parece afectar a población infantil en una proporción similar a adultos mayores de 65 años.
- El serotipo a aparece como un serotipo emergente en la patología invasiva.
- Las cepas de HiNT asociadas a patología invasiva presentan una mayor diversidad genética que las cepas capsuladas.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. van Wessel K, Rodenburg GD, Veenhoven RH, Spanjaard L, van der Ende A, Sanders EA. Nontypeable *Haemophilus influenzae* invasive disease in The Netherlands: a retrospective surveillance study 2001-2008. Clin Infect Dis. 2011;53:e1-7. doi: [10.1093/cid/cir268](https://doi.org/10.1093/cid/cir268).
2. MacNeil JR, Cohn AC, Farley M, Mair R, Baumbach J, Bennett N, Gershman K, Harrison LH, Lynfield R, Petit S, Reingold A, Schaffner W, Thomas A, Coronado F, Zell ER, Mayer LW, Clark TA, Messonnier NE. Current epidemiology and trends in invasive *Haemophilus influenzae* disease--United States, 1989-2008. Clin Infect Dis. 2011;53(12):1230-6. doi: [10.1093/cid/cir735](https://doi.org/10.1093/cid/cir735).
3. Collins S, Ramsay M, Campbell H, Slack MP, Ladhani SN. Invasive *Haemophilus influenzae* type b disease in England and Wales: who is at risk after 2 decades of routine childhood vaccination? Clin Infect Dis. 2013;57:1715-21. doi: [10.1093/cid/cit579](https://doi.org/10.1093/cid/cit579).
4. Whittaker R, Economopoulou A, Dias JG, Bancroft E, Ramliden M, Celentano LP; European Centre for Disease Prevention and Control Country Experts for Invasive *Haemophilus influenzae* Disease. Epidemiology of Invasive *Haemophilus influenzae* Disease, Europe, 2007-2014. Emerg Infect Dis. 2017 Mar;23(3):396-404. doi: [10.3201/eid2303.161552](https://doi.org/10.3201/eid2303.161552).
5. Gastmeier P, Schwab F, Bärwolff S, Rüdén H, Grundmann H. 2006. Correlation between the genetic diversity of nosocomial pathogens and their survival time in intensive care units. J Hosp Infect 62:181-186. doi: [10.1016/j.jhin.2005.08.010](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2005.08.010).

Programa de Resistencia a Antibióticos

Informe elaborado por M. Pérez Vázquez*†#, B. Aracil García*†#,
V. Bautista Sánchez, N. Lara Fuella, J. Campos, J. Oteo Iglesias*†#.

Laboratorio de Referencia e Investigación en Resistencia a Antibióticos e Infecciones Relacionadas con la Asistencia Sanitaria. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

*Red Española de Investigación en Patología infecciosa. REIPI.

†Red de Laboratorios para la Vigilancia de Microorganismos Resistentes. RedlabRA.

#CIBER de Enfermedades Infecciosas. CIBERINFEC.

INTRODUCCIÓN

La resistencia a antibióticos (RA) es una amenaza de primer orden para los enfermos, la comunidad y la salud pública que puede limitar de manera importante las alternativas terapéuticas en las infecciones por bacterias con resistencia a múltiples antibióticos. Se trata de un problema de salud dinámico y rápidamente evolutivo que ha experimentado un progresivo aumento hasta convertirse en una emergencia sanitaria según todas las instituciones internacionales tales como la Comisión Europea, el G7, el G20, el ECDC, la OMS y el CDC, entre otras. Su mayor impacto, tanto clínico como epidemiológico, se produce por aquellas bacterias resistentes frente a la práctica totalidad de los antibióticos disponibles, con escasas y casi nunca óptimas alternativas terapéuticas. Preocupa especialmente la rápida propagación de bacterias gram-negativas con resistencia combinada a múltiples familias de antibióticos, entre las que destacan aquellas resistentes a antibióticos carbapenémicos. En general, las infecciones producidas por estas bacterias multi-resistentes generan ingresos más prolongados, complicaciones más frecuentes, incluyendo la evolución fatal, y un coste económico mayor que las infecciones producidas por bacterias sensibles.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

Las bacterias resistentes a antibióticos constituyen una de las mayores amenazas para la salud pública. Estudios recientes han estimado el impacto de las principales bacterias multirresistentes en Europa en alrededor de 33.000 muertes al año, generando un gasto sanitario adicional de unos 1.500 millones de euros. El impacto de la RA no solo es directo, limitando la eficacia del tratamiento de las enfermedades infecciosas, si no también indirecto comprometiendo la realización de procedimientos avanzados de la medicina moderna, como son los trasplantes de órganos, la quimioterapia o las grandes cirugías, inviables sin una eficaz cobertura antibiótica.

El conocimiento detallado y actualizado de las tendencias evolutivas de la prevalencia de la resistencia, de la aparición de nuevos mecanismos de resistencia y de la dispersión de los ya existentes, de la distribución de los clones de alto riesgo circulantes, y de la existencia de brotes intra- o interhospitalarios es imprescindible para la implementación precoz de medidas que ayuden a su control.

Alineado con las principales instituciones internacionales, el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) considera la RA una de sus prioridades. El Programa de Vigilancia Microbiológica de la Resistencia a Antibióticos del Centro Nacional de Microbiología (PVRA-CNM) es un programa financiado por el ISCIII, y desarrollado por el Laboratorio de Referencia e Investigación en Resistencia a Antibióticos del CNM (LRA), que está al servicio del SNS y en conexión con los programas y proyectos europeos impulsados al respecto por el ECDC. La vigilancia de la RA solo se puede entender desde un abordaje multidisciplinar en el que la caracterización microbiológica es imprescindible, y especialmente sensible, dada la complejidad técnica e interpretativa que conlleva. Por todo lo anterior, los principales objetivos del PVRA-CNM son:

- La detección precoz y la caracterización molecular de nuevos mecanismos de resistencia y de modificaciones en las tendencias de los ya conocidos.
- El conocimiento de los clones de alto riesgo multirresistentes circulantes en España.
- El estudio y caracterización precoz de brotes producidos por bacterias multirresistentes.
- El seguimiento de las tendencias evolutivas de la prevalencia de RA en infecciones invasivas, en línea con la red europea de vigilancia de la resistencia a antibióticos EARS-Net del ECDC cuya subred nacional se coordina desde el LRA.
- Los dos primeros objetivos se realizan integrados tanto en la Red de Laboratorios para la Vigilancia de Microorganismos Resistentes (RedLabRA) coordinada desde el LRA, como en el programa del ECDC *European Antimicrobial Resistance Genes Surveillance Network (EURGen-Net)*.

Este documento presenta los resultados más relevantes obtenidos por el PVRA-CNM sobre las tendencias evolutivas de los principales problemas de multiresistencia en España en los últimos años.

DISEÑO DEL PROGRAMA

El PVRA-CNM tiene un diseño abierto a la participación de todos los laboratorios de microbiología clínica y de salud pública del SNS. Los sujetos de estudio son aquellos pacientes infectados y/o colonizados por las bacterias multirresistentes con un mayor impacto clínico y epidemiológico. Las prioridades de vigilancia pueden variar, por lo que son revisadas cada año de acuerdo a su evolución. En la actualidad, y alineado con las recomendaciones de la OMS, el PVRA-CNM prioriza los problemas de multiresistencia relacionados con la resistencia a antibióticos carbapenémicos en bacilos gram-negativos como enterobacterias, *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas* spp., y la resistencia a glucopéptidos y linezolid en enterococos.

El PVRA-CNM trabaja con cepas bacterianas procedentes de humanos con sospecha de portar mecanismos de resistencia. La inclusión de cepas bacterianas en el PVRA-CNM debe cumplir unas mínimas recomendaciones generales para garantizar su calidad, representatividad e intercomparabilidad. A nivel metodológico, actualmente el programa incluye las siguientes determinaciones:

- Caracterización fenotípica de la sensibilidad a antibióticos según criterios EUCAST.
- Caracterización fenotípica y genotípica (PCR individuales, PCR múltiples y secuenciación de genomas completos) de los mecanismos de resistencia.
- Determinación de la estructura poblacional, de los clones de alto riesgo circulantes y estudio de brotes mediante secuenciación de genomas completos (MLST, cgMLST y filogenia mediante SNPs)
- Además, el LRA coordina la red EARS-Net a nivel nacional filtrando, validando y enviando al ECDC datos de sensibilidad a antibióticos de aislamientos invasivos de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* procedentes de alrededor de 40 hospitales (con ligeras variaciones en el número desde su inicio en 2001)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cepas estudiadas y principales mecanismos de resistencia detectados

Entre los años 2015-2020, el PVRA-CNM estudió un total de 17921 aislamientos con problemas de multiresistencia, estos aislamientos procedieron de 123 hospitales distribuidos entre las 50 provincias y las dos ciudades autónomas españolas.

La mayor parte de ellos correspondieron a especies de *Enterobacterales* (12778; 71,3%) distribuidas de la siguiente forma: *Klebsiella pneumoniae* (8656; 48,3%), *Escherichia coli* (1792; 10%), *Enterobacter* spp. (1452; 8,1%), *Klebsiella oxytoca* (484; 2,7%), *Citrobacter* spp. (251; 1,4%), y otros (143; 0,8). Otros géneros bacterianos estudiados incluyen *Pseudomonas* spp. (1935; 10,8%), *Acinetobacter* spp. (1165; 6,5%) y *Enterococcus* spp. (1129; 6,3%).

Producción de carbapenemasas en *Enterobacterales*. Un total de 8676 (67,9%) producían carbapenemasas distribuidas en los siguientes tipos: 6663 (76,8%) fueron OXA-48, 1162 (13,4%) VIM-1, 607 (7%) KPC, 278 (3,2%) NDM y 35 (0,4%) IMP; 69 (0,8%) aislados produjeron más de una carbapenemasa.

Resistencia a carbapenémicos en *Acinetobacter* spp. multiresistente. Durante el periodo de estudio, un total de 1064 *Acinetobacter* spp. (91,3% de los aislamientos recibidos) fueron resistentes a antibióticos carbapenémicos por la producción de carbapenemasas de clase D: 882 (82,9%) produjeron OXA-23, 117 (11%) OXA-24, y 60 (5,6%) OXA-58; en 9 (0,8%) cepas se detectó la hiperproducción de la enzima cromosómica OXA-51 y en 4 (0,3%) la producción de doble carbapenemasa.

Resistencia a antibióticos carbapenémicos mediada por carbapenemasas en *Pseudomonas spp. multirresistente*: Un total de 975 (50,4% de los aislamientos recibidos) *Pseudomonas spp.* fueron resistentes a antibióticos carbapenémicos por la producción de carbapenemasas: 863 (88,5%) produjeron VIM, 118 (12,1%) IMP, 15 (1,5%) KPC-2, 2 GES-5 (0,2%), 1 NDM-1 (0,1%); 24 cepas producían más de dos carbapenemasas. Entre las carbapenemasas de tipo VIM predominaron las de tipo VIM-2 (84,5%). Cabe destacar la caracterización de la nueva carbapenemasa VIM-69, con importantes implicaciones en el diagnóstico por PCR (necesidad de diseño de iniciadores específicos)

Resistencia a vancomicina y linezolid en enterococos. En el periodo de estudio se caracterizaron un total 414 cepas resistentes a glucopéptidos portadoras de los genes adquiridos *vanA* (410, 99%, en *E. faecium*) o *vanB* (247, 81,8%, en *E. faecium*). La aparición de los genes transferibles *optrA* y *poxxA* de resistencia a linezolid es una amenaza creciente que requiere vigilancia, en total se han estudiado 123 cepas resistentes a linezolid de los cuales el 56,7% tenía el gen *optrA*, el 44,3% la mutación G2576T en la subunidad 23S del ARNr, y el 6,2% el gen *poxxA*; el 7,2% de las cepas tenían más de un mecanismo de resistencia a linezolid. El gen *optrA* fue más frecuente en *E. faecalis* (83,6%) que en *E. faecium* (11,1%).

Clones de alto riesgo circulantes en España

El éxito biológico de determinados mecanismos de resistencia se asocia a la existencia de clones especialmente implicados en su diseminación, son los denominados clones de alto riesgo cuya vigilancia es trascendente. A continuación se detallan los principales hallazgos detectados por el PVRA-CM en los últimos años:

K. pneumoniae multi-resistente productora de carbapenemasas. Los principales clones de alto riesgo (identificados como secuenciotipo (ST)/tipo de carbapenemasa) responsables de su diseminación son en la actualidad, y por este orden, el ST307/OXA-48, el ST11/OXA-48, el ST15/OXA-48, el ST512/KPC y el ST147/OXA-48. La **Figura 1** representa un análisis de la estructura poblacional mediante cgMLST de cepas representativas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas implicadas en brotes o infección invasiva de los dos últimos años.

Figura 1. *Minimun spanning tree* que representa la estructura poblacional 131 cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas representativas de brotes e infecciones invasivas en 2019-2020.

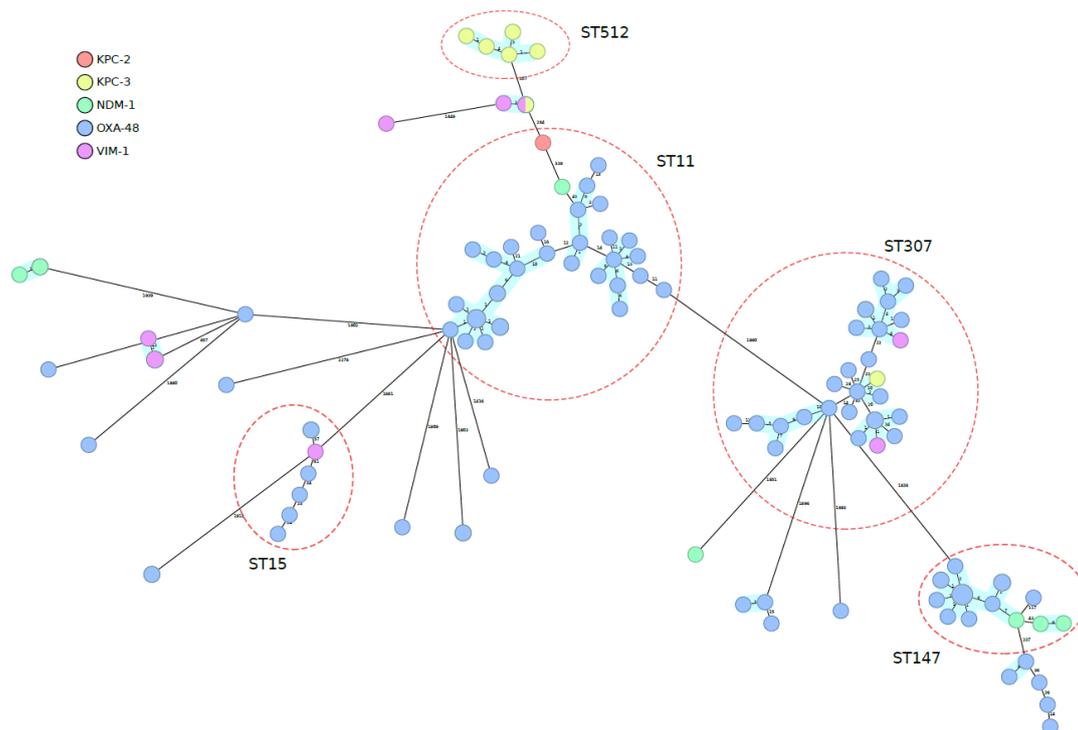


Imagen obtenida aplicando un esquema de cgMLST de 2358 genes.

Los colores representan el tipo de carbapenemasa y las líneas punteadas muestran los clones de alto riesgo.

P. aeruginosa multirresistente productora de carbapenemasa. Más del 80% de las cepas estudiadas en el PVRA-CNM pertenecieron a los clones de alto riesgo ST175, ST244, ST815 y ST155; siendo el ST175 y ST244 los predominantes. Todos estos clones se detectaron portando diferentes tipos de carbapenemasas.

A. baumannii multirresistente productor de OXA-23. Actualmente, la dispersión de *A. baumannii* multi-resistente en España se debe mayoritariamente al clon de alto riesgo ST218/OXA-23 y a su *single locus variant* ST208/OXA-23.

E. faecalis resistente a linezolid portador del gen *optrA*. Su dispersión se ha detectado principalmente asociada a los ST585 y ST480 productores de infecciones de orina adquiridas en la comunidad.

E. faecium resistente a vancomicina portador del gen *vanA*. Los resultados obtenidos por el PVRA-CNM muestran la implicación de diferentes STs como el ST17, el ST18, el ST80, el ST598 y el ST17, siendo el ST17 el predominante.

Figura 2. *Minimun spanning tree* que representa la estructura poblacional de 65 cepas de *P. aeruginosa* productoras de carbapenemasas representativas de las recibidas en el PVRA en los últimos años.

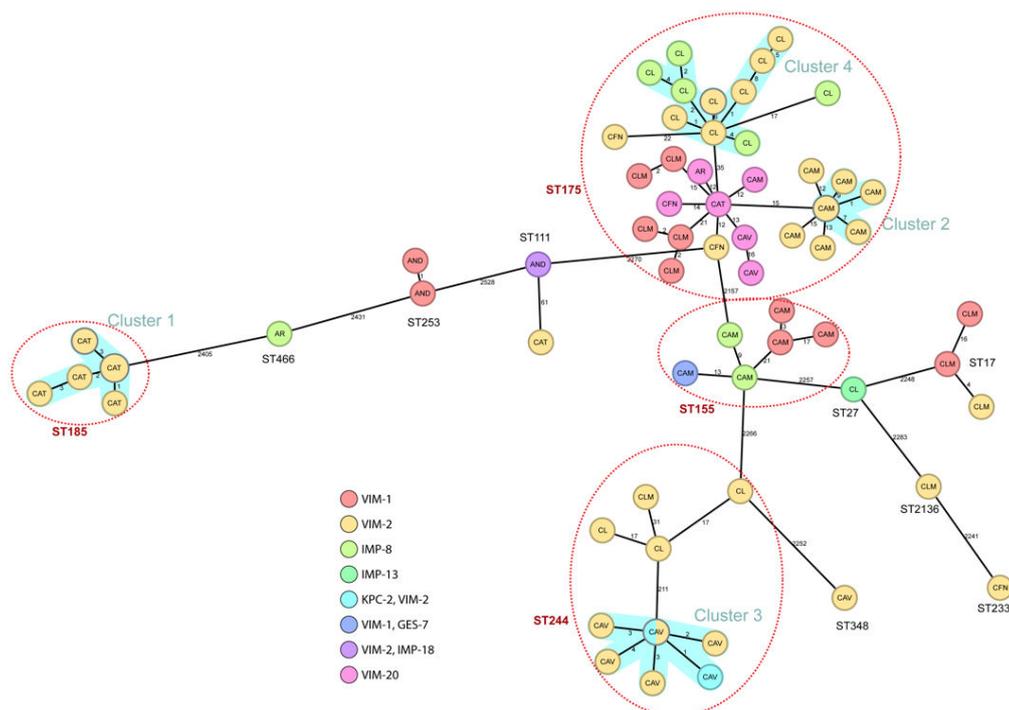


Imagen obtenida aplicando un esquema de cgMLST de 3121 genes.

Los colores representan el tipo de carbapenemasa y las líneas punteadas muestran los clones de alto riesgo.

Principales tendencias evolutivas detectadas por el PVRA-CNM

- 2001-2019. El PVRA-CNM (EARS-Net) detectó durante estos años variaciones significativas en la tendencia de la prevalencia de resistencia que supusieron modificaciones en el tratamiento empírico de las infecciones bacterianas. Caben destacar, como ejemplo, los incrementos de las resistencias a cefalosporinas de 3ª generación (del 1,6% en 2001 al 14,2% en 2019), a fluorquinolonas (del 16% en 2001 al 32% en 2019), y a amoxicilina/clavulánico (del 9,3% en 2003 al 29,2% en 2019) en aislamientos invasivos de *Escherichia coli*.
- 2004-2005. Diseminación en la comunidad e interhospitalaria del clon de alto riesgo ST131 de *E. coli* productor de la betalactamasa de espectro extendido CTX-M-15.
- 2010-2012. Aparición en España, y rápida diseminación, de *K. pneumoniae* productora de OXA-48, al principio asociada a los clones de alto riesgo ST11/OXA-48 y ST405/STOXA-48. Posteriormente ST405 disminuyó su prevalencia y emergieron otros como, principalmente, ST307, ST15, y ST147.
- 2010-2013. Primer caso importado en España de *E. coli* productor de la carbapenemasa NDM. Desde 2010 hasta 2013 se caracterizaron casos esporádicos de NDM-1, todos importados del sudeste asiático. En 2013 se detectó por primera vez transmisión nacional en un brote producido por *K. pneumoniae* ST437/NDM-7.

- 2014-2019. Expansión interregional de *K. pneumoniae* productora de KPC asociada al ST512 (principalmente por la mitad sur de España), y de *K. pneumoniae* productora de NDM asociada a ST437, ST147 y ST11 (principalmente por la mitad norte de España).
- 2018-2019. Dispersión interregional de *E. faecalis* linezolid-resistente con *optrA*.

Caracterización de brotes por bacterias multirresistentes

Durante el periodo comprendido entre enero de 2017 y diciembre de 2020, se caracterizaron 91 brotes producidos por las especies de bacterias multirresistentes previamente mencionadas. En total comprendieron un total de 596 aislados con un rango de 2 a 40 aislados por brote. Estos brotes se detectaron en 55 hospitales de 28 provincias. Un total de 50 (54,9%) brotes fueron producidos por enterobacteriales productores de carbapenemasas, de los cuales 44 fueron por *K. pneumoniae* (13 por ST307/OXA-48 o KPC; 11 por ST11/OXA-48, KPC o NDM; y 5 por ST512/KPC-3). En 36 (39,6%) brotes, las bacterias causantes fueron bacilos gram-negativos no fermentadores productores de carbapenemasas: 23 por *A. baumannii* (19 fueron por ST218/OXA-23), 12 por *P. aeruginosa*, y uno por *P. mosselli*. Por último, se detectaron 5 (7,9%) brotes por *E. faecium* portador del gen *vanA*.

CONCLUSIONES

- La vigilancia microbiológica de la resistencia a antibióticos, tanto fenotípica de la prevalencia de resistencia que permita dirigir adecuadamente el tratamiento empírico de las infecciones bacterianas, como genómica a través de la caracterización y trazabilidad de los mecanismos de resistencia emergentes y de los clones de alto riesgo que facilitan su diseminación, es imprescindible para dirigir las medidas encaminadas a su control. En este sentido, los datos obtenidos por el PVRA-CNM han dado soporte al SNS, a la vez que han servido como base para el desarrollo de diferentes iniciativas en las que el LRA participa activamente, como son, entre otras: el Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos, la Red de Laboratorios para la Vigilancia de los Microorganismos Resistentes (RedLabRA), el Plan de prevención y control frente a la infección por enterobacterias productoras de carbapenemasas de la Comunidad Autónoma de Madrid, el Plan para la creación de un Sistema Nacional de Vigilancia de las Infecciones relacionadas con la Asistencia Sanitaria, *el Global Antimicrobial Resistance Research and Development Hub*.
- La vigilancia de laboratorio ha permitido hacer un seguimiento continuo de la dinámica evolutiva de las cepas multi-resistentes, mecanismos de resistencia y clones circulantes, lo que redundará en el establecimiento de alertas precoces y en una mayor eficacia de las medidas a implementar.

- La optimización de dicho seguimiento solo se consigue con la incorporación a la vigilancia de las últimas técnicas genómicas, como la secuenciación de genomas completos. El uso rutinario de estas metodologías permite alinearse con el marco estratégico para la integración del tipado molecular en la vigilancia de enfermedades infecciosas desarrollado por el ECDC en Europa; el LRA colabora activamente con el ECDC en este sentido a través del proyecto *EurGenCCRE (Genomic based surveillance of carbapenem resistant and/or colistin-resistant Enterobacteriaceae at the EU level)*

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, Colomb-Cotinat M, Kretzschmar ME, Devleeschauwer B, Cecchini M, Ouakrim DA, Oliveira TC, Struelens MJ, Suetens C, Monnet DL; Burden of AMR Collaborative Group. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(1):56-66. doi: [10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4).
2. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outtersson K, Patel J, Cavalieri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N; WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):318-327. doi: [10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3).
3. Pérez-Vázquez M, Sola Campoy PJ, Ortega A, Bautista V, Monzón S, Ruiz-Carrascoso G, Mingorance J, González-Barberá EM, Gimeno C, Aracil B, Sáez D, Lara N, Fernández S, González-López JJ, Campos J, Kingsley RA, Dougan G, Oteo-Iglesias J; Spanish NDM Study Group. Emergence of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Spain: phylogeny, resistome, virulence and plasmids encoding *bla*_{NDM-like} genes as determined by WGS. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(12):3489-3496. doi: [10.1093/jac/dkz366](https://doi.org/10.1093/jac/dkz366).
4. Moure Z, Lara N, Marín M, Sola-Campoy PJ, Bautista V, Gómez-Bertomeu F, Gómez-Dominguez C, Pérez-Vázquez M, Aracil B, Campos J, Cercenado E, Oteo-Iglesias J; Spanish Linezolid-Resistant Enterococci Collaborating Group. Interregional spread in Spain of linezolid-resistant *Enterococcus* spp. isolates carrying the *optrA* and *poxtA* genes. *Int J Antimicrob Agents.* 2020;55(6):105977. doi: [10.1016/j.ijantimicag.2020.105977](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105977).
5. Pérez-Vázquez M, Sola-Campoy PJ, Zurita AM, Ávila A, Gómez-Bertomeu F, Solís S, López-Urrutia L, González-Barberá EM, Cercenado E, Bautista V, Lara N, Aracil B, Oliver A, Campos J, Oteo-Iglesias J; Spanish Antibiotic Resistance Surveillance Program collaborating Group. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Spain: interregional dissemination of the high-risk clones ST175 and ST244 carrying *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{IMP-8}, *bla*_{VIM-20} and *bla*_{KPC-2}. *Int J Antimicrob Agents.* 2020;56(1):106026. doi: [10.1016/j.ijantimicag.2020.106026](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106026).

Programa de infecciones producidas por los estafilococos

Informe elaborado por Federico Román.

Laboratorio de Referencia e Investigación en Resistencias a Antibióticos e Infecciones relacionadas con la Asistencia Sanitaria. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

INTRODUCCIÓN

Entre las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria (IRAS), las producidas por los estafilococos ocupan un papel preponderante, siendo los microorganismos más frecuentes en bacteriemias e infecciones quirúrgicas en 2018 y 2019 en España (1). Son microorganismos que se encuentran habitualmente en la piel de las personas y en las superficies y objetos que entran en contacto con la piel. Las especies más comunes son *Staphylococcus aureus* y los estafilococos coagulasa negativos (ECN).

Pese a que no siempre son dañinos, pueden ingresar en el torrente sanguíneo y causar infecciones graves, las cuales pueden llevar a la septicemia o a la muerte. Entre las enfermedades que produce este importante grupo de patógenos se encuentran las mediadas por toxinas (intoxicación alimentaria, síndrome del shock tóxico, síndrome de la piel escaldada), enfermedades piógenas (impétigo, foliculitis, forúnculos, ántrax, infecciones de heridas) y otras enfermedades sistémicas.

Las especies que se asocian con mayor frecuencia a enfermedad en el ser humano son: *S. aureus* (el miembro más virulento y mejor conocido del género) *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis* y *Staphylococcus saprophyticus*. Los factores de virulencia incluyen componentes estructurales que facilitan la adherencia a los tejidos del hospedador y evitan la fagocitosis, y una variedad de toxinas y enzimas hidrolíticas.

Además, la gran capacidad de *S. aureus* de adaptarse al huésped y de adquirir mecanismos de resistencia a los nuevos antimicrobianos, obligan a realizar una vigilancia continuada de la resistencia, o disminución de sensibilidad, a los diferentes antimicrobianos, incluyendo a los de más reciente introducción como el linezolid, el tedizolid (oxazolidinonas) y la daptomicina.

El principal marcador de resistencia a antibióticos en *S. aureus*, así establecido por el protocolo europeo de vigilancia de las IRAS y uso de antimicrobianos (2), es la resistencia a la meticilina (SARM). El porcentaje de SARM en España fue de 31,0% en 2018 y 31,8% en 2019 (1).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

La confirmación y caracterización molecular de las cepas de estafilococos implicadas en cuadros clínicos es necesaria para conocer su epidemiología molecular, los determinantes de resistencia y virulencia, y el estudio de brotes, así como sus tendencias evolutivas. Este conocimiento es la base de cualquier desarrollo precoz de medidas para el control de las infecciones producidas por estas bacterias.

Entre los principales objetivos de este programa se encuentran:

- El seguimiento permanente de la evolución de los patrones que circulan en España, definidos por distintos marcadores: perfil de ADN en electroforesis en campo pulsado, spa-tipo, secuenciotipo (ST).
- La caracterización de casos individuales y brotes.
- Control de las cepas multirresistentes, dedicando especial atención a las cepas resistentes a la meticilina, las oxadolidinonas (linezolid, tedizolid), la daptomicina, los lipoglucopeptidos (entre ellos, la dalbavancina), así como las que presentan sensibilidad disminuida a los glucopeptidos.
- Detección precoz de casos y brotes de infecciones por SARM adquiridas en la comunidad, y su comparación con las infecciones relacionadas con asistencia sanitaria.
- Proporcionar al Sistema de Vigilancia datos de laboratorio con los que se puedan elaborar indicadores epidemiológicos fiables en todo el territorio.

DISEÑO DEL PROGRAMA

Sujetos de estudio: Pacientes con sospecha clínica de alguna de las enfermedades producidas por los estafilococos: las mediadas por toxinas [intoxicación alimentaria, síndrome del shock tóxico (TSST), síndrome de la piel escaldada (ETA, ETB)], enfermedades piógenas (impétigo, foliculitis, forúnculos, ántrax, infecciones de heridas) y otras enfermedades sistémicas.

Participantes: Abierto. Es necesario haber declarado el caso a la RENAVE.

Muestras, condiciones de envío y análisis de laboratorio: Se estudian únicamente cepas aisladas en cultivo puro. Tras una confirmación previa de la especie, las cepas se caracterizan mediante la secuencia de los genes que codifican el 16S ARNr, *sau*, *rpoB*, *tuf* (Tabla 1). En las cepas de *S. aureus* se estudia la presencia de genes codificantes de toxinas como la leucocidina de Panton Valentine (PVL), la del síndrome del shock tóxico (TSST), y las toxinas exfoliativas (ETA, ETB, ETD). Tanto en *S. aureus* como en los ECN se analizan los genes de resistencia a meticilina *mecA* y *mecC*, así como los mecanismos moleculares que generan resistencia a las oxazolidinonas (3) y daptomicina. En el caso que se sospeche resistencia a los glucopeptidos se estudia la sensibilidad y se estudia busca la presencia del gen *vanA*.

El estudio de brotes y de la epidemiología molecular se realiza mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE). Para el estudio y seguimiento de clones circulantes de *S. aureus* se caracterizan los spa-tipos generados al secuenciar el gen que codifica la proteína A, los tipos de cassette cromosómico estafilocócico (*SCCmec*), y el secuenciotipo (ST) mediante *multilocus sequence typing* (MLST)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio y seguimiento de las cepas aisladas de estafilococos, tanto de los *S. aureus* sensibles como de los resistentes a meticilina, así como de los ECN, se lleva a cabo desde hace más de 20 años en el CNM (4). Mostramos una tabla (Tabla 1) de los últimos años (2018-2020), comparando las cepas enviadas al CNM para su caracterización microbiológica con los datos comunicados a la RENAVE.

Durante los años 2018-2020 se han remitido un total de 1843 cepas de estafilococos para su caracterización microbiológica en el CNM, 73,7 (%) *S. aureus* y 26,3 (%) SCN. El 49,3% correspondían a infecciones adquiridas en el hospital (52,9% *S. aureus* y 47,1% SCN) y el 50,7% a infecciones comunitarias.

Se observa una preocupación creciente por la caracterización de los ECN aislados en el hospital (Tabla 1). Entre estos, destacamos a los *S. epidermidis*, en los que mostramos los mecanismos más habituales de resistencia al linezolid: prevalece la mutación G2576T en el dominio V del ARNr. La disminución de las cepas con gen *cfz* positivo en los dos últimos años, dado que se trata de un gen portado por un plásmido, podría indicar una disminución de su transmisión entre cepas. También estudiamos cepas de *S. aureus* y *S. hominis* resistentes al linezolid, en menor número que los *S. epidermidis* (datos no mostrados en la Tabla 1).

La distribución de los spa-tipos entre las cepas de *S. aureus* intrahospitalarias nos muestra una gran variabilidad; los más prevalentes en el periodo 2018-2019 fueron: t002, t008, t012, t019, t021, t067, t084, t223. No se observaron diferencias significativas entre ambos años excepto en el t008 que descendió del 3,1% en 2018 al 0,6% en 2019.

En cuanto a la distribución de los spa-tipos en las cepas de *S. aureus* comunitarias, aunque también se detecta una gran variabilidad, existe una mayor preponderancia de algunos clones específicos respecto a las cepas intrahospitalarias. En 2018 cabe destacar el t008 (11,5%), t019 (4,4%), t1451 (4,1%), t021 (3,7%), el t067 (3,0%), t148 (3,0%) y el t097 (2,6%); mientras que en 2019 los principales spa-tipos fueron t008 (10,8%), t148 (6,6%), t002 (4,7%), t067 (3,9%), y t166 (2,8%).

El gen *mecA* se ha detectado en la totalidad de *S. aureus* resistentes a meticilina estudiados, no detectándose en gen *mecC* en el periodo de tiempo reportado.

En el estudio de las toxinas, llevado a cabo en el CNM (Tabla 2), observamos un incremento en el 2020 de las cepas SASM intrahospitalarias productoras de PVL, y también la tendencia de aumento progresivo de las cepas comunitarias, tanto SASM como SARM, productoras de TSST.

Entre los brotes que se han estudiado en 2018-2020 destacan: uno de toxiinfección alimentaria en Galicia producido por *S. aureus*; otro en UCI de un hospital de Canarias causado por *S. aureus* spa-tipo t067; otro de *S. aureus* en Asturias, también en una UCI; y uno de *S. epidermidis* con un gran número de cepas analizadas, resistentes al linezolid, con mutación G2576T, en una UCI de un hospital madrileño, ya en el período inicial de la pandemia de coronavirus.

Asimismo, el Programa de Vigilancia colaboró en un estudio de portadores de *S. aureus* de niños menores de 14 años (estudio COSACO) (5), con miembros de la Sociedad Española de Pediatría; caracterizando 572 aislados de todo el país, en los que se encontraron que el 3,5% eran SARM, de los cuales el spa-tipo más abundante fue el t002, asociados con el SCCmec IVc. En los SASM los más prevalentes fueron: t012 (7,6%), t021 (4,5%), t375 (4,2), t002 (2,5%). Los SARM fueron todos PVL negativos, uno ETA y ETB positivo y 6 cepas portaban TSST. Entre los SASM fueron positivos: el 0,7% (PVL), 33% (TSST), 4,2% ETA), 1,5% (ETB), 0,7% (ETA+ETB), y 2% (ETD).

Tabla 1. Datos de prevalencia de RENAVE y cepas estudiadas en el CNM.

Microorganismo	2018		2019		2020
	RENAVE*	CNM**	RENAVE	CNM*	CNM*
	Nº aislados/%				
<i>S. aureus</i>	991	457	955	525	377
Origen de la infección					
Desconocido	1				
Intrahospitalario	435	171	410	179	130
Comunitario	555	286	545	346	247
SASM (Intrahospitalario)	280/64,4	100/58,5	264/64,4	96/53,6	90/69,2
SARM (Intrahospitalario)	126/29,0	71/41,5	123/30,0	83/46,4	40/30,8
<i>S. epidermidis</i>	358	69	366	102	269
Origen de la infección					
Intrahospitalario	243	64	236	89	248
Comunitario	115	5	130	13	21
Intrahospitalario (R al linezolid)					
Cfr positivo		10/15,6		1/1,1	4/1,6
Mutación G2576T		36/56,3		63/70,8	221/89,1
cfr positivo y mutación G2576T		2/2,9		0/0,0	3/1,1
Comunitario (R al linezolid)					
cfr positivo		0/0,0		0/0,0	0/0,0
Mutación G2576T		2/40,0		7/53,8	15/71,4
cfr positivo y mutación G2576T		0/0,0		0/0,0	0/0,0
<i>S. haemolyticus</i>	31	4	54	3	4
Origen de la infección					
Intrahospitalario	22	2	46	2	2
Comunitario	9	2	8	1	2
<i>S. hominis</i>	24	5	23	10	4
Origen de la infección					
Intrahospitalario	11	3	12	9	3
Comunitario	13	2	11	1	1

Microorganismo	2018		2019		2020
	RENAVE*	CNM**	RENAVE	CNM*	CNM*
	N° aislados/%				
Otros ECN	164	7	100	6	1
Origen de la infección					
Intrahospitalario	75	2	45	4	0
Comunitario	89	5	55	2	2

*Datos comunicados a RENAVE (Nacional) facilitados por Virginia Arroyo Nebreda y Pilar Gallego Berciano (Centro Nacional de Epidemiología)

**Número total de remitidas y estudiadas en el CNM.

Tabla 2. Distribución de las toxinas detectadas en las cepas de *S. aureus* en el CNM.

Toxinas	2018				2019				2020			
	Comunitarias		Intrahospitalarias		Comunitarias		Intrahospitalarias		Comunitarias		Intrahospitalarias	
	SASM N° aislad./%	SARM N° aislad./%	SASM N° aislad./%	SARM N° aislad./%	SASM N° aislad./%	SARM N° aislad./%	SASM N° aislad./%	SARM N° aislad./%	SASM N° aislad./%	SARM N° aislad./%	SASM N° aislad./%	SARM N° aislad./%
PVL	10/3,7	72/26,7	3/0,7	22/4,9	3/0,8	74/20,4	1/0,2	26/5,0	4/1,7	53/22,4	4/1,1	10/2,6
TSST	32/11,9	2/0,7	31/6,9	2/0,4	46/12,7	8/2,2	22/4,2	5/1,0	32/13,5	13/5,5	17/4,5	2/0,5
ETA	1/0,4	0	0	0	7/1,9	2/0,6	4/0,8	1/0,2	10/4,2	3/1,3	1/0,3	0
ETB	1/0,4	0	0	0	0	1/0,3	0	0	0	0	0	0
ETA+ETB	5/1,9	0	0	0	2/0,6	1/0,3	0	0	0	0	0	0
ETD	1/0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Impacto de la pandemia de COVID-19 en la vigilancia epidemiológica de los estafilococos

En los datos facilitados por el Centro Nacional de Epidemiología (1) se observa que en los años 2018 y 2019 la procedencia de *S. aureus* aislados en los hospitales según servicios hospitalarios es 1° Quirúrgica, 2° Médica, 3° Mixta, 4° Cuidados Intensivos (UCI); la misma situación se repite en el caso de los *S. epidermidis*.

En 2000 se detectó un aumento en el número de cepas de *S. epidermidis* procedentes de UCIs (Tabla 1), probablemente justificado por un mayor número de ingresos en estas unidades. En muchos de estos casos se detectó resistencia a linezolid, se caracterizaron un total de 145 cepas con estas características. En el octavo estudio multicéntrico nacional de prevalencia de los estafilococos, realizado en 2014, ya se observaba esta tendencia, resistencia a linezolid en *S. epidermidis* de UCIs del 20,9% (6). Los ECN ejercen un importante papel como introductores y transmisores de resistencias a los *S. aureus*.

CONCLUSIONES

- El aumento de las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria en las últimas décadas, entre ellas las producidas por estafilococos, condujo a la necesidad de desarrollar este programa de vigilancia.
- En el caso de los estafilococos, en los tres últimos años se ha mantenido la adherencia al programa; aunque existe un cierto desequilibrio, en algunos casos, entre la participación en el estudio de prevalencia y el envío de cepas al CNM.
- Se notó un incremento en la solicitud y detección de cepas resistentes al linezolid, estudiando su mecanismo de resistencia, en el que prevaleció la mutación G2576T.
- Se ha observado un aumento de infecciones comunitarias por SARM del spa-tipo t223 productoras de TSST. Entre las cepas SARM comunitarias productoras de PVL juegan un papel preponderante las cepas del spa-tipo t008.
- Entre los ECN, prevalecieron las cepas de *S. epidermidis* resistentes al linezolid.
- Las medidas del control epidemiológico de la COVID-19, entre ellas, el simple pero eficaz lavado de manos, parecen haber disminuido el número de *S. aureus*, y puesto más en evidencia el papel de los estafilococos coagulasa negativos, incrementándose las cepas de *S. epidermidis* resistentes al linezolid con mutación G2576T en las UCIs.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Arroyo Nebreda V y Gallego Berciano P. "Encuesta de prevalencia de las IRAS y uso de antimicrobianos en España 2018-2019. Centro Nacional de Epidemiología.ISCIII. Informes de Vigilancia de RENAVE.". Madrid, España, 2021.
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of healthcare associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals - protocol versión 5.3 Stockholm: ECDC; 2016.
3. Román F, Roldán C, Trincado P, Ballesteros C, Carazo C, Vindel A. Detection of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* with 23S rRNA and novel L4 riboprotein mutations in a cystic fibrosis patient in Spain. *Agents Chemother.* 201; 57(5): 2428-2429. doi: [10.1128/AAC.00208-13](https://doi.org/10.1128/AAC.00208-13).
4. Vindel A, Cuevas O, Cercenado E, Marcos C, Bautista V, Castellares C, Trincado P, Boquete T, Pérez Vázquez M, Marín M, Bouza E; Spanish Group for the Study of *Staphylococcus*. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: molecular epidemiology and utility of different typing methods. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(6): 1620-1627. doi:[10.1128/JCM.01579-08](https://doi.org/10.1128/JCM.01579-08). Epub 2009 Apr 1.PMID: 19339473.
5. Román F, Mendez-Echevarria, Ana; Del Rosal, Teresa; Garcia-Vera, Cesar; Escosa-Garcia, Luis; Agud, Martín; Chaves, Fernando; Gutierrez-Fernandez, Jose; Ruiz de Gopegui, Enrique; Ruiz-Carrascoso, Guillermo; Ruiz-Gallego, María del Carmen; Bernet, Albert; Quevedo, Sara Maria; Fernandez-Verdugo, Ana Maria; Sainz, Talia; Calvo, Cristina, Characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains colonising the nostrils of Spanish children *MicrobiologyOpen* (2021) (en prensa).
6. Cercenado E, Cuevas O, Vindel A, Román F, Marín M, Bouza E y Grupo Español para el Estudio de *Staphylococcus*. Situación actual de la resistencia de los estafilococos en España (2014): octavo estudio nacional de prevalencia. En abstracts del XIX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Sevilla, Mayo. 2015.

Programa de infecciones entéricas bacterianas transmitidas por agua y alimentos

Informe elaborado por S. Herrera León, M.T. Llorente Rodríguez y L. Herrera León en nombre de: M.T. Gutiérrez Catela, J. Beltrán Feliu, V. Martín Merino, R. Ramiro Jiménez, Elena Mateos de las Moreras y A. Molina Marín.

Laboratorio de Referencia e Investigación en Enfermedades Transmitidas por Agua y Alimentos. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) son un conjunto de enfermedades producidas por la ingestión de un alimento, incluido el agua, que puede estar contaminado por diversos agentes, como bacterias, virus, parásitos o químicos. Las manifestaciones clínicas de estas enfermedades son generalmente de tipo gastrointestinal y cursan con calambres o dolor abdominal, diarrea (a veces con sangrado), vómitos y/o fiebre. La vigilancia de estas enfermedades es vital para poder establecer las medidas adecuadas de control y prevención y poder anticiparse a la aparición de brotes, minimizando el daño producido en la población.

En España, los casos y brotes ocurridos se notifican al Centro Nacional de Epidemiología (CNE) a través de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE). Las Comunidades Autónomas (CCAA) notifican a la RENAVE los casos/brotos ocurridos en su territorio y esta información es remitida al Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC). El programa de Vigilancia de infecciones entéricas transmitidas por agua y alimentos del Centro Nacional de Microbiología (CNM) se centra en las infecciones bacterianas y nace de la necesidad de vigilar tanto las zoonosis como los agentes zoonóticos desde el punto de vista microbiológico (ej. resistencia antimicrobiana, detección de clones virulentos, etc) como epidemiológico ej. (detección e investigación de brotes, generación de información que permita la evaluación de las fuentes y tendencias pertinentes). Esta función viene respaldada por el Real Decreto 1940/2004 del 27 de septiembre sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos así como por la Orden APA/1808/2007 del 13 de junio en la que se nombra al CNM como Laboratorio Nacional de Referencia para los casos de zoonosis en el hombre.

Con la información remitida al ECDC, conjuntamente con la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), publica dos informes anuales: i) informe de tendencias y fuentes de agentes zoonóticos y brotes de transmisión alimentaria en el que se constata que las zoonosis más frecuentes en nuestro entorno son producidas por *Campylobacter* spp, seguida de *Salmonella* spp, *Escherichia coli* verotoxigénico y *Yersinia* spp; ii) informe sobre la resistencia antimicrobiana en bacterias zoonóticas e indicadoras de personas, animales y alimentos donde se recopilan y analizan los datos de todos los Estados Miembros. El objetivo es mantener un seguimiento continuo de la situación epidemiológica de cada enfermedad para valorar la eficacia de las medidas preventivas puestas en marcha. En relación a este último informe, el CNM contribuye aportando los datos de resistencia en *Salmonella* y *Campylobacter* spp.

Además de estas zoonosis, y con el fin de dar respuesta al requerimiento del Real Decreto 1940/2004 del 27 de septiembre, el CNM lleva a cabo la vigilancia microbiológica de las infecciones por *Shigella* spp. y *Vibrio* spp.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

La vigilancia de las enfermedades bacterianas transmitidas por alimentos requiere de datos microbiológicos que apoyen a los sistemas epidemiológicos en la evaluación de las fuentes de infección, tendencias, investigación y detección temprana de brotes y en el seguimiento en la aparición y persistencia de las resistencias a antimicrobianos. Para ello, los objetivos específicos de este programa son:

- Proporcionar información microbiológica al Sistema Nacional de Vigilancia y Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC).
- Identificar y caracterizar las cepas que causan enfermedad (casos esporádicos o brotes) en la población, así como su evolución en el tiempo.
- Llevar a cabo estudios de epidemiología molecular para la investigación y detección temprana de brotes y clones emergentes.

DISEÑO DEL PROGRAMA

Sujetos del estudio: pacientes con infección entérica causada por cualquiera de los microorganismos incluidos en el programa. En el caso de brotes se admitirán aislados procedentes de alimentos o animales que puedan ser considerados fuente de infección.

Participantes: cualquier laboratorio de microbiología hospitalaria de la red pública y los laboratorios de salud pública de las CCAA. Los laboratorios privados realizarán los estudios de referencia a través de la cartera de servicios (precio público) del CNM.

Muestras, condiciones de envío y análisis de laboratorio.

Se reciben aislados previamente caracterizados como *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Yersinia* spp, *Escherichia coli* de cualquiera de los grupos causantes de diarreas (enteropatógeno, enteroagregativo, enterotoxigénico, enteroagregativo o enterohemorrágico/verotoxigénico), *Campylobacter* spp o *Vibrio* spp. En el caso de *E. coli* se recomienda el envío de heces o placa de coprocultivo primario. Las condiciones de envío deben cumplir las normas de bioseguridad y no es necesario el envío refrigerado.

Los análisis que se realizan en el laboratorio son los siguientes:

- Aislamiento de *E. coli* productor de diarrea a partir de muestra clínica (heces) o placa de coprocultivo primario.
- Confirmación/identificación de la especie se realiza por métodos fenotípicos y/o moleculares. En el caso de aislados de *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Yersinia* spp, *Vibrio* spp y *E. coli* productores de diarrea se determina el serogrupo/serotipo por medios fenotípicos y/o moleculares.
- Fagotipificación de *E. coli* O157:H7. En el caso de *Salmonella* únicamente se caracterizan por medio de esta técnica aislados de los serotipos Enteritidis, Typhimurium, Hadar, Virchow y Typhi y siempre que se hayan remitido en el curso de una investigación de brote alimentario.
- Determinación de patrones de resistencia a antimicrobianos.
- Genotipificación mediante PCR y/o secuenciación de genomas completos en el estudio de brotes/casos o en situaciones de especial interés para la Salud Pública: estudio de factores de virulencia de *Shigella* spp, *E. coli* diarreagénicos y *Vibrio cholerae*; estudio de relaciones filogenéticas, estudio de determinantes de resistencia a antimicrobianos y sus entornos genéticos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El CNM lleva realizando la vigilancia de estas enfermedades desde comienzos de los años 80. En este informe se analizan los resultados del periodo 2013-2020. Con el fin de facilitar el análisis y debido a la gran heterogeneidad en la vigilancia de cada una de las enfermedades incluidas en el programa, éstas se analizan por separado indicando para cada uno de ellas los resultados más relevantes. Para el análisis no se han tenido en cuenta las muestras procedentes de alimentos/animales/medio ambiente o aquellas en las que no se recuperó el microorganismo esperado.

El análisis sobre las resistencias antimicrobianas en *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. no se presenta en este informe ya que el CNM es la fuente principal de información para el Sistema de Vigilancia Europeo (TESSy) por lo que los datos se analizan de manera exhaustiva en los informes anuales ⁽²⁾.

Salmonelosis

durante el periodo 2013-2020 se recibieron 24.038 aislados, aunque en el análisis descriptivo se incluyen 23.686 ya que en el caso de que el mismo paciente tuviera más de uno únicamente se ha considerado aquel con fecha de toma más temprana.

El programa de vigilancia cuenta con una buena representación geográfica ya que en el periodo estudiado se recibieron aislados de 17 Comunidades Autónomas, así como de Ceuta y Melilla. Sin embargo, tal y como se muestra en la [Tabla 1](#) existen regiones cuyo envío es anecdótico (Cantabria, Ceuta, La Rioja o Melilla).

Tabla 1. Aislados enviados al CNM en el periodo 2013-2021.

	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
Andalucía	133	189	279	390	308	241	153	126	1.819
Aragón	176	162	163	101	81	76	57	39	855
Asturias	159	284	253	681	249	80	49	83	1.838
Cantabria	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Castilla La Mancha	153	111	126	155	199	241	139	47	1.171
Castilla y León	280	262	353	430	330	291	230	97	2.273
Cataluña	205	161	224	167	134	177	249	88	1.405
Ceuta	0	0	24	16	0	0	28	0	68
Comunidad Valenciana	535	565	661	430	431	479	529	244	3.874
Extremadura	27	31	20	28	22	6	12	0	146
Galicia	102	61	73	191	159	93	57	14	750
La Rioja	0	17	0	25	2	6	3	4	57
Islas Baleares	171	191	278	292	238	209	205	102	1.686
Islas Canarias	158	224	56	80	2	12	129	15	676
Madrid	765	641	876	990	720	552	455	292	5.291
Melilla	0	0	0	5	0	0	0	1	6
Murcia	20	3	29	53	27	42	12	11	197
Navarra	50	50	67	52	45	46	61	42	413
País Vasco	173	169	140	95	122	145	173	108	1.125
Total CNM	3.107	3.121	3.622	4.181	3.069	2.696	2.542	1.313	23.651
Total declarados ^(a)	4.762	7.342	9.134	10.212	9.810	8.940	8.348	4.553	63.101
Total (%) ^(a)	65,24	42,51	39,65	40,94	31,28	30,16	30,45	28,83	37,48

^(a) Casos confirmados notificados a la RENAVE. ^(b) Porcentaje de casos confirmados enviados al CNM.

No existieron diferencias en la afectación de hombres y mujeres con una razón hombre-mujer de 1,06. Los grupos de edad más afectados correspondieron a los intervalos 0-4 años (27,73%), seguido de 5-14 (21,79%) y >65 años (17,23%). De los 23.686 aislados recibidos, el 94,31% procedían de heces, el 3,12% de sangre, el 1,51% de orina y el resto de diversas localizaciones.

Si comparamos nuestros datos con las tendencias y los serotipos más frecuentemente identificados en Europa, vemos que, aunque existe una correlación en los serotipos más frecuentes, existe una inversión en la frecuencia de los dos serotipos más comúnmente identificados siendo Typhimurium y su variante monofásica, el serotipo más común en España (43,02%) seguido de Enteritidis (30,74%). Le siguen en orden de frecuencia: Infantis (1,91%), Rissen (1,52%), Newport (1,51%) y Mikawasima (1,50%).

En los casos de *S. Enteritidis* existe una clara estacionalidad produciéndose un aumento en los meses de verano (coincidiendo con mayor número de brotes) mientras que en los casos por *S. Typhimurium* no parece existir estacionalidad o ésta es menos marcada.

Tal y como sucede en el resto de Europa, los casos de fiebres tifoideas (producidas por *S. Typhi*) y fiebres paratifoideas (*S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B sensu stricto* y *S. Paratyphi C*) son anecdóticos y se asociaron a menudo con viajes principalmente a India y Pakistán.

El análisis de series temporales permite no solo colaborar en la evaluación de los programas de control y prevención de la salmonelosis sino también la detección o investigación de brotes o clones emergentes. En este periodo, el CNM dio respuesta a más de 70 *urgent inquiries* emitidas por diferentes estados miembros en la red de vigilancia del ECDC, alertó y colaboró con diversas CCAA en el estudio de incrementos inusuales de serotipos poco frecuentes y participó en la investigación de 201 brotes (65,2% causados por *S. Enteritidis*).

Desde el año 2020 se secuencian el genoma completo de aquellos aislados enviados en el contexto de investigación de brotes. Estas secuencias se encuentran en un repositorio común y permiten tanto la comparación con aquellas secuencias obtenidas en el transcurso de la investigación (ya sea de origen animal, alimentario o humano) como la inclusión de secuencias de otros brotes o eventos, contemporáneos o pasados, ya sean de ámbito nacional o internacional.

Infecciones gastrointestinales producidas por *Escherichia coli*

Aunque los sistemas de vigilancia del ECDC y la RENAVE únicamente recogen los casos producidos por el grupo ECVT/ECEH, el CNM lleva a cabo el aislamiento y caracterización de todos los grupos productores de diarrea. El brote de infección por ECVT O104:H4 que tuvo lugar en Alemania en mayo de 2011 contribuyó a aumentar el conocimiento y la preocupación acerca de las infecciones gastrointestinales por *E. coli* en España y, como consecuencia, los índices de detección de las infecciones por este microorganismo aumentaron significativamente en nuestro país. Así, en el periodo de estudio (2013-2020) se han recibido en el CNM 4.002 heces, coprocultivos primarios y/o aislados para el estudio de este grupo de microorganismos. En 1.455 muestras (45,2%) se identificó alguno de los principales grupos causantes de diarrea (Tabla 2).

Tabla 2. Número de muestras de cada uno de los grupos de *E. coli* productores de diarrea y no productores de diarrea (ECND) en el periodo estudiado.

	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
ECVT	28	50	86	51	60	64	152	93	584
ECEP	2	9	53	111	38	48	51	36	348
ECET	4	2	14	29	14	19	15	5	102
ECEA	4	3	52	98	57	64	48	4	330
ECEI	1	0	4	9	7	3	15	8	47
ECND	174	89	52	655	195	205	267	126	1763
Total	213	153	261	953 ^(a)	371	403	548	272	3174

ECVT: *E. coli* verotoxigénico; ECEP: *E. coli* enteropatógeno; ECET: *E. coli* enterotoxigénico; ECEA: *E. coli* enteroagregativo; ECEI: *E. coli* enteroinvasivo. ^(a)Tendencia distorsionada por la presencia de un proyecto de investigación.

Durante este periodo se recibieron muestras de 16 Comunidades Autónomas, así como de Ceuta y Melilla. Sin embargo, no existió una buena representatividad nacional ya que solo Castilla La Mancha, Castilla León, Madrid y en los últimos años Navarra y País Vasco mantuvieron el número de envíos constante.

Si nos centramos en el único grupo de declaración obligatoria, el grupo ECVT/ECEH, en el periodo de tiempo analizado, el CNM recibió muestras clínicas/aislados del 73% de los casos declarados en la RENAVE (Tabla 3). No existieron diferencias en la afectación de hombres y mujeres con una razón hombre-mujer de 0,99. La manifestación clínica más frecuente fue diarrea seguida de diarrea sanguinolenta y, por último, síndrome urémico hemolítico. En ambas fuentes de datos el grupo de edad más afectado correspondió al intervalo 0-4 años (43,7%). La discrepancia entre los datos del laboratorio y los datos de la RENAVE en el resto de grupos etarios puede deberse a la identificación del serotipo O157:H7. Por sus características fenotípicas este serotipo se puede aislar/identificar sin necesidad de emplear métodos moleculares por lo que no suele requerir el envío a laboratorios de referencia.

Tabla 3. Aislados ECVT/ECEH identificados por año durante el periodo 2013-2020.

	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
ECVT	28	50	86	51	60	64	152	93	584
Total declarados ^(a)	6	39	46	84	93	126	271	135	800
Total (%) ^(a)	466	128,2	186,9	60,71	64,5	50,8	56,1	68,9	73

^(a)Casos confirmados notificados a la RENAVE. ^(a)Porcentaje de casos confirmados enviados al CNM.

La distribución por serotipos difirió año a año siendo los más frecuentes O157:H7, O128:H2, O91:H14 y O26:H11. En cuanto al perfil de verotoxinas tipo 1 y tipo 2 las variantes más comunes fueron vtx1a y vtx2b. Cuando ambas estaban presentes en la misma cepa la combinación más frecuente fue vtx1a/vtx2c y vtx1c/vtx2b. Actualmente la subtipificación de verotoxinas no se realiza de manera rutinaria en los laboratorios de microbiología clínica. Sin embargo, diversos estudios^{3,4} sugieren la posibilidad de llevar a cabo diferentes estrategias en el manejo de los casos en función de datos epidemiológicos (edad y clínica) y perfil de verotoxinas.

Desde el año 2020 el CNM secuencia el genoma completo de todos los aislados ECVT/ECEH.

Campilobacteriosis

Durante el período 2013-2020 se recibieron un total de 2.458 aislados procedentes de 10 CCAA. No existe una buena representación nacional ya que mayoritariamente se enviaron de Castilla La Mancha, Castilla y León, Galicia y Madrid y tampoco existe una buena cobertura poblacional teniendo en cuenta que tan solo se recibieron aislados del 2,13% de los casos declarados. El 96,87% procedían de heces seguido de sangre completa (1,67%); biopsias de colon, rectales o intestinales (0,24%); abscesos, cepillado anal, exudado vaginal, ascitis, líquido biliar, líquido sinovial y orina (0,28%). El número de afectados en hombres fue más elevado que en mujeres con una con una razón hombre-mujer de 1,37. El grupo de edad más afectado, tanto para hombres como para mujeres, correspondió a los menores de 5 años de edad. La afectación descendió paulatinamente con el aumento de la edad, siendo más baja en los grupos de 35-44 y 45-54 años de edad.

La especie más frecuente fue *C. jejuni* (83,56%) seguida de *C. coli* (15,7%) (Tabla 4) lo que supone un reflejo de la situación europea donde ambas especies se identificaron en el mismo periodo de tiempo en un 80-83% y un 10-12% respectivamente. En el periodo 2013-2020 se investigaron únicamente tres brotes. El resto de aislados se recibieron en el contexto de infecciones esporádicas.

Tabla 4. Especies de *Campylobacter* identificadas por año durante el período 2013-2020.

	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total	%
<i>C. jejuni</i>	322	264	277	297	322	312	241	21	2056	83,6
<i>C. coli</i>	58	71	63	39	54	47	49	4	385	15,7
<i>C. fetus</i>	1	2	2	1	0	0	0	0	6	0,2
<i>C. upsaliensis</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	2	0,2
<i>C. ureolyticus</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	2	0,1
<i>C. lari</i>	0	0	0	1	0	2	0	0	3	0,1
<i>C. lanieae</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0,0
Total CNM	382	337	343	338	378	361	291	25	2.455	100,0
Total declarados ^(a)	7.282	11.415	13.347	15.555	19.777	19.132	19.153	9.739	115.400	
Total (%) ^(a)	5,25	2,95	2,57	2,17	1,91	1,89	1,51	0,26	2,13	

^(a) Casos confirmados notificados a la RENAVE. ^(b) Porcentaje de casos confirmados enviados al CNM.

Shigelosis

En el periodo 2013-2020 se recibieron un total de 605 aislados procedentes de las 17 CCAA. El 73,8 de los envíos procedían de Madrid (28,36 %), Navarra (17,25), País Vasco (9,62%), Castilla y León (6,9%) y Castilla La Mancha (7,13%). Si comparamos nuestros datos con los recogidos en TESSy en el mismo periodo de tiempo, el CNM recibió el 27,39% de los casos confirmados (Tabla 5). En este caso no se comparan con los datos de la RENAVE ya que esta recoge casos probables y confirmados. El 96,86 % fueron obtenidos a partir de heces, el 1,16% de orina y el 0,83% de sangre. El 1,15 % procedían de biopsia de colon, líquido biliar, exudado

vaginal y lavado nasal. El número de casos en hombres fue más elevado que en mujeres con una con una razón hombre/mujer de 1,89. La mayor afectación entre los hombres se alcanzaron en el grupo de 25 a 44 años, seguido del grupo de 0 a 4 años. En las mujeres, el grupo más afectado correspondió al de 25 a 44 años seguido del grupo de 45 a 64 años y menores de 5 años (Figura 3).

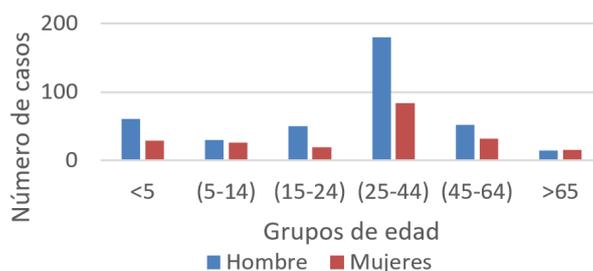
Tabla 5. Aislados enviados al CNM en el periodo 2013-2021.

Especie	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total	%
<i>S. sonnei</i>	35	38	49	38	20	70	46	10	306	50,58
<i>S. flexneri</i>	30	22	25	29	35	29	58	21	249	41,16
<i>S. boydii</i>	4	6	2	2	3	11	5	1	34	5,62
<i>S. dysenteriae</i>	3	0	1	1	0	1	2	0	8	1,32
<i>Shigella spp.</i>	0	2	0	2	1	0	3	0	8	1,32
Total CNM	72	68	77	72	59	111	114	32	605	100
Total declarados ¹	142	230	293	180	325	455	512	72	2209	
Total CNM (%) ²	50,7	29,57	26,28	40	18,15	24,40	22,27	44,44	27,39	

¹ Casos confirmados notificados a TESSy. ² Porcentaje de casos confirmados enviados al CNM.

Las especies más frecuente fueron *S. sonnei* (50,58%) y *S. flexneri* (41,16%). Dentro de la especie *S. flexneri* el serotipo más abundante fue el II (48,39%). Estos datos correlacionan con los datos declarados en Europa donde estas dos especies son predominantes, así como en la tendencia ascendente en el número de casos producidos por *S. sonnei* entre los hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres y en la aparición de cepas multirresistentes ⁶. Todos los casos en los que se disponía de información acerca del lugar de infección de *S. dysenteriae* se asociaron a viajes a Sudamérica o África.

Figura 3. Distribución de los casos de shigelosis según grupos de edad.



Yersiniosis

En el periodo analizado se han recibido 864 aislados procedentes de 14 CCAA siendo las más activas Navarra (24,54%), Madrid (21,06%), Comunidad Valenciana (18,52%), Cataluña (10,76%) y Castilla y León (10,30%). Si comparamos nuestros datos con los recogidos en la RENAVE en el mismo periodo de tiempo, el CNM recibió el 24,94% de los casos confirmados. El 98,39% fueron obtenidos a partir de heces. En cuanto a la distribución por sexos, la razón hombre-mujer fue de 1,18. La media de edad de los casos fue de 21,04 años con un rango de 0 a 114 años. El grupo de edad más afectado correspondió a los menores de 5 años descendiendo el número de casos paulatinamente con la edad.

La especie más frecuente fue *Yersinia enterocolitica* (94,10%) (Tabla 6). Las cepas patógenas más frecuentemente aisladas en humanos pertenecen a los serotipos O:3, O:5, O:8 y O:9. Además, las combinaciones O: 3/biotipo 4, O: 5 / biotipos 2 y 3, O: 8 / biotipo 1B y O: 9 / biotipo 2 se aíslan con mayor frecuencia en todo el mundo a partir de muestras humanas. En nuestra serie el serotipo más común fue el O:3 (70,83%) siendo O:3 /biotipo 4 la combinación más abundante (98,95%). Es importante señalar que en el 27,17% de los aislados de *Y. enterocolitica* se identificó el biotipo 1A. Aunque el papel patógeno de este biotipo es controvertido ya que no poseen el plásmido de virulencia u otros factores de virulencia como la enterotoxina termoestable, cada vez existen más evidencias clínicas, epidemiológicas y microbiológicas (presencia de factores de virulencia alternativos) que indican que al menos algunas cepas de este biotipo si serían causantes de cuadros leves de gastroenteritis en humanos.

Tabla 6. Aislados enviados al CNM en el periodo 2013-2021.

Especie	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total	%
<i>Y. enterocolitica</i>	63	62	100	91	122	132	151	92	813	94,1
<i>Y. frederiksenii</i>	1	1	6	3	1	7	4	6	29	3,36
<i>Y. bercovieri</i>	1	1	4	1	0	0	0	0	7	0,81
<i>Y. intermedia</i>	0	0	0	0	0	0	1	2	3	0,35
<i>Y. kristensenii</i>	0	1	1	1	0	0	0	0	3	0,35
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	1	0	1	1	0	0	0	0	3	0,35
<i>Yersinia spp</i>	0	1	0	1	2	0	2	0	6	0,69
Total CNM	66	65	112	97	123	139	156	100	864	
Total declarados ¹	243	435	478	436	636	564	644	420		
Total CNM (%) ²	27,16	14,94	23,43	22,25	19,34	24,64	24,22	23,80		

¹ Casos confirmados notificados a TESSy. ² Porcentaje de casos confirmados enviados al CNM.

Vibriosis

Debido a un cambio en el sistema informático solo se analizan los datos de mitad de 2014 a 2020. En dicho periodo de tiempo se recibieron 104 aislados procedentes de 16 CCAA con un aumento significativo en el año 2019 (32,69% del total). El 53,61% se aislaron en heces, el 23,71% de sangre, el 10,31% de exudado de oído y el 7,22% de exudado de herida. Cabe destacar que el caso de disponer de información sobre el vehículo de infección el 82% de los casos en los que se detectó *Vibrio spp* en exudado de oído o de herida existía una relación directa con baño en agua dulce o salada. En estos casos las especies identificadas fueron *V. cholerae* (76,47%) y *V. alginolyticus* (23,53%).

En cuanto a la distribución por sexos, no existen diferencias en la afectación de hombres y mujeres siendo la razón hombre-mujer de 1,04. La media de edad de los casos fue de 54,43 años con un rango de 0 a 98 años. El grupo de edad más afectado correspondió a los mayores de 65 años. Existe una tendencia en el número de casos según aumenta la edad.

En el caso de *V. parahaemolyticus* el 66,67% eran portadoras del gen que codifica la hemolisina termoestable, directamente relacionada con virulencia. El 90,28% de los aislados de *V. cholerae* fueron no toxigénicos. En el caso de la vigilancia nacional y europea únicamente se declaran los casos de cólera producidos por las cepas toxigénicas de *V. cholerae*. En nuestra serie temporal se declararon a la RENAVE 8 casos. De ellos, 7 fueron confirmados en el CNM. Cinco habían viajado a India o República Dominicana y uno no tenía antecedentes de viaje. En este caso, la media de edad de los afectados fue de 41 años con un rango de 33 a 62. La razón hombre-mujer fue de 0,17.

Las especies identificadas Y el número de casos por año se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Aislados enviados al CNM en el periodo 2014-2021.

Especie	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total	%
<i>V. cholerae</i>	6	9	11	8	9	20	10	73	70,19
<i>V. parahaemolyticus</i>	0	2	4	1	1	9	0	17	16,35
<i>V. alginolyticus</i>	0	0	0	0	2	5	0	7	6,73
<i>V. fluvialis</i>	1	0	1	0	0	0	3	5	4,81
<i>V. furnissii</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0,96
<i>V. mimicus</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	0,96
Total	8	11	17	9	12	34	13	104	100

LIMITACIONES

- El envío de muestras al programa de vigilancia se realiza de manera voluntaria por lo que no es homogéneo para las distintas enfermedades.
- Para la interpretación de los grupos de edad más afectados hay que tener en cuenta que en este tipo de infecciones existe un *sesgo de gravedad*. Los niños y ancianos son los que de forma más frecuente acuden a los centros sanitarios.

CONCLUSIONES

- El programa de vigilancia microbiológica cumple con los objetivos propuestos.
- La participación en el programa de vigilancia se ha mantenido a lo largo de los años si bien existe una gran diferencia entre Comunidades Autónomas.
- La representatividad es buena en el caso de salmonelosis, infecciones gastrointestinales producidas por *E. coli* y vibriosis; aceptable para shigelosis y yersiniosis y baja para campilobacteriosis por lo que debería hacer un esfuerzo para impulsar este último.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFSA Journal 2021;19(2):6406, 286 pp.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>.
2. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2021. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. EFSA Journal 2021;19(4):6490, 179 pp.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6490>
3. Veneti L, Lange H, Brandal L, Danis K, Vold L (2019). Mapping of control measures to prevent secondary transmission of STEC infections in Europe during 2016 and revision of the national guidelines in Norway. Epidemiology and Infection 147, e267, 1-10.
<https://doi.org/10.1017/S0950268819001614>.
4. Jenssen GR, Veneti L, Lange H, Vold L, Naseer O, Brandal L (2019). Implementation of multiplex PCR diagnostics for gastrointestinal pathogens linked to increase of notified Shiga toxin-producing *Escherichia coli* cases in Norway, 2007-2017. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 38:801-809.
<https://doi.org/10.1007/s10096-019-03475-5>.
5. Shad, A.A., Shad, W.A. (2021) *Shigella sonnei*: virulence and antibiotic resistance. Archives of Microbiology 203, 45-58.
<https://doi.org/10.1007/s00203-020-02034-3>.

Programa de Legionelosis

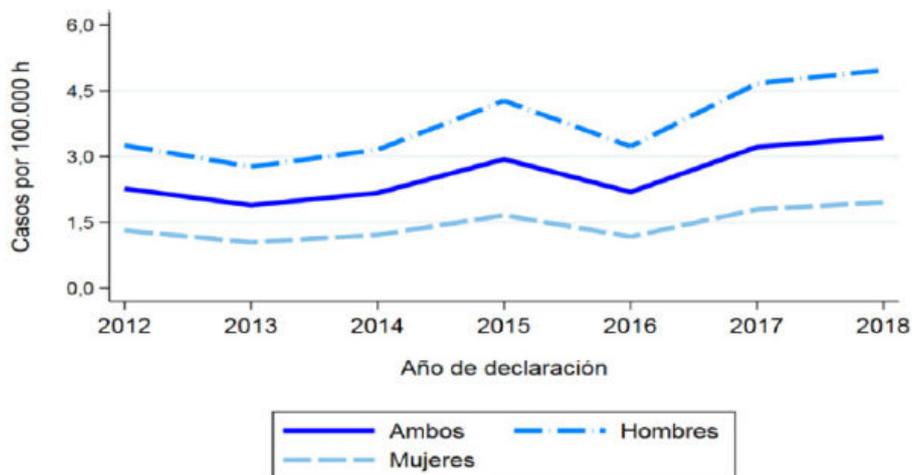
Informe elaborado por B. Bellido y C. Pelaz.

Unidad de Legionella. Laboratorio de Referencia e Investigación en Infecciones Bacterianas Transmitidas por Agua y Alimentos. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

INTRODUCCIÓN

La legionelosis es la infección de origen ambiental causada por bacterias del género *Legionella*, que se encuentran presentes de forma ubicua en ecosistemas acuáticos, tanto naturales como artificiales (sistemas de distribución de agua sanitaria, torres de refrigeración, etc.). En estos últimos, el estancamiento de agua a una temperatura entre 20°C y 45°C, la acumulación de materia orgánica y la presencia de *biofilms* favorecen su multiplicación. Si la instalación permite la formación de aerosoles, las bacterias son diseminadas y pueden ser inhaladas por personas susceptibles, causando enfermedad de forma oportunista. Los factores de riesgo más relevantes son la edad avanzada, la presencia de otras patologías, como enfermedades respiratorias crónicas o diabetes, los tratamientos inmunosupresores y el tabaquismo. Cabe destacar que esta enfermedad afecta en mayor proporción a hombres que a mujeres (Figura 1). La legionelosis se puede presentar en forma de neumonía que puede llegar a ser grave, en cuyo caso puede tener un desenlace fatal. España es uno de los países europeos que notifica las tasas de incidencia más elevadas, siendo de 3,18 casos/100.000 habitantes en 2018 (Figura 1).

Figura 1. Vigilancia de Legionelosis. 2012-2018. Tasas de incidencia (casos por 100.000 h.)



Fuente: Red de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE)

La letalidad de esta enfermedad puede ser elevada (5,9% en España en 2018), principalmente en el ámbito hospitalario o si existe demora en la instauración del tratamiento antibiótico adecuado. Por otro lado, es frecuente que la enfermedad se presente en forma de brotes. La legionelosis, además, tiene unas repercusiones económicas considerables, principalmente en el sector turístico. Por todo ello, esta enfermedad tiene una gran relevancia en el ámbito de la Salud Pública.

Desde 1996, la legionelosis es una enfermedad de declaración obligatoria en España. Tanto los casos aislados/ esporádicos como los brotes deben ser notificados a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) coordinada por el Centro Nacional de Epidemiología (CNE). Además, la Red Europea de Vigilancia de la Enfermedad del Legionario (ELDSNet), que está coordinada por el ECDC y en la cual participan el Centro Nacional de Microbiología (CNM) y el CNE, lleva a cabo una vigilancia a tiempo real de los casos asociados a viajes, con el objetivo de detectar agrupaciones de casos (*clusters*) de viajeros de distintos países, y prevenir la aparición de nuevos casos.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

Los resultados microbiológicos de los aislados de *Legionella* en pacientes son necesarios para la vigilancia de la enfermedad a nivel nacional y europeo. Además, a la hora de identificar las fuentes de infección en la investigación de brotes/casos, el análisis conjunto de los resultados microbiológicos humanos y ambientales es imprescindible. Por otro lado, la capacidad de supervivencia y replicación de *Legionella* en el interior de protozoos confiere a estas bacterias de una gran resistencia a condiciones adversas (tratamientos térmicos, biocidas, etc.) por lo que su persistencia en las instalaciones colonizadas es muy elevada. Por todo ello, los objetivos de este programa son:

- Proporcionar información microbiológica al Sistema Nacional de Vigilancia y al *European Center for Diseases Control* (ECDC).
- Conocer las cepas de *Legionella* que están causando enfermedad (casos esporádicos o brotes) en la población y su evolución en el tiempo.
- Identificar las fuentes de infección de los casos/brotes.
- Conocer la persistencia en instalaciones de cepas de *Legionella* asociadas previamente a casos.
- Determinar si existen diferencias entre las cepas de *Legionella* que colonizan edificios en función de si están o no asociadas a casos.

DISEÑO DEL PROGRAMA

Sujetos de estudio:

- Casos humanos de infección respiratoria asociada a *Legionella* e ingresados en centros hospitalarios.

- En el caso de investigaciones de casos/brotes, se incluyen los aislados ambientales relacionados procedentes de los laboratorios de Salud Pública de las Comunidades Autónomas (CC.AA.), con el objetivo de detectar las posibles fuentes de infección, así como para realizar la vigilancia ambiental de las mismas.
- Aislados ambientales, procedentes de aguas u otras muestras ambientales recogidas en cumplimiento de los planes de prevención organizados por las CCAA, o en cumplimiento de la legislación vigente.

Participantes: Los laboratorios de microbiología clínica del Sistema Nacional de Salud, fundamentalmente de la red pública, y los laboratorios de Salud Pública de las CCAA.

Muestras:

- Muestras clínicas (respiratorias) para aislamiento, identificación y caracterización de *Legionella*.
- Aislados de origen humano para identificación y caracterización de *Legionella*.
- Aislados de origen ambiental para identificación y caracterización de *Legionella*.

Hasta 2018 inclusive, también se analizaban muestras ambientales (aguas y otras muestras) para el aislamiento y caracterización de *Legionella*.

Técnicas:

- Aislamiento de la bacteria a partir de muestras clínicas (muestras respiratorias).
- Identificación y tipificación fenotípica de cultivos (humanos y ambientales):
 - Identificación o confirmación mediante la determinación de especie y serogrupo de *Legionella* con métodos serológicos y/o moleculares (secuenciación del gen *mip* o del gen del 16S-RNA).
 - Tipificación de *L. pneumophila* SG1 mediante inmunofluorescencia con el panel de Anticuerpos Monoclonales de Dresden (AcMc).
- Genotipificación de cultivos humanos y/o ambientales de *L. pneumophila* en el estudio de brotes/casos o en situaciones de especial interés para la Salud Pública: secuenciación (SBT de 7 genes con el esquema del grupo de expertos europeos ESGLI -anteriormente EWGLI-), y en caso necesario PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*).
- Genotipificación aplicada directamente en extractos de ADN de muestras clínicas cuando no se consigue un aislado, mediante secuenciación (Nested-PCR SBT de 7 genes basado en el esquema de SBT).

Hasta 2018 inclusive, también se llevaba a cabo el aislamiento y recuento de *Legionella* a partir de muestras ambientales (aguas y otras muestras), siguiendo un protocolo basado en las normas de ensayo UNE ISO 11731: 2007 y UNE-EN ISO 11731-2: 2008.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde comienzo de los años 80, en el CNM se realizan ensayos de aislamiento de *Legionella* en muestras clínicas y ambientales, así como ensayos de identificación y tipificación fenotípica y molecular de aislados de esta bacteria. En este informe se analizan los resultados de estos ensayos desde que se implementó el Programa de Vigilancia de Legionelosis en 2012 hasta el año 2020, para las muestras de origen humano (Tabla 1) y de origen ambiental (Tabla 2) recibidas en el CNM.

En este período, se recibieron un total de 300 aislados humanos y 812 muestras clínicas, de las cuales 779 se cultivaron, obteniéndose 179 aislados que pudieron ser identificados y caracterizados. Las muestras clínicas de las que no se consiguió un aislado fueron procesadas por el método de ensayo Nested-PCR SBT, obteniéndose un total de 136 resultados interpretables (5-7 genes secuenciados). El 39% de las muestras clínicas recibidas tuvieron un resultado epidemiológico útil, así como el 55% del total de muestras de origen humano.

Tabla 1. Muestras de origen humano recibidas por el Programa de Vigilancia de Legionelosis en el CNM (2012-2020).

MUESTRAS DE ORIGEN HUMANO										
Año	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
Nº Muestras	66	73	77	168	314	99	115	137	63	1.112
Aislados recibidos	30	39	42	37	16	37	28	47	24	300
M. clínica	36	34	35	131	298	62	87	90	39	812
Cultivos realizados	36	34	35	124	294	60	82	79	35	779
Aislados obtenidos	15	10	10	33	32	19	24	21	15	179
% m. clínicas con cultivo positivo	42	29	29	25	11	31	28	23	38	22
M. clínicas con Nested-PCR SBT interpretable	18	12	8	22	29	5	17	21	4	136
% m. clínicas con Nested-PCR SBT interpretable	50	35	23	17	10	8	20	23	10	17
% m. clínicas con resultados epidemiológicos útiles	92	65	51	42	20	39	47	47	49	39

Durante los 9 años analizados, se recibieron 7.883 muestras de origen ambiental, 7.498 de ellas eran aislados. Se recibieron también 385 muestras de agua que se procesaron por cultivo, obteniéndose un total de 104 aislados.

Tabla 2. Muestras de origen ambiental recibidas por el Programa de Vigilancia de Legionelosis en el CNM (2012-2020)

MUESTRAS DE ORIGEN AMBIENTAL										
Año	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
Nº Muestras	1.087	1.177	1.146	1.138	815	671	658	893	298	7.883
Aislados recibidos	1.021	1.096	1.054	1.016	801	661	658	893	298	7.498
Aguas	66	81	92	122	14	10	-	-	-	385
Aislados obtenidos	15	11	6	64	2	6	-	-	-	104
% muestras con cultivo positivo	23	14	7	52	14	60	-	-	-	27

En el citado período, se identificaron 474 aislados de origen humano de *Legionella* (Tabla 3). El 99% de estos aislados se identificaron como *L. pneumophila*, siendo el serogrupo 1 el más frecuente (93%). Los 440 aislados de *L. pneumophila* SG1 se tipificaron con los AcMc del panel de Dresden. Un total de 367 (83%) se clasificaron como aislados pertenecientes al subgrupo mayor Pontiac (MAB 3/1 +), siendo los subgrupos menores Philadelphia y Knoxville los más frecuentes. El 17% de los aislados de *L. pneumophila* SG1 tuvieron una reacción negativa al AcMc MAB 3/1, siendo el subgrupo menor Olda OLDA el más frecuente. El secuenciotipo (ST) según el esquema SBT fue determinado en todos los aislados (467) de origen humano de *L. pneumophila*. Los secuenciotipos más frecuentes fueron el ST1, ST23, ST20 y ST42. Los 31 aislados de origen humano del ST899 (ST muy poco frecuente en España) estaban relacionados con un brote de gran envergadura (más de 400 casos) que tuvo lugar a finales del año 2015 en Manzanares (Castilla-La Mancha).

Tabla 3. Resultados de ensayos en aislados de origen humano del Programa de Vigilancia de Legionelosis (2012-2020)

RESULTADOS DE AISLADOS DE LEGIONELLA DE ORIGEN HUMANO								
Especie y serogrupo (SG)	Nº	%	Subgrupo de <i>L. pneumophila</i> SG1*	Nº	%	Secuenciotipo (ST) de <i>L. pneumophila</i>	Nº	%
<i>L. pneumophila</i>	467	99	Pontiac (MAB 3/1 +)	367	83	ST1	63	13
SG1	440	93	Knoxville	94	21	ST23	47	10
SGs 2-16	27	5,7	Philadelphia	105	24	ST899	31	6,6
SG3	2	0,4	Benidorm	53	12	ST20	28	6,0
SG4	3	0,6	France/Allentown	58	13	ST42	23	4,9
SG5	4	0,8	S.Me.no realizado	57	13	ST181	20	4,3
SG6	7	1,5	MAB 3/1 -	73	17	ST37	18	3,9
SG7	3	0,6	Olda	46	10	ST448	13	2,8
SG8	3	0,6	OLDA	40	9,1	ST48	11	2,4
SG9	1	0,2	Oxford	4	0,9	ST1581	10	2,1
SG10	2	0,4	Heysham	2	0,5	STs nuevos	23	4,9
Otros SGs	0	0,0	Camperdown	0	0,0	STs incompletos	2	0,4
N.T./R.C.	2	0,4	Bellingham	9	2,0	Otros STs	178	38
Otras especies	7	1,5	S. Me. no realizado	18	4,1	Total	467	100
Total	474	100	Total	440	100			

*Tipificación con AcMc del Panel de Dresden.

Nº: Número de muestras; N.T.= no tipable; R.C. = reacciones cruzadas entre distintos SGs; AcMc = anticuerpos monoclonales; S.Me. = subgrupo menor

En el período entre 2012 y 2020, se identificaron 7.286 aislados de origen ambiental de *Legionella* (Tabla 4). El 92% de estos aislados se identificaron como *L. pneumophila*, siendo el serogrupo 1 el más frecuente (68%). Los 4.986 aislados de *L. pneumophila* SG1 se tipificaron con AcMc. Únicamente el 28% de ellos pertenecen al subgrupo mayor Pontiac (MAB 3/1 +).

Tabla 4. Resultados de ensayos en aislados de origen ambiental del Programa de Vigilancia de Legionelosis (2012-2020)

RESULTADOS DE AISLADOS DE LEGIONELLA DE ORIGEN AMBIENTAL								
Especie y serogrupo (SG)	Nº	%	Subgrupo de <i>L. pneumophila</i> SG1*	Nº	%	Secuenciotipo (ST) de <i>L. pneumophila</i>	Nº	%
<i>L. pneumophila</i>	6.732	92	Pontiac (MAB 3/1 +)	1.407	28	ST1	114	27
SG1	4.986	68	Knoxville	297	6,0	ST23	44	11
SGs 2-16	1.746	24	Philadelphia	234	4,7	ST42	41	10
SG2	4	0,1	Benidorm	301	6,0	ST181	18	4
SG3	264	3,6	France/Allentown	242	4,9	ST62	15	4
SG4	89	1,2	S. Me. no realizado	333	6,7	ST20	13	3
SG5	33	0,5	MAB 3/1 -	3.524	71	ST37	12	3
SG6	285	3,9	Olda	2.593	52	ST146	12	3
SG8	300	4,1	OLDA	1.975	40	STs nuevos	12	3
SG9	33	0,5	Oxford	407	8,2	STs incompletos	3	1
SG10	163	2,2	Heysham	57	1,1	Otros STs	133	32
SG12	39	0,5	Camperdown	154	3,1	<i>Total</i>	417	100
SG13	3	0,0	Bellingham	299	6,0			
SG14	16	0,2	S. Me. no realizado	632	13			
Otros SGs	0	0,0	No tipable/No determinado	55	1,1			
N.T./R.C.	517	7,1	<i>Total</i>	4986	100			
Otras especies	554	7,6						
<i>Total</i>	7286	100						

*Tipificación con AcMc del Panel de Dresden

Nº: Número de muestras; N.T.= no tipable; R.C. = reacciones cruzadas entre distintos SGs; AcMc = anticuerpos monoclonales; S.Me. = subgrupo menor

El 71% de los aislados de origen ambiental de *L. pneumophila* SG1 reaccionaron negativamente al AcMc MAB 3/1, siendo el subgrupo menor Olda OLDA el más frecuente (40%). En 417 (6,2%) aislados ambientales de *L. pneumophila* se determinó el secuenciotipo, ya que estaban relacionados con casos esporádicos/brotos o con alguna situación de especial interés para la Salud Pública. Los secuenciotipos más frecuentes fueron el ST1, ST23 y ST42.

Cabe destacar la diferencia significativa que existe entre los aislados de origen humano y los de origen ambiental en cuanto a la reacción con el AcMc MAB 3/1, siendo ésta positiva en la mayoría (83%) de los aislados humanos y sin embargo negativa en la mayor parte (71%) de los aislados ambientales. Este hecho pone de manifiesto claramente que el AcMc MAB 3/1 reconoce un epítipo asociado con virulencia.

Por otro lado, resaltar que durante el período de tiempo analizado se ha participado en la investigación de al menos 51 brotes (11 hospitalarios, 2 en residencias/centros de 3ª edad, 11 relacionados con hoteles/balnearios/alojamientos y 27 de ámbito comunitario), analizándose más de 2.000 muestras y encontrándose resultados coincidentes entre muestras humanas y ambientales en el 42% de ellos. Los brotes más relevantes por su magnitud y/o repercusión fueron los de Móstoles-2012, Calpe-2012, Sabadell-2014, Manzanares-2015 y Palmanova-2017.

CONCLUSIONES

- Cabe resaltar la necesidad de contar con muestras de origen humano, ya que los métodos disponibles permiten una identificación y caracterización precisa del agente etiológico, incluyendo la genotipificación. El ensayo Nested-PCR SBT rinde unos resultados útiles epidemiológicamente para un 17% de las muestras clínicas recibidas en las que no se logra obtener un aislado de *Legionella*.
- Se pone de manifiesto la diferencia en la patogenicidad entre cepas de *L. pneumophila* SG1 MAB 3/1 positivas y negativas, lo que podría ser clave en la evaluación del riesgo de las instalaciones.
- En el contexto de la investigación de brotes, los análisis realizados son fundamentales para la confirmación microbiológica de las posibles fuentes de infección, para lo cual es imprescindible contar con muestras de los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la vigilancia Epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual. Años 2017-2018. Madrid, 2020.
2. European Centre for Disease Prevention and Control. European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet) - Operating procedures for the surveillance of travel-associated Legionnaires' disease in the EU/EEA. Stockholm: ECDC; 2017. Stockholm: ECDC; 2017.

Programa de infecciones causadas por especies toxigénicas del género *Corynebacterium*

Informe elaborado por L. Herrera-León*¹, S. Herrera León¹.

¹Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

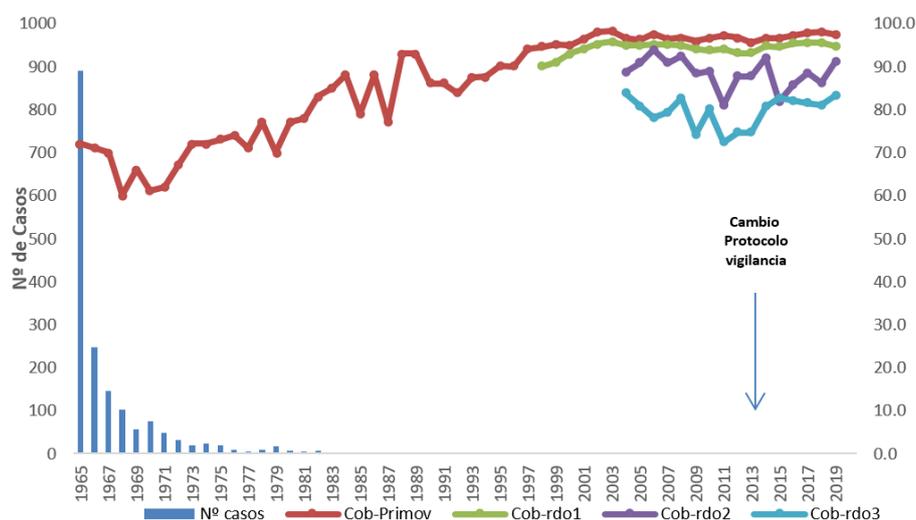
*CIBER de Epidemiología y Salud Pública. CIBERESP.

INTRODUCCIÓN

La difteria es una enfermedad potencialmente letal que está causada por cepas toxigénicas del patógeno humano *Corynebacterium diphtheriae* y con menos frecuencia por cepas toxigénicas de los patógenos zoonóticos *Corynebacterium ulcerans* o *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Recientemente, se han identificados dos especies nuevas: *Corynebacterium belfantii* (se corresponde con la biovariedad Belfanti de la especie *C. diphtheriae*) y *Corynebacterium rouxii*. El principal factor patógeno del género *Corynebacterium* es su capacidad de producir una exotoxina causante de las manifestaciones locales y de los efectos tóxicos sistémicos.

En España, la difteria es una enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO) muy poco frecuente gracias a la elevada cobertura de vacunación (Figura 1).

Figura 1. Casos de difteria y coberturas de vacunación con toxoide diftérico, España 1965-2020.



Fuentes: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE).

Centro Nacional de Epidemiología, ISCIII. Coberturas de vacunación: Ministerio de Sanidad

El objetivo final de la vigilancia de la difteria es detectar, investigar, caracterizar y controlar todos los casos aislados y los brotes de difteria así como identificar agrupaciones de individuos susceptibles frente a esta enfermedad. Desde el CNM, se ofrece la posibilidad a los laboratorios del Sistema Nacional de Salud, de realizar el estudio de toxigenicidad de los aislados pertenecientes a las especies potencialmente toxigenicas ya que en los protocolos de vigilancia de la RENAVE se define como caso confirmado aquel que satisface los criterios clínicos y de laboratorio siendo los criterios de laboratorio el “aislamiento en una muestra clínica de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* o *C. pseudotuberculosis* productores de toxina”.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

A pesar de ser una enfermedad infrecuente es necesario mantener la vigilancia de la enfermedad para la detección temprana de posibles casos o brotes, así como incrementar el conocimiento científico de estas infecciones en relación con factores de riesgo, emergencia y dispersión de nuevos clusters, mecanismos de resistencia y factores de virulencia.

El estudio de expresión de la toxina requiere una metodología difícil de implementar en los laboratorios por la dificultad de adquisición de los reactivos necesarios para llevarlo a cabo. En el año 2017 el ECDC publicó un informe en el que alertaba de la escasa capacidad diagnóstica para este tipo de aislados y la importancia de mantener los laboratorios de referencia para este tipo de ensayos.

Por todo ello, los objetivos de este programa son:

- Proporcionar al Sistema de Vigilancia datos de laboratorio con los que poder los diferentes indicadores epidemiológicos.
- Proporcionar a los hospitales y laboratorios de salud pública la caracterización microbiológica de casos individuales especialmente en la realización del test Elek para el estudio de toxigenicidad.
- Dar respuesta a la Red de Vigilancia de Difteria del ECDC.

DISEÑO DEL PROGRAMA

Sujetos de estudio: Paciente con sospecha de difteria respiratoria, cutánea o de otras localizaciones (lesión en conjuntiva o mucosas).

Participantes: Abierto a los hospitales y laboratorios de salud pública. En el estudio de casos y contactos, se analizarán también las cepas procedentes de otros orígenes, sospechosos de ser la fuente de infección (por ejemplo, muestras de animales o alimentos involucrados). La información proporcionada en el cuestionario de envío debe ser cumplimentada de forma completa y veraz.

Muestras, condiciones de envío y análisis de laboratorio: Recogida de una muestra clínica en cuanto se sospeche difteria, incluso en los casos en los que ya se haya iniciado el tratamiento antibiótico, aunque preferiblemente se deben recoger antes.

Se recogerán muestras (con dos hisopos, que pueden ser de dacron o de alginato cálcico, para cada localización) de la nariz, de la garganta y de las membranas si las hubiere (se debe coger la muestra de debajo de la membrana donde se suele concentrar la bacteria). En la difteria cutánea se recogerán también muestras de las lesiones. Asimismo, se recogerán muestras de exudado nasal y de garganta de todos los contactos estrechos expuestos a un caso sospechoso de difteria. El aislamiento de *C. diphtheriae* toxigénico en los contactos puede ayudar a confirmar el diagnóstico cuando el cultivo del paciente sea negativo. Las muestras deben ser enviadas rápidamente al laboratorio para cultivo en un medio apropiado (Amies gel, Cary Blair, Stuart o similar) a temperatura ambiente.

Mediante una PCR a tiempo Real se lleva a cabo de manera simultánea la identificación a nivel de especie y la presencia del gen *tox*. Para confirmar la expresión del gen *tox* y la capacidad toxigénica en las cepas identificadas como *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* o *C. pseudotuberculosis*, se realiza el método de referencia Elek, ya que existen cepas portadoras del gen incapaces de expresar la toxina. Hasta el año 2019, las cepas con resultado positivo para el gen *tox* se enviaban para su caracterización mediante el test Elek al laboratorio “WHO Collaborating Centre for Diphtheria and Streptococcal Infections at Public Health England” en Londres. Desde el año 2020 el test Elek se realiza en el propio laboratorio del CNM.

La tipificación molecular se realizaba mediante MLST (*Multi Locus Sequence Typing*). Desde el año 2019 se realiza la secuenciación del genoma completo con fines de vigilancia y se ha llevado a cabo la secuenciación de todas las cepas aisladas e identificadas en el CNM desde el año 2014.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestras recibidas.

El diagnóstico de la difteria lleva en servicio en el CNM desde el año 2007. En este informe se incluye el análisis de los resultados obtenidos desde el año 2014 hasta el año 2020. Entre 2014 y 2020 se han recibido en el Laboratorio de Difteria del CNM 305 muestras clínicas o aislados no duplicados, para su identificación, confirmación, estudio de toxigenicidad y/o caracterización molecular. Los aislados proceden de muestras respiratorias (frotis nasofaríngeo, aspirados, esputos), muestras cutáneas y/o sangre de pacientes con sospecha clínica de difteria, de estudios de contactos o de pacientes sin criterio clínico de difteria.

Identificación de especies potencialmente toxigénicas.

De las 305 muestras clínicas o aislados recibidos, en 56 (18,3%) se identificó algunas de las especies potencialmente toxigénicas del género *Corynebacterium* (*C. diphtheriae*, *C. belfantii*, *C. ulcerans* o *C. rouxii*). De estos 56, diez corresponden a portadores asintomáticos identificados en el estudio de contactos del caso de difteria respiratoria notificado en Cataluña en 2015, por lo que se han excluido del estudio descriptivo al tratarse de la misma cepa que el caso. Los 46 aislados o muestras clínicas restantes procedían de 13 CCAA: Andalucía (4), Aragón (2), Valenciana (3), Canarias (3), Castilla La Mancha (4), Castilla y León (1), Cataluña (7), Galicia (2), Baleares (1), Madrid (8), Murcia (1), Navarra (3) y País Vasco (7). El número de determinaciones positivas varía según los años: 4 (2014), 5 (2015), 5 (2016), 11 (2017), 9 (2018), 5 (2019), y 7 (2020) siendo la media anual de 7,8 aislados.

Veintiséis (56,5%) aislados fueron identificados como *C. diphtheriae* (13 pertenecían a la biovariedad mitis, 11 a la biovariedad gravis y en 2 no se pudo determinar la biovariedad al no poderse obtener un cultivo positivo), 14 (30,4%) como *C. belfantii*, 5 (10,9%) como *C. ulcerans*, y uno (2,2%) como *C. rouxii*.

Estudio de toxigenicidad y características de los aislados toxigénicos.

Sobre los 56 aislados totales: el estudio de toxigenicidad (PCR + Elek) identificó 36 aislados como no-toxigénicos, uno de ellos identificado como NTTB (non-toxicogenic tox gene-bearing), y 18 aislados como toxigénicos (incluyendo los 10 aislados de portadores asintomáticos identificados en el estudio de contacto del caso de difteria respiratoria 2015). En otras dos muestras se detectó el gen *tox* mediante PCR, pero no se consiguió cultivar el agente ya que procedían de pacientes que habían recibido tratamiento antibiótico antes de la recogida, por lo que no se pudo confirmar la capacidad de expresión de la toxina. A pesar de este resultado la clínica sugestiva de difteria respiratoria llevó a que un paciente se clasificara como caso confirmado de difteria y otro como caso probable.

Excluyendo a los 10 contactos del caso de difteria respiratoria, el rango de edad de los pacientes varió de 1 a 89 años y el 60,8% (28/46) eran hombres. Según la toxigenicidad de la cepa, los pacientes con aislados de difteria no-toxigénica fueron en general mayores que los pacientes con aislados toxigénicos. El 11,1% (4/36) de los pacientes con cepas no toxigénicas tenían menos de 15 años frente al 20,0% (2/10) de los pacientes con cepas toxigénicas. La razón hombre/mujer fue 1,25 (20/16) para los aislados no-toxigénicos y 4 (8/2) para los toxigénicos.

Únicamente los casos toxigénicos se deben notificar a la RENAVE. En la tabla 1 se detallan las características de los casos declarados a la RENAVE y confirmados en el Laboratorio de Difteria excluyendo los aislados de los contactos asintomáticos del caso de 2015.

Tabla 1. Características de los aislados toxigénicos notificados a la RENAVE.

Especie	Año	CCAA	Edad	Sexo	Muestra	Clínica	Biovariedad	Gen <i>tox</i> (PCR)	Producción de toxina (ELEK)	ST*
<i>C. diphtheriae</i>	2014	Castilla la Mancha	12	Hombre	Cutánea	Úlcera de pie	Mitis	Positivo	Positivo	389
	2015	Cataluña	7	Hombre	Membrana faríngea	Difteria respiratoria	Mitis	Positivo	Positivo	377
	2016	Cataluña	20	Hombre	Cutánea		Mitis	Positivo	Positivo	484
	2018	C. Valenciana	53	Hombre	Cutánea	Membrana faríngea, miocarditis	NA	Positivo	NA	297
	2019	C Madrid	40	Hombre	Cutánea	Herida necrotizante en pierna	Mitis	Positivo	Positivo	458
	2019	Cataluña	34	Hombre	Cutánea		Mitis	Positivo	Positivo	377
	2020	C. Madrid	71	Mujer	Membrana faríngea	Membrana faríngea	NA	Positivo	NA	NA
	<i>C. ulcerans</i>	2014	Andalucía	62	Hombre	Cutánea		NA	Positivo	Positivo
2016		Cataluña	85	Mujer	Cutánea	Úlceras crónicas vasculares	NA	Positivo	Positivo	337
2019		C. Madrid	60	Hombre	Hisopo faríngeo	Odinofagia, lesiones faríngeas	NA	Positivo	Positivo	514

* Secuenciotipo

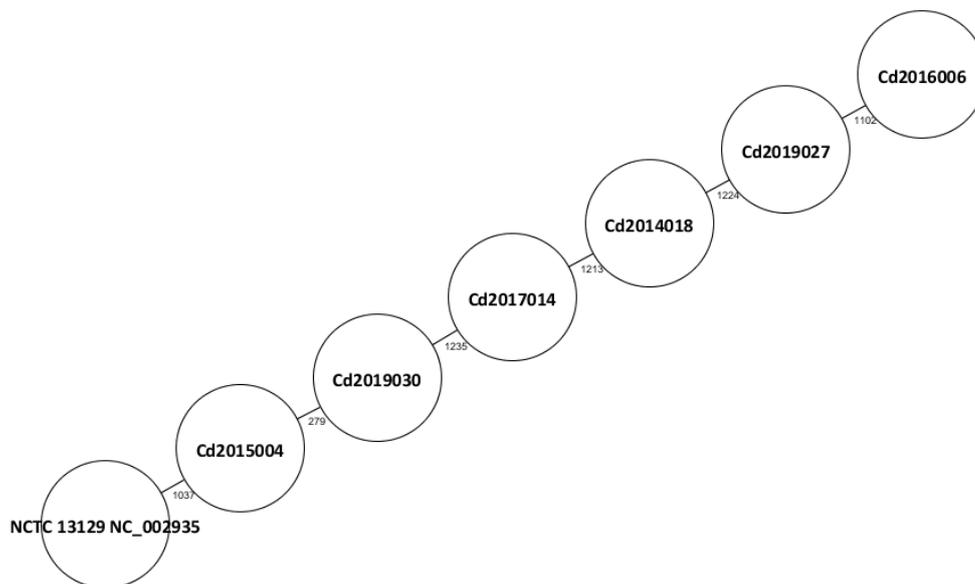
Como factores de riesgo se indica viaje países con elevada incidencia de difteria y contactos con animales domésticos (gatos y perros).

Tipificación molecular.

La tipificación mediante MLST mostró ocho secuenciotipos (STs) diferentes (Tabla 1). En uno de los aislados no pudo determinarse el ST al no poder obtenerse un cultivo positivo y no disponer de cantidad de ADN suficiente para realizar el estudio. Únicamente dos aislados mostraban el mismo ST (ST377). Uno de estos dos aislados fue identificado en el caso de difteria respiratoria de Cataluña de 2015 y el otro procedía también de Cataluña de un caso de difteria cutánea. El análisis posterior mediante cgMLST mostró una gran diferencia entre todos los aislados sin que se observe ningún agrupamiento, descartando una posible relación entre los dos aislados que compartían el mismo ST.

La información disponible es limitada debido al bajo número de muestras recibidas y caracterizadas; por el momento resulta difícil estimar cual es la transmisión real de las cepas de *Corynebacterium* potencialmente toxigénicos en nuestro país.

Figura 2. Minimum spanning tree basado en el análisis mediante cgMLST de 1441 loci de las cepas identificadas como *C. diphtheriae* tomando como referencia la cepa tipo NCTC 13129.



CONCLUSIONES

- La mayoría de las cepas identificadas son no-toxigénicas. La proporción de cepas toxigénicas es más alta entre *C. ulcerans* que entre *C. diphtheriae* (75% vs 17%). Se ha identificado una cepa de *C. diphtheriae* NTTB (non-toxigenic tox gene-bearing) en un joven con clínica respiratoria bien vacunado procedente de Reino Unido. El caso se notificó como caso descartado. Este caso pone de manifiesto la necesidad de realizar el test Elek ya que mediante las técnicas moleculares se hubiera informado y notificado como caso confirmado.
- La infección por *C. diphtheriae* se presenta con clínica respiratoria y/o cutánea. La infección por *C. ulcerans* generalmente tiene presentación cutánea, aunque también puede cursar con síntomas respiratorios.
- En nuestro país no existen clones circulantes, sino que se tratan en su mayoría de casos importados de países con elevada incidencia de difteria.
- Es necesario mantener la capacidad diagnóstica y aumentar la sospecha clínica.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Madrid, 2013. Centro Nacional de Epidemiología. *Instituto de Salud Carlos III. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.*
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Gap analysis on securing diphtheria diagnostic capacity and diphtheria antitoxin availability in the EU/EEA. Stockholm: ECDC; 2017.
3. Sharma NC, Efstratiou A, Mokrousov I, Mutreja A, Das B, Ramamurthy T. Diphtheria. *Nat Rev Dis Primers.* 2019; 5(1):81.
doi: [10.1038/s41572-019-0131-y](https://doi.org/10.1038/s41572-019-0131-y)

Programa de resistencias en el complejo tuberculoso

Informe elaborado por L. Herrera-León*, M.S. Jiménez-Pajares, R. Ramiro Jimenez, P. Saiz Vega y A. Valverde Cobacho.

Laboratorio de Micobacterias. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

*CIBER de Epidemiología y Salud Pública. CIBERESP.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad transmisible causada por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Puede afectar a cualquier órgano, siendo la forma pulmonar la más frecuente. Fue declarada emergencia mundial por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la 44 Asamblea Mundial de la Salud (1). En España, la TB es una enfermedad de declaración obligatoria. Las autoridades de salud pública de las Comunidades Autónomas (CCAA) notifican de forma individualizada los casos sospechosos, probables y confirmados al Centro Nacional de Epidemiología (CNE), a través de la RENAVE y envían la información de la encuesta epidemiológica de declaración del caso con una periodicidad semanal. Adicionalmente, una vez al año, se completa la información de las variables contenidas en la encuesta epidemiológica. Ante la detección de un caso bacilífero multirresistente que requiera medidas especiales de seguimiento, la detección de un brote o si el patrón de difusión de la enfermedad requiere medidas de coordinación, el Servicio de Vigilancia de la CA lo comunica al Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias (CCAES) y al CNE. El CCAES valora junto con las CCAA afectadas las medidas a tomar y, si es necesario, se notifica al Sistema de Alerta y Respuesta Rápida de Unión Europea y a la OMS de acuerdo con el Reglamento Sanitario Internacional (2).

La TB-MDR¹ y XDR² representa una de las mayores amenazas para los planes de prevención y control de la TB. El sistema de vigilancia basado en la realización rutinaria de pruebas de susceptibilidad a todos los pacientes con diagnóstico de TB, es la mejor manera de alcanzar un sistema de vigilancia *sistemático y continuo* tal y como recomienda la OMS. De esta forma, se suministra información sobre las características de la farmacorresistencia en los diferentes grupos de pacientes y, por consiguiente, se reconocen con exactitud las tendencias en el transcurso del tiempo, así como la evolución de la incidencia; además, permite identificar grupos de alto riesgo y ámbitos donde se produce la transmisión e identificar brotes (3). La epidemiología molecular facilita la identificación de cadenas de transmisión y la rápida identificación de clones emergentes, permitiendo el desarrollo e instauración de estrategias de prevención y control óptimas. Por todo ello, para llevar a cabo una vigilancia adecuada es necesaria la colaboración entre los diferentes agentes implicados y la integración de la información microbiológica y epidemiológica.

Los laboratorios de microbiología desempeñan un papel clave suministrando resultados que constituyen una fuente de información de excelente sensibilidad y valor predictivo positivo, imprescindible para cumplir eficazmente los objetivos de un sistema de vigilancia.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

La aparición de la resistencia a los fármacos antituberculosos, y en particular la TB-MDR/XDR, se ha convertido en un problema de salud pública y en un obstáculo al control eficaz de la TB en el mundo. La vigilancia de la resistencia resulta indispensable para abordar el problema mediante el manejo adecuado de los pacientes y la adopción de estrategias para prevenir la aparición y diseminación de la TB resistente. La encuesta epidemiológica recogida en el protocolo de la RENAVE recoge los resultados de las pruebas de susceptibilidad (2). Estos datos también son requeridos anualmente por el ECDC y la OMS para monitorizar y analizar la situación de la TB a nivel europeo y mundial. La OMS aconseja que los resultados de las pruebas de susceptibilidad a la rifampicina se deben documentar como mínimo en el 75% de los casos nuevos de TB pulmonar (3). Por otro lado, los estudios moleculares indican que los nuevos casos de TB-MDR/XDR se deben a la transmisión de estas cepas más que a mecanismos de adquisición de resistencia frente a los fármacos de primera línea, por lo que resulta imprescindible la utilización de herramientas moleculares con un elevado poder de discriminación que aseguren la rápida identificación de clones circulantes y que permitan su trazabilidad. El ECDC utiliza la plataforma EpiPulse para la vigilancia de la tuberculosis utilizando para ello la secuenciación del genoma completo.

Por todo ello, los objetivos del programa son:

- Apoyar al Sistema Nacional de Salud realizando las técnicas fenotípicas y moleculares necesarias para la caracterización de las cepas resistentes.
- Identificación a nivel de especie los aislados pertenecientes al complejo tuberculoso.
- Estudios de epidemiología molecular para la detección temprana de brotes y clones emergentes, diferenciación entre recaídas/reinfecciones o descartar posibles contaminaciones cruzadas.
- Proporcionar al Sistema de Vigilancia datos de laboratorio con los que poder elaborar los diferentes indicadores epidemiológicos descritos en el Plan de Control y Prevención de la TB.

¹ TB-MDR: Tuberculosis multirresistente: resistente al menos a rifampicina e isoniazida

² TB-XDR: TB extremadamente resistente: MDR más resistencia a fluoroquinolona y, al menos, a uno de los restantes fármacos del grupo A (levofloxacin/moxifloxacin, bedaquilina y linezolid).

DISEÑO DEL PROGRAMA

Sujetos de estudio: pacientes con infección tuberculosa sometidos a tratamiento antituberculoso.

Participantes: abierto a los laboratorios de microbiología de la red de hospitales públicos del Sistema Nacional de Salud y los laboratorios de Salud Pública de las Comunidades Autónomas.

Muestras, condiciones de envío y análisis de laboratorio: se reciben aislados previamente caracterizados como *Mycobacterium tuberculosis* complex. Las condiciones de envío deben cumplir con las medidas de bioseguridad y no es necesario el envío refrigerado.

El estudio fenotípico de las resistencias se realiza mediante el método de las proporciones en Lowenstein-Jensen para el estudio de la sensibilidad frente a isoniacida (INH), rifampicina (RIF), estreptomina (SM), etambutol (EMB), kanamicina, cicloserina, capreomicina, y ethionamida y utilizando el sistema BACTEC 960 (sistema de lectura automática utilizando medio líquido MGIT) para la pirazinamida (PZ), amikacina, moxifloxacino, levofloxacino, linezolid, clofazimina, bedaquilina y delamanida siguiendo las indicaciones de la OMS (4). El estudio molecular de las mutaciones asociadas a la resistencia se realiza mediante PCR y secuenciación mientras que para los estudios de tipificación molecular se emplea la técnica de MIRU y más recientemente la secuenciación del genoma completo (WGS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el periodo 2014-2020 se recibieron 4.541 aislados. En aquellos casos en el que un mismo paciente tuviera más de un aislamiento positivo, únicamente se ha considerado aquel con fecha de toma más temprana por lo que el análisis descriptivo incluye 4.241 aislados. Debido a un cambio en el sistema informático, sólo se recogen los aislados recibidos en el Laboratorio de Micobacterias a partir de julio de 2014.

Se han recibido aislados de 16 Comunidades Autónomas y Ceuta. El 47,49% proceden de la Comunidad de Madrid, seguido por Castilla y León (14,85%), Comunidad Valenciana (7,10%), Cantabria (6,25%), Navarra (4,98%), País Vasco (3,77%), Andalucía (2,33%) y Canarias (1,20%). El resto de CCAA tiene una representación menor al 1% siendo Asturias la única Comunidad que no ha enviado ningún aislado. Los datos del 2020 deben tomarse con cautela debido a la situación sanitaria provocada por el virus SARS-Cov2. En la siguiente tabla se muestran los aislados enviados al CNM en relación a los casos notificados a la RENAVE (Tabla 1).

Tabla 1. Aislados enviados al CNM en relación al número de casos notificados por cada Comunidad Autónoma a la RENAVE (datos cedidos por Rosa Cano del Centro Nacional de Epidemiología)

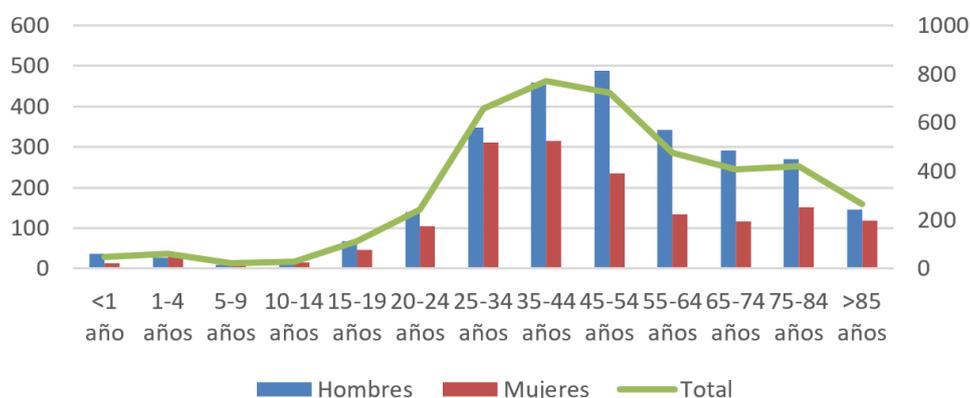
RENAVE/CNM	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
ANDALUCIA	723/5	679/17	711/17	669/16	718/24	682/15	552/5	4.734/99
ARAGON	171/0	145/0	171/9	136/5	113/6	134/8	-/8	870*/36
ASTURIAS	169	127	135	113	107	113	123	887
ISLAS BALEARES	133/9	105/1	110/2	133/4	119/6	76/3	-/7	676*/32
CANARIAS	130/3	161/13	127/5	129/10	164/9	136/6	108/5	955/51
CANTABRIA	66/26	59/40	67/42	60/42	79/48	49/29	-/38	380/265
CASTILLA LA MANCHA	168/33	134/58	168/81	139/56	149/56	124/47	-/29	882*/360
CASTILLA Y LEON	280/46	244/81	252/92	217/93	213/104	203/126	-/88	1.409*/630
CATALUÑA	1133/0	1082/1	1002/0	996/1	996/0	1080/0	-/0	6.289*/2
VALENCIA	456/25	435/55	484/62	454/61	374/34	467/30	337/34	3.007/301
EXTREMADURA	65/0	66/4	71/7	58/11	73/4	56/9	20/5	409/40
GALICIA	558/3	589/2	565/0	525/0	528/2	518/0	392/0	3.675/7
MADRID	641/150	668/328	693/354	605/328	581/309	584/342	277/203	4.049/2.014
MURCIA	132/7	148/3	115/1	122/6	133/3	138/0	125/0	913/20
NAVARRA	67/23	50/38	42/33	42/35	54/40	32/24	32/18	319/211
PAIS VASCO	322/21	256/24	275/38	227/19	217/22	198/20	15/16	1.510/160
LA RIOJA	32/0	27/1	34/3	30/3	28/0	29/0	22/0	202/7
CEUTA	32/1	19/1	33/2	11/0	13/0	18/2	1/0	127/6
MELILLA	38/0	26/0	19/0	18/0	12/0	13/0	9/0	135/0
Total	5.316/352	5.020/667	5.074/748	4.684/690	4.671/667	4.650/661	2.013/456	31.428/4.241
Total (%)	6,62	13,17	14,74	14,73	14,28	14,21	22,65*	13,49

*Datos provisionales a la espera de la notificación por parte de la Comunidad Autónoma.

Características de los casos

El mayor número de los casos se produjo en hombres (2.633 casos, 62,08% del total), con una razón hombre/mujer de 1,6. La mediana de edad fue de 49 años (RIC: 33-65) en hombres y 43 (RIC: 31-63) en mujeres. La distribución de casos por edad y sexo se muestra en la [Figura 1](#). Durante el periodo 2014-2020 se estudiaron 160 aislados de menores de 15 años.

Figura 1. Número de casos por grupo de edad y sexo.



De los 4.241 aislados recibidos, el 83,02% procedían de muestras respiratorias, el 5,61% de muestras ganglionares y el 0,75% de muestras meníngeas. El resto de los aislados (10,61%) procedían de diversas localizaciones. Los casos con localización meníngea se han mantenido estables en el periodo 2014-2020.

El 95,07% de los casos eran nuevos (sin tratamiento previo anti-TB). El 4,27% lo habían recibido anteriormente, y en el 0,66% de los casos no se disponía de esa información. De los 4.241 aislados estudiados se informó del país de origen en 2.902. El 19,36% (821) procedía de un país distinto de España. Las personas nacidas en Marruecos (179) y Rumania (177) representaron el grupo más numeroso. En este periodo de estudio no se ha observado un incremento en el número de casos importados. Como factores de riesgo en el 5,7% se indica inmunosupresión, en el 1,59% SIDA, en el 1,38% alcoholismo y en el 91,33% no se especifica ningún factor. Dada la tasa de co-infección VIH-TB recogida en los indicadores del Plan para la prevención y control de la TB, pensamos que esta variable no se estaría cumplimentando correctamente posiblemente por desconocimiento de la persona que solicita el estudio.

Características de los aislados

El 94,27% (3.999) fueron identificados como *M. tuberculosis*, el 2,95% (125) como *Mycobacterium bovis*, el 1,81% (82) como *M. bovis*-BCG, el 0,54% (23) como *Mycobacterium africanum* y el 0,42% (18) como *Mycobacterium caprae*. La instilación con BCG se utiliza para conseguir la estimulación de la inmunidad celular. El 72,73% (56) de los aislados identificados como *M. bovis*-BCG procedían de orina, el 13% (10) de localización pulmonar, el 9,09% (7) de abscesos y el resto procedían de diversas localizaciones (solo uno procedía de sangre completa). Tanto como *M. caprae* están consideradas como zoonosis. En España, los casos de TB debido a *M. bovis* o *M. caprae* representan una baja proporción y suelen asociarse a exposición ocupacional (ámbito veterinario y ganadero) o a casos procedentes de países endémicos para la TB bovina. *M. bovis* es resistente a PZ por lo que es importante la diferenciación de ambas especies. De los 143 casos identificados como *M. bovis*/*M. caprae*, se conocía el país de origen en 115. De los casos procedentes de otros países (36), la mayoría procedían de Marruecos (18,88%; 27). Los casos de TB humana producidos por *M. africanum* están principalmente localizados en África Occidental donde causan hasta la mitad de los casos de TB pulmonar. Únicamente se conoce el país de origen en 9 de los 23 casos identificados como *M. africanum*. De ellos seis eran de origen extranjero: dos procedían de Mali, dos de Guinea Ecuatorial, uno de Marruecos y uno de Portugal.

Estudio de susceptibilidad

Se realizó el estudio de susceptibilidad a 4.026 aislados (Tabla 2). El 80,38% fueron sensibles a los fármacos antituberculosos. Un total de 233 aislados presentaban monorresistencia a PZ. De estos 233, 122 fueron identificados como *M. bovis*, y 77 como *M. bovis*-BCG. El porcentaje de TB-MDR y pre-XDR³ global fue de un 3,55% y 0,72% respectivamente, aunque, tal y como era de esperar, se observa un mayor porcentaje en el grupo de tratados previamente.

Los casos importados presentaban mayor porcentaje de TB-MDR y TB-pre-XDR (7,51% y 2,44%) frente a los casos autóctonos (1,40% y 0,41%). Atendiendo a la nueva definición propuesta por la OMS, no se identificó ningún aislado XDR en el periodo de estudio (5).

Tabla 2. Resistencia a fármacos de primera y segunda línea. FQ: fluoroquinolonas; AMG: aminoglucosidos; Polirresistencia: cualquier combinación de más de una resistencia excluida MDR; pre-XDR: MDR más resistente a FQ.

	Nunca tratados		Previamente tratados		Desconocido		Total	
	Número	%	Número	%	Numero	%	Número	%
Total aislados recibidos	4.032		181		28		4.241	
Total antibiogramas realizados	3.833	95,06	170	93,92	23	82,14	4.026	94,93
Resistencia solo a isoniacida	114	2,97	5	2,94	0	0,00	119	2,96
Resistencia solo a rifampicina	11	0,29	0	0,00	0	0,00	11	0,27
Resistencia solo a etambutol	1	0,03	0	0,00	0	0,00	1	0,02
Resistencia solo a estreptomycin	71	1,85	2	1,18	0	0,00	73	1,81
Resistencia solo a pirazinamida	227	5,92	4	2,35	2	8,70	233	5,79
Total mono-resistencia	424	11,06	11	6,47	2	8,70	437	10,85
MDR	18	0,47	4	2,35	0	0,00	22	0,55
MDR + primera/segunda línea	80	2,09	13	7,65	1	0,00	94	2,33
MDR + primera/segunda línea + AMG	22	0,57	5	2,94	0	0,00	27	0,67
Total MDR	120	3,13	22	12,94	1	4,35	143	3,55
Pre-XDR	21	0,55	7	4,12	1	4,35	29	0,72
XDR	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Total polirresistencia	168	4,39	11	6,47	2	8,70	181	4,50
Sensibles	3.100	80,88	119	70,00	17	73,91	3.236	80,38

En el periodo de estudio se han notificado a la RENAVE 432 casos con TB resistente a INH, RIF o MDR. Esta cifra indica una infra-notificación de las resistencias a nivel nacional lo cual repercute en la calidad de los datos enviados a nivel europeo (ECDC) y a nivel mundial (OMS).

El 98,40% de los aislados presentaba alguna mutación en la región determinante de resistencia a **rifampicina** (gen *rpoB*), siendo las mayoritarias la mutación Ser450Leu (67,38%), Asp435Val (13,37%) e His445Tyr (6,42%). Entre los aislados resistentes a **isoniacida**, en el 63,35% se detectó la substitución Ser315Thr en el gen *katG* asociada a un alto nivel de resistencia, mientras que, el 34,21% tenía alguna mutación en la zona promotora del operon *ma-bA-inhA* asociada a bajo nivel de resistencia. El 84,86% de los aislados resistentes a **pirazinamida** presentaba alguna mutación en el gen *pncA* o en su promotor sin que se observe una mutación predominante a excepción de la mutación His57Asp encontrada en 199 de los 350 aislados (mutación característica en *M. bovis* y *M. bovis*-BCG). Se han identificado 64 mutaciones diferentes a lo largo de todo el gen. Si dos aislados presentan la misma mutación se realiza el estudio de tipificación para descartar que puedan estar relacionados.

³ Pre-XDR:TB pre-extremadamente resistente: MDR más resistencia a cualquier fluoroquinolona (levofloxacin/moxifloxacin)

El 56,70% de los aislados resistentes a **etambutol** presentaban alguna sustitución del codón 306 en el gen *embB* siendo la más frecuente Met306Val (30,93%). Entre los aislados resistentes a **estreptomicina**, el 34,32% presentaban alguna mutación el gen *rpsL* en las posiciones asociadas a resistencia: Lys43 (26,40%) y Lys88 (7,92%). Sólo el 22,52% presentaba alguna mutación asociada a resistencia a estreptomicina en el gen *rrs*. En 8 de estos aislados se identificó la mutación a1401G responsable también de resistencia a amikacina, capreomicina y kanamicina.

CONCLUSIONES

- Aunque es difícil realizar una estimación precisa debido al carácter voluntario del envío de los aislados resistentes, parece que el porcentaje de TB-Resistente se mantiene estable para el periodo estudiando. La resistencia adquirida es mayor a la resistencia primaria y los casos importados presentan mayor porcentaje de TB-MDR y preXDR.
- La vigilancia de la resistencia no debe basarse exclusivamente en métodos moleculares dado el porcentaje de aislados para los que no se detectan mutaciones asociadas a resistencia por lo que deben mantenerse los métodos fenotípicos de estudio de susceptibilidad.
- Es necesario promover una mayor participación de las CCAA que mejorara la representación geográfica y una mejora de la notificación de las resistencias a la RENAVE.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. 44a Asamblea Mundial de la Salud, Ginebra, 6-16 de mayo de 1991: resoluciones y decisiones anexos. Organización Mundial de la Salud. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/202551>
2. Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, 2013. Disponible en: <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Paginas/ProtocolosRENAVE.aspx>
3. Directrices para la vigilancia de la farmacorresistencia en la tuberculosis. Organización Mundial de la Salud. 5ª Ed. 2015. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204279>
4. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/275469>.
5. Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis. 27-29 October 2020. Geneva: World Health Organization; 2021. CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/338776>

Programa de micobacterias no tuberculosas

Informe elaborado por M. S. Jiménez, L. Herrera-León*.

Laboratorio de Referencia e Investigación en Micobacterias. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

*Red Europea de Laboratorios de Referencia de Tuberculosis (ERLN-TB). Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis. CIBER de Epidemiología y Salud Pública.

INTRODUCCIÓN

Las micobacterias no tuberculosas (MNT), antes llamadas micobacterias atípicas, comprenden un amplio grupo de especies que cada vez van adquiriendo más importancia clínica. Este grupo incluye todas las especies del género *Mycobacterium* excepto aquellas pertenecientes al complejo tuberculoso y las especies productoras de lepra. Las enfermedades que causan son muy diversas y pueden afectar a diferentes localizaciones, pero todas ellas se engloban en el término micobacteriosis.

Las MNT son bacterias ubicuas que se encuentran en el medio ambiente siendo éste su reservorio y la fuente de infección.

El número de casos causado por estas micobacterias, mostró un aumento muy importante con la aparición del VIH. En la última década el aumento se debe principalmente al uso de técnicas quirúrgicas más agresivas que favorecen la infección por bacterias oportunistas, la utilización de fármacos inmunosupresores, y a la mayor supervivencia de los pacientes con inmunodeficiencias. El desarrollo de nuevos medios de cultivo ha mejorado la capacidad de aislamiento de este grupo bacteriano siendo otro de los factores que ha influido en el incremento en el número de casos detectados. Este incremento ha supuesto que en algunos laboratorios de microbiología el número de aislamiento de cepas de MNT haya superado al de *M. tuberculosis* complex. El impacto de las infecciones por MNT se agudiza por tratarse de bacterias altamente resistentes a los antibióticos, para cuyo tratamiento específico personalizado se requiere la identificación de la especie y un estudio de sensibilidad [1,2].

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

Taxonómicamente, las MNT forman un grupo de especial complejidad por el gran número de especies y por la diversidad biológica entre ellas, que se traduce en una elevada heterogeneidad intraespecífica tanto fenotípica como genotípica. Este hecho hace que por economía, rentabilidad y organización el Centro Europeo de Control de Enfermedades (ECDC) recomiende la centralización de las labores de identificación y estudios de sensibilidad en laboratorios con un alto grado de especialización y que dispongan de las medidas de bioseguridad adecuadas para el manejo de estas cepas.

Las micobacteriosis no son una enfermedad de declaración obligatoria a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), por lo que se desconoce el número de aislamientos y qué especies son las mayoritariamente implicadas en los casos de enfermedad. Los datos obtenidos por el Programa de Vigilancia del CNM, llevado a cabo en el Laboratorio de Micobacterias, que recibe cepas de la mayoría de las Comunidades Autónomas (CCAA) son de utilidad para conocer el impacto que estas cepas tienen en Salud Pública, la prevalencia de las diferentes especies, las tendencias evolutivas temporales y geográficas, y por último detectar posibles especies emergentes; siempre teniendo en cuenta el carácter voluntario del envío de muestras al CNM.

El objetivo principal es la caracterización microbiológica de este grupo de micobacterias, mediante la identificación de la especie, el estudio de sensibilidad frente a los fármacos adecuados al tratamiento según la especie aislada y la confirmación de brotes epidemiológicos, incluyendo, siempre que es posible la fuente ambiental de la infección.

Objetivos adicionales serían proporcionar al Sistema de Vigilancia datos de laboratorio para poder elaborar indicadores epidemiológicos, conocimiento de la dispersión de especies ya descritas, seguimiento continuo de la evolución del patrón de las especies identificadas como indicador de especies emergentes, y la descripción de nuevas especies.

DISEÑO DEL PROGRAMA

Sujetos de estudio: casos humanos de infección producida por MNT, y las cepas aisladas de fuentes ambientales con sospecha de ser el origen de la infección.

Participantes: todos los laboratorios de microbiología que realicen aislamientos de MNT de la red de pública de todas las CCAA. Los laboratorios de carácter privado participarán en el envío de cepas a través de la cartera de servicios.

Tipo de muestra y condiciones de envío: se deberá cumplimentar en su totalidad el formulario específico que se encuentra en GIPI para el envío de cepas no tuberculosas.

Las muestras que se procesarán son cepas humanas y las cepas ambientales siempre que éstas pudieran estar asociadas a un brote, identificadas previamente como no tuberculosas, teniendo en cuenta que las condiciones del envío cumplan las normas de bioseguridad. No es necesario el envío refrigerado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La descripción de nuevas especies pertenecientes al grupo de las MNT se ha incrementado por las mejoras en las técnicas de identificación y cultivo. Actualmente existen 248 especies de MNT reconocidas y 24 subespecies [3]. En los últimos años se ha observado un incremento tanto en el número de cepas identificadas como MNT frente al complejo tuberculoso, como en el número de especies y subespecies diferentes identificadas en el Laboratorio (Tabla 1).

Tabla 1. Evolución del número de hospitales, número de cepas y número de especies, subespecies y tipos en el periodo de tiempo de vigencia del Programa de Vigilancia de cepas MNT.

	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Nº de hospitales	93	93	87	88	76	77	76	78	81	79	83	81	76
% de cepas MNT	37,1	41,3	45,0	46,8	56,1	58,9	74,1	60,8	60,2	65,3	65,5	77,2	69,8
Nº de especies, subespecies y tipos	52	44	43	43	70	61	61	63	69	73	80	85	68

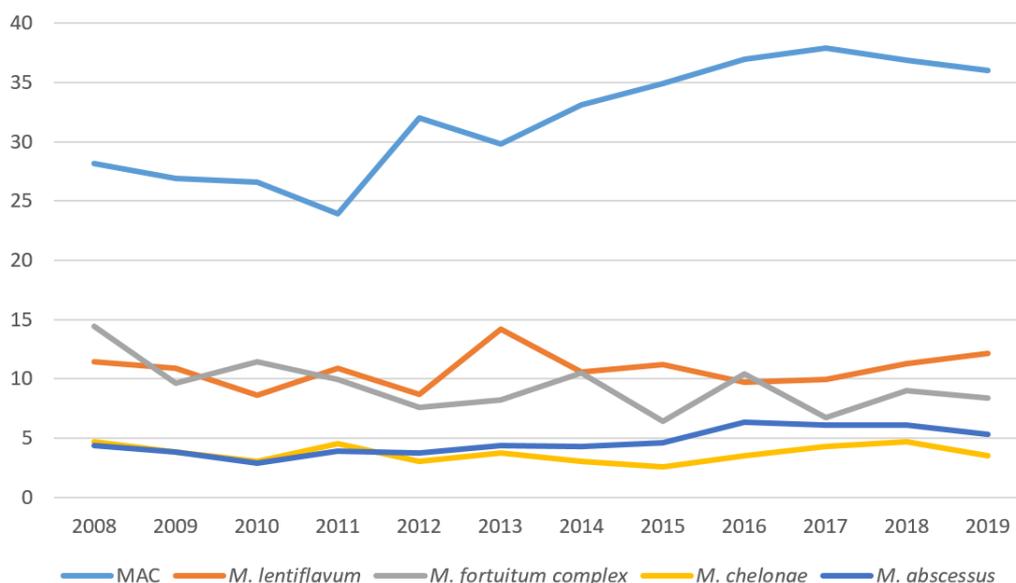
Los datos del 2014 y 2020 deben tomarse con precaución debido a un cambio en el sistema informático en el laboratorio que impidió la correcta extracción de los datos y debido a la situación sanitaria que se produjo como consecuencia de la pandemia por el virus SARS-Cov2 respectivamente.

Se recibieron cepas de diferentes hospitales de Ceuta y Melilla y de todas las Comunidades Autónomas (CCAA) excepto de Asturias, aunque la representación no es homogénea (Tabla 2).

Tabla 2. Número de hospitales de las diferentes CCAA que han enviado cepas de MNT al laboratorio de Micobacterias.

CCAA	Nº de hospitales	CCAA	Nº de hospitales
Andalucía	12	Galicia	7
Aragón	3	Madrid	21
Baleares	2	Murcia	4
Canarias	4	Navarra	2
Cantabria	1	País Vasco	6
Cataluña	2	Rioja	2
Castilla Leon	13	C. Valenciana	7
Castilla la Mancha	11	Ceuta	1
Extremadura	5	Melilla	1

Figura 1. Evolución a lo largo de los años de los complejos y de las especies con mayor número de aislamientos expresado en tanto por ciento.



Se observa que el número de cepas del complejo *Mycobacterium avium* (MAC) ha aumentado a lo largo de los últimos años (Figura 1), al igual que ocurre con *Mycobacterium abscessus*. Por el contrario, se observa una disminución de aislamientos de *Mycobacterium fortuitum complex*, y los casos causados por *Mycobacterium lentiflavum* se han mantenido estables con pequeñas oscilaciones (Figura 1).

Se identificaron 153 cepas como *Mycobacterium simiae*, de las que 64 (41,8%) se aislaron en Canarias y 29 (19%) en un hospital de una única provincia de Castilla la Mancha. Es muy probable que sean las variaciones regionales de las condiciones ambientales las que favorezcan diferencias en las poblaciones de MNT predominantes en los reservorios a los que los pacientes susceptibles están expuestos, explicando así la gran incidencia de esta especie en la Comunidad Autónoma de Canarias. La alta incidencia de cepas de esta especie en un hospital en concreto que se mantiene durante todo el periodo de estudio, puede estar más relacionado con un reservorio ambiental en el propio hospital, o en la localidad donde se ubica.

De las 106 cepas identificadas como *Mycobacterium marinum*, el 89% de las cepas se aislaron de lesiones cutáneas, el 5% de lesiones óseas, el 4% de muestras ganglionares y solo el 1% de muestras de origen respiratorio, siempre en pacientes que tenían acuarios en su domicilio o profesiones relacionadas con el medio acuático, personal de piscinas, pescaderos, etc. Dato que confirma lo que ocurre en otros lugares del mundo.

Las 68 cepas aisladas de ambiente hospitalario (agua de grifos, tanto de los laboratorios como de otras dependencias, agua de duchas, instrumental quirúrgico, broncofibroscopios, etc.) pertenecieron a 18 especies diferentes, no se detectaron diferencias significativas a lo largo del periodo de estudio. Se identificaron 8 casos de infección por *Mycobacterium chimaera* aislado de válvulas cardíacas tras su implantación (3).

Se han confirmado y caracterizado 35 brotes epidémicos mediante la aplicación de marcadores epidemiológicos moleculares. Diecinueve fueron ocasionados por cepas identificadas como MAC, afectando a varios pacientes (rango: 3-6), no pudiéndose determinar la fuente ambiental en ninguno de los casos. La especie que originó el segundo mayor número de brotes fue *M. fortuitum*, estando implicada en 8 brotes, todos ellos de ámbito hospitalario (4), y mayoritariamente relacionados con clínicas de cirugía estética; en uno de ellos la fuente de infección era el líquido que se inyectaba a los pacientes para realizar la liposucción. *M. simiae* estuvo implicado en un brote afectando a 7 pacientes de un mismo hospital de Canarias, donde no se pudo determinar el origen del mismo. Se caracterizó un brote, de gran importancia clínica, causado por *M. chelonae* que afectó a 4 pacientes que habían sido sometidos a cirugía ocular para la implantación de una lente, aislándose la misma cepa de un instrumento utilizado en la cirugía. Por último, cabe destacar otro brote causado por *M. xenopi* en pacientes con intervenciones quirúrgicas de muy diverso tipo, la fuente de la infección en este caso fue el líquido desinfectante que se utilizaba para la limpieza de las heridas quirúrgicas. Cabe destacar un brote por *M. chimaera* que afectó a 4 pacientes produciendo una infección diseminada tras cirugía cardíaca, la misma cepa fue también aislada de las válvulas cardíacas que se les habían implantado recientemente y, en uno de estos casos, del agua del circuito del equipo de normo-hipotermia utilizado en la cirugía.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta que el objetivo principal de la vigilancia y en concreto para este programa de MNT, es la monitorización de tendencias a lo largo del tiempo podemos concluir:

1. No se encuentran diferencias importantes en el número de cepas recibidas, ni en el número de hospitales que enviaron cepas para su caracterización al Laboratorio de Referencia de Micobacterias. Sí que se observa una tendencia ascendente en el número de especies distintas identificadas, debido a la importancia que estas bacterias están adquiriendo en patología humana y a la utilización en los laboratorios hospitalarios de métodos comerciales que identifican las especies más frecuentes, enviando al laboratorio de Referencia solo aquellas cepas que no consiguen identificar.
2. Las especies más frecuentemente aisladas fueron las del complejo *M. avium*, y *M. lentiflavum* entre las de crecimiento lento. Entre las especies de crecimiento rápido las más frecuentes han sido *M. chelonae*, *M. abscessus* y las del grupo *M. fortuitum*, manteniéndose las mismas a lo largo de los 13 años recogidos en este resumen.

3. Las especies del complejo MAC se convierten en las MNT más frecuentemente asociada a infección y/o afectación pulmonar. *M. lentiflavum* además de infecciones pulmonares, provoca afectación linfática en niños de corta edad. Las micobacteriosis que producen *M. marinum* son mayoritariamente lesiones cutáneas relacionadas con el medio acuático. Entre las cepas de crecimiento rápido destaca *M. fortuitum*, que se ha asociado a brotes de infección nosocomial por contaminación de material hospitalario y que puede causar afectación pulmonar con diferencias patogénicas entre ellas. *M. abscessus* es una micobacteria emergente en los casos de afectación pulmonar, siendo la especie más frecuentemente aislada de muestras respiratorias en pacientes con fibrosis quística, en cuyo caso el tratamiento se complica enormemente por sus elevadas tasas de resistencia.
4. Se observa un incremento en los casos producidos por MAC y por *M. abscessus*
5. No se observan diferencias en la distribución geográfica de las especies excepto para *M. simiae*.
6. Las cepas aisladas de muestras ambientales, siempre del ámbito hospitalario, no se agruparon en especies concretas, la identificación dio como resultado una gran variedad de especies, a excepción de *M. chimaera* siempre relacionada con instrumental utilizado en cardiología.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. McGrath EE, Anderson PB. Increased prevalence of nontuberculous mycobacteria infection. Lancet. 2007; 370:28.
2. Lee YM, Kim MJ, Kim YJ. Increasing Trend of Nontuberculous Mycobacteria Isolation in a Referral Clinical Laboratory in South Korea. Medicina 2021, 57, 720. <https://doi.org/10.3390/medicina57070720>.
3. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature-Genus Mycobacterium. 2021. Disponible online: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=mycobacterium> (accessed on 11 Agosto 2021).
4. Gasch O, Meije Y, Espasa M, Font B, Jiménez S, FernándezHidalgo N. Disseminated Infection Due to *Mycobacterium chimaera* After Aortic Valve Replacement. Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2019;72(6):502-503. doi: 10.1016/j.rec.2018.06.026.
5. Campos-Gutiérrez S, Ramos-Real MJ, Abreu R, Jiménez MS, Lecuona M. Pseudo-outbreak of *Mycobacterium fortuitum* in a hospital bronchoscopy unit. Am J Infect Control. 2020;48(7):765-769. doi: 10.1016/j.ajic.2019.11.019.

Programa de GRIPE

Informe elaborado por I. Casas*, F. Pozo*, S. Vázquez-Morón, M.M. Iglesias-Caballero, V. Sandoís.

Personal Técnico: M. Gonzalez-Esguevillas, M. Molinero, N. Reyes, V. Montero, D. K. Santos, S. Camarero.

Laboratorio de Referencia e Investigación en Virus Respiratorios. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

*CIBER de Epidemiología y Salud Pública. CIBERESP.

INTRODUCCIÓN

Desde el siglo XVI, se conoce que se han producido pandemias de gripe a intervalos entre 10 y 50 años con variable gravedad e impacto. La pandemia más reciente en 2009 se caracterizó con una alta transmisibilidad y rápida difusión, con una transmisión sostenida inter-humana en el mundo. Sin embargo el impacto sobre la mortalidad de la población, produciendo entre 200.000 y 600.000 muertes atribuibles al virus A(H1N1)pdm09 fue menor que la descrita en pandemias anteriores¹.

La gripe estacional o las epidemias anuales de gripe constituyen un importante problema de salud pública a nivel mundial y están asociadas a una alta tasa de hospitalizaciones y mortalidad. El periodo de incubación oscila entre 1 y 4 días. Se caracteriza por un inicio súbito de fiebre, tos, dolores musculares, articulares, de cabeza y garganta, malestar y secreción nasal. Estos síntomas suelen desaparecer en el plazo de una semana. En personas de alto riesgo, la gripe puede ser una enfermedad grave e incluso mortal. Según la OMS, las epidemias anuales de gripe pueden afectar hasta el 15% de la población y causan entre 3 a 5 millones de casos graves con una mortalidad entre 290.000-650.000 muertes al año².

En los países industrializados la mayoría de las muertes relacionadas con la gripe se producen en mayores de 65 años. También presentan un mayor riesgo de enfermedad grave mujeres embarazadas, menores de 5 años, y pacientes con enfermedades crónicas o inmunodepresión. Los profesionales sanitarios corren gran riesgo de infectarse y a su vez de transmitirlos, sobre todo a personas vulnerables. Las epidemias pueden causar gran absentismo laboral y escolar con pérdidas de productividad. La medida de control más eficaz frente a la gripe es la inmunización anual de ciertos grupos de población de alto riesgo de padecer complicaciones asociadas a gripe. Las vacunas trivalentes y tetravalentes, contienen subunidades de los dos subtipos de gripe A y desde la temporada 2013-14 los dos virus gripales tipo B. En los adultos sanos, la vacunación antigripal es protectora, incluso cuando los virus circulantes no coinciden exactamente con los virus vacunales. En los ancianos la vacunación puede ser menos eficaz para prevenir la enfermedad, aunque reduce la gravedad y las complicaciones/mortalidad asociada.

LOS VIRUS DE LA GRIPE

Se clasifican en cuatro tipos diferentes, A, B, C y D. Los causantes de las epidemias estacionales son los virus gripales de tipo A y B. Su genoma está formado por 8 segmentos en el caso de la gripe A y B. Estos segmentos son moléculas de ARN de cadena sencilla y polaridad negativa y cada uno de ellos codifica una de las diferentes proteínas virales.

En los virus de la gripe se identifican dos de los tres mecanismos de variabilidad genética descritos en los virus ARN. Por una parte, la capacidad de introducir mutaciones (delecciones, inserciones y cambios nucleotídicos) y por otra, la reorganización o intercambio de genes dado que su genoma es segmentado. La variabilidad genética y antigénica configura partículas virales con mayor eficiencia biológica. Estos virus circulan en una población susceptible y su estudio se basa en la comparación de sus características genéticas y antigénicas con aquellas de los virus de referencia. Estos virus están en constante evolución, y para ello utilizan diferentes mecanismos, por un lado, la falta de capacidad de corrección de errores de la polimerasa viral, que ocasiona un gran número de mutaciones puntuales (deriva antigénica), y un segundo mecanismo de intercambio genético o recombinación genética, (salto antigénico). Estos dos mecanismos son la base de la evolución genética que les confiere una gran capacidad para adaptarse a nuevos hospedadores y llegar a adquirir capacidades pandémicas.

Los virus de la gripe A se dividen en subtipos en función de las combinaciones de dos proteínas de su superficie: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Los subtipos actualmente circulantes en el ser humano son el A(H1N1) y el A(H3N2). El A(H1N1) también se conoce como A(H1N1)pdm09, pues fue el causante de la pandemia de 2009. Todas las pandemias conocidas han sido causadas por virus gripales de tipo A. Los virus de tipo B se diversifican en dos linajes diferentes B/Yamagata y B/Victoria.

VIGILANCIA MICROBIOLÓGICA DE LA INFECCIÓN PRODUCIDA POR EL VIRUS DE LA GRIPE

El sistema mundial de Vigilancia y Respuesta de Gripe (GISRS) se fundó en 1952 por la OMS y está coordinado por el Programa Global de Influenza de la OMS (GIP). Se basa en la colaboración efectiva entre los Centros Nacionales de Gripe (NICs), designados por los Ministerios de Sanidad de los países miembros, y los Centros Colaboradores de la OMS (WHO-CC) que reciben virus desde los NICs para un seguimiento continuo y global de los virus gripales circulantes y actualizar la composición de las vacunas dos veces al año. El GISRS incluye a 144 NICs ubicados en 123 países que tienen como misión aislar y caracterizar los virus gripales en su área geográfica. Los NICs son instituciones nacionales autorizadas y designadas por los correspondientes Ministerios de Sanidad, y reconocidas por la OMS para participar bajo los términos de referencia definidos por la OMS. Los NICs tienen otras obligaciones ante las autoridades nacionales de sus países.

En España, la vigilancia de gripe se recoge en la *Guía de Procedimientos para la vigilancia de la gripe en España* que es un desarrollo del Protocolo de vigilancia de gripe consensuado por la Ponencia de Vigilancia Epidemiológica (9 de abril de 2013) y aprobado por la Comisión de Salud Pública y el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud, 19 junio y 23 julio de 2013³. La Unidad de Gripe y Virus Respiratorios del CNM es uno de los NICs de la OMS en España desde mayo de 1968 y coordina la Red de Laboratorios Regionales especializados en Gripe (ReLEG) como parte del Sistema de Vigilancia de Gripe en España (SVGE) que toma los datos de los Sistemas centinela de vigilancia de gripe (ScVGE), el Sistema de Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDOs), Vigilancia de casos graves hospitalizados confirmados de gripe (CGHCG), Notificación de brotes de gripe y Mortalidad relacionada con gripe.

Sistemas centinela de vigilancia de gripe (ScVGE): La temporada de vigilancia de gripe se inicia en la semana 40 coincidiendo con el otoño y en este periodo se restablece la vigilancia integral de la enfermedad, epidemiológica y virológica, a través del SVGE. La información de vigilancia se recoge semanalmente hasta la semana 20 del año siguiente. En los periodos estivales se mantiene una vigilancia virológica, vigilancia inter-temporada, semana 21 a 39. La población vigilada es la suma de las poblaciones cubiertas por los médicos centinela y es el denominador para el cálculo de la incidencia semanal⁴. Para la vigilancia virológica de la gripe, los médicos centinela recogen muestras de los pacientes que respondan a la definición de caso de gripe y las envían al laboratorio que haya sido designado en cada CCAA. Los laboratorios ReLEG deberán tener capacidad de una buena eficacia diagnóstica de virus de la gripe A y B, capacidad para subtipar los virus de la gripe A (H1/H3/H5), enviar a la unidad de Gripe y Virus Respiratorios del CNM virus aislados, muestras respiratorias y/o extractos de ácidos nucleicos representativos de los virus circulantes, con el fin de que puedan ser caracterizados antigénica y genéticamente, y que posteriormente puedan ser enviados al WHO-CC europeo (Londres, en nuestro caso).

Redes Intenacionales:

1. Red “European Influenza Surveillance Network (EISN)” coordinada por el ECDC⁵.

Países de la Unión Europea y Estados asociados EU/EEA. Objetivo: proporcionar información epidemiológica y virológica útil para la vigilancia de gripe estacional o pandémica en Europa.

2. Red “Global Influenza Surveillance Network (GISN)”, de la OMS

Redes Nacionales:

SVGE y coordinador de la Red de Laboratorios Españoles de Gripe (ReLEG).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

La Unidad de Gripe y Virus Respiratorios del CNM realiza la caracterización genética y antigénica de las cepas de virus gripales o directamente desde las muestras clínicas, enviadas por los laboratorios del SVGE con objeto de identificar la concordancia entre los virus de la gripe circulantes y los incluidos en la vacuna antigripal de la temporada. El CNM realiza también estudios de susceptibilidad a antivirales en un número representativo de virus circulantes.

Los objetivos concretos del programa son:

1. Describir la actividad gripal estacional o pandémica por tipos/subtipos/linajes de virus.
2. Detectar el comienzo de la epidemia gripal.
3. Caracterizar virus gripales de cada temporada y la aparición de nuevos subtipos de gripe A.
4. Determinar la susceptibilidad de las cepas circulantes a los antivirales.
5. Aislar virus para la composición de la vacuna antigripal de la siguiente temporada.
6. Determinar el grado de semejanza entre las cepas de gripe con las cepas vacunales.
7. Contribuir al conocimiento de los factores relacionados con las epidemias de gripe.
8. Participar en el intercambio de información de vigilancia de gripe a nivel nacional y europeo.
9. Guiar a las autoridades locales y nacionales en la formulación de las medidas de prevención y de control de la gripe, incluidas las recomendaciones de vacunación antigripal.
10. Proporcionar datos de la efectividad vacunal en las epidemias estacionales o pandémicas.
11. Contribuir a los planes nacionales de preparación y respuesta frente a una pandemia.
12. Cumplimiento de las funciones como Centro Nacional de Gripe de la OMS y Laboratorio Nacional de Referencia de Gripe del Sistema de Vigilancia de la Gripe en España (SVGE).

DISEÑO DEL PROGRAMA

Sujetos de estudio: Caso con cuadro gripal clínico que acuda a la Red de Médicos Centinela y se haya declarado como caso de gripe por el SVGE.

Participantes: programa cerrado a los laboratorios participantes de la ReLEG.

Tipo de muestra y condiciones de envío:

- Aislado viral en células MDCK/MDCK-siat 1 (exudado nasofaríngeo y lavado nasofaríngeo).
- exudado nasal, exudado faríngeo y nasofaríngeo, aspirado o lavado nasofaríngeo.

Las muestras respiratorias se recogen en medio de transporte de virus y se envían refrigeradas (4°C) de manera inmediata al laboratorio. Las muestras deben de ser transportadas en envases con tres niveles de contención recomendados por la OMS y adecuadamente rotuladas. Las muestras clínicas y los cultivos de virus gripales son categoría B (UN3373).

Técnicas a aplicar para el estudio en la unidad de Gripe y Virus Respiratorios del Centro Nacional de Microbiología (CNM), Centro Nacional de Gripe de OMS:

- Detección múltiple de gripe A, B y C por amplificación en tiempo real (ENAC-ISO 15189).
- Detección múltiple de subtipos H1, H3, H5, H7 y H9 por amplificación en tiempo real (ENAC-ISO 15189).
- Secuenciación masiva de genomas completos de Gripe A, B y C.
- Amplificación y secuenciación de los segmentos que codifica la HA y la NA viral.
- Aislamiento viral en cultivo celular en células MDCK-siat1 y MDCK.
- Inhibición de la Hemaglutinación en aislamientos virales y en muestras de suero.
- Neutralización de virus gripales.
- Caracterización fenotípica de los virus resistentes mediante MUNANA

Actividades a realizar en la Unidad de Gripe y Virus Respiratorios del Centro Nacional de Microbiología (CNM), Centro Nacional de Gripe de OMS:

1. Ofrecer un catálogo actualizado de métodos validados para la detección y la caracterización genómica y fenotípica de los virus gripales.
2. Caracterizar genéticamente los virus circulantes de cada temporada mediante el análisis de secuencias de nucleótidos de los segmentos genómicos virales y la posterior comparación con las secuencias obtenidas de virus prototipo sean vacunales o no.
3. Analizar antigénicamente los virus circulantes de cada temporada para comparar su similitud antigénica con las cepas vacunales correspondientes a esa temporada epidémica

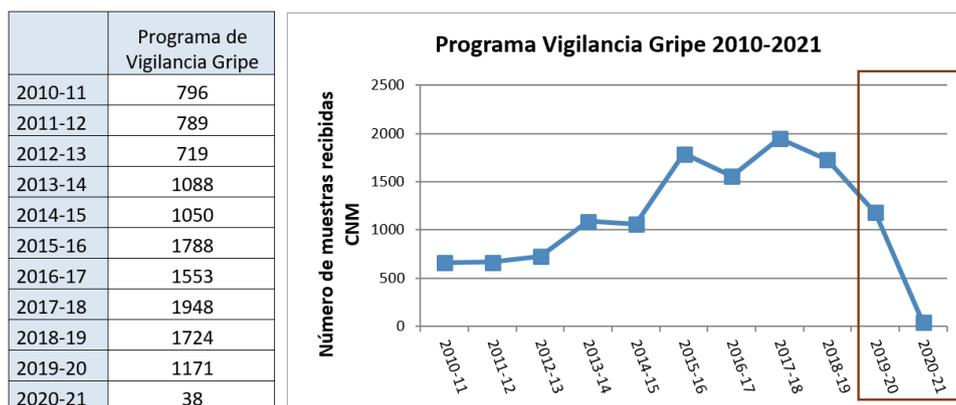
4. Determinar la susceptibilidad de los virus circulantes a diferentes fármacos antivirales, especialmente en virus procedentes de pacientes en tratamiento con dichos fármacos.
5. Ofrecer un servicio de investigación de los virus gripales considerados no circulantes, particularmente gripe A que no puedan ser subtipados, con el objeto de conocer la posible infección de un subtipo procedente de hospedadores diferentes al ser humano.
6. Seleccionar los virus gripales representativos de cada temporada a nivel nacional o virus que posean alguna característica de especial interés, para su envío al WHO-CC en Londres.
7. Desarrollar y mantener una colección de materiales de referencia y establecer los contactos necesarios para poder tener acceso a dichos materiales.
8. Ofrecer y facilitar el acceso de los materiales de referencia a laboratorios y organizaciones relevantes que los requieran para alcanzar sus objetivos de diagnóstico y vigilancia.
9. Proporcionar información virológica a las autoridades sanitarias regionales, nacionales y supranacionales responsables de la vigilancia de gripe. El CNM con el CNE elabora los informes semanales de la circulación de los virus gripales en España.
10. Proporcionar apoyo técnico al desarrollo de las políticas sanitarias
11. Proporcionar asesoría científica, formación y apoyo técnico a los laboratorios ReLEG.
12. Participar en redes nacionales e internacionales de laboratorios para la vigilancia de gripe.
13. Ofrecer las capacidades de laboratorio a las iniciativas nacionales e internacionales de vigilancia, control, preparación y respuesta de gripe. El CNM dispone de instalaciones de riesgo biológico de nivel 3 en caso de ser necesario.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde 1972, se han ido creando las diferentes fuentes de datos utilizadas en la vigilancia de la enfermedad que son esenciales en el Programa de Vigilancia. El ScVGE ofrece información sobre los casos leves de gripe en la comunidad, que acuden a las consultas de atención primaria. La información no centinela procede de otras fuentes como son los hospitales, laboratorios, centros institucionales, y ayuda a la caracterización de forma más completa de la circulación en el territorio sujeto a vigilancia. La coordinación del ScVGE se lleva a cabo de manera coordinada entre CNE y el CNM. Está integrado en la Red EISN, coordinada por ECDC. La información se almacena en la página web del ISCIII⁶ y se recoge los informes semanales y los documentos de inicio y cierre de temporada desde 2003-04⁷.

En la Unidad de Gripe y Virus Respiratorios del CNM, se han recibido virus gripales y muestras clínicas positivas, tal y como se muestra en la [Tabla 1/Figura 1](#), incluyendo las 10 últimas temporadas gripales indicadas. Ha existido un aumento del número de virus y muestras clínicas recibidas y analizadas desde la siguiente temporada a la pandemia de gripe A hasta la última temporada en la que se ha mantenido el sistema especificado en este capítulo, 2019-20. La temporada 2020-21 no puede ser contabilizada por el escaso número de muestras estudiadas.

Tabla 1 y Figura 1. Muestras recibidas en el Programa de Vigilancia de la gripe desde el 1 de septiembre de 2010 hasta 31 de agosto de 2021. Se destaca la distorsión asociada a la pandemia por SARS-CoV-2



La disminución del número de virus y muestras respiratorias estudiadas en la temporada 2019-20 se debió a la instauración de la pandemia de SARS-CoV-2 en España. Durante la temporada 2020-21 se recibieron solamente 38 muestras ya que no circuló gripe. Los sistemas para la detección y vigilancia de la gripe fueron desmantelados y, a día de hoy diciembre de 2021, no se han recuperado. En la [Tabla 2](#) se muestran los datos por CCAA en las 10 últimas temporadas de gripe incluidas en este capítulo. Navarra, Castilla La Mancha y País Vasco han enviado el mayor número de muestras. Cataluña no ha mandado ningún virus ni muestra clínica ya que el trabajo se realiza en el NIC-Barcelona al igual que en Castilla y León, NIC-Valladolid. Estos dos NICs están coordinados por el NIC-Madrid en el CNM.

Tabla 2. Número de muestras estudiadas por CCAA recibidas en el Programa de vigilancia de Gripe

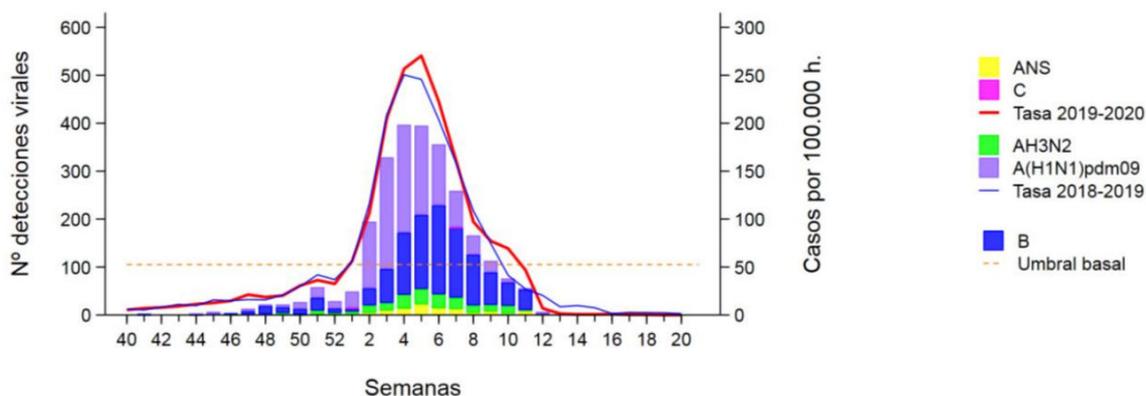
	2010-11	2011-12	2012-13	2013-14	2014-15	2015-16	2016-17	2017-18	2018-19	2019-20	Total
ANDALUCIA	2	21	20	19	21	11	7	21	15	42	179
ARAGON	16	36	41	32	21	38	145	222	135	129	815
ASTURIAS	8	21	0	3	11	10	19	7	26	14	119
CANTABRIA	0	0	0	0	0	2	57	71	42	49	221
CASTILLA LA MANCHA	119	133	125	320	245	359	229	259	312	258	2359
CASTILLA Y LEON	18	0	0	0	0	0	0	0	0	1	19
CEUTA	106	11	15	37	17	60	41	64	50	95	496
COMUNIDAD VALENCIANA	0	0	0	0	8	1	0	0	0	0	9
EXTREMADURA	53	54	51	170	124	123	96	123	102	55	951
GALICIA	33	130	38	44	25	48	52	20	103	45	538
ISLAS BALEARES	25	55	65	69	58	69	53	60	51	40	545
ISLAS CANARIAS	82	33	27	24	20	44	21	37	0	39	327
LA RIOJA	55	4	10	10	4	56	76	149	68	26	458
MADRID	0	16	7	4	32	32	75	62	34	1	263
MELILLA	80	47	56	74	69	71	88	92	62	76	715
MURCIA	26	20	22	23	17	23	3	14	78	16	242
NAVARRA	128	167	152	170	188	576	385	426	341	205	2738
PAIS VASCO	45	41	90	89	190	265	206	321	305	80	1632
TOTAL	796	789	719	1088	1050	1788	1553	1948	1724	1171	12626

DESCRIPCIÓN DE LA ÚLTIMA TEMPORADA VIGILADA EN CONDICIONES NO PANDÉMICAS

Corresponde a la temporada 2019-2020 (semana 40/2019 hasta la semana 20/2020). Se integraron 16 redes de vigilancia centinela de gripe de cada CCAA, exceptuando Aragón, Galicia y Murcia, un total de 20 laboratorios de microbiología y unidades administrativas e institutos de Salud Pública de todas las CCAA. Se inició en septiembre de 2019 y se utilizó la información derivada de la epidemia gripal del invierno de 2019 en el hemisferio sur, que constituyó el punto de partida para la vigilancia de gripe al inicio de la temporada 2019-20 en el hemisferio norte. Ante la declaración de la pandemia de SARS-CoV-2, se siguieron las recomendaciones de la OMS que instaban a mantener la vigilancia nacional e internacional de la gripe en la temporada 2019-20 a partir de febrero y marzo de 2020, para caracterizar la circulación de los virus gripales y su difusión e impacto entre la población. Obviamente, la pandemia de SARS-CoV-2 distorsionó los datos ya que los sistemas fueron desmantelados en todas las CCAAs.

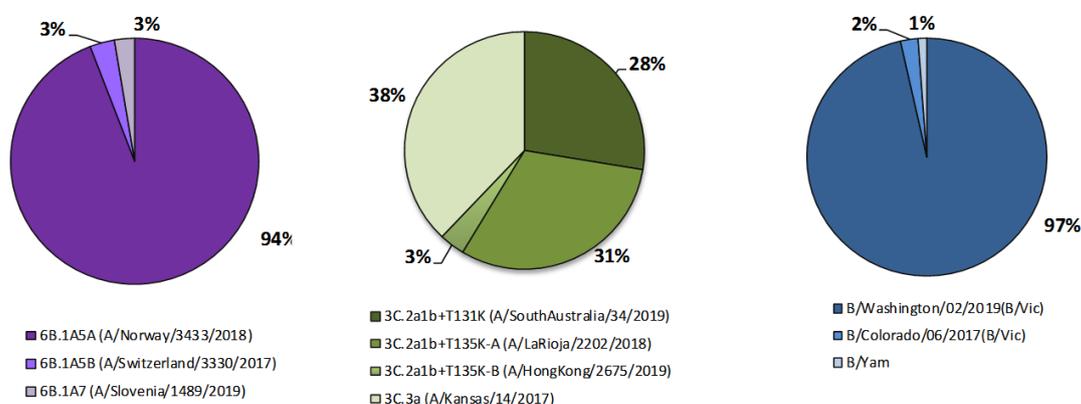
El estudio de la temporada 2019-20 estuvo precedido por una vigilancia virológica durante el periodo de inter-temporada 2019, notificándose un total de 49 detecciones no centinela, 96% virus de la gripe A y 4% virus B. Las primeras detecciones centinela de gripe de la temporada 2019-20 se identificaron en las semanas 41 y 44/2019, procedentes de Madrid, Andalucía y Ceuta. Se notificaron un total de 9.430 detecciones de virus de la gripe. El 72% fueron virus de la gripe A [entre los subtipados (45%), 89% A(H1N1)pdm09 y 11% A(H3N2)] y el 28% virus de la gripe B. De las 2.579 detecciones centinela, el 57,5% fueron virus de la gripe A, el 42,4% virus tipo B y el 0,1% virus C. De los virus de la gripe A subtipados (93%), el 84% fueron A(H1N1)pdm09 y 16% A(H3N2). La circulación dominante en la temporada fue A(H1N1)pdm09/B. De las 6.851 detecciones procedentes de fuentes no centinela, el 78% fueron virus tipo A, el 93% fueron A(H1N1)pdm09 y el 22% tipo B.

Figura 2. Tasa de incidencia de gripe y número de detecciones virales. Temporada 2019-20. Sistemas centinela. Fuente: ISCIII. Sistema centinela de Vigilancia de Gripe en España



Basándose en estudios genéticos realizados en la unidad de Gripe y Virus Respiratorios del CNM se caracterizaron 343 virus de la gripe A(H1N1), 323 de ellos del grupo 6B.1A5A representado por A/Norway/3433/2018, 11 del grupo 6B.1A5B representado por A/Switzerland/3330/2017, y 9 del grupo 6B.1A7 representado por A/Slovenia/1489/2019. Además, se caracterizaron 58 virus A(H3N2), 16 de ellos del grupo 3C.2a1b+T131K representado por A/SouthAustralia/34/2019, 18 del grupo 3C.2a1b+T135K-A representado por A/LaRioja/2202/2018, 2 del grupo 3C.2a1b+T135K-B representado por A/HongKong/2675/2019 y 22 del grupo 3C.3a representado por la cepa vacunal A/Kansas/14/2017. En relación a los virus de la gripe B, se caracterizaron 85 virus, 84 de ellos del linaje Victoria, 82 del grupo 1A(Δ3)B representado por B/Washington/02/2019, caracterizado por una triple delección en el gen de la hemaglutinina, y 2 del grupo 1A(Δ2), representado por el virus vacunal B/Colorado/06/2017.

Figura 3. Distribución de las caracterizaciones genéticas realizadas en el CNM. Temporada 2019-20. Sistemas centinela. Fuente: ISCIII. Sistema centinela de Vigilancia de Gripe en España



CONCLUSIONES

1. La vigilancia de la gripe en España se ha servido de diversos sistemas y fuentes de información que permitían ofrecer una visión amplia del comportamiento de la enfermedad y de los virus gripales circulantes, tanto en el conjunto del Estado como en cada CCAA.
2. La emergencia de COVID-19 durante febrero/marzo de 2020 produjo una distorsión de estos los sistemas de vigilancia, tanto en las redes de vigilancia centinela en atención primaria como en la vigilancia en el ámbito hospitalario, afectando su funcionamiento en todas las CCAA. Esta distorsión continuó en la temporada 2020-21 y en la actual 2021-22, lo que obliga a replantear y adaptar todo el Sistema de Vigilancia a nivel global.

3. Siguiendo las recomendaciones del ECDC y OMS se propone establecer nuevos sistemas de vigilancia centinela en el ámbito de la atención primaria y hospitalaria, basándonos en la experiencia conseguida en el marco del SVGE. El objetivo es vigilar gripe y COVID-19 conjuntamente iniciándose en la actual temporada 2021-2022, y que permanezcan en el tiempo como sistemas de vigilancia de infección respiratoria aguda (IRA) leve y grave, con los que se podrá vigilar los virus gripales, el SARS-CoV-2 y cualquier otro virus respiratorio.
4. La transición entre los sistemas de vigilancia y la implantación de los nuevos para la vigilancia de la IRA se plantea en medio de la pandemia de COVID-19, con la presión que ello supone tanto para los sistemas asistenciales en atención primaria, los hospitalarios, el personal implicado en la vigilancia epidemiológica y virológica en las CCAA.
5. En la actualidad, la vigilancia IRA debe convivir con la vigilancia universal de COVID-19 que se viene realizando desde el inicio de la pandemia, basada en la búsqueda exhaustiva de todos los casos, para garantizar su aislamiento, su control y el seguimiento de sus contactos.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Organización Mundial de la Salud. Reglamento sanitario internacional (2005). 3ª Ed. Geneva: World Health Organization (WHO); 2016.
Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246186/9789243580494-spa.pdf;jsessionid=4A53C25E3E633E7A6073682F4C45536D?sequence=1>;
2. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).
3. Sistema de Vigilancia de Gripe en España. Guía de Procedimientos para la vigilancia de la gripe en España. ISCIII, 2019.
Disponible en: https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/GRIPE/GUIAS/Guia_procedimientos_vigilancia_gripe_Octubre2019.pdf
4. Vega AT, Zurriaga O, Galmés A, Lozano JE, Paisán L, Gil M, Herrero A, Ramos JM. Guía de principios y métodos de las redes centinelas sanitarias en España. Gac Sanit 2006; 20(Supl 3): 52-60.
5. (<https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/eisn>)
6. (<https://vgripe.isciii.es/inicio.do;jsessionid=0D533249C11F7785E41A6113F91FBA72>)
7. (<https://vgripe.isciii.es/inicio.do;jsessionid=21C14608DDF95D70C53145B918F1BC88>)

Programa de SARS-CoV-2

Informe elaborado por I. Casas*, F. Pozo*, S. Vázquez-Morón, M. Iglesias-Caballero, V. Sandoís, V. Mas, C. Palomo

Personal Técnico: M. Gonzalez-Esguevillas, M. Molinero, N. Reyes, V. Montero, D. K. Santos, S. Camarero, O. Cano, M. Vázquez, T. Delgado.

Laboratorio de Referencia e Investigación en Virus Respiratorios. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

*CIBER de Epidemiología y Salud Pública. CIBERESP.

INTRODUCCIÓN

A finales del 2019 se detectó la aparición de un nuevo coronavirus que causa la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) [1]. La biología del virus SARS-CoV-2, al igual que el resto de los virus, lleva implícita cambios constantes en su genoma a través de mutaciones, por lo que la aparición de variantes es un hecho esperado. La adaptación evolutiva y la diversificación de SARS-CoV-2 se ha ido observando a nivel global a lo largo de la pandemia [2]. La mayoría de las mutaciones que surgen no proporcionan una ventaja selectiva al virus, ni tampoco cambios fenotípicos que impliquen alteraciones en el comportamiento o patrón de infección. Sin embargo, algunas mutaciones o combinaciones de mutaciones pueden proporcionar al virus una ventaja selectiva, como una mayor transmisibilidad a través de un aumento en la unión del receptor o mejoras en la estabilidad de la proteína. Del mismo modo, existe preocupación acerca de la aparición de una variante que escape al efecto de los anticuerpos neutralizantes generados tras una infección previa o tras la vacunación, lo que podría condicionar casos de reinfección o pérdida de la eficacia vacunal.

VIGILANCIA MICROBIOLÓGICA DE LA INFECCIÓN PRODUCIDA POR EL SARS-COV-2.

Desde el punto de vista de la vigilancia consideramos variantes de preocupación para la salud pública (VOC, por sus siglas en inglés, *Variant of Concern*) [3] aquellas que pueden tener un impacto significativo en la situación epidemiológica de nuestro país y para las que existen evidencias de un posible incremento en la transmisibilidad, la gravedad de la enfermedad y/o el escape a la respuesta inmune. Consideramos variantes de interés (VOI, por sus siglas en inglés, *Variant of Interest*) [3] aquellas que, con una probabilidad menor, podrían también tener un impacto en la situación epidemiológica en España o para las que existen indicios de un incremento en la transmisibilidad, la gravedad y/o el escape a la respuesta con un grado menor de certeza.

El Comité Técnico Coordinador de la Red Nacional de Laboratorios de Secuenciación de SARS-CoV-2 revisa periódicamente la clasificación de una variante como VOC o VOI para nuestro país. No obstante, a través de la implementación de la secuenciación de muestras aleatorias se busca hacer una vigilancia integral tanto de las variantes conocidas como de la aparición de nuevas variantes que puedan representar un aumento del riesgo.

El documento de “Estrategia de integración de la secuenciación en la vigilancia de SARS CoV-2”, aprobado por la Ponencia de Alertas y por la Comisión de Salud Pública, plantea la necesidad de incluir como parte de la vigilancia de la COVID-19, los datos generados mediante secuenciación genómica de SARS-CoV-2 para la detección e identificación de variantes virales en España.

Para cumplir este objetivo la Red Nacional de Laboratorios de Secuenciación Genómica (RELECOV) cubre las necesidades de generación de secuencias de los virus y de conocimiento genómico mediante su análisis. El Centro Nacional de Microbiología (CNM-ISCIII) coordina dicha red.

PATÓGENOS INVOLUCRADOS

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) es el nombre que se le dio al nuevo coronavirus detectado por primera vez en Wuhan, China, en 2019 [1] .

El SARS-CoV-2 pertenece a la Familia Coronaviridae al Género Betacoronavirus. Su genoma es una molécula de ARN monocatenario de polaridad positiva con un tamaño de 27 a 32 Kb. Son virus grandes de 80-160 nm, envueltos y pleomórficos. Presenta un 96% de homología con un β -coronavirus descrito en murciélagos [4], además de tener un 80% de homología con el SARS-CoV-1 de 2003 y un 55% con el MERS-CoV [4,5].

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

Detección y caracterización de los virus SARS-CoV-2 circulantes en la población general, tratando de identificar de manera rápida y eficaz los casos positivos y sus contactos, los brotes o las cadenas de personas infectadas asociadas a casos positivos en donde se haya podido determinar nuevas variantes o nuevos linajes, incluyendo aquellas infecciones humanas que se sospechen producidas por un virus de origen animal.

Se incluye la vigilancia de la aparición de variantes resistentes a antivirales. Cumplimiento de las funciones como Laboratorio Nacional de Referencia para Virus Respiratorios y Gripe dentro de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

Objetivos concretos de este programa son:

- Detección de virus SARS-CoV-2 circulantes en la población general humana.
- Caracterización de los virus SARS-CoV-2 mediante Secuenciación genómica para la vigilancia de las variantes, aparición de nuevas variantes y aparición de nuevos linajes y sublinajes.
- Definición de las mutaciones específicas, la variabilidad y la epidemiología molecular del virus
- Caracterización antigénica de SARS-CoV-2. Aislamiento de virus en nivel de contención BSL3. Neutralización con virus completo y con pseudovirus. Estudio fenotípico de proteína de la espícula.
- Vigilancia de la aparición de variantes resistentes a antivirales.
- Cumplimiento de las funciones como Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios y Gripe.

REDES INTERNACIONALES:

- Red “WHO COVID-19 Reference Laboratory Network” ECDC.
- Red “Joint ECDC/WHO Europe Laboratory Network
- Proyecto Europeo HERA-Incubator Grant/2021/PHF/23776-*Enhancing Whole Genome Sequencing (WGS) and/or Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) national infrastructures and capacities to respond to the Covid-19 pandemic in Spain.*

REDES NACIONALES:

- Coordinador: Red Nacional de Laboratorios para la integración de la Secuenciación genómica en la vigilancia de COVID (RELECOV).

DISEÑO DEL PROGRAMA:

Abierto durante los años 2020-2021 y 2022

Sujetos de estudio: Cualquier caso compatible con la definición de caso de COVID para su diagnóstico y posterior caracterización genotípica y fenotípica del virus. Pacientes positivos procedentes de cualquier hospital tanto público como privado

Participantes: Cualquier hospital público o privado del país. Se debe rellenar en su totalidad y sin imprecisiones un Formulario específico para la realización de la secuenciación genómica y la caracterización antigénica.

TIPO DE MUESTRA Y CONDICIONES DE ENVÍO

Para el diagnóstico y secuenciación genómica: muestras tomadas del tracto respiratorio superior: exudado nasal, exudado faríngeo, exudado nasofaríngeo, aspirado o lavado nasofaríngeo.

Para el aislamiento de virus: muestras respiratorias recogidas en medio de transporte de virus (MTV) y deben ser enviadas de manera inmediata al laboratorio de referencia, refrigeradas (4°C) sin congelación siguiendo todos los protocolos vigentes de transporte de muestras infecciosas de SARS-CoV-2.

Muestras para estudios concretos de excreción de virus: heces, placenta y muestras obstétricas

Estudios serológicos: Suero

Las condiciones de envío deben de cumplir las normas de bioseguridad. Las muestras deben de ser transportadas en envases con tres niveles de contención recomendados por la OMS y adecuadamente rotuladas. El transporte ha de realizarse con empresas que cumplan con la normativa recomendada por la OMS y posean el Certificado correspondiente expedido por una entidad de acreditación para el transporte de material biológico. Las muestras clínicas sospechosas tomadas a personas que cumplen la definición de caso de COVID, así como las muestras de pacientes positivos se consideran de categoría B (UN3373).

TÉCNICAS A APLICAR PARA EL ESTUDIO EN EL CNM

1. Detección específica de SARS-CoV-2 mediante sistemas de amplificación genómica en tiempo real (genes E, N, y ORF1)
2. Secuenciación de genoma completo de SARS-CoV-2 por secuenciación masiva
3. Detección múltiple simultánea de Coronavirus mediante sistemas de amplificación genómica convencional: incluye SARS-CoV-2 y Coronavirus estacionales
4. Aislamiento viral en cultivo celular en células VERO-E6
5. Neutralización de virus infectivo para análisis de la respuesta de anticuerpos frente a SARS-CoV-2
6. Neutralización mediante pseudovirus y ensayos de neutralización subrogada con formas solubles de la proteína de la espícula
7. Amplificación del gen de la espícula para secuenciación Sanger.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

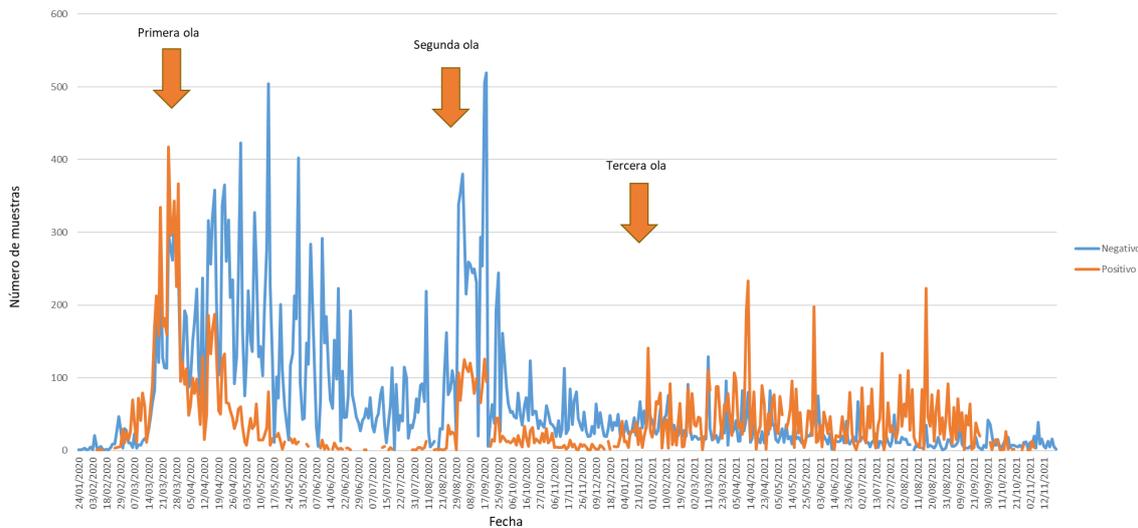
En la Unidad de Gripe y Virus Respiratorios del CNM, se han recibido muestras clínicas desde el comienzo de la pandemia. Estas muestras han sido empleadas para diagnóstico del virus y para la vigilancia genómica por secuenciación masiva.

Desde Enero de 2020 hasta Noviembre de 2021 se han recibido un total de 49.995 muestras para el análisis de SARS-CoV-2.

En la **Figura 1** se puede observar que el papel de la Unidad ha ido evolucionando conforme el desarrollo de la pandemia. En la primera y segunda ola el papel de apoyo diagnóstico que se desempeñaba se refleja en el número de muestras recibidas que eran negativas. Conforme las capacidades diagnósticas mejoraban en los hospitales, el perfil de muestras recibido cambió siendo mayoritariamente muestras positivas que se recibían para ser secuenciadas dentro de la Red Nacional de Laboratorios para la integración de la Secuenciación genómica en la vigilancia de COVID-19 formada en Enero de 2021.

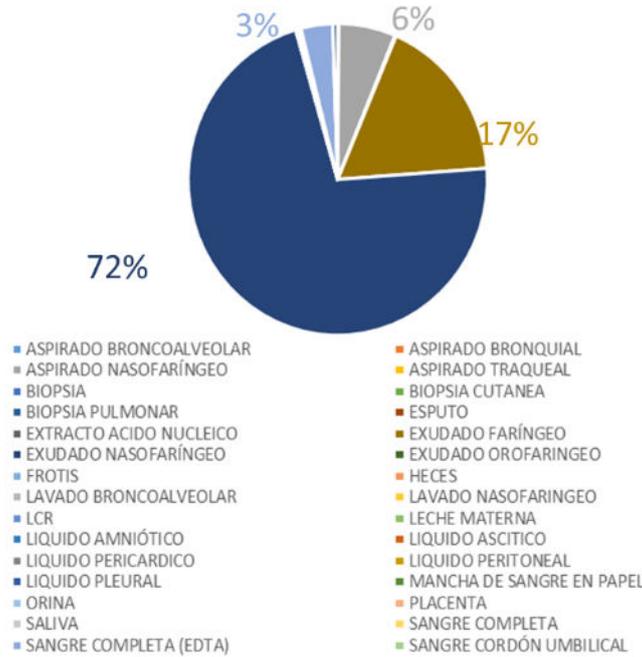
La representación temporal de las muestras recibidas también refleja el perfil de las diferentes olas epidémicas de la pandemia.

Figura 1. Muestras recibidas y analizadas en el CNM desde el principio de la pandemia



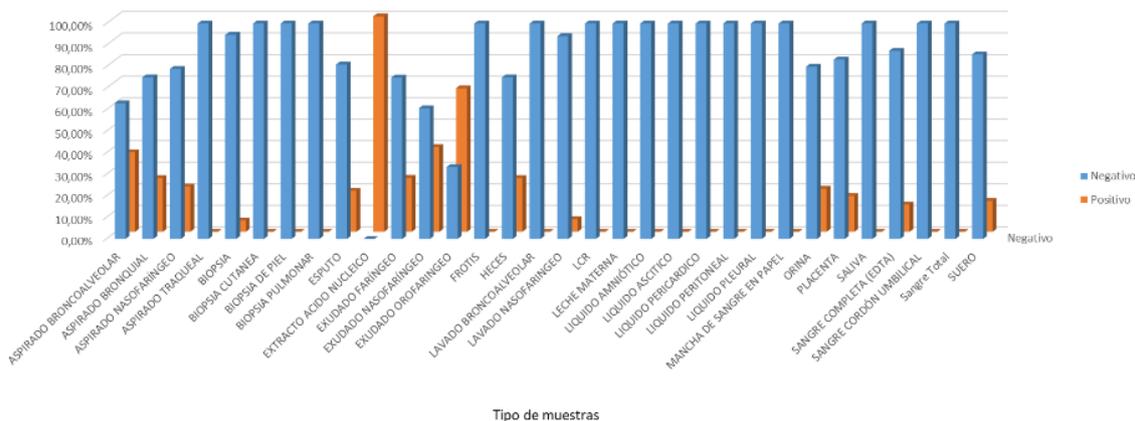
En la Unidad de Gripe y Virus Respiratorios del CNM se han recibido 32 tipos de muestras diferentes para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Dentro de esta variedad, el tipo de muestra más común han sido las muestras respiratorias predominando el Exudado Nasofaríngeo, seguido del Exudado Faríngeo y del Aspirado Nasofaríngeo (**Figura 2**). Estos tipos de muestras entran dentro del grupo de las muestras de cumplen el criterio para el diagnóstico y secuenciación del virus

Figura 2. Tipo de muestras recibidas y analizadas en el CNM desde el principio de la pandemia



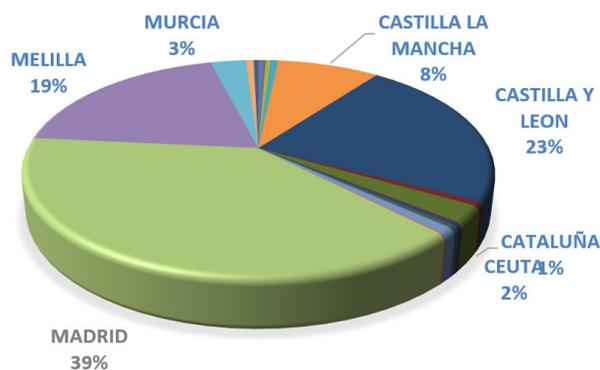
Como se puede observar en la **Figura 3** el mejor rendimiento para la detección y secuenciación del virus fue obtenido en la muestra respiratoria. El resto de tipo de muestras, empleadas en estudios de investigación, han producido resultados desiguales destacando a las heces, la orina y la placenta como muestras no respiratorias que permiten la detección del virus SARS-CoV-2.

Figura 3. Rendimiento de detección de los diferentes tipos de Muestras recibidas y analizadas en el CNM desde el principio de la pandemia



Se han recibido muestras procedentes de todas las Comunidades Autónomas siendo Madrid, Castilla y León y Melilla las 3 comunidades que más muestras han enviado para su análisis a la Unidad (**Figura 4**).

Figura 4. Distribución de las CCAA que han enviado muestras al CNM desde el principio de la pandemia



CONCLUSIONES

- Detección precoz de la circulación de las variantes e integración de la información en la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
- Cultivo de las principales VOCs que se imponen en el tiempo
- Mantener la red de laboratorios para generar información útil en la toma de decisiones
- Evaluar el impacto de las variantes: transmisibilidad, gravedad, escape a la inmunidad.
- Evaluar los porcentajes de cobertura vacunal y dosis de refuerzo en poblaciones diana y realización de los correspondientes estudios virológicos.
- Mantener la realización continua de los análisis de efectividad vacunal

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020, 382, 727-733.
2. WHO World Health Organization- Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Situation Report-83 2020.
3. Rapid Risk Assessment: Assessing SARS-CoV-2 Circulation, Variants of Concern, Non-Pharmaceutical Interventions and Vaccine Rollout in the EU/EEA, 15th Update Available online: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-sars-cov-2-circulation-variants-concern> (accessed on 6 July 2021).
4. Forster P, Forster L, Renfrew C, Forster M. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2020, 117.
5. Liu Y, Eggo RM, Kucharski AJ. Secondary attack Rate and superspreading events for SARS-CoV-2. *Lancet Lond. Engl.* 2020, 395, e47.

Programa de Enterovirus y Parálisis Flácida en menores de 15 años

Informe elaborado por M. Cabrerizo*, M. D. Fernandez-García, A. Otero, P. Higuera.

Laboratorio de Referencia e Investigación en Enfermedades Víricas Inmunoprevenibles, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Red Nacional de Laboratorios para la Vigilancia de PFA y WHO-Euro Polio Lab Network.

*CIBER de Epidemiología y Salud Pública. CIBERESP.

INTRODUCCIÓN

La poliomielitis es una enfermedad caracterizada por la aparición de una parálisis flácida, aguda, asimétrica, en ocasiones mortal, de la que puede o no haber recuperación y que está producida por los poliovirus cuando se replican y destruyen las moto-neuronas de las astas anteriores medulares y/o bulbares. En la mayoría de las ocasiones la infección es asintomática, a veces producen cuadros leves y solo en menos del 1%, parálisis. En 1988, con 125 países endémicos y más de 500.000 casos declarados en todo el mundo, la OMS en su 41º Asamblea Mundial de la Salud, lanzó la Iniciativa para la Erradicación Mundial de la Poliomielitis (GPEI) (1). Desde entonces, los casos de polio se han reducido en más de un 99%, siendo Afganistán y Pakistán los únicos países considerados endémicos actualmente. Pero para mantener un territorio libre de polio y evitar la reintroducción del virus se requieren elevadas coberturas de vacunación en todos los grupos de población y niveles geográficos y un **sistema de vigilancia de poliovirus** activo. La piedra angular es la Vigilancia de la Parálisis Flácida Aguda (PFA), que es una vigilancia sindrómica. En países no endémicos que además cuenten con servicios de salud de calidad, la OMS acepta sistemas alternativos de vigilancia de laboratorio, entre ellos la vigilancia de enterovirus (EV) en muestras clínicas (2).

En España, la vigilancia de polio se realiza con la notificación obligatoria de cualquier sospecha de poliomielitis o de cualquier cuadro de PFA en un menor de 15 años, que desencadena un proceso de investigación epidemiológica, clínica y de laboratorio con el fin de descartarlo/confirmarlo como caso de polio, clasificarlo de forma adecuada y, si procede, instaurar rápidamente las medidas de intervención (3). En la Vigilancia participan tanto la red de laboratorios sub-nacionales para PFA en Cataluña, Andalucía y Canarias, coordinada por el Laboratorio Nacional de Polio (LNP, en el CNM), como el CNE, el MSSSI (Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación) y las Consejerías de Salud de las 19 CCAA, Ceuta y Melilla. Además, todo caso declarado se debe notificar inmediatamente a la OMS-Europa, que exige la evaluación anual del sistema mediante un conjunto de indicadores. Los principales indicadores son la tasa de notificación de PFA y el porcentaje de casos en los que se han tomado muestras clínicas adecuadas.

Del producto de ambos se obtiene el Índice de Vigilancia que resume la calidad del sistema y que ha de ser >0,80. El sistema de vigilancia de poliomielitis se complementa con la vigilancia de EV en muestras clínicas de otros cuadros clínicos, fundamentalmente neurológicos.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

La notificación de casos de PFA se hace bajo sospecha clínica y el circuito se inicia en el hospital donde se identifica el caso. La investigación microbiológica requiere el estudio de dos muestras de heces recogidas con una diferencia de 24-48h, dentro de los primeros 14 días tras la aparición de los síntomas. Para confirmar/descartar la presencia de un poliovirus, las muestras de heces deben ser estudiadas mediante cultivo en al menos dos líneas celulares establecidas y específicas para el aislamiento de poliovirus y otros EV, las líneas de células RD y L20B. La confirmación y caracterización intratípica de los poliovirus aislados, así como el tipado de los EV detectados en estas u otras muestras clínicas, se realiza mediante métodos moleculares (amplificación por RT-PCR, secuenciación y análisis filogenético). Todos estos métodos específicos no están disponibles en todos los laboratorios del SNS, y sí en los 3 laboratorios sub-nacionales y el LNP, que es el encargado del estudio virológico de todos los casos declarados fuera de las tres CCAA que disponen de laboratorio acreditado (Cataluña, Andalucía y Canarias) y de la confirmación y caracterización de todos los poliovirus y EV-no polio identificados tanto en casos de PFA como en otras patologías, todo ello a través del Programa de Vigilancia del CNM.

Así, los objetivos específicos de este programa son:

- Confirmar o descartar la presencia de poliovirus en casos de PFA en pacientes menores de 15 años o en pacientes de cualquier edad con sospecha de poliomielitis.
- La caracterización intratípica de los poliovirus detectados: serotipo, tipo de cepa- salvaje, vacunal o derivado de vacuna- y procedencia.
- La caracterización microbiológica de los EV detectados en muestra clínica procedentes de casos de PFA u otros síndromes clínicos.
- El seguimiento permanente de la evolución del patrón de circulación de los diferentes sero/genotipos de EV circulantes en España y las características epidemiológicas y clínicas asociadas.

DISEÑO DEL PROGRAMA

Sujetos de estudio: Paciente < 15 años con signos de PFA o cualquier paciente con sospecha de poliomielitis. En el caso de la vigilancia de EV, cualquier paciente con diagnóstico confirmado previo de infección por EV (cultivo viral o RT-PCR positiva).

Participantes. Abierto a cualquier laboratorio/hospital. Para los casos de PFA, es imprescindible haber declarado el caso.

Muestras, condiciones de envío y análisis de laboratorio:**Muestras y determinaciones para Vigilancia de PFA < 15 años o poliomielitis:**

Muestra	Obligatorio	CC RD/L20B	RT-PCR EV/PV	ITD si LB20+	serología
Heces 24-48h	Si	Si	Si	Si	
Respiratoria	No	Si	Si	Si	
Aislado de CC	No	Si	Si	Si	
Suero	No	No	No	No	Si

CC, cultivo celular; EV, enterovirus; PV, poliovirus; ITD, diferenciación intratípica para poliovirus

Muestras y determinaciones para Vigilancia de Enterovirus:

Muestra	RT-PCR tipado y secuenciación	RT-PCR EV confirmación (si PCR tipado negativa)
LCR	Si	Si
Heces	Si	Si
Respiratoria (ANF/EF/LBA)	Si	Si
Exudado vesicular/conjuntival/lesión piel	Si	Si
Suero/sangre*	Si	Si
Biopsia	Si	Si
Aislado de CC	Si	Si

*Sólo en < 6 meses o infecciones sistémicas. LCR, líquido céfalo-raquídeo; ANF, aspirado nasofaríngeo; EF, exudado faríngeo; LBA, lavado broncoalveolar; CC, cultivo celular; EV, enterovirus.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En España tanto la Vigilancia de PFA como la de otros Enterovirus no-polio se implantó en 1998. La tasa de notificación de la vigilancia de PFA siempre ha sido menor de lo esperado, ya que se considera que debe haber 1 caso de PFA por cada 100.000 menores de 15 años (tasa 1), y la media no supera el 0,6, oscilando a lo largo de los años (Tabla 1). Sin embargo, cuando los casos son declarados, la recogida de muestras clínicas y su estudio es adecuado en un porcentaje elevado, logrando superar, en la mayoría de ellos, los valores que establece la OMS (Tabla 1). Hasta que en 2004 se sustituyó la vacuna oral frente a polio (VPO) por la inactivada (VPI), se detectaron algunos casos de excreción de poliovirus vacunales en niños recién vacunados. Desde entonces no se ha vuelto a detectar ningún poliovirus en España, a excepción de dos **casos importados** de poliovirus derivados de vacuna (PVDV) en 2005 y 2019, que fueron diagnosticados y caracterizados gracias al sistema de vigilancia, sin que produjera riesgo de circulación y transmisión en la población (4, 5). En relación con la identificación de EV -no polio en heces procedentes de casos de PFA, la frecuencia de detección varía anualmente, aunque la media en los últimos 20 años ha sido de un 10% (rango, 1-40%), lo cual está dentro de los valores esperados. Se han identificado diferentes serotipos, pudiéndose destacar que, desde 2015, se han descrito ya varios casos de PFA causados por EV-D68, que confirma el carácter neurotrópico de las cepas circulantes actuales.

Tabla 1. Indicadores de calidad de la vigilancia de PFA en España (2002-2019).

Indicador	Objetivo OMS	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Tasa de notificación de PFA (casos /100.000 hab. < 15 años)	≥1	0,61	0,74	0,72	0,73	0,66	0,57	0,53	0,31	0,45	0,49	0,33	0,37	0,58	0,45	0,73	0,56	0,58	0,55
% PFA con 1 muestra de heces en ≤14 días desde inicio de la parálisis	≥80%	73,0	70,0	70,0	75,0	59,5	83,6	57,1	81,0	80,6	70,6	91,3	69,2	73,2	65,6	80,4	71,8	80,0	68,4
% PFA con 2 muestra de heces en ≤14 días desde inicio de la parálisis		57,0	46,0	56,0	65,9	45,2	56,8	34,3	38,1	45,2	38,2	56,5	57,7	41,5	46,9	51,0	51,3	65,0	50,0
% PFA investigados ≤48 horas desde la notificación	≥80%	97,0	93,0	100	100	100	94,6	100	95,2	96,8	91,2	95,7	96,2	95,1	96,8	94,1	97,4	92,5	81,6
% PFA con seguimiento a los 60-90 días	≥80%	92,0	96,0	100	100	100	97,3	100	100	96,8	100	95,7	88,0	95,1	96,8	94,1	100	95,0	97,4
Índice de Vigilancia (*)	≥0,8	0,35	0,34	0,50	0,48	0,30	0,32	0,18	0,12	0,20	0,19	0,18	0,21	0,24	0,21	0,36	0,29	0,37	0,28

(*) Índice de vigilancia (Surveillance Index) = Tasa de notificación de PFA hasta 1.0 x (proporción de casos de PFA con 2 muestras de heces recogidas de forma separada entre 24-48 horas en los 14 días después del inicio de parálisis)

Con respecto al sistema de vigilancia de enterovirus, en España es voluntario, al igual que en la mayoría de países europeos, y no está establecido en todo el territorio nacional. En el LNP se reciben para genotipar, una media de 550 muestras EV-positivas al año (rango 500-1200), procedentes de más de 60 hospitales diferentes (Figura 1). No obstante, los laboratorios que aportan el 50% de las muestras y la información requerida para realizar los informes de vigilancia pertenecen a 11 hospitales: los 3 laboratorios sub-nacionales que realizan además la vigilancia de PFA (H. V. Nieves en Granada, H. Santa Creu i Sant Pau en Barcelona y H. Dr. Negrín en Las Palmas) y 8 que sólo realizan vigilancia de EV (H. Cruces en Bilbao, H. V. Arrixaca en Murcia, H. San Joan de Deu en Barcelona, H. La Paz de Madrid, H. M. Servet en Zaragoza, H. Navarra en Pamplona, H. de Vigo, H. de Burgos). Actualmente, los principales cuadros clínicos que se incluyen son: meningitis, encefalitis y otras patologías neurológicas, infecciones respiratorias, fiebre sin foco en niños < 6 meses, enfermedad mano-pie-boca (EMPB) u otro tipo de exantemas, miocarditis y sepsis neonatal (Figura 2a). La muestra adecuada para la detección de los EV depende del diagnóstico clínico de sospecha (Figura 2b).

Figura 1. Evolución en los últimos 15 años (2006-2020) del número de aislados de EV y muestras clínicas recibidas en el CNM para la vigilancia microbiológica.

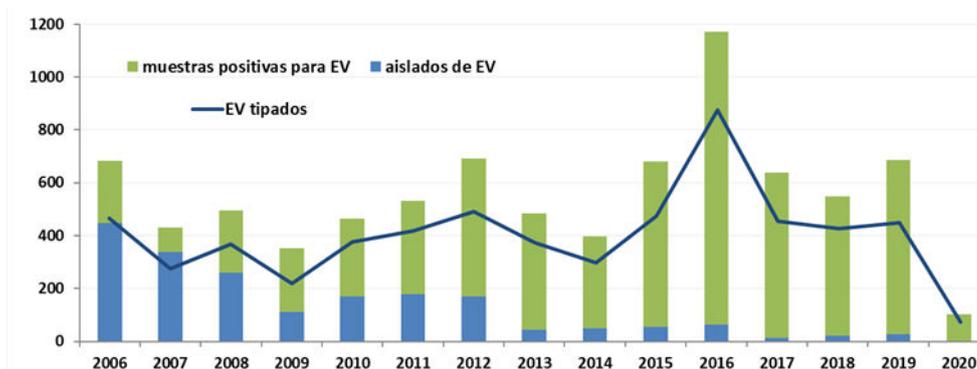
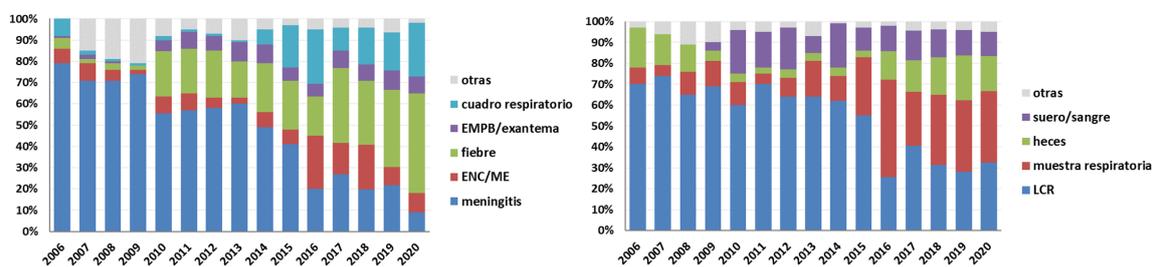


Figura 2. a) Evolución en los últimos 15 años (2006-2020) del tipo de patología asociada a la infección por EV de las muestras EV-positivas recibidas en el CNM para la vigilancia microbiológica. b) tipos de muestras estudiadas (2006-2020).

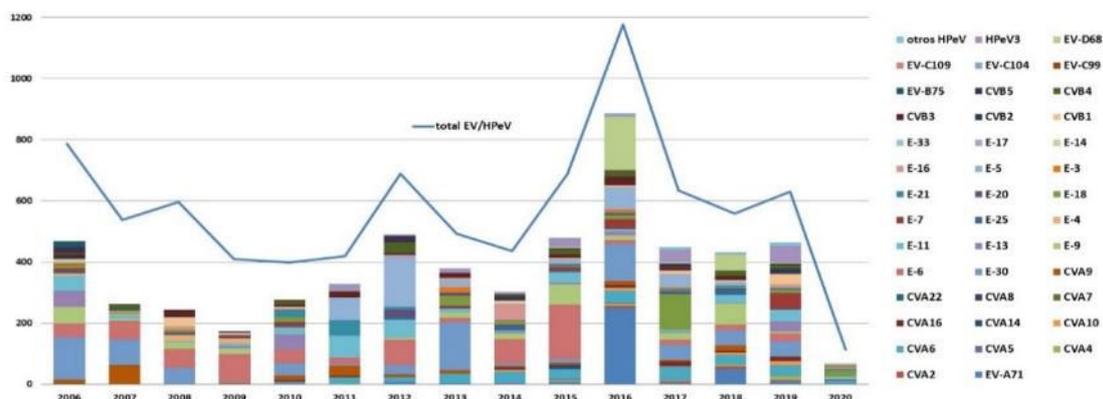


Con respecto a la caracterización del sero/genotipo de EV, entre el 60-80% de las muestras EV-positivas recibidas pueden ser genotipadas cada año (Figuras 1 y 3). Se identifican diferentes serotipos co-circulando anualmente (hasta 20 diferentes se pueden observar en una misma temporada (Figura 3)). Hay serotipos endémicos, como E-30, E-6 o CVB3, que se detectan todos los años con mayor o menor frecuencia, mientras que otros EV circulan de forma epidémica, alternando años de gran incidencia con periodos de baja o nula detección, como E-13, E-5 o E-18. Por último, hay serotipos que han emergido en los últimos años asociados a diferentes patologías o formas más severas de las mismas como son CVA6 (causante de la forma atípica de EMPB), o EV-D68 (asociado a cuadros respiratorios moderados y a PFA) y EV-A71, ambos prevalentes en 2016, siendo EV-A71 el causante de un importante brote de encefalitis graves en niños pequeños que ocurrió en nuestro país durante dicho año.

CONCLUSIONES

El sistema de Vigilancia de PFA en España está consolidado y aunque no se declaran todos los casos, se mantiene la notificación y el estudio virológico de aquellas parálisis en pacientes pediátricos que ingresan en los hospitales, lo cual permite descartar la circulación de poliovirus en nuestro territorio. La vigilancia microbiológica de las infecciones por EV, además de complementar la vigilancia de PFA, sirve para identificar que sero/genotipos circulan cada año, determinando las características demográficas y epidemiológicas de dichas infecciones, así como las patologías asociadas. Todo ello no sólo está ayudando a que en los próximos años se logre la erradicación de la polio en todo el mundo, sino que contribuye a mejorar nuestro conocimiento sobre las infecciones causadas por los EV, permitiendo detectar tipos o variantes emergentes asociadas a nuevas o más graves enfermedades o causantes de brotes epidémicos de importancia en salud pública.

Figura 3. Tipos de EV y parechovirus identificados y total de muestras positivas recibidas en el CNM en los últimos 15 años, entre 2006 y 2020.



BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. World Health Organization. Global Polio Eradication Initiative. Disponible en <https://polioeradication.org/>
2. World Health Organization. Global Polio Eradication Initiative. Enterovirus surveillance guidelines. Guide-lines for enterovirus surveillance in support of the Polio Eradication Initiative. Disponible en: <https://www.euro.who.int/data/assets/pdf/file/0020/272810/EnterovirusSurveillanceGuidelines.pdf>
3. Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, 2013. Disponible en: <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Paginas/ProtocolosRENAVE.aspx>
4. Avellón A, Cabrerizo M, de Miguel T, Pérez-Breña P, Tenorio A, Pérez JL, de Aragón MV, Trallero G. Paralysis case and contact spread of recombinant vaccine-derived poliovirus, Spain. Emerg Infect Dis. 2008 Nov;14(11):1807-1809.
5. Centro Nacional de Epidemiología y Centro Nacional de Microbiología. ISCIII. Plan Nacional de Erradicación de la Poliomieltis. Vigilancia de la Parálisis Flácida Aguda y Vigilancia de Enterovirus, año 2019. Madrid, julio 2020. Disponible en: https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20AZ/POLIO/Resultados_Vigilancia_Polio/Informes_Anuales_Polio/Informe_anual_PFA_EV_2019_VF.pdf

Programa de Parotiditis

Informe elaborado por J.E. Echevarría^{1*}, A. Fernández-García^{1*}, F. de Ory^{2*}, M.T. Pérez-Olmeda^{2†}, A. Gavilán^{1*}, A. Castellanos^{1*}, I. González-Martínez¹, J.M. Berciano¹, C. Hoyas¹, F. Salvador¹, S. Ruíz-Velázquez¹, J. de la Fuente², P. Balfagón², M.A. Murillo², M. Castillo², I. Pérez-Grajera².

¹Laboratorio de Referencia e Investigación en Enfermedades Víricas Inmunoprevenibles. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

²Laboratorio de Serología, Centro Nacional de Microbiología Instituto de salud Carlos III.

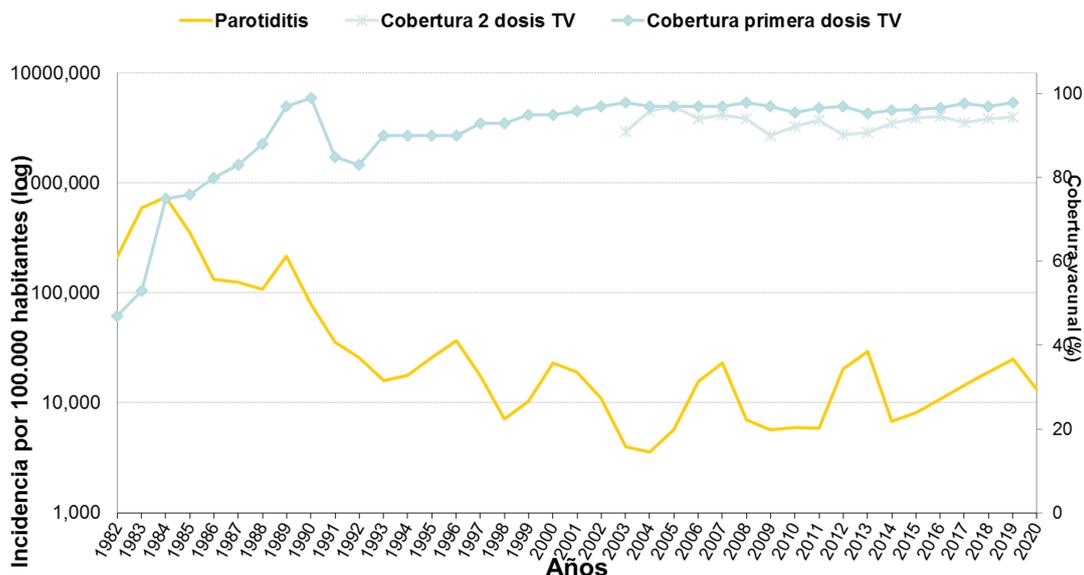
*CIBER de Epidemiología y Salud Pública. CIBERESP.

†CIBER de Enfermedades Infecciosas. CIBERINFEC.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo a los protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) (1), la parotiditis es una enfermedad causada por el virus de la parotiditis (VP) caracterizada por fiebre e inflamación de las glándulas parótidas u orquitis. Como complicaciones más frecuentes tenemos la orquitis y la meningitis aséptica, siendo la ooforitis y la pancreatitis menos frecuentes, y la encefalitis mucho más rara. La mortalidad se estima en 1/10.000 casos. La incorporación de la vacuna triple vírica, uno de cuyos componentes es el virus de la parotiditis (VP), en el calendario de la infancia en 1981 y la segunda dosis en 1996 ha supuesto una importante bajada de la incidencia (**Figura 1**). Sin embargo, a pesar de las altas coberturas vacunales (**Figura 1**) la enfermedad sigue estando presente y el virus mantiene circulación endémica con ciclos epidémicos plurianuales (**Figura 1**), por lo que la parotiditis, si bien está sometida a vigilancia y control, no se considera una enfermedad eliminable. Esto es debido fundamentalmente a la elevada frecuencia de infección en personas vacunadas, cuyas causas últimas no están del todo claras y es una de las líneas principales de investigación en esta enfermedad. La OMS ha normalizado un sistema de genotipado del virus basado en la secuenciación del gen de la proteína SH (2). En base a análisis filogenéticos de esta secuencia, la OMS ha establecido 12 genotipos (A-N), y ha designado secuencias de referencia para cada uno de ellos. La vigilancia de la parotiditis incluye la detección clínica de los casos, la confirmación de los mismos mediante técnicas de laboratorio y el genotipado de los virus para conocer el patrón de circulación de las cepas. En España, la parotiditis es una enfermedad de declaración obligatoria a través de la RENAVE y se hace tanto de manera individual como agregada semanal. Los datos de vigilancia epidemiológica y de laboratorio se incluyen en SIVIES, la base de datos de la RENAVE.

Figura 1. Incidencia de parotiditis. Coberturas de vacunación. España, 1982-2018.
Centro Nacional de Epidemiología (ISCIII).



Fuentes: Red de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) (Incidencia) y Ministerio de Sanidad (coberturas de vacunación)

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

La confirmación por el laboratorio microbiología de los casos clínicamente sospechosos es necesaria, de acuerdo a los protocolos de vigilancia. Sin embargo, la detección de IgM frente a parotiditis tiene muy baja sensibilidad clínica asociada a un bajo valor predictivo negativo en el actual contexto epidemiológico, y la PCR y el aislamiento, son técnicas de escasa implantación a nivel nacional. Por otra parte, la OMS y la RENAVE recomiendan incluir el genotipado en la vigilancia para estudiar la fuente de infección, conocer el patrón de circulación las diferentes cepas e investigar los casos en que se sospecha una relación con la vacuna. Por todo ello, los objetivos de este programa son:

- Proporcionar al Sistema de Vigilancia datos de laboratorio con los que poder elaborar indicadores epidemiológicos fiables en todo el territorio.
- La caracterización microbiológica de casos individuales y brotes.
- El seguimiento permanente de la evolución del patrón de circulación de genotipos y variantes del virus de la parotiditis en España como indicador del grado de progreso en su control a través de la vacunación.
- Proporcionar datos que contribuyan al esclarecimiento de las causas de la elevada frecuencia de fallos vacunales.

DISEÑO DEL PROGRAMA

Sujetos de estudio: Paciente con sospecha clínica de parotiditis (RENAVE).

Participantes: Abierto. Es imprescindible haber declarado el caso a la RENAVE.

Muestras, condiciones de envío y análisis de laboratorio:

Tabla 1. Muestras y determinaciones.

Muestra	Obligatorio	RT-PCR	Genotipado*	IgM	IgG
Saliva	SI	SI	SI	NO	NO
Orina	NO	SI	SI	NO	NO
LCR	SI**	SI	SI	NO	NO
Aislado	NO	SI	SI	NO	NO
Suero	SI***	NO	NO	SI	SI

* Solo si la muestra ha sido previamente positiva a PCR o aislamiento. Se genotiparán solo las 20 primeras muestras de cada brote y a partir de ahí, una por semana y localidad, o área de salud en grandes localidades

** Solo si hay cuadro neurológico asociado.

*** Se puede prescindir del envío de suero, si se informa del resultado de IgM e IgG.

Desde hace unos años, el genotipado se completa con el análisis de variantes, definiéndose como haplotipo a un grupo de secuencias (SH) idénticas al que se asigna el nombre de la más antigua. Aquellos haplotipos que circulan durante al menos seis meses y se extienden por más de tres provincias reciben el rango de variantes. Además del resultado de las determinaciones de diagnóstico (RT-PCR y serología), se emite el resultado del genotipado y el análisis de haplotipo/variante de acuerdo a la nomenclatura OMS: MuV*/provincia.país/semana.año/N. Donde*: s=muestra o i=aislado y N es el número correspondiente al orden de las muestras obtenidas en la misma localidad y la misma semana epidemiológica del mismo año. Ej. MuVs/Ávila.ESP/11.16/2. Asimismo, se acompaña de una breve interpretación epidemiológica del resultado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El diagnóstico de parotiditis lleva en servicio en el CNM desde hace décadas y el genotipado desde el año 2001. En este informe se incluye el análisis de los resultados obtenidos desde que se implementó el programa de vigilancia de parotiditis en 2013, hasta el año 2020 (Tabla 2). Los 2001 casos diagnosticados en el CNM suponen el 12,4% de los confirmados por laboratorio a nivel nacional (Tabla 2). Este porcentaje ha ido creciendo desde la implantación del programa, desde el 1,6% en 2013 hasta el 16% en 2019. El 41% alcanzado en 2020 hay que tomarlo con cautela, ya que puede haber habido subnotificación a SIVIES debido a la crisis del COVID-19. Un 42% de las muestras provino de la Comunidad de Madrid, seguida de Castilla y León (28,9%), Comunidad Valenciana (10%), Castilla la Mancha (6,8%), Murcia (5,4%), Navarra (2,8%) y Galicia (2,2%). El resto de las CCAA mandaron menos de cien muestras, o ninguna, en el caso de Cataluña, País Vasco, la Rioja y Asturias. De acuerdo a la población actual, Madrid y Castilla y León estarían muy sobrerrepresentadas, Castilla la Mancha, Murcia, Navarra y

Melilla ligeramente sobrerrepresentadas; la Comunidad Valenciana estaría adecuadamente representada, Galicia ligeramente infrarrepresentada y el resto bastante infrarrepresentadas. No disponemos de información objetiva sobre las razones de la falta de demanda del programa en algunas CCAA. Algunas podrían ser la falta de información sobre el programa, o la disponibilidad de los datos en laboratorios propios. En el primer caso esperamos que la difusión de este informe pueda ayudar a solucionarlo y en el segundo sería conveniente arbitrar mecanismos para que toda la información disponible pueda analizarse conjuntamente a nivel nacional.

Tabla 2. Resultados de vigilancia microbiológica de parotiditis en el CNM entre 2013 y 2020.

	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	TOTAL
Casos Totales SIVIES*	8130	2174	4037	5047	10302	9045	10670	1809	51214
Casos confirmados SIVIES*	2799	248	512	1489	2951	2929	4428	788	16144
Casos estudiados CNM	194	210	279	439	614	971	1316	534	4602
Casos confirmados CNM (% confirmados SIVIES)	46(1.6)	16(6.4)	41(8.0)	159(10.6)	267(9.0)	427(15.0)	715(16.0)	330(41.9)	2001(12.4)
Genotipados CNM (% confirmados SIVIES)	31(1.1)	14(5.6)	41(8.0)	90(6.0)	201(6.8)	130(4.4)	338(7.6)	120(15.2)	965(6.0)
Muestras estudiadas CNM	273	262	357	635	845	1278	1756	715	6121
Salivas (% positivas PCR)	176(22.0)	189(6.8)	237(13.5)	397(40.0)	464(44.0)	1015(36.0)	1194(56.0)	457(68.0)	4129(43.4)
Orinas (% positivas PCR)	40(12.5)	31(19.3)	57(5.2)	112(15.0)	147(20.0)	185(10.0)	225(10.0)	80(16.0)	877(13.1)
Exudados orofaríngeos (% positivos CNM)	8(50.0)	12(25.0)	23(35.0)	20(5.0)	119(42.0)	129(37.0)	115(36.0)	37(29.0)	463(35.8)
Sueros (% positivos IgM)	48(12.5)	27(7.4)	39(10.0)	106(10.3)	103(17.0)	144(6.0)	148(11.0)	139(11.0)	754(10.9)

* Datos cedidos por Noemí López Perea y Josefa Masa Calles, del Centro Nacional de Epidemiología (ISCIII).

La mayoría de las muestras recibidas fueron para detección de ARN vírico por RT-PCR (Tabla 2). La muestra que presenta un mejor rendimiento es la saliva (43,3% positivas), seguida del exudado orofaríngeo (35,8%), siendo la orina (13,1%) la de menor. La saliva es, además, fácil de obtener en la propia consulta, por lo que es la más recomendable. De los 754 sueros recibidos, un 10,9% fueron positivos a IgM frente al VP. El actual bajo valor predictivo negativo de la IgM frente a VP es un hecho conocido que se debe a que la mayoría de los casos ocurren en personas vacunadas, que hacen una respuesta inmunológica secundaria con ausencia de IgM detectable. Esto hace fundamental la detección genómica para una correcta clasificación de los casos.

De los 965 casos genotipados, 957 fueron genotipo G. De los ocho restantes, tres fueron de genotipo H, tres genotipo D, uno genotipo A (cepa salvaje) y uno genotipo N (cepa vacunal L-Zagreb). Este último caso fue importado de Venezuela, donde se usa la cepa vacunal L-Zagreb de la que existen documentados casos de parotiditis post-vacunal. No hemos encontrado ningún caso relacionado con la cepa vacunal Jeryl-Lynn, que es la que se administra en España. El genotipo G ha sido, por consiguiente, el claramente predominante durante este período. De acuerdo a nuestros estudios previos (3), se introdujo en España en el año 2005 desplazando al genotipo H y en menor medida al D, al inicio de la onda epidémica 2005-2009. Los tres casos H y tres D detectados entre 2013 y 2020 se deben, sin duda, a eventos de importación. A partir de ahí, el genotipo G ha circulado de manera continua en España, de acuerdo a un patrón temporal de ciclos epidémicos que se repiten cada 3-5 años (Figura 1) que ya era característico de esta enfermedad antes de la introducción de la vacuna.

A la vista de estos resultados, el dato del genotipo no parece tener mucha utilidad en las actuales circunstancias epidemiológicas, más allá de la definición del patrón general de circulación del virus, siendo una herramienta poco o nada útil para identificar el origen de los brotes, trazar cadenas de transmisión o establecer relaciones entre casos y brotes coincidentes en el tiempo. Por esta razón hemos incorporado el análisis de las secuencias para determinar el haplotipo-variante, de acuerdo a las definiciones indicadas anteriormente. En la [tabla 3](#) se muestran los resultados de dicho análisis desde el año 2008 hasta 2020.

Tabla 3. Variantes de genotipo G circulantes entre 2008 y 2020 (número de secuencias por año).

Variante	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
MuVi/Sheffield.GBR/1.05/	7	10	60	51	4	23	13	36	3	4	45	90	13
MuVs/Avila.ESP/11.16/									80	98	5		
MuVs/Madrid.ESP/50.16/2									2	36	89	1	
MuVs/NewYork.USA/45.15/									6	33	17	2	
MuVs/Avila.ESP/51.18/												39	11
MuVs/Salamanca.ESP/24.19/												53	34
MuVs/New_Jersey.USA/20.10/												202	65

Como se puede observar, hasta el año 2015 se observó la circulación predominante de la variante MuVi/Sheffield.GBR/1.05/ y haplotipos relacionados (datos no mostrados), con lo que este análisis no aportaba información complementaria relevante. Por ello, se desarrollaron herramientas complementarias al gen SH basadas en la secuenciación de regiones intergénicas no codificantes, que permitieron establecer patrones de circulación vírica asociados a los ciclos temporales que habían permanecido ocultos al manejar como único marcador la secuencia del gen SH (4). Sin embargo, a partir de 2016, parecen surgir por evolución de MuVi/Sheffield.GBR/1.05 variantes derivadas que son capaces de establecer circulación, observándose una diversificación creciente que ya otorga a la secuencia de SH capacidad suficiente para permitir el estudio detallado de la circulación del virus. Esta situación se mantuvo hasta el mes de marzo de 2020, a partir del cual dejamos de confirmar casos en las escasas muestras de sospechas de parotiditis recibidas en el CNM, posiblemente debido a las medidas de control de la COVID-19, que parecen haber impactado fuertemente en la circulación del VP, con previsibles consecuencias para su diversidad genética que habrá que observar mediante el mantenimiento de las actividades de vigilancia.

CONCLUSIONES

- El presente programa de vigilancia se ha implantado al objeto de satisfacer las recomendaciones de la OMS y la RENAVE sobre vigilancia de parotiditis.
- La adherencia al programa ha ido incrementándose con el tiempo, desde su implantación en el año 2013, alcanzando su máximo en el año 2019 y los primeros dos meses de 2020.

- La representación territorial relativa muestra un importante sesgo positivo hacia Madrid y Castilla y León, siendo adecuada para algunas CCAA como Castilla la Mancha, Murcia, Navarra, Galicia, Melilla y escasa para el resto. Sería conveniente corregir estos desequilibrios fomentando la participación en el programa de algunas CCAA y el intercambio de información con aquellas que lo estén realizando por sus medios.
- La detección de genomas por PCR en saliva es el marcador diagnóstico que ha ofrecido mayor rendimiento. La detección de IgM es complementaria pero tiene un valor predictivo negativo bajo en el contexto epidemiológico actual, y no sirve por sí misma para el diagnóstico de la infección y la clasificación de los casos.
- Durante este período ha circulado casi con exclusividad el genotipo G, y de forma predominante, una misma variante (MuVi/Sheffield.GBR/1.05/). Sin embargo, a partir de 2016 se observa una clara diversificación, estableciéndose circulación de varias variantes derivadas de (MuVi/Sheffield.GBR/1.05/ por evolución local.
- Durante el predominio de MuVi/Sheffield.GBR/1.05/ fue necesario desarrollar marcadores adicionales al gen SH para aumentar la discriminación. Dichos marcadores habrán de implementarse en el programa si volviese a darse una situación similar.
- Las medidas de control epidemiológico de la COVID-19, parecen haber disminuido drásticamente la incidencia de la enfermedad y en consecuencia, la demanda de determinaciones y de casos confirmados. Es necesario mantener la vigilancia para estudiar su impacto en los patrones de circulación del virus.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, 2013. Disponible en: <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Paginas/ProtocolosRENAVE.aspx>
2. World Health Organisation (WHO). Mumps Virus nomenclature update 2012. Wkly Epidemiol Rec. 2012. 87(22): 2017-2024.
3. Echevarría JE, Castellanos A, Sanz JC, Pérez C, Palacios G, Martínez de Aragón MV, Peña Rey I, Mosquera M, de Ory F, Royuela E. Circulation of mumps virus genotypes in Spain from 1996 to 2007. J Clin Microbiol. 2010; 48(4):1245-1254
4. Gavilán AM, Fernández-García A, Rueda A, Castellanos A, Masa J, López-Perea N, Torres de Mier MV, de Ory F, Echevarría JE. Non-coding sequences reveal hidden patterns of mumps virus circulation in Spain, Euro Surveill. 2018; 23(15): 1-8

Programa de Sarampión y Rubeola

Informe elaborado por A. Fernández-García^{1*}, J.E. Echevarría^{1*}, F. de Ory^{2*}, M.T. Pérez-Olmeda^{2†}, A. Castellanos^{1*}, S. Ruiz-Velazquez¹, A. M. Gavilan^{1*}, I. Perez-Grajera², P. Balfagon², J. de la Fuente², M.A. Murillo², M. Castillo².

¹Laboratorio de Referencia e Investigación en Enfermedades Víricas Inmunoprevenibles. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

²Laboratorio de Serología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de salud Carlos III.

*CIBER de Epidemiología y Salud Pública. CIBERESP.

†CIBER de Enfermedades Infecciosas. CIBERINFEC.

INTRODUCCIÓN

El sarampión y la rubeola son enfermedades víricas exantemáticas de gran importancia para la Salud Pública. El sarampión es una de las enfermedades más transmisibles y una de las principales causas de mortalidad infantil en el mundo, a pesar de ser inmunoprevenible. La rubeola puede dar lugar a una infección congénita provocando aborto espontáneo, muerte fetal o el síndrome de rubeola congénita (SRC), en función del tiempo de embarazo en el que se produce la primoinfección. Ambas enfermedades están sometidas a un proceso de eliminación liderado por la OMS. En España se aprobó el Plan Nacional de Eliminación (PNE) del Sarampión en el año 2001, en el 2008 se incorporaron la rubeola y el síndrome de rubeola congénita (SRC), y en 2021 se ha aprobado un nuevo Plan Estratégico 2021-2025¹. Hay dos estrategias relevantes para alcanzar la eliminación: cobertura de vacunación superior al 95% y vigilancia epidemiológica basada en el caso, que en España se enmarca en la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), gestionada por el Centro Nacional de Epidemiología (CNE) (ISCIII) y coordinada desde el Ministerio de Sanidad. La investigación de laboratorio se realiza en las Comunidades Autónomas (CCAA) y en el Laboratorio Nacional de Referencia para Sarampión y Rubeola (LNR-SR) del Centro Nacional de Microbiología (CNM) (ISCIII), que está acreditado por la OMS. Los protocolos de vigilancia de la RENAVE² recogen las definiciones, actividades y circuitos para la notificación, investigación y manejo de estas enfermedades. Para esta vigilancia es fundamental la integración de los datos epidemiológicos con los de laboratorio, habiéndose incluido ambos en la ficha epidemiológica de notificación de caso a la RENAVE, que queda recogida en la plataforma informática SIVIES. Para evaluar la calidad de la vigilancia y verificar la eliminación, se creó el Comité Nacional de Verificación de la Eliminación en el año 2012, que emite un informe anual para la OMS, en cuya elaboración participan el CNE, el CNM y el Ministerio de Sanidad.

La incidencia de ambas enfermedades en España ha disminuido notablemente gracias a la elevada cobertura de vacunación con la vacuna triple vírica, que se introdujo en 1981. La OMS declaró el sarampión eliminado en España en el año 2016 y la rubeola en 2015, por la ausencia de transmisión endémica en un período de al menos 36 meses. La etapa post-eliminación se caracteriza por la existencia de casos esporádicos y brotes importados o relacionados con la importación; desde el año 2017 se ha producido un pequeño aumento de los casos de sarampión, coincidente con el notable aumento de casos a nivel mundial y sobre todo a nivel europeo solo frenado por la llegada de la pandemia de COVID-19 en el año 2020. Asimismo, aumenta la proporción de casos de sarampión en personas correctamente vacunadas, como en otros países en situación de eliminación. Esto supone un reto tanto en la sospecha, puesto que en muchos casos se producen síntomas leves (sarampión modificado), como en el diagnóstico, dado que el valor predictivo de la IgM disminuye, cobrando especial importancia el diagnóstico molecular.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

La investigación de laboratorio de todos los casos sospechosos de sarampión y rubeola, es fundamental para la vigilancia. La disponibilidad de las diferentes técnicas de diagnóstico en los laboratorios de las CCAA es diversa. El CNM completa las capacidades no disponibles en los laboratorios autonómicos para asegurar la investigación de laboratorio en todo el territorio del Estado y además actúa como LNR-SR para la OMS, proporcionando la información necesaria a la RENAVE y a la Red Europea de Laboratorios de la OMS. Esto incluye el análisis molecular de los virus identificados, que ayuda a establecer el origen de los casos y brotes, a verificar la ausencia de endemidad y a vincular casos. Además, en el programa se incluye la confirmación de reactividades IgM en mujeres embarazadas y el diagnóstico de SRC.

DISEÑO DEL PROGRAMA

Sujetos de estudio: Paciente con sospecha clínica de sarampión, rubeola o SRC (RENAVE); Contacto de un caso confirmado; Mujer embarazada con resultados de laboratorio compatibles con infección reciente por virus de la rubeola; Neonato nacido de mujer con diagnóstico de rubéola confirmado por laboratorio durante el embarazo.

Participantes: Laboratorios implicados en la vigilancia de sarampión y rubeola en las CCAA. Es imprescindible haber notificado el caso a los Servicios de Salud Pública de la CCAA, que facilitarán el número identificador del Plan de Eliminación (Código SAR o RUB).

Muestras, condiciones de envío y análisis de laboratorio: El diagnóstico de laboratorio incluye técnicas de serología (detección de IgM, IgG y avidéz de IgG), de detección directa (RT-PCR, aislamiento) y la caracterización molecular de los virus (genotipado y análisis de variantes), siguiendo las recomendaciones de la OMS. Se deben recoger muestras de exudado faríngeo, orina y suero, con el fin de conseguir el máximo rendimiento en la clasificación de los casos, el diagnóstico de los casos con antecedente de vacunación reciente y la caracterización molecular de los virus. Es necesario completar un formulario con los datos epidemiológicos. Todas las muestras de sueros que llegan a través del programa se analizan simultáneamente para sarampión y rubeola; en cuanto a las RT-PCR se realiza una prueba múltiple que además de sarampión y rubeola incluye parvovirus B19, con el fin de hacer diagnóstico diferencial. Cuando existan antecedentes de viaje a zona endémica se estudian, además, los virus dengue, chikungunya y zika.

Tabla 1. Muestras y determinaciones del programa

Muestra	Obligatorio ¹	RT-PCR	Genotipado ⁷	IgM	IgG	Avidéz de IgG
Exudado faríngeo	SI	SI	SI	NO	NO	NO
Orina	SI	SI	SI	NO	NO	NO
LCR	SI ²	SI	SI	NO	NO	NO
Líquido amniótico	SI ³	SI	SI	NO	NO	NO
Aislado	NO	SI	SI	NO	NO	NO
Suero	SI ⁴	SI ⁵	NO	SI	SI	SI ⁶

1. Muestra necesaria para una investigación de laboratorio adecuada. 2. Solo si hay cuadro neurológico asociado. 3. Cuando el médico lo considere oportuno ante una sospecha en embarazada. 4. Se puede prescindir del envío de suero, si se informa del resultado de IgM e IgG, excepto en cualquier mujer embarazada, así como en casos esporádicos no ligados a brote. 5. Sólo en casos en los que no se disponga de otra muestra. 6. En cualquier mujer embarazada con IgM positiva es imprescindible realizar la determinación de avidéz de IgG. En las sospechas de fallo vacunal en sarampión se recomienda el envío del suero para su caracterización mediante avidéz de IgG (fallo primario o secundario). 7. Sólo si la muestra ha sido previamente positiva a PCR o aislamiento.

El genotipado se realiza sobre muestras sobre las que se haya detectado previamente el virus. En el virus del sarampión se utiliza la región N450 (450 nt)³ y en rubeola la región codificante de E1 (739 nt)⁴. Sin embargo, en la situación actual el genotipado de sarampión es insuficiente para describir con precisión los patrones de circulación de los virus y el origen de los casos. Por ello se realiza el análisis de haplotipos y variantes o “named strain”, que se definen como un grupo de secuencias (N450) idénticas al que se asigna el nombre de la más antigua, y que adquiere el grado de variante cuando se ha identificado en varios países durante un periodo de al menos dos años. Además del resultado de las determinaciones de diagnóstico (RT-PCR y serología), en el informe se emite el genotipo, el nombre de la cepa y del haplotipo/variante de acuerdo a la nomenclatura de la OMS³. Asimismo, se acompaña de una breve interpretación epidemiológica del resultado. En el año 2015 se incluyeron los campos de *nombre de cepa*, *haplotipo* y *variante* en la ficha epidemiológica de caso de sarampión y de rubeola, accesible en la plataforma SIVIES, para poder recoger la información molecular de los casos. El LNR-SR (CNM) aporta la información de secuencias de sarampión y rubeola a las bases de datos internacionales MeaNS y RubeNS, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El diagnóstico de sarampión y rubeola se lleva a cabo en el CNM desde hace décadas y el genotipado desde que comenzó el Programa Específico de Vigilancia Microbiológica (PEVM). El análisis de variantes de sarampión se incluyó en el año 2015. En este informe se incluye el análisis de los resultados obtenidos desde el año 2013 al 2020 (tabla 2 y 3). En cada tabla se incluyen datos epidemiológicos (CNE, SIVIES) y datos de aquellas muestras que llegan al CNM a través del PEVM como sospechas de sarampión o rubeola, respectivamente, aunque todas las muestras se analicen para ambos virus. Además, se incluyen los sueros que llegan para la caracterización y confirmación de reactividades a IgM de rubeola en mujeres embarazadas.

Según los datos facilitados por el CNE, en la mayoría de los casos sospechosos de sarampión y rubeola se realiza investigación de laboratorio (96,2% y 90,8%) y la mayoría de los casos se confirman de este modo, superando los criterios de calidad de la vigilancia de la OMS. Más de la mitad de los casos confirmados de sarampión se genotipan (58,5%) y, aunque en rubeola el porcentaje es mucho menor (24,1%), en ambas enfermedades se supera el genotipado del 80% de los brotes, marcado como estándar de calidad por OMS. El diagnóstico de los casos se realiza mayoritariamente en las CCAA, especialmente en sarampión, siendo el total de los casos estudiados en el CNM de un 35,7%. Sin embargo, el genotipado se realiza en la mayoría de los casos en el CNM (55,0 % en sarampión y 85,7% en rubeola). Estos porcentajes varían a lo largo de los años, en función de las CCAA en las que han tenido lugar los brotes y sus capacidades diagnósticas.

En la mayoría de las muestras del PEVM se solicitó la detección de ARN vírico por RT-PCR en sarampión (tabla 2) y de suero para la determinación de IgM y avidez de IgG en rubeola (tabla 3), probablemente debido al envío de numerosas muestras para la confirmación de IgM en mujeres embarazadas. La muestra que presentó mayor rendimiento diagnóstico fue el exudado faríngeo tanto en sarampión como en rubeola (61,8% y 70,0% del total de los positivos). El exudado faríngeo es, además de más fácil de obtener en el momento de la consulta, la muestra óptima para la identificación del virus hasta los 5 días tras el inicio del exantema, y estos casos se suelen estudiar de forma temprana. Gracias a la utilización de una RT-PCR múltiple se identificó PVB19 en 46 casos sospechosos de sarampión y 10 de rubeola. Así mismo se identificó el virus de la rubeola en 6 casos sospechosos de sarampión y el virus del sarampión en 3 sospechas de rubeola.

De los 497 sueros recibidos para sarampión, un 27,4 % fueron positivos a IgM. En situación de baja circulación del virus, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de la IgM disminuye, por lo que es necesario utilizar técnicas complementarias como la determinación de avidez de IgG sobre el mismo suero y la detección genómica para una correcta clasificación de los casos. La secuenciación del genoma además es imprescindible para clasificar los casos con antecedente de vacunación reciente, mediante la identificación o no de la cepa vacunal. En el caso de la rubeola, de los 493 sueros recibidos, un 14,6% fueron positivos a IgM y se realizó la determinación de la avidez de IgG en 287 casos.

Tabla 2. Resultados de vigilancia microbiológica de sarampión en el CNM entre 2013 y 2020.

PEVM SARAMPIÓN	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020 ^c	TOTAL
Casos totales notificados (SIVIES) ^a	217	339	115	98	304	363	606	159	2201
Casos estudiados por laboratorio (SIVIES) ^a (% de notificados)	203 (93,5)	335 (98,8)	104 (90,4)	90 (91,8)	293 (96,4)	351 (96,7)	587 (96,9)	154 (96,9)	2117 (96,2)
Casos confirmados (SIVIES) ^a	131	158	37	35	161	225	287	88	1122
casos confirmados por laboratorio (SIVIES) ^a (% de confirmados)	110 (84,0)	150 (94,9)	32 (86,5)	27 (77,1)	151 (93,8)	214 (95,1)	273 (95,1)	84 (95,5)	1041 (92,8)
Casos genotipados (SIVIES) ^{ab} (% de confirmados)	75 (57,3)	92 (58,2)	16 (43,2)	21 (60,0)	96 (59,6)	125 (55,6)	181 (63,1)	50 (56,8)	656 (58,5)
numero de brotes (SIVIES) ^a	11	5	4	3	16	13	17	2	71
numero de brotes genotipados (SIVIES) ^a (% de brotes)	8(72,7)	5 (100,0)	4 (100,0)	3 (100,0)	14 (87,5)	11 (84,6)	16 (94,1)	2 (100,0)	63 (88,7)
Casos estudiados CNM (% de estudiados por laboratorio)	112 (55,2)	8 (2,39)	13 (12,5)	14 (15,6)	135 (46,0)	231 (65,8)	225 (38,3)	18 (11,7)	756 (35,7)
casos genotipados en CNM ^b (% respecto a genotipados)	36 (48,0)	11 (12,0)	5 (31,2)	11 (52,4)	47 (49,0)	108 (86,4)	127 (70,2)	13 (26,00)	358 (55,0)
Muestras estudiadas en CNM ^c	195	104	78	75	255	360	606	59	1732
Muestras estudiadas para PCR en CNM	195	76	43	69	254	354	427	35	1453
PCR positivas (% de las estudiadas para PCR)	68 (34,9)	16 (21,0)	6 (13,9)	22 (31,9)	53 (20,9)	144 (40,7)	160 (37,5)	8 (22,9)	477 (32,8)
Ex. Faríngeos positivos (% del total de PCR pos)	40 (58,8)	9 (56,3)	5 (83,3)	13 (59,0)	25 (47,2)	83 (57,6)	114 (71,3)	6 (75,0)	295 (61,8)
Orinas positivas (% del total de PCR pos)	25 (36,8)	7 (43,7)	1 (16,7)	8 (36,4)	23 (43,4)	56 (38,9)	42 (26,2)	2 (25,0)	164 (34,4)
Sueros positivos (% del total de PCR pos)	3 (4,4)	0	0	1 (4,5)	5 (9,4)	5 (3,5)	4 (2,5)	0	18 (3,8)
Muestras suero estudiadas para serología en CNM	10	33	42	22	73	55	233	29	497
IgM positivas (% de las estudiadas serología)	3 (30,0)	3 (9,1)	2 (4,7)	5 (22,7)	22 (30,1)	20 (36,4)	71 (30,5)	10 (34,5)	136 (27,4)
Avidez de IgG sarampión ^d	0	0	0	0	49	36	205	22	312
Diagnóstico diferencial : PVB19 positivos por PCR	3	1	3	1	4	15	17	2	46
Diagnóstico diferencial : RUB positivos por PCR	0	2	1	0	0	2	1	0	6

^aDatos analizados por Noemí López Perea y Josefa Masa Calles, del Centro Nacional de Epidemiología (ISCIII), e incluidos en los informes anuales.

^bSe excluyen los casos de genotipo A[vac], descartados.

^cSe presentan los datos de las muestras totales, generalmente más de una por cada caso estudiado (suero y exudado faríngeo/orina).

^dLa avidéz de IgG de sarampión comenzó a realizarse en el CNM en el año 2017.

^eLa actividad de los programas específicos de vigilancia microbiológica del CNM cesó entre el 17 de marzo y el 15 de junio por la respuesta a COVID-19

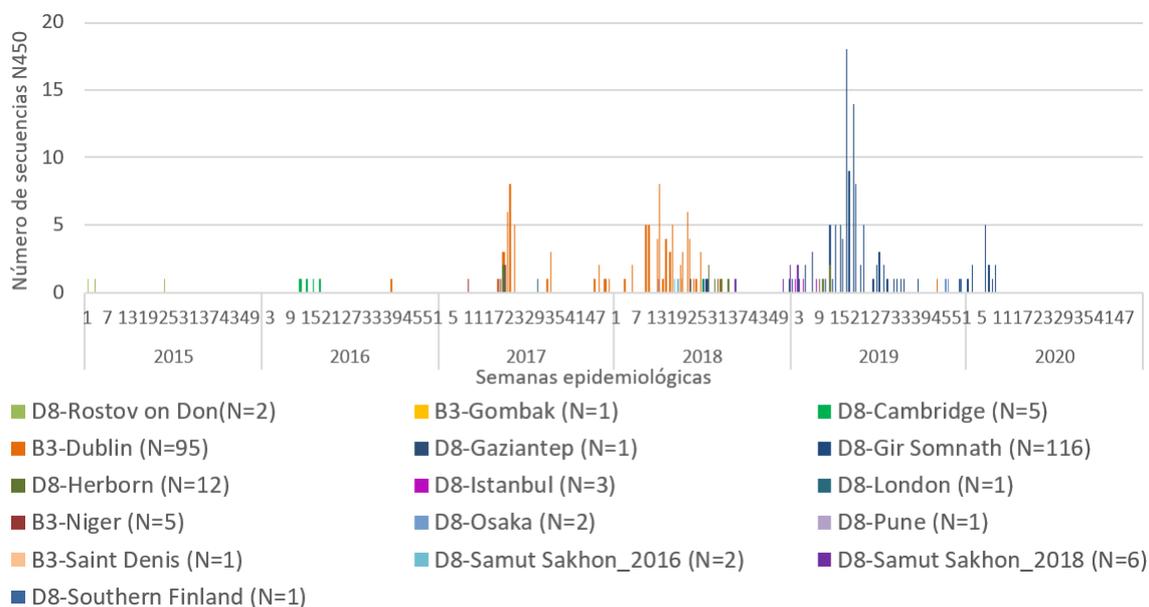
Tabla 3. Resultados de vigilancia microbiológica de rubeola en el CNM entre 2013 y 2020.

PEVM RUBEOLA	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020 ^c	TOTAL
Casos totales notificados (SIVIES) ^a	18	22	29	10	16	21	22	3	141
Casos estudiados por laboratorio (SIVIES) ^a (% de notificados)	17 (94,4)	16 (72,7)	27 (93,1)	10 (100)	16 (100)	20 (95,2)	19 (86,4)	3 (100)	128 (90,8)
Casos confirmados (SIVIES) ^a	2	4	4	2	1	12	3	1	29
Casos confirmados por laboratorio (SIVIES) ^a (% de confirmados)	2 (100,0)	3 (75,0)	3 (75,0)	2 (100,0)	1 (100,0)	8 (66,7)	0 (0,0)	1 (100,0)	20 (69,0)
Casos genotipados (SIVIES) ^{ab} (% de confirmados)	0 (0,0)	2 (50,0)	1 (25,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (24,1)
numero de brotes (SIVIES) ^a	0	1	0	0	0	2	1	0	4
numero de brotes genotipados (SIVIES) ^a (% de brotes)	0	1 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (100,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	4 (100,0)
casos SRC confirmados ^a	1	1	0	0	0	0	0	0	2
casos SRC genotipados ^a	1	1	0	0	0	0	0	0	2
Casos estudiados CNM (% de estudiados por laboratorio)	8 (47,1)	11 (68,8)	10 (37,0)	2 (20,0)	6 (37,5)	17 (85,0)	12 (63,2)	2 (66,7)	68 (53,1)
casos genotipados en CNM ^b (% respecto a genotipados)	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (85,7)
Muestras estudiadas en CNM ^c	15	59	61	27	70	68	258	23	581
Muestras estudiadas para PCR en CNM	15	19	18	26	10	21	34	3	146
PCR positivas (% de las estudiadas para PCR)	2 (13,3)	2 (10,5)	0 (0,0)	2 (13,3)	0 (0,0)	3 (14,3)	1 (2,9)	0 (0,0)	10 (6,8)
Ex. Faringeos positivos (% del total de PCR pos)	1 (50,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (100,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	7 (70,0)
Orinas positivas (% del total de PCR pos)	1 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (10,0)
Sueros positivos (% del total de PCR pos)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Muestras suero estudiadas para serología en CNM	3	42	51	17	64	55	233	28	493
IgM positivas (% de las estudiadas serología)	1 (33,3)	4 (9,5)	9 (17,6)	2 (11,8)	4 (6,3)	21 (38,2)	24 (10,3)	7 (25,0)	72 (14,6)
Avidez de IgG rubeola	0	15	16	17	64	55	92	28	287
Diagnóstico diferencial : PVB19 positivos por PCR	0	1	0	3	2	4	0	0	10
Diagnóstico diferencial : SAR positivos por PCR	2	1	0	0	0	0	0	0	3

Notas al pie en la tabla 2.

En sarampión de los 358 casos confirmados genotipados, 17 fueron genotipo D4, 130 de genotipo B3 y 211 de genotipo D8. Además, en 29 casos, se identificó la cepa vacunal siendo casos descartados. La circulación de genotipos de sarampión en España ha seguido el patrón del resto de países europeos, siendo el predominante el genotipo D4 desde el año 2008 hasta fines del 2012. En el año 2013 el genotipo D4 fue reemplazado por cepas del genotipo D8 y B3, que han sido predominantes hasta el año 2020. En la actualidad, el genotipo no tiene mucha utilidad en sarampión para estudiar los patrones de circulación y confirmar el origen de los casos, puesto que circula el mismo en numerosos países, con lo que es necesario incorporar el análisis de las secuencias para determinar el haplotipo y variante o “named strain”. En la **figura 1** se muestran los resultados de dicho análisis en las muestras estudiadas en el PEVM, desde que se incorporó a la vigilancia en tiempo real en 2015. En los últimos años han circulado variantes predominantes coincidentes con el resto de Europa, lo que limita la capacidad de este análisis para trazar las cadenas de transmisión y vincular casos entre sí. Por ello se ha desarrollado una RT-PCR en el CNM que permite amplificar la región no codificante MF NCR⁵, aunque su aplicación para la vigilancia aún está en estudio. En cuanto a la rubeola el genotipo predominante ha sido el 2B, a excepción de un brote importado de Filipinas de genotipo 1J. Sólo se han identificado 2 SRC en el periodo de estudio, ambos de genotipo 2B.

Figura 1. Distribución de las variantes de sarampión identificados en el CNM por semanas epidemiológicas, desde 2015 a 2020. Las variantes predominantes se resaltan en negrita. N= número de secuencias.



CONCLUSIONES

- El PEVM de Sarampión y Rubeola del CNM se implantó con el fin de cumplir con las recomendaciones del Plan de Eliminación de Sarampión y Rubeola, que a su vez se ajusta a las recomendadas por la OMS.

- El diagnóstico de laboratorio de sarampión y rubeola se realiza fundamentalmente en los laboratorios de origen de las CCAA; el CNM actúa como laboratorio de referencia para dotar de todas las técnicas necesarias en caso de no disponer de ellas, para la confirmación de los resultados, y la notificación de los datos de laboratorio a la OMS, incluyendo el genotipado y análisis de variantes.
- La detección de genomas por PCR en exudado faríngeo es la técnica diagnóstica que ha ofrecido el mejor rendimiento diagnóstico, debido a que la toma de muestras suele ser temprana y que la IgM puede no ser detectable en los primeros días tras del inicio del exantema. Además, en el contexto epidemiológico actual la detección de IgM tiene un valor predictivo negativo y positivo bajo, y no sirve por sí misma para el diagnóstico de la infección, en ausencia de vínculo epidemiológico o fuerte sospecha clínica.
- La integración de los datos epidemiológicos y de laboratorio en la vigilancia es fundamental para la clasificación de los casos y la verificación de la eliminación en esta etapa de post-eliminación. El análisis de variantes en tiempo real ha permitido mejorar el estudio del patrón de circulación de los virus, la confirmación del origen de los casos y la vinculación de los casos.
- Las medidas de control llevadas a cabo en la pandemia de la COVID-19 han provocado una disminución muy notable de la incidencia de las dos enfermedades, y por tanto en la demanda de determinaciones del PEVM, así como en el número de casos confirmados. Es necesario mantener la vigilancia para estudiar su impacto en los patrones de circulación de los virus en el futuro inmediato.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Plan estratégico para la eliminación del sarampión y la rubeola en España. Ministerio de Sanidad. Enero 2021. https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/vacunaciones/sarampion-rubeola/docs/PlanEstrategico_SarampionyRubeola.pdf
2. Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Madrid, 2013. Centro Nacional de Epidemiología. *Instituto de Salud Carlos III. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.*
3. World Health Organization. Measles virus nomenclature update: 2012. Weekly epidemiological record, 2012, 87: 73-80.
4. World Health Organization. Rubella virus nomenclature update: 2013. Weekly epidemiological record, 2013, 88, 337-348.
5. Gil H, Fernández-García A, Mosquera MM, Hübschen JM, Castellanos AM, de Ory F, Masa-Calles J, Echevarría JE. Measles virus genotype D4 strains with non-standard length M-F non-coding region circulated during the major outbreaks of 2011-2012 in Spain. PLoS One. 2018 Jul 16;13(7):e0199975.

Enfermedades víricas transmitidas por vectores

Informe elaborado por M.P Sánchez-Seco*, A. Vázquez†, A. Negro*, MT. Pérez-Olmeda*, L. Herrero, F. Molero, J. de la Fuente, P. Balfagón, M.A. Murillo, L. Hernández, I. Pérez-Grajera y M. Castillo.

Laboratorio de Referencia e Investigación en Serología y Arbovirus. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

*CIBER de Enfermedades Infecciosas. CIBERINFEC.

†CIBER de Epidemiología y Salud Pública. CIBERESP.

INTRODUCCIÓN

Los virus transmitidos por vector son un grupo muy heterogéneo de agentes virales cuya característica común es la ruta de infección: se transmiten mediante la picadura de un artrópodo infectado. De ellos, el dengue es la infección vírica más frecuente transmitida por mosquitos del género *Aedes*. Más de 3900 millones de personas en más de 129 países corren el riesgo de contraer dengue, y se estima que cada año se registran 96 millones de casos sintomáticos y 40 000 muertes. Entre las otras enfermedades víricas de transmisión vectorial se encuentran la fiebre chikungunya, la fiebre por el virus de Zika, la fiebre amarilla, la fiebre del Nilo Occidental o West Nile, la encefalitis japonesa (todas ellas transmitidas por mosquitos) y la encefalitis transmitida por garrapatas. En España y otros países mediterráneos es importante también la infección por virus Toscana que puede producir cuadros de meningitis aséptica y en los últimos años se han descrito casos de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo.

La mayor carga de estas enfermedades, que afectan de forma desproporcionada a las poblaciones más pobres, corresponde a las zonas tropicales y subtropicales. Desde 2014, grandes brotes de dengue, chikungunya, fiebre amarilla y enfermedad por el virus de Zika han azotado a diferentes poblaciones, cobrándose vidas y abrumando los sistemas de salud en muchos países. La distribución de las enfermedades de transmisión vectorial está determinada por un conjunto complejo de factores demográficos, medioambientales y sociales.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

La vigilancia microbiológica de enfermedades víricas transmitidas por vector (EVTV) en España, en el marco del RD 1940/2004 sobre vigilancia de zoonosis, en el que el CNM es designado Laboratorio Nacional de Referencia para infecciones en humanos, incluye los virus transmitidos por artrópodos entre las zoonosis y los agentes zoonóticos que deben ser objeto de vigilancia como son hantavirus y arenavirus de importancia en salud pública. Además, la Dirección General de Salud Pública tiene encomendada al CNM como Laboratorio Nacional de Referencia, las actividades de vigilancia de las fiebres hemorrágicas virales (Pleno del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud del 26 de marzo de 2003) y para la viruela (Pleno del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud de 15 de abril de 2002 <http://www.boe.es/boe/dias/2004/10/01/pdfs/A32772-32777.pdf>).

Las EVTV son consideradas como Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO) desde 2014 y están recogidas, en su mayoría, en los protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) aprobados en 2013.

Patógenos involucrados: Riesgo Biológico 3: virus dengue (VDEN), fiebre amarilla (VFA), West Nile (VWN), encefalitis japonesa, encefalitis de St. Louis (VESL), encefalitis transmitidas por garrapatas (VETG) y otros virus del género Flavivirus; virus chikungunya (VCHIK), Sindbis, encefalitis equinas americanas y otros virus del género Alphavirus; virus del género Hantavirus; virus de la fiebre del Valle del Rift, encefalitis de California y otros virus de la familia Bunyaviridae; virus de la coriomeningitis linfocitaria (VLCM); virus Monkeypox. Riesgo Biológico 2: virus Toscana (VTOS), Granada y otros virus del género Phlebovirus; virus Cowpox y otros virus del género Orthopoxvirus o virus Zika (VZIK). En la actualidad, se recogen también algunos patógenos de clase 4 como el Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (VFHCC) aunque al causar generalmente alertas sanitarias no son estudiados en el Plan de Vigilancia sino como resolución de brotes.

Objetivos: Identificar los casos de infección por agentes víricos exóticos en viajeros internacionales que regresan a España sospechosos de EVTV por criterios clínicos y de localización geográfica. Caracterizar las cepas de virus involucradas, vigilar la aparición de casos secundarios; Identificar los casos de infección sospechosos de EVTV autóctonos por criterios clínicos, de localización y de estacionalidad. Detectar cambios en la frecuencia y la distribución geográfica de las EVTV que sean autóctonas de España.

DISEÑO DEL PROGRAMA

Sujetos de estudio: Viajeros internacionales con sospecha clínica, de localización y de estacionalidad de patología viral importada relacionada con los agentes exóticos considerados; Pacientes con enfermedad aguda, con inicio de síntomas dentro de las estaciones de actividad de los vectores involucrados en la transmisión de virus autóctonos en España, o en cualquier otro contexto medioambiental de riesgo, que muestren resultados negativos en origen para los agentes no transmitidos por vector relacionados con su etiología; Pacientes con

marcadores positivos de infección aguda reciente por cualquiera de los agentes considerados en los que se requiera confirmación del diagnóstico; Casos de posible infección secundaria en torno a los casos índice detectados.

Participantes: Cualquier laboratorio de microbiología hospitalaria de la red pública y los laboratorios de salud pública de las CCAA.

TIPO DE MUESTRA Y CONDICIONES DE ENVÍO:

Aunque inicialmente se reconocían sólo suero, sangre anticoagulada con citrato, preferentemente para cultivo celular, líquido cefalorraquídeo o tejidos, actualmente se ha ampliado a otros fluidos como pueden ser el semen, saliva y, sobre todo, la orina o tejidos como placenta.

Al tratarse de virus con ARN como genoma las muestras han de enviarse refrigeradas con acumuladores de hielo y por el medio más rápido posible y, por supuesto, los envíos siempre deben cumplir las normas de bioseguridad.

METODOLOGÍA:

La metodología empleada es muy variada y ha sufrido modificaciones desde su inicio. Actualmente tenemos métodos de RT-PCR para, entre otros, VWN, VTOS, VDEN, VCHIK, VFA, VZIK, VESL, Virus de las encefalitis equinas americanas, virus Mayaro y VLCM. RT-PCR-nested convencional para Flavivirus, Alphavirus, Phlebovirus, Bunyavirus, Hantavirus, detección de antígeno NS1 para VDEN, detección de IgM/IgG para: VWN, VETG, VTOS, VLCM, VDEN, VCHIK, VFA, VZIK, VFHCC, o Hantavirus. La técnica de neutralización viral es confirmatoria en el diagnóstico serológico, y en algunos casos es necesaria y se utiliza de rutina como en el caso de la infección por el virus zika en las embarazadas.

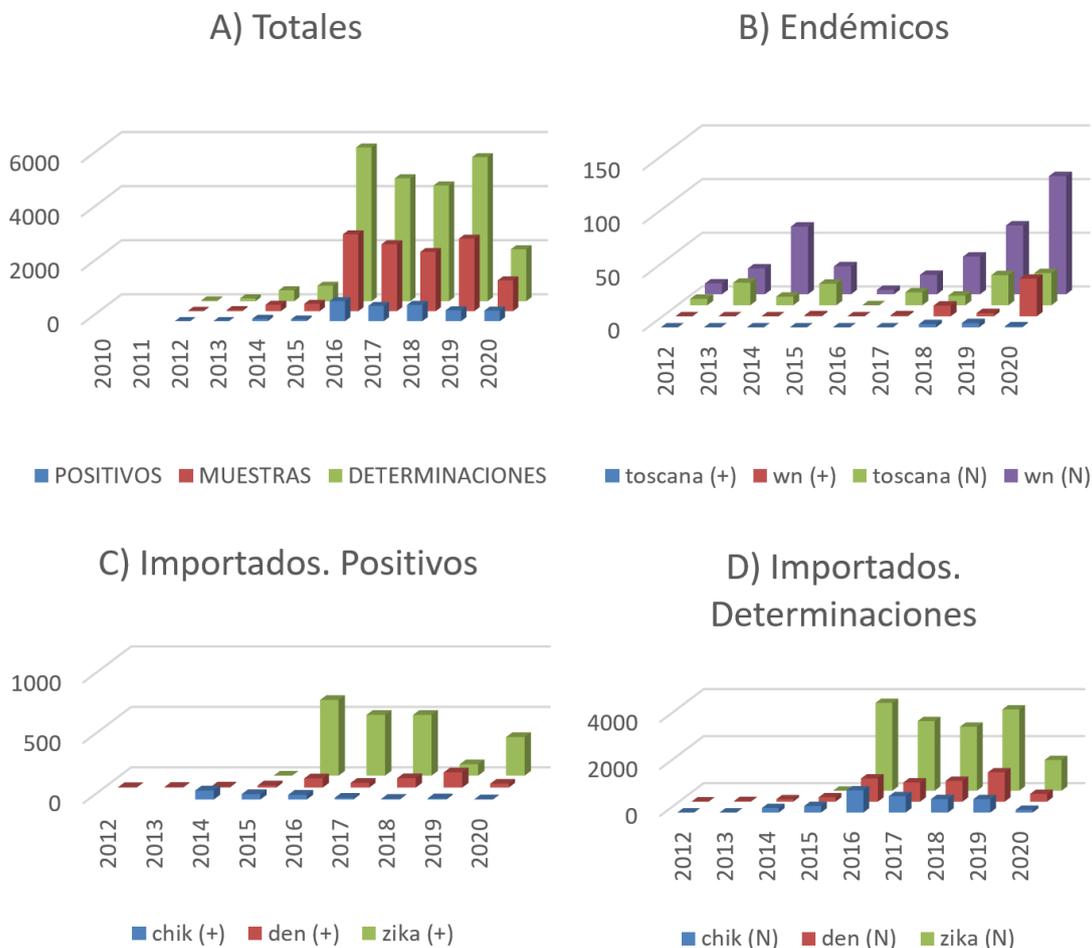
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El diagnóstico de estos virus comenzó a hacerse en el CNM alrededor del inicio del siglo XXI mediante proyectos de investigación. Las técnicas que se fueron desarrollando se implementaron y se ofrecieron en la Cartera de Servicios del Centro y se fue concienciando a los clínicos del país para que buscaran estos agentes. Se buscan los virus endémicos en España en pacientes que no han salido del país y los importados en viajeros procedentes de zonas endémicas por lo que las grandes epidemias sufridas en el mundo a lo largo de estos años se reflejan en un mayor incremento de peticiones diagnósticas de esos agentes. El efecto se ve más si se producen en regiones como Sudamérica con las que tenemos una fuerte relación que se traduce en un gran intercambio de viajeros que vuelven de dicha región. Un aspecto relevante es también la búsqueda de infecciones secundarias de virus como VCHIK, VDEN o VZIK que pueden entrar a través de pacientes virémicos y para los que tenemos vector transmisor (el mosquito *Aedes albopictus*).

El programa de Vigilancia se inicia en 2012. En este año se analizaron 16 muestras en las que se pide diagnóstico de VDENV, VWN, VLDM y VTOS (ver Figura 1, panel A). Las peticiones aumentan a 43 al año siguiente. Sin embargo, el primer aumento importante se produce en 2014 y 2015 (238 muestras en 2014 y 271 en 2015) reflejando la epidemia producida por VCHIK al llegar a Sudamérica a finales de 2013 y expandirse por la región de forma explosiva (Figura 1, paneles A y D). Sin embargo, en 2016 se produce la gran epidemia por VZIK en esa región y se asocia a este virus con malformaciones fetales, además de la capacidad de transmisión sexual. Este hecho marcó la actividad del laboratorio que recibió dicho año 2845 muestras con peticiones de diagnóstico de infección aguda (PCRs, detección de antígeno y/o de IgM). Desde ese momento, se ha mantenido por encima de las 2000 peticiones/año (2480, 2192, 2685 en 2017, 2018 y 2019 respectivamente) excepto en 2020 (sólo 1140) debido a las restricciones en los viajes por la pandemia de COVID-19. La emergencia de VZIK ha hecho que ahora sea un virus a considerar en el paciente con síndrome febril inespecífico que viene de zona endémica y que haya de ser vigilado, especialmente en todas las mujeres embarazadas procedentes de zona endémica, por su alto grado de infección asintomática. La reactividad cruzada existente entre los flavivirus hace que se hayan tenido que implementar técnicas de mayor complejidad en la rutina diagnóstica, por su laboriosidad y el nivel de bioseguridad requerido para el trabajo con algunos de estos virus como VDENV y VZIK, como la neutralización del crecimiento viral (NT). Desde 2016 se produce, por tanto, un aumento de diez veces el número de muestras a procesar y, además, la necesidad de realizar NT en un gran número de ellas. Así, hasta 2016, el diagnóstico molecular por PCR suponía el 58% de las determinaciones realizadas, frente a un 41,4% para la detección de IgM mediante ELISA y/o IFI. A partir de 2016, las PCRs suponen el 12,6% de las determinaciones realizadas, la detección de IgM supone el 47,3% y la NT el 24,2%. Además, la detección de antígeno NS1 para VDENV representa aproximadamente el 2,7% de las peticiones. De este grupo de técnicas las que peor rendimiento diagnóstico tienen son las de detección directa (PCR con un 5,6% de determinaciones positivas en el total de PCRs realizadas y detección de NS1 con 9,3%). La ventaja de este tipo de técnicas es que una detección positiva con ellas nos indica que estamos ante un caso confirmado. En el caso de la detección de IgM el 25,6% de las determinaciones han sido positivas pero la desventaja de esta técnica es que, como ya se ha dicho, la reactividad cruzada entre virus del mismo serogrupo, que epidemiológica y clínicamente no pueden ser diferenciados, hace que no sean técnicas confirmatorias y el caso quede categorizado como caso probable. Finalmente, la NT supone que un 38,4% de las determinaciones tienen un resultado positivo. De nuevo, la reactividad cruzada, incluso para una técnica más específica como esta, requiere de NT frente a los otros virus que pudieran estar dando reactividad cruzada, algo que no es posible realizar en la rutina diagnóstica del CNM, por lo que, en este caso, lo relevante es que en el 61,6% de las determinaciones no se han obtenido anticuerpos neutralizantes frente a VZIK y, en esos casos, se puede descartar la infección por este agente.

A nivel de las muestras estudiadas, el suero es la muestra mayoritaria representando más del 90%. Las muestras clásicas recibidas durante este tiempo han sido también sangre y LCR pero en los últimos años, sobre todo con los avances debidos a la aparición de VZIK la orina se presenta como una alternativa diagnóstica a tener en cuenta.

Figura 1. Muestras totales y positivas recibidas en el CNM para diagnóstico de virus endémicos (VTOS y VWN) e importados (VCHIK, VDEN y VZIK). Panel A: determinaciones totales y positivas. Panel B: determinaciones totales y determinaciones positivas para VTOS y/o para VWN. Panel C: determinaciones positivas para VDEN, VCHIK y VZIK. Panel D: determinaciones totales para VDEN, VCHIK y VZIK.



En cuanto al diagnóstico de los virus endémicos (VWN y VTOS), las peticiones para diagnóstico de VTOS que se hacen al CNM son pocas (Ver [Figura 1, panel B](#)) ya que, al ser un virus cuya circulación en España está descrita desde 1991, muchos laboratorios han implementado su diagnóstico enviando pocas muestras al CNM en su papel de laboratorio primario y ninguna para confirmación. Sin embargo, el VWN ha producido casos humanos de forma esporádica hasta que en 2020 produjo un brote en Andalucía y Extremadura con 77 casos confirmados. El CNM recibe en sus dos vertientes de laboratorio primario y de referencia muestras para la detección/caracterización de la infección por este virus. El brote de 2020 se ve reflejado en las gráficas con un aumento tanto en el número de determinaciones como de resultados positivos.

En el caso de los virus importados, vemos un incremento en el año 2014 (Ver [Figura 1, panel C](#)) a raíz de la llegada de VCHIK al continente americano a finales de 2013 y su posterior expansión. Posteriormente, la llegada en 2016 de VZIK ha hecho que el diagnóstico diferencial entre VZIK, VCHIK y VDEN suponga un incremento en el diagnóstico de los tres virus y, como ya se ha dicho, la rutina diagnóstica se ha visto modificada desde entonces. El diagnóstico de VDEN ha sido el más estable, aunque es un virus en claro ascenso tanto en el número de peticiones diagnósticas como en los resultados positivos ([Figura 1, paneles C y D](#)). Dentro de este Programa se han estudiado los casos autóctonos de infección por VDEN en 2018 así como la posible transmisión sexual del virus estudiada en 2019.

CONCLUSIONES

- El presente programa de vigilancia se ha implantado al objeto de satisfacer las recomendaciones de la OMS y la RENAVE sobre vigilancia de virus transmitidos por vector y virus relacionados.
- La adherencia al programa ha ido incrementándose con el tiempo, desde su implantación y la tendencia es que siga en ascenso.
- Este programa es dinámico y se va adaptando a nuevas situaciones producidas por la emergencia y/o re-emergencia de determinados patógenos.
- La emergencia de estos agentes en cualquier parte del mundo tiene repercusión en el número de viajeros que llegan a nuestro país con sospecha de infección por dichos virus.
- Aunque la detección de IgM tiene un rendimiento diagnóstico más alto debido, posiblemente, a la escasa duración de la viremia y la dificultad de detección mediante métodos directos, presenta la dificultad de interpretación de resultados por la reactividad cruzada.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Madrid, 2013. Centro Nacional de Epidemiología. *Instituto de Salud Carlos III. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica*.
2. Martínez Yoldi MJ, Pérez Ruiz M, Sánchez-Seco Fariñas MP, Vázquez González A. Diagnóstico microbiológico de las principales arbovirosis importadas y autóctonas. 2020. 68. Miguel Julián Martínez Yoldi (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2020.

Programa de Rabia

Informe elaborado por J.E. Echevarría^{1*}, J.M. Berciano¹, M. Vera¹, S. Vázquez-Morón¹, V. Sardonís¹, C. Aznar-López¹, A. Avellón^{1*}, F. de Ory^{2*}, M.T. Pérez-Olmeda^{2†}, A. Fernández- García^{1*}, A. Tenorio¹.

¹Laboratorio de Referencia e Investigación en Enfermedades Víricas Inmunoprevenibles. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

²Laboratorio de Serología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de salud Carlos III.

*CIBER de Epidemiología y Salud Pública. CIBERESP.

†CIBER de Enfermedades Infecciosas. CIBERINFEC.

INTRODUCCIÓN.

De acuerdo a los protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), un caso sospechoso de rabia se define como una encefalomiелitis aguda en la que concurren algunos otros síntomas característicos. La confirmación de los casos sospechosos o probables solo es posible mediante diagnóstico de laboratorio. No hay tratamiento eficaz y la letalidad es del 100% tras inicio de síntomas, aunque existen vacunas eficaces y seguras que pueden ser usadas tanto para profilaxis pre-exposición, como post-exposición en combinación con inmunoglobulina específica. Si bien la mayoría de las 59.000 muertes anuales por rabia estimadas en el mundo son producidas por el virus de la rabia (RABV) transmitido por el perro, cualquier mamífero del orden *Carnivora* y muchos murciélagos americanos pueden ser reservorios del virus. Otros mamíferos pueden infectarse y eventualmente transmitir RABV de forma limitada. Fuera de América, los murciélagos son portadores de otros virus del mismo género (*Lyssavirus*), todos ellos capaces de producir infección neurológica en ratones en condiciones experimentales, aunque solo cinco de ellos han causado un total de menos de 20 casos de rabia humana. La vacunación canina y felina es la base del control de la rabia urbana y a la postre de la humana. España era un país endémico para rabia canina hasta que fue eliminada en 1965, rebrotando en 1975 en la provincia de Málaga en forma de un brote que se extendió hasta 1978 afectando a más de 100 animales y causando una víctima humana. Desde entonces solo se registran casos importados de manera regular en las ciudades autónomas de Ceuta y Melilla, ya que los territorios circundantes son altamente endémicos. Se producen, sin embargo, con cierta regularidad en Europa, casos caninos importados desde áreas endémicas, muy especialmente Marruecos. Varios de ellos se han declarado en Francia tras tránsito por territorio español. En el año 2013, tuvimos un caso canino en Toledo importado desde Marruecos que fue causa de alerta epidemiológica. La epizootia vulpina europea fue controlada mediante vacunación con cebos orales

antes de que nos alcanzase, estando actualmente prácticamente ausente de la UE. Los últimos casos autóctonos de rabia humana ocurrieron en Málaga (1975) y Melilla (1978). Desde entonces solo hemos tenido tres casos humanos importados desde Marruecos (2004, 2014, 2019).

En España se han declarado hasta el momento 40 casos de murciélagos infectados por lisavirus europeo de murciélago tipo 1 (EBLV-1) y uno por lisavirus de murciélago Lleida (LLEBV). Este último virus no es neutralizado por anticuerpos inducidos por vacuna. Ninguno de los cinco casos humanos transmitidos por murciélagos europeos ha ocurrido en España.

En España, la vigilancia de rabia humana se realiza en el contexto de la RENAVE. La vigilancia de rabia animal se basa esencialmente en los casos en los que ha habido agresión a personas y en menor medida en las sospechas clínicas. En los últimos años, la incorporación de los centros de recuperación de fauna salvaje ha permitido mejorar mucho la vigilancia en murciélagos. La rabia, tanto humana como animal, es una enfermedad de declaración obligatoria a nivel nacional (Ministerio de Sanidad y Ministerio de Agricultura) como internacional (OMS, OIE, EFSA).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

El CNM es laboratorio nacional de referencia para los casos de zoonosis en el hombre y en los animales sospechosos de rabia al amparo del RD 1940/2004. Actualmente, solo Aragón y la Comunidad Valenciana disponen de laboratorios de rabia, por lo que el CNM actúa, además, de laboratorio primario para el resto del Estado.

Los objetivos del programa son:

- Garantizar la disponibilidad del diagnóstico de laboratorio de la rabia en todo el Estado a fin de orientar las actuaciones pertinentes.
- Proporcionar al Sistema de Vigilancia datos de laboratorio con los que poder elaborar indicadores epidemiológicos fiables en todo el territorio y confeccionar los informes periódicos para la declaración internacional a la OMS, OIE y EFSA.

DISEÑO DEL PROGRAMA

Sujetos de estudio:

- Paciente con sospecha clínica de rabia (RENAVE).
- Mamífero no humano que:
 - Ha agredido a una persona y presenta antecedentes epidemiológicos compatibles, o ha muerto durante el período de observación (solo perros y gatos).
 - Presenta síntomas clínicos compatibles a juicio de un veterinario.
 - Es un murciélago y ha sido encontrado muerto o moribundo.

Participantes. Abierto. Es imprescindible haber declarado el caso a las autoridades de salud pública o salud veterinaria.

Tabla 1. Muestras y determinaciones.

Muestra	Animal	Humano ante-mortem	Detección de antígenos	PCR RABV-EBLV1	PCR genérica lisavirus	IgG
Encéfalo*	SI	NO	SI	SI	SI	NO
Biopsia ** piel nuca	NO	SI	SI	SI	SI	NO
Saliva	NO	SI	NO	SI	SI	NO
LCR	NO	SI	NO	SI	SI	NO
Suero***	NO	SI	NO	NO	NO	SI

* Para animales del tamaño de una rata o menores, se enviará el cadáver entero.

** Imprescindible para diagnóstico ante-mortem de casos humanos. Debe contener folículo piloso.

*** En ausencia de antecedentes de vacunación antirrábica.

Un resultado positivo por detección de antígenos o PCR genérica de lisavirus permite confirmar el caso. Un positivo a PCR múltiple de RABV y EBLV-1 permite, además, una primera identificación del lisavirus que, en cualquier caso, se hará por secuenciación genómica en todos los casos positivos. Un resultado de IgG positiva permite confirmar casos humanos en ausencia de antecedente de vacunación (Tabla 1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Casi la mitad de las muestras recibidas entre 2011 y 2020 (Tabla 2) correspondieron a murciélagos no agresores, la mayoría provenientes de centros de recuperación de especies amenazadas (CREA) de Cataluña (83,9%), habiéndose incorporado más recientemente otros de otras CCAA. El resto de las muestras correspondieron en su mayoría a animales mordedores o clínicamente sospechosos. De acuerdo a la población española actual, Madrid, Castilla y León, Castilla la Mancha, Extremadura, Murcia, Navarra, Ceuta y Melilla tendrían mayor representación de lo esperable en este grupo. Andalucía estaría participando proporcionalmente de acuerdo a su población y el resto estarían infrarrepresentadas. Resulta lógico, de acuerdo a su especial situación epidemiológica, que la participación de Ceuta y Melilla sea particularmente alta y que Aragón y la Comunidad Valenciana tengan menos demanda, ya que disponen de laboratorios primarios.

Tabla 2. Distribución territorial de las muestras recibidas (2011-2020)

	Murciélago no mordedor	Otras	Total
Cataluña	868	70	938
Madrid	21	267	288
Andalucía	38	174	212
Extremadura	19	155	174
Castilla y León	0	90	90
Castilla la Mancha	0	86	86
Baleares	73	3	76
Melilla	0	60	60
Ceuta	0	51	51
Murcia	0	48	48
Navarra	0	20	20
Pais Vasco	0	12	12
Galicia	0	11	11
Aragón	0	7	7
Asturias	0	3	3
Cantabria	0	3	3
Canarias	0	2	2
Rioja	0	2	2
TOTAL	1034	1064	2098

El diagnóstico y caracterización de rabia lleva en servicio en el CNM desde 1987, cuando la actividad fue trasladada desde la Escuela Nacional de Sanidad. Hasta 2020 se han recibido un total de 6.484 muestras, la mayoría de perros, gatos y murciélagos, tal y como corresponde al riesgo epidemiológico (tabla 3). Setenta y seis de los 118 casos positivos corresponden a animales infectados por RABV importados en Ceuta y Melilla (Tabla 4). Únicamente se han detectado dos casos por RABV fuera de Ceuta y Melilla. El primero correspondió a un gato que mordió a un viajero en Guinea en 1988, siendo sacrificado por el lesionado y transportado muerto en la maleta hasta Madrid. El segundo fue el caso canino de Toledo importado en 2013 al que hacíamos referencia anteriormente. Finalmente, hemos tenido tres casos humanos importados con origen en Marruecos (Ceuta 2004, Madrid 2014 y Vizcaya 2019). En lo referente a rabia por otros lisavirus, hemos detectado 37 casos en murciélagos peninsulares, de los que todos, salvo uno, fueron EBLV-1 en sus hospedadores habituales: *Eptesicus serotinus* en la mitad norte y *Eptesicus isabellinus* en la mitad sur. El caso restante dio lugar a la descripción original de LLEBV en un murciélago de cueva (*Miniopterus schreibersii*) recogido en la ciudad de Lleida en el año 2012. El 80,3% de los murciélagos recibidos fueron de las cuatro especies más comunes en medios urbanos, de las que solamente dos (*E. serotinus*, *E. isabellinus*) son reservorios conocidos de lisavirus. El 20% restante lo integran especies raras en medios urbanos con un número muy bajo de ejemplares analizados, aun cuando algunas de ellas son reservorios relevantes de lisavirus.

Tabla 3. Casos analizados por especie (1987-2020).

	Totales	Positivos	
		Ceuta y Melilla	Resto
Perros	2208	70	1
Gatos	1202	3	1
Otros Domésticos	15	2	0
Murciélagos	1579	0	37
Zorros	253	1	0
Mustélidos	88	0	0
Otros Silvestres	138	0	0
Roedores	978	0	0
Humanos	23	1	2
Total	6484	77	41

De acuerdo a la web de la OMS para rabia en Europa, en el año 2018 España fue el quinto país de la región europea en cuanto a murciélagos estudiados con 103, por debajo de Francia (354), Reino Unido (433), Polonia (223) y Alemania (224). En cuanto a otros animales salvajes, estudiamos 24, solo por encima de Portugal (0), Holanda (0), Reino Unido (0), Irlanda (0), Kosovo (0), Dinamarca (3), Liechtenstein (3), Suiza (11), Bosnia (12) y Turquía (12) y muy lejos de otros países con campañas de vacunación vulpina activas (ej, Polonia con 6.370) o que sufrieron la epizootia en el pasado (Ej. Alemania 5.985). Finalmente, en 2019 estudiamos 76 animales domésticos, siendo superados por 14 países, la mayoría de ellos con focos vulpinos cercanos. Lllaman, sin embargo, la atención los 101 de Bélgica, 386 de Alemania o 1.333 de Francia, ya que son países que no tienen tan cerca como nosotros un foco endémico de rabia canina.

Tabla 4. Distribución territorial de los casos positivos.

	RABV animal	RABV humana	Lisavirus murciélagos
Melilla	59*	0	0
Ceuta	17*	1*	0
Andalucía	0	0	18 EBLV1
Cataluña	0	0	11 EBLV1 1LLEBV
Aragón	0	0	2 EBLV1
Extremadura	0	0	2 EBLV1
Murcia	0	0	2 EBLV1
Castilla y León	0	0	1 EBLV1
Castilla la Mancha	1*	0	0
País Vasco	0	1*	0
Madrid	1*	1*	0
TOTAL	78**	3*	37

* Caso importado, * Muestra importada (ver texto).

La alerta por el caso de rabia importado en Toledo en el año 2013 supuso un incremento en el número de animales domésticos estudiados, desde los 48-53 de 2010-2012, hasta 91 en 2013, que se mantuvo hasta 2015 (96), pero que ha venido disminuyendo hasta 69 en 2019.

CONCLUSIONES

- El presente programa de vigilancia se ha implantado al objeto de cumplir con nuestro papel de laboratorio nacional de referencia de rabia reconocido en la legislación vigente. Además, actuamos como laboratorio primario para todo el territorio, salvo Aragón y la Comunidad Valenciana.
- En términos generales, la demanda analítica en animales diferentes de murciélagos es especialmente intensa Ceuta y Melilla dada la frecuencia de importación de casos desde Marruecos. En el lado opuesto, la escasa demanda de Aragón y la Comunidad Valenciana se debe a que disponen de laboratorios primarios. No podemos explicar las diferencias entre otras CCAA.
- La alerta por un caso canino importado del año 2013 en Toledo tuvo como efecto un aumento discreto de la intensidad de la demanda que parece ir amortiguándose.
- Entre 1987 y 2020 se han estudiado 23 casos humanos sospechosos, siendo tres de ellos positivos, todos ellos de transmisión canina importados de Marruecos. Dada la frecuente ausencia de evidencia de vinculación epidemiológica en casos transmitidos por murciélago y su carácter endémico, sería aconsejable establecer vigilancia sobre los casos fatales de encefalitis no filiada. Un caso humano por EBLV-1 recientemente descrito en Francia se ha podido detectar a través de esta aproximación.
- La vigilancia de rabia en murciélagos ha mejorado mucho tras la colaboración de los CREAs catalanes, que debería seguir impulsándose en el resto de CCAA. Se ha demostrado el carácter endémico de EBLV-1 en España y se ha descrito por primera vez el LLEBV. La escasa representación en el sistema de vigilancia de especies de murciélagos no ligadas a medio urbano impide descartar la presencia en España de lisavirus europeo de murciélago tipo 2, Lisavirus de murciélago Bokeloh, Virus Aravan, virus Khujand o virus de murciélago europeo del Cáucaso Occidental.
- Nuestra vigilancia de rabia en murciélagos está entre las mejores de Europa, aunque todavía lejos de los países que la lideran. La de otros animales salvajes es poco intensa, de acuerdo a nuestra situación de escaso riesgo. Finalmente, la vigilancia en animales domésticos, aunque superior a la de la mayoría de los países en situación de menor riesgo, es bastante menos intensa que la de otros como Francia o Alemania que no tienen frontera con países endémicos, a diferencia de nosotros.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, 2013. Disponible en: <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Paginas/ProtocolosRENAVE.aspx>
2. Programa de vigilancia de la rabia (animal) en España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Ministerio de Sanidad, Ministerio de Ciencia e Innovación. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programadevigilanciadelarabiaversiionfinal_tcm30-561135.pdf
3. Plan de contingencia para el control de la rabia en animales domésticos en España. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Ministerio de Sanidad, servicios Sociales e Igualdad, Ministerio de Economía y Competitividad. Disponible en: https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/sanidadExterior/docs/planContingencia_control_rabia_animales_domesticos_esp_rev3_Junio2013.pdf
4. Protocolo de actuación ante mordeduras o agresiones de animales (tratamiento post-exposición). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Ministerio de Sanidad, servicios Sociales e Igualdad, Ministerio de Economía y Competitividad. Disponible en: https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/sanidadExterior/docs/protocoloActuacion_mordeduras_agresiones_animales_Junio2013.pdf
5. Mingo-Casas P, Sardonís V, Vázquez-Morón S, Berciano JM, Juste J, Echevarría JE Rabies in Spain. A Peculiarity in Eurasia. *Ann virol res.* 2017; 3(2): 1030.

Programa de Variantes del Virus de la Hepatitis B de Impacto en Salud Pública y Estudio de Brotes de Hepatitis

Informe elaborado por A. Avellón y M. Muñoz Chimeno.

Laboratorio de Referencia e Investigación en Hepatitis Víricas: UNIDAD DE HEPATITIS. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

CIBER de Epidemiología y Salud Pública. CIBERESP.

Asistencia técnica: Lucía Morago, Sandra Arroyo, María del Carmen García Galera, Vanessa Rodríguez, Álvaro Rodríguez, Maira Alejandra García-Lugo, Noelia Reyes, Sara Camarero, Silvia Calleja.

INTRODUCCIÓN

Las hepatitis víricas constituyen un importante problema de Salud Pública siendo las hepatitis A, B y C enfermedades de declaración obligatoria en España. En el CNM estudiamos filogenéticamente brotes de Hepatitis A, B y C. Adicionalmente se creó el Programa de Vigilancia de Variantes del Virus de la Hepatitis B de Impacto en Salud Pública para estudiar e identificar variantes del virus de la hepatitis B (VHB). La detección, caracterización y evaluación de la aparición de estas variantes puede tener una implicación directa en las políticas de vacunación, en las pautas de tratamiento y en la elección de sistemas diagnósticos para la detección del virus de la VHB.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

Vigilar la emergencia de variantes del VHB que puedan tener impacto sobre la Salud Pública, en concreto sobre:

1. Los objetivos del programa de vacunación vigente, mediante la caracterización de variantes del VHB potencialmente resistentes a la inmunidad humoral natural o a la inducida por vacunación.
2. El éxito de los trasplantes de órganos, especialmente del trasplante hepático, y la seguridad viral de la transfusión sanguínea mediante la caracterización de variantes del VHB capaces de escapar a la detección mediante las técnicas de cribado de HBsAg al uso en los centros de transfusión y en los bancos de tejidos y órganos. El origen de estas variantes son con una alta frecuencia infecciones reactivadas en personas inmunodeprimidas.
3. La eficacia de la terapia antiviral en la hepatitis B crónica mediante la vigilancia de las variantes del VHB resistentes a la acción de los fármacos antivirales específicos utilizados en el tratamiento de la hepatitis B crónica.

DISEÑO DEL PROGRAMA

Se incluyen dentro del presente programa los siguientes casos:

- Pacientes con antecedentes de vacunación, que desarrollen infección por virus de la hepatitis B.
- Pacientes trasplantados que desarrollen infección por virus de la hepatitis B.
- Muestras con sospecha de mutantes de escape en la detección de HBsAg (HBsAg negativo o débilmente positivo con ADN detectable).
- Muestras con ADN detectable sin detección de anti-HBc total.
- Muestras con HBsAg aislado.
- Muestras con coexistencia HBsAg y anti-HBs.
- Pacientes con reactivación de la infección por VHB.
- Pacientes con infección por virus de la hepatitis B fulminante.
- Pacientes con infección aguda por VHB.
- Pacientes con fracaso terapéutico (sospecha de resistencias)
- Estudios en poblaciones especiales (embarazadas, donantes, inmunodeprimidos, hemodiálisis, recién nacidos)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Programa de Vigilancia de Variantes del Virus de la Hepatitis B de Impacto en Salud Pública:

Desde 2013 a 2020 se han estudiado un total de 188 casos sospechosos de variantes del VHB (Tabla 1). Los estudios más frecuentes fueron, por este orden: Coexistencia de HBsAg y anti-HBs (n=76), reactivaciones (n=26), infecciones anti-HBc negativo (n=18) y hepatitis B en transplantados (n=10).

Tabla 1. Casos estudiados en el programa de vigilancia desde 2013 hasta 2020

	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
Hepatitis B en vacunado			1					1	2
Trasplantado	4	1		3		1	1		10
Sospecha de mutante escape		2	1	3		1	1	1	9
Sospecha infección oculta		1				1	1	4	7
Hepatitis B anti-HBc negative		1	1	3	6	5		2	18
HBsAg aislado	1	1	1	1			1	3	8
Coexistencia HBsAg/anti-HBs	3	2	9	14	7	17	20	4	76
Estudio de reactivación	6	5	2		1	3	7	2	26
Hepatitis fulminante	1						1		2
Hepatitis aguda		1							1
Resistencias				3					3
Embarazada	5	1					2	1	9
Donante	1		1	1	2	1			6
Infección en inmunodeprimido						1		2	3
Hemodiálisis				2	1	1			4
Transmisión vertical	2						1		3
Anti-HBs aislado en paciente no vacunado						1			1
Total	23	15	16	30	17	32	35	20	188

De las 188 muestras estudiadas, 135 tenían ADN del VHB detectable, encontrándose mutaciones consideradas de escape en la secuencia del HBsAg (1) en 45 casos (33,3%). Las mutaciones fueron especialmente frecuentes en los estudios de reactivación (17 de 21, 80,9%), de sospecha de infección oculta (3 de 4, 75,0%), de sospecha de mutante de escape (4 de 7, 57,1%) y de hepatitis B en trasplantado (4 de 7, 57,1%). Se estudiaron 80 casos de coexistencia de HBsAg y anti-HBs, encontrándose un porcentaje de mutantes de escape cercano al 20%. El listado de mutaciones aisladas y combinaciones de mutaciones se detalla en la **Tabla 2**.

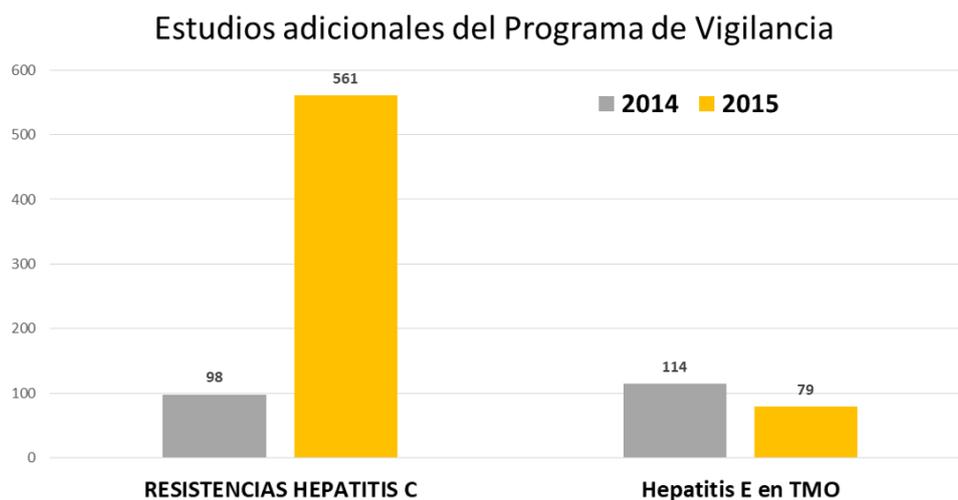
Tabla 2. Listado de mutaciones de escape en HBsAg encontradas

Mutación/ combinación de mutaciones
120Q
120R, 144E
145R
144E,145R
118K, 120L, 129H, 133T
123A,141R
118R, 120Q, 128V, 131N, 132F, 133T, 143L
134N, 143L
120S, 143L
123N, 126S, 130R inserción
113P, 118M, 134H, 144AG
138S, 159 ^a
144E,145R
120Q,127L,136F,145R,169H
120S
144N
126S
126I, 143W
134H
142T
134N
130K,133L,134T,161S,168 ^a
120Q,127L,136F,145R,169H
122K
118V,128V
114P
142S,144 ^a
122K, 133I, 143L
129P,131N
130R, 131N
129P, 131N
133T, 144G
128V
129R
142S
120A, 122K, 134H
134F, codón de parada en aminoácido L209

2. Estudios adicionales del Programa de Vigilancia

Durante los años 2014 y 2015, adscritos al programa de vigilancia, se realizaron estudios adicionales en relación a otras hepatitis víricas (Figura 1). En concreto se iniciaron los estudios de resistencias a antivirales del virus de la hepatitis C (con el estudio de un total de 659 muestras) y se estudió un caso de posible transmisión de virus de la hepatitis E por hemoderivados (con el estudio de 193 muestras).

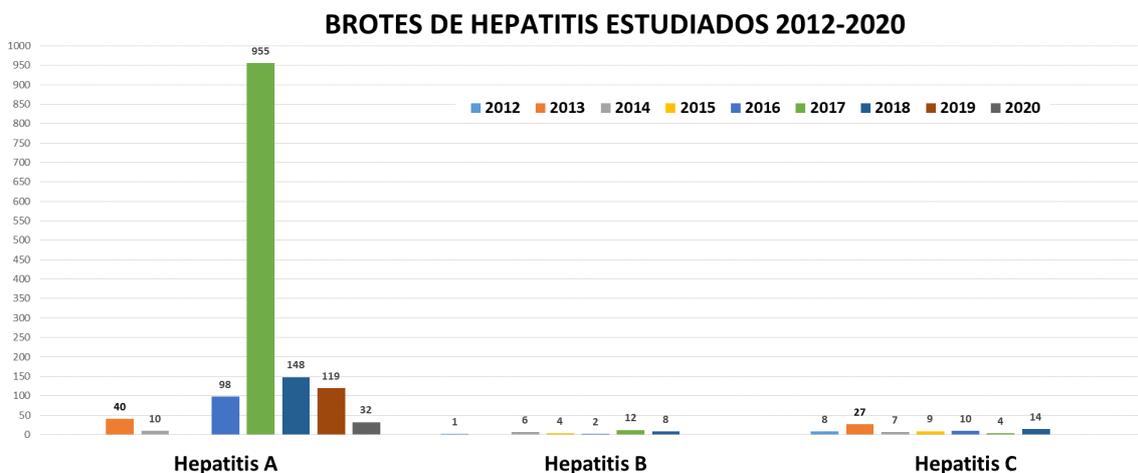
Figura 1. Estudios de hepatitis C y hepatitis E adicionales realizados en el periodo de estudio



3. Brotes

Finalmente, las actividades de vigilancia contemplaron el estudio de brotes de hepatitis A (con el estudio de 1402 muestras), B (33 muestras) y C (79 muestras) (Figura 2)

Figura 2. Brotes de hepatitis estudiados en el CNM. Distribución por año y tipo de hepatitis



CONCLUSIONES

Desde 2013 hasta 2020 la actividad de vigilancia de la Unidad de Hepatitis del laboratorio de Referencia e Investigación en Hepatitis Víricas se centró en el estudio de brotes y en el desarrollo del Programa de Vigilancia de Variantes del Virus de la Hepatitis B de Impacto en Salud Pública. En relación al programa, aunque inicialmente se pensó tanto para el estudio de variantes de escape del HBsAg como para el estudio de mutaciones de resistencia en la polimerasa viral, los estudios solicitados por los hospitales participantes se han centrado fundamentalmente en el análisis del HBsAg. Los perfiles más demandados han sido los patrones serológicos atípicos (coexistencia HBsAg/anti-HBs, casos anti-HBc negativos, HBsAg aislado o sospecha de mutante de escape por negatividad o reactividad débil del HBsAg). Se han estudiado también casos de reactivación, infección fulminante e infecciones en trasplantados e inmunodeprimidos). El estudio molecular en todos estos casos ha permitido identificar los determinantes moleculares que en ocasiones los condicionan ayudando a la interpretación y manejo de los casos. El programa ha permitido conocer la prevalencia de los mutantes de HBsAg en distintas situaciones clínicas.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Avellon A, Echevarria JM. Frequency of hepatitis B virus 'a' determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. *J Med Virol.*, Jan;78(1):24-36., 2006.

Programa de Leishmaniasis Humana en el Area-9 de la Comunidad Autónoma de Madrid

Informe elaborado por R. Molina, J. Moreno, M. Jiménez, J. Nieto, E. Carrillo y C. Chicharro.

Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología. Laboratorios de Entomología Médica (LEM) y de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas (LLEC), Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

Filiación adicional, Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis.

INTRODUCCIÓN.

La leishmaniasis humana es una enfermedad zoonótica transmitida por artrópodos cuyo principal reservorio es el perro. Es endémica en España y en la cuenca mediterránea y se manifiesta con dos presentaciones clínicas, visceral y cutánea. El periodo de incubación es muy variable, oscilando desde unas pocas semanas a varios meses. Los únicos vectores conocidos de *Leishmania infantum* en la Península Ibérica son *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*. La leishmaniasis se vigila en la Comunidad de Madrid (CM) desde 1997 a través del sistema de notificación de Enfermedades de Declaración Obligatoria. Hasta ese año se notificaban en la región 12-25 casos anuales. A finales de 2010 se detectó un aumento notable en la notificación de casos en el suroeste de la CM (área 9), constatándose la existencia de un brote comunitario de leishmaniasis que afectaba a Fuenlabrada, Getafe, Leganés y Humanes. Del 1 de julio de 2009 al 4 de marzo de 2021 se ha notificado a la Red de Vigilancia Epidemiológica un total de 782 casos de leishmaniasis, 303 viscerales y 479 cutáneos.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

Una vez confirmada la existencia del brote, la Consejería de Sanidad de la CM, a través de la Subdirección General de Sanidad Ambiental y Epidemiología, puso en marcha en 2011 una batería de actuaciones en materia de vigilancia, investigación y control del brote. Debido a la complejidad del brote, al ser una zoonosis transmitida por un artrópodo, la CM solicitó la intervención del ISCIII en la vigilancia de la leishmaniasis en la zona del brote, en especial de casos humanos, vectores y reservorios domésticos y silvestres de la enfermedad. La vigilancia se lleva a cabo ininterrumpidamente desde 2011. En un primer momento estas actuaciones se realizaron como estudio de brote declarado por el CNM con fecha 04/04/2011 y código 1027-11, y a partir de 2012 se han llevado a cabo en el contexto del actual programa de vigilancia de leishmaniasis humana.

DISEÑO DEL PROGRAMA

1. Vigilancia de casos humanos: El Laboratorio de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas (LEEC) dirige las actividades correspondientes a este apartado. El laboratorio ha recibido muestras clínicas de pacientes con sospecha de leishmaniasis procedentes de los hospitales de la zona del brote y otros de la CM, con el objetivo de confirmar/descartar la infección por *Leishmania* en estos individuos. Se han recibido muestras de suero, sangre completa, aspirado de médula ósea, aspirado ganglionar, biopsia de piel y otro tipo de biopsias, con las que se han llevado a cabo diferentes pruebas diagnósticas:

- Diagnóstico serológico: Inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA y rK39-ICT
- Pruebas de inmunidad celular: Proliferación celular y WBA
- Detección del parásito: Ln-PCR y cultivo
- Identificación de la especie de *Leishmania*: PCR-RFLP y/o secuenciación

Además de confirmar el diagnóstico de nuevos casos de leishmaniasis humana, se ha establecido un procedimiento de seguimiento postratamiento de pacientes inmunodeprimidos (VIH+, trasplantados o bajo tratamientos inmunosupresores) cuyo riesgo de recaída después del tratamiento para leishmaniasis visceral es alto. Estas actividades de diagnóstico se completaron con la realización de una encuesta transversal de prevalencia de infección asintomática por *Leishmania* llevada a cabo en 2015 en el contexto de la V Encuesta de Seroprevalencia - SEROVI- de la CM. También se realizó entre 2015 y 2017 una encuesta de prevalencia de infección asintomática por *Leishmania* en donantes voluntarios del Banco de Sangre del Hospital de Fuenlabrada.

2. Vigilancia de los vectores: El Laboratorio de Entomología Médica (LEM) diseña e implementa desde 2012 un plan de vigilancia de flebotomos, fundamentalmente en la zona del brote, denominado “muestreo intensivo”, durante los meses de mayo a octubre de cada año. Su finalidad es la identificación taxonómica de los flebotomos capturados con trampas adhesivas y luminosas (CDC) y el establecimiento de la fenología de las especies predominantes; la detección de *L. infantum* en los flebotomos capturados, “in vivo” mediante disección o mediante PCR, para determinar las especies vectoras; el genotipado de las cepas de *L. infantum* obtenidas y de una parte de los flebotomos conservados en etanol hallados infectados; y la identificación molecular de la sangre ingerida por los flebotomos capturados con sangre en sus estómagos. Los muestreos se planificaron en varias fases, en la primera, de 2012 a 2014, se seleccionaron 4 estaciones de muestreo, en cada una de las cuales se colocaron mensualmente, de mayo a octubre, 20 trampas adhesivas durante 3 días consecutivos y 2+2 trampas CDC (2 cada una de las 2 noches consecutivas de muestreo). En la segunda fase, de 2015 a 2020, se colocaron sólo 2 trampas luminosas al mes en las mismas estaciones. En paralelo, desde 2016 hasta la actualidad se muestrean otras áreas no pertenecientes al brote, tanto por el LEM como por la CM. De manera independiente la CM realiza, en la zona del brote y en otras áreas, muestreos entomológicos denominados “muestreos extensivos”, realizados en su mayoría con trampas adhesivas. La CM remite parte de esas capturas al LEM, en su mayoría

flebotomos con sangre en sus estómagos. Para los estudios moleculares de los flebotomos, como detección de *Leishmania* spp, preferencias alimentarias, carga parasitaria y caracterización de *Leishmania* spp, el LEM ha diseñado y puesto a punto varias PCRs: ADNk, *cpb*, ITS1, Nested-PCR ITS1, ITS2, Nested-PCR ITS2, Cyt *b*, qPCR y PCR-RFLP *HaeIII*. El genotipado de *Leishmania* spp y la identificación de la sangre ingerida precisó de la secuenciación y el análisis de las secuencias obtenidas (EMBL, GenBank).

Para investigar el papel que liebres y conejos podían estar jugando como reservorios silvestres de la enfermedad, el LEM realizó cuatro sesiones de xenodiagnóstico de la leishmaniasis con leporidos capturados vivos en la zona del brote, utilizando una colonia de *P. perniciosus* mantenida en su insectario.

3. Vigilancia inicial del perro como principal reservorio conocido: El LLEC realizó en el bienio 2011-2012 pruebas serológicas de detección de anticuerpos de leishmaniasis a perros que eran llevados por sus propietarios a la campaña de vacunación antirrábica anual del municipio de Fuenlabrada, a través de un kit rápido inmunocromatográfico y también mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI).

4. Vigilancia de otros reservorios potenciales: Dado que los resultados iniciales del estudio de seroprevalencia de la leishmaniasis canina dejaban en un segundo plano al perro como reservorio de la leishmaniasis en el brote, se llevó a cabo la vigilancia de reservorios silvestres potenciales, fundamentalmente de liebres y conejos, muy abundantes en las zonas verdes colindantes a las áreas urbanas de Fuenlabrada, Leganés, Humanes y Getafe. La detección de ADN de *Leishmania* spp. en las muestras de piel y de bazo de reservorios silvestres remitidas por la CM al LLEC se realizó mediante una PCR puesta a punto en este laboratorio. Para aumentar la sensibilidad y especificidad de esta técnica se ha llevado a cabo una *nested* PCR diseñada y puesta a punto también por el LLEC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Vigilancia de casos humanos:

En 2012, antes de la puesta en marcha del Programa de vigilancia, se recibieron muestras clínicas de 248 pacientes de la zona del brote, con las que se realizaron un total de 506 pruebas diagnósticas que confirmaron leishmaniasis en 138 pacientes. Dentro del Programa de Vigilancia se recibieron entre 2012 y 2020 un total de 6.840 muestras clínicas, cuyo número se recogen en la [Tabla 1](#), donde también se incluyen para comparar las muestras recibidas de la CM no incluidas en el Programa de vigilancia. En ambos casos se indica el número y porcentaje de muestras clínicas que resultaron positivas para leishmaniasis. El número total de procedimientos diagnósticos realizados por el LLEC en el periodo 2012-2020 fue de 6.844. En la [Tabla 2](#) se muestran el número de los diferentes procedimientos diagnósticos, comparando también con los realizados para la CM fuera del Programa de vigilancia, indicando también número y porcentaje de los que resultaron positivos. En la [Figura 1](#) se recoge el número de muestras recibidas cada año.

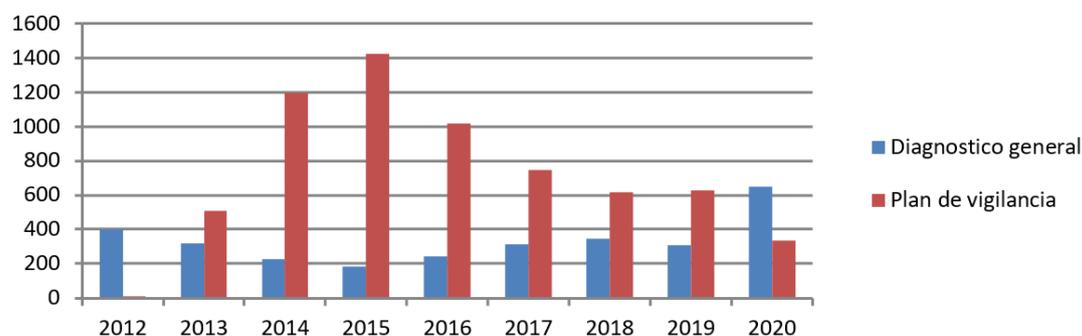
Tabla 1.

TIPO DE MUESTRA	Diagnóstico de leishmaniasis en la Comunidad de Madrid			Programa de vigilancia de leishmaniasis humana		
	Total	Positivas	% positivas	Total	Positivas	% positivas
Aspirado ganglionar	46	4	8,6	86	4	4,6
Aspirado medula ósea	625	97	15,5	1.127	179	15,8
Biopsia de piel	947	405	42,7	1.606	288	17,9
Otras biopsias	113	32	28,3	19	1	5,2
Sangre	1.308	178	13,6	3.660	174	4,7
Suero	282	36	12,7	342	100	29,2
TOTAL	3.321	752	22,6	6.840	746	10,9

Tabla 2.

PRUEBA DIAGNOSTICA	Diagnóstico de leishmaniasis en la Comunidad de Madrid			Programa de vigilancia de leishmaniasis humana		
	Total	Positivas	% positivas	Total	Positivas	% positivas
Caracterización molecular	56			514		
Cultivo	370	28	7,5	2.140	79	3,6
ELISA rK39	15	2	13,3	24	0	0
ICT-rK39	70	16	22,8	154	45	29,2
Inmunofluorescencia indirecta IFI	198	19	9,5	202	62	30,6
Leishmania nested PCR	2.190	375	17,1	3.807	550	14,4
Proliferación celular	28	1	3,5	3	0	0
TOTAL	2.927	441	15,0	6.844	736	10,7

Figura 1. Evolución del nº de muestras clínicas procedentes de la CM analizadas dentro del programa de vigilancia y como diagnóstico general del LLEC



El número de pacientes de la CM de los que se enviaron muestras clínicas al laboratorio en el periodo 2012-2020 ha sido de 4.526. De estos, 2.796 lo hicieron a través del programa de vigilancia, confirmándose la infección por *Leishmania* en 423 casos (15,1 %), mientras que el resto de los pacientes sospechosos, 1.730, fueron enviados como diagnóstico general, diagnosticándose leishmaniasis en 253 casos (14,6 %). Las figuras 2 y 3 recogen la distribución por hospital de los pacientes con sospecha de leishmaniasis cuyas muestras fueron enviadas al LLEC. Como era de esperar, buena parte de los pacientes estudiados en el contexto del programa de vigilancia fueron atendidos en hospitales de la zona del brote, aunque otros centros han aprovechado el programa de vigilancia para confirmar/descartar casos de leishmaniasis en otras zonas de la CM. Aunque el brote esté

controlado esos resultados muestran que persiste una alta tasa de transmisión en toda la región que se traduce en un número importante de casos. El seguimiento estrecho de pacientes inmunodeprimidos, tanto los que han sufrido leishmaniasis clínica como los que han permanecido asintomáticos tras la infección, ha permitido confirmar el desarrollo de inmunidad específica para el parásito en estos pacientes y retirar la profilaxis secundaria en estos casos sin que haya habido recaídas. Dentro del programa de vigilancia también se han caracterizado molecularmente los aislados de *L. infantum* obtenidos de las muestras clínicas humanas. La tipificación molecular de aislados de la CM demostró la existencia de 7 genotipos diferentes combinando los datos de 2 marcadores genéticos: los espaciadores transcritos internos ribosómicos (ITS) -1 y -2 y el gen haspb (k26). La mayoría de los aislados asociados al brote (22/31) presentan el mismo genotipo combinado. Los resultados se recogen en detalle en Chicharro et al. (Euro Surveill. 2013).

Figura 2. Distribución por hospital de la CM del nº de pacientes cuyas muestras clínicas se recibieron para diagnóstico general en el periodo 2012-2020. Se indican el número de pacientes que fueron positivos para alguna prueba diagnóstica y los negativos para todas las pruebas hechas.

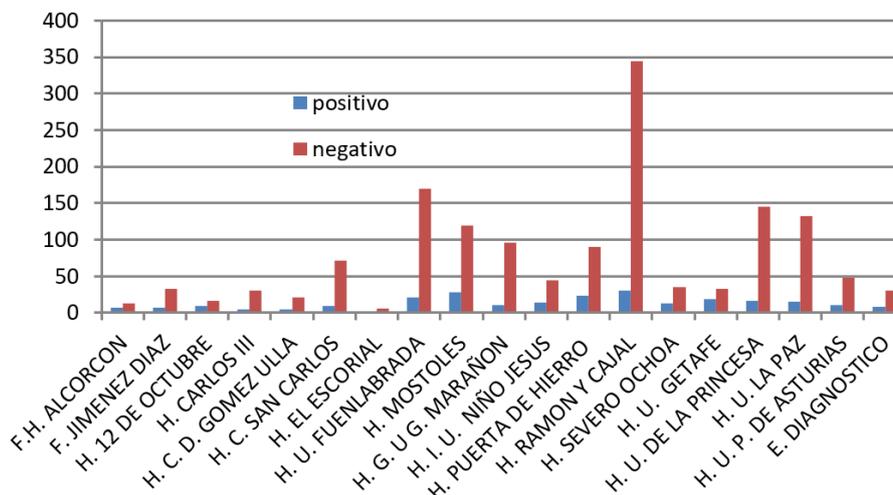


Figura 3. Distribución por hospital de la CM del nº de pacientes cuyas muestras clínicas se recibieron dentro del programa de vigilancia en el periodo 2012-2020. Se indican los pacientes positivos para alguna prueba diagnóstica y los negativos para todas las pruebas.

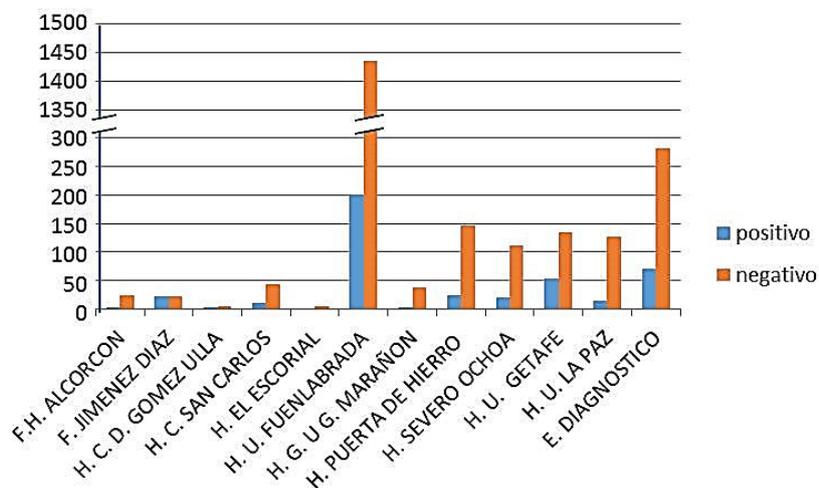


Tabla 3.

POBLACIÓN	Diagnostico molecular	Diagnóstico serológico	Diagnóstico celular
	PCR+ (%)	IFI+ (%)	WBA (IL-2)+ (%)
Pob. Fuenlabrada N = 805	0 (0%)	1 (0.11 %)	166 (20.6%)
Banco de Sangre N = 567	0 (0%)	3 (0,52%)	97 (17.1%)
Pob. C. Madrid N = 4050	0 (0%)	9 (0,22%)	337 (8,3%)

La encuesta transversal de prevalencia de infección asintomática por *Leishmania* en la población general sana de Fuenlabrada y la CM, y la encuesta de prevalencia en donantes del Banco de Sangre del H. U. de Fuenlabrada, mostraron la mayor prevalencia de infección asintomática en la zona del brote, comparado con el resto de Madrid, tal y como cabría esperar en la situación posterior al brote (Tabla 3). La infección asintomática se pudo establecer mediante pruebas celulares de estimulación de sangre

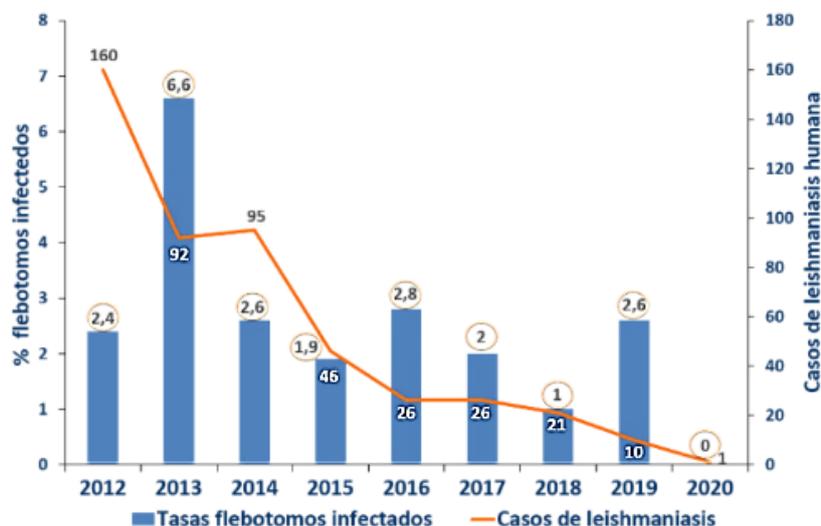
completa y análisis de la expresión de IL-2 en el plasma (WBA). Las PCRs y las IFIs dieron resultados nulos o muy bajos en la detección de la infección asintomática. Es relevante el alto porcentaje de infección asintomática por *Leishmania* detectado en la población de la CM, que indica una transmisión activa del parásito.

2. Vigilancia de vectores

El plan de muestreo diseñado por el LEM en la zona del brote ha recolectado hasta la fecha 55.279 flebotomos. El 78% pertenece a *P. perniciosus*, con una densidad promedio de 200 flebotomos/m². Se han disecado 7.148♀ de esta especie, hallándose 188 (2,6%) infectadas por *L. infantum* (Tabla 4). Se confirma así que *P. perniciosus* es el único vector de la leishmaniasis en el brote (Figura 4).

Tabla 4. *P. perniciosus* recolectados, recolectados en el brote, disecados e infectados con *L. infantum*.

BROTE FUENLABRADA	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	TOTAL
Trampas adhesivas	6053	5553	6840	-	-	-	-	-	-	18446
Trampas luminosas	8044	3469	4037	3823	1433	978	1187	346	1416	24733
Total	14097	9022	10877	1770	1433	978	1187	346	1416	43179
♀ disecadas	736	864	1604	1770	754	452	488	116	364	7148
Positivas	18	57	41	34	21	9	5	3	0	188
%	2.4	6.6	2.6	1.9	2.8	2	1	2.6	0	2.6
Cepas de <i>L. infantum</i> aisladas y caracterizadas	14	44	9	15	-	-	-	-	-	82

Figura 4. Tasas de *P. perniciosus* infectados por *L. infantum* y casos humanos de leishmaniasis

 Tabla 5. Identificación de sangre ingerida y tasas de infección por *L. infantum* en *P. perniciosus* recolectados en la zona del brote.

Fuente de alimentación	Nº de flebotomos analizados (Nº positivos)									
	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	TOTAL
Conejo	41 (2+)	46 (10+)	68 (3+)	50 (3+)	39 (3+)	28 (2+)	14	8 (2+)	24	318 (25+)
Liebre	28 (11+)	16	15 (3+)	10 (2+)	8 (1+)	2	1	0	0	80 (17+)
Gato	0	8	0	4	1	0	1	0	0	14
Perro	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Caballo	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Hurón	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Gallo	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Humano	1	1	1	1	0	0	1	0	0	5
Conejo/Liebre	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
No identificada	29 (10+)	21 (1+)	29 (1+)	16 (1+)	13 (1+)	7	7 (1+)	0	2	124 (15+)
Total	100 (23+)	92 (11+)	113 (7+)	83 (6+)	63 (5+)	37 (2+)	25 (1+)	8 (2+)	26	547 (57+) 10,4%
Sin sangre	225 (15+)	192 (21+)	187 (11+)	0	71 (7+)	36	14 (1+)	4	41 (1+)	770 (56+) 7,3%
TOTAL	325 (38+)	284 (32+)	300 (18+)	83 (6+)	134 (12+)	73 (2+)	39 (2+)	12 (2+)	67 (1+)	1317 (113+) 8,6%

El análisis molecular de la sangre ingerida por 423♀ del brote mostró que el 75,2% era de conejo (7,9% infectado por *L. infantum*) y el 18,9% de liebre (23% infectado por el parásito). Se identificó la sangre de otros 6 mamíferos, lo que sugiere un carácter oportunista de este insecto en cuanto a sus preferencias alimentarias. La tasa de infección por *L. infantum* en las 124♀ en las que no se logró identificar la sangre fue del 12,1%. En las 770♀ capturadas en el brote sin sangre en sus estómagos, se detectó *L. infantum* en el 7,3% (Tabla 5). Entre 2012 y 2015 se aislaron un total de 82 cepas de *L. infantum*, todas pertenecientes al genotipo “Lombardi”, el mismo presente en humanos, liebres y conejos del brote. Se ha constatado la presencia de este genotipo en otros flebotomos analizados salvo un ejemplar en el que se identificó el genotipo “A”, el mayoritario en los perros de la zona. En cuanto a los flebotomos recolectados fuera del brote se

han capturado 680♀ en 16 municipios, se han disecado 88♀ (2,3% infectadas por *L. infantum*) y se han estudiado molecularmente 366♀ (1,1% infectadas por *L. infantum*). El 63,2% de las hembras en las que se identificó la sangre ingerida se había alimentado de conejo. El estudio de los flebotomos enviados al LEM por la CM, recolectados en la zona del brote en sus actividades de vigilancia extensiva, arrojan los siguientes resultados. Se han estudiado 2210♀ de *P. perniciosus* (7,1% infectadas por *L. infantum*). De las 964♀ con sangre estudiadas el 55,6% fue de liebre (18,5% infectadas) y el 28,7% conejos (5,1% infectados). Se identificó además la sangre de 6 especies de mamíferos y 3 de aves, y se detectaron 5 ingestiones mixtas (Tabla 6).

Tabla 6. Identificación de la sangre ingerida y tasas de infección por *L. infantum* en *P. perniciosus* recolectados en el muestreo extensivo del brote.

Muestreo extensivo	Nº de flebotomos analizados (Nº infectados por <i>L. infantum</i>)/Año									
	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
Fuente de alimentación										
Conejo	8 (3+)	1	33 (2+)	40 (3+)	36 (4+)	69 (1+)	74 (1+)	16	0	277 (14+) 5,1%
Liebre	137 (47+)	37 (10+)	110 (21+)	89 (5+)	70 (11+)	70 (4+)	24 (2+)	1	0	538 (100+) 18,6%
Gato	0	0	5	10	12	10	8	1	0	46
Perdiz	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Caballo	0	0	2 (1+)	9	0	0	0	0	0	11 (1+) 9,1%
Oveja	0	0	1+	1	0	0	1	0	0	3 (1+) 33,3%
Gallo	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Ñandú	0	0	1	1	1	0	0	0	0	3
Jabali	0	0	1	13	0	0	0	0	0	14
Cabra	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Humano	1+	0	6	10	4	11 (1+)	22	2	0	56 (2+) 3,6%
Conejo/Liebre	0	1	1	0	1+	2	1	0	0	6 (1+) 16,7%
Liebre/Humano	0	0	2	0	0	2	0	0	0	4
Gallo/Jabalí	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Conejo/Pavo	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Conejo/Gato	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
No identificada	7 (1+)	9 (2+)	13 (1+)	77 (2+)	40 (5+)	60 (7+)	35	5	0	246 (18+) 7,3%
Sin sangre	0	0	322 (14+)	332 (1+)	0	0	313 (5+)	28	5	1000 (20+) 2%
Total	153 (52+)	48 (12+)	498 (40+)	584 (11+)	165 (21+)	225 (13+)	478 (8+)	54	5	2210 (157+) 7,1%

En cuanto a los estudios de xenodiagnóstico de la leishmaniasis, se investigaron 7 liebres en 2 sesiones (diciembre de 2011 y enero de 2012). Cinco de ellas (71,4%) transmitieron *L. infantum* a los flebotomos. El promedio de tasas de flebotomos infectados fue del 8,3% (5,3% - 10,6%). En otras 2 sesiones (marzo y octubre de 2013) se estudiaron 10 conejos, de los que 5 fueron infectivos para los flebotomos. El promedio de tasas de flebotomos infectados fue del 1,8% (1,5% - 2%).

3. Vigilancia de otros reservorios potenciales

Ante la baja seroprevalencia encontrada en los perros, la vigilancia se dirigió a otras fuentes de alimentación de flebotomos como liebres, conejos, gatos y ratas. Los resultados obtenidos indican que alrededor del 30% de las liebres y el 13% de los conejos están infectados por el *L. infantum* (Tabla 7).

Tabla 7. Muestras de potenciales reservorios silvestres analizadas mediante PCR.

Año	LIEBRES			CONEJOS			GATOS			RATAS			MURCIÉLAGOS		
	Nº	Bazo posit.	Piel posit.	Nº	Bazo posit.	Piel posit.	Nº	Bazo posit.	Piel posit.	Nº	Bazo posit.	Piel posit.	Nº	Bazo posit.	Piel posit.
2011-2016	717	45	149	1327	79	172	204	13	2	-	-	-	-	-	-
2017	31	2	9	303	35	34	0	0	0	-	-	-	-	-	-
2018	22	1	7	200	17	29	0	0	0	-	-	-	-	-	-
2019	19	3	4	297	36	9	17	3	2	-	-	-	-	-	-
2020	19	5	2	93	0	4	23	2	1	26	0	2	1	0	0
TOTAL	808	56	171	2220	167	248	244	18	5	26	0	2	1	1/0	1/0

4. Vigilancia del perro

La seroprevalencia de la leishmaniasis canina fue estudiada en 2011 y 2012. Se llevaron a cabo 1290 IFIs en la zona, de las que 151 fueron positivas (11,7%). En 17 de los animales seropositivos, se realizaron estudios complementarios, tras la obtención de aspirados de medula ósea y ganglio, en los que se realizó PCR y cultivo para aislar y caracterizar molecularmente la cepa. En todos los casos se identificó el parásito como *L. infantum*.

CONCLUSIONES

- El programa de vigilancia de leishmaniasis humana ha permitido realizar un estudio detallado y completo de parásitos, vectores, reservorios y pacientes implicados en el brote de leishmaniasis del suroeste de la CM, así como de la situación posbrote.
- El programa ha permitido también conocer en detalle la situación de la leishmaniasis en la CM y confirmar el alto número de casos de leishmaniasis humana y la alta prevalencia de infección asintomática en toda la región, mayor en la zona del brote.
- El seguimiento de pacientes inmunodeprimidos con leishmaniasis con técnicas de diagnóstico molecular y celular permite retirar la profilaxis secundaria y evitar recaídas.
- El perro no juega un papel relevante en la transmisión de la leishmaniasis en la zona.
- Se han identificado 2 nuevos reservorios de la leishmaniasis, la liebre y el conejo.
- *P. perniciosus* es el responsable de la transmisión de *L. infantum* en el brote y sus preferencias alimentarias se centran en lepóridos de la zona (liebres y conejos).
- A día de hoy la situación en el brote se puede dar por controlada, pero es ahora cuando es más necesario continuar con la vigilancia, en especial de reservorios y vectores, pues el parásito sigue circulando en los grandes parques de Bosquesur y Polvoranca manteniéndose activo el ciclo silvestre de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. González E, Molina R, Iriso A, et al. Opportunistic feeding behavior and *L. infantum* detection in *P. perniciosus* females collected in the human leishmaniasis focus of Madrid, Spain (2012-2018). *PLoS Negl Trop Dis*. 2021. 15: e0009240
2. Molina R, Jiménez M, García-Martínez J, et al. Role of asymptomatic and symptomatic humans as reservoirs of visceral leishmaniasis in a Mediterranean context. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 14:e0008253.
3. Horrillo L, Castro A, Matía B, et al. Clinical aspects of visceral leishmaniasis caused by *L. infantum* in adults. Ten years of experience of the largest outbreak in Europe: what have we learned? *Parasites & Vectors*. 2019, 12:359.
4. Ibarra-Meneses AV, Carrillo E, Nieto J, et al. Prevalence of asymptomatic *Leishmania* infection and associated risk factors, after an outbreak in the south-western Madrid region, Spain, 2015. *Euro Surveill*. 2019, 24:1800379.
5. González E, Jiménez M, Hernández S, et al. Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis of Madrid, Spain (2012-2014): seasonal dynamics, *L. infantum* infection rates and blood meal preferences. *Parasites & Vectors*. 2017. 10:368.
6. Chicharro C, Llanes-Acevedo IP, García E, et al. Molecular typing of *L. infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill*. 2013, 18(30):20545.
7. Molina R, Jiménez M, Cruz I, et al. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *L. infantum* in Spain. *Vet Parasitol*. 2012. 190: 268-271.

Programa de la Enfermedad de Chagas

Informe elaborado por: M. D. Flores Chavez, E. García Díez, J. Nieto Martínez* & Red de Laboratorios de Chagas de España

Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas (ULeish-Cha). Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

*CIBER de Enfermedades Infecciosas. CIBERINFEC.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas (EC) o tripanosomiasis americana es una infección parasitaria silente causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, cuya distribución geográfica se circunscribía desde el sur de Estados Unidos al sur de Argentina. Actualmente, debido a los cambios demográficos, la EC es una parasitosis de distribución mundial. En áreas donde el vector que lo transmite no existe, puede adquirirse por las vías alternativas de transmisión: de madre a hijo, transfusión sanguínea, trasplantes de órganos y accidentes de laboratorio.

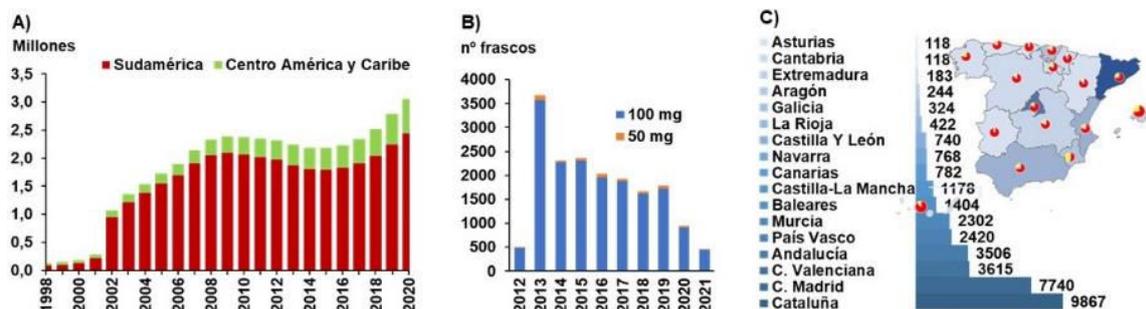
Se estima que afecta a 7 millones de personas en el mundo, y según la revisión realizada en 2009, España es el país europeo donde residen el mayor número de personas afectadas fuera de área endémica, entre 40.000 y 80.000 individuos. Se calcula que, sin ninguna intervención, anualmente nacerían 9.000 niños infectados, en España cada año estarían naciendo 16 a 62 niños infectados. Sin embargo, según los datos del CNM, hasta finales de 2009, se detectaron sólo 3.821 casos de infección crónica y 12 casos de infección congénita. Estudios posteriores realizados en Europa, describen que la prevalencia de la EC es próxima al 4,5%, que la población más afectada procede de Bolivia y que la prevalencia en esta población es del 20%.

Sin tratamiento específico, la evolución natural de la infección, por factores no conocidos totalmente, progresa a formas clínicas severas: alteraciones cardíacas, digestivas y del sistema nervioso central. En la última década, se ha demostrado que el tratamiento previene la progresión de la infección, elimina la circulación del parásito en el torrente sanguíneo, disminuye los portadores asintomáticos reservorios del parásito, previniendo así la transmisión por las vías alternativas, principalmente, la transmisión vertical.

Es importante tener presente que la infección por *T. cruzi* tiene dos fases una aguda y otra crónica; en ambas fases la presentación clínica predominante es la forma asintomática. Por ello, el diagnóstico de laboratorio define el estatus de infección, es decir, define el caso. Según las recomendaciones tanto de la OMS como la OPS, cuando la infección está en fase aguda, las técnicas que se deben utilizar son las herramientas parasitológicas. En España, la técnica de elección es la PCR y la población diana son los niños nacidos de madres con serología positiva. Por el contrario, la infección crónica se confirma con la detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* mediante dos técnicas y principios distintos.

Al no existir un sistema de vigilancia de la EC en España, las estimaciones de la población afectada se basan en el análisis de los datos sobre población procedente de Latinoamérica reportada por el Instituto Nacional de Estadística (INE), que en conjunción con los datos de consumo del principal fármaco de elección (benznidazol), permiten estimar la distribución de la población infectada en las diferentes regiones de España, así como la proporción de población que ha recibido tratamiento (Figura 1).

Figura 1. A) Población nacida en Latinoamérica que reside en España. Fuente: INE (1998-2001, consultado en 2009; 2002-2020, consultado en 2021). B) Consumo de benznidazol. Fuente: Fundación Mundo Sano. C) Estimación de la población afectada con la EC que reside en España, y estimación de la población que ha recibido tratamiento (en la gráfica de anillos, en amarillo % de población que habría recibido tratamiento, en rojo % de población que no ha sido tratada). Fuente: elaborado a partir de los datos de INE a enero de 2020 y los datos de consumo de benznidazol según Comunidades Autónomas.



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

Como la infección por *T. cruzi* es predominantemente crónica, no reúne las características para ser considerada una alerta sanitaria, por lo que no existe un programa de vigilancia nacional, su declaración no es obligatoria exceptuando en Cataluña.

Para cubrir este vacío, el CNM, desde la ULeish-Cha, inició un Programa de Vigilancia de la enfermedad de Chagas (PVEC) con los siguientes objetivos:

- Información epidemiológica de la prevalencia de la enfermedad de Chagas en las Comunidades Autónomas.
- Diagnóstico serológico en ausencia de programas de cribado serológico.
- Confirmación serológica en presencia de programas de cribado serológico.
- Diagnóstico parasitológico de la infección congénita.
- Diagnóstico o confirmación molecular de la presencia de parasitemia.
- Identificación molecular del genotipo infectante en situaciones de alta parasitemia.
- Estudio de intercomparación multicéntrico de pruebas serológicas y moleculares.
- Implantación de un programa de control de calidad de pruebas serológicas y moleculares.
- Seguimiento tras el tratamiento parasiticida.

- Conformación de una Red de Laboratorios de Chagas para contar con una vigilancia microbiológica nacional.

DISEÑO DEL PROGRAMA

Sujetos de estudio: Casos humanos de infección por *T. cruzi*, casos humanos sospechosos de ser portadores de *T. cruzi*.

Participantes: Abierto. Cualquier Laboratorio de Microbiología de los Hospitales de la Red Pública y los Laboratorios de Salud Pública de las CCAA. Los laboratorios privados solicitarán los estudios de referencia de acuerdo con convenios previamente establecidos.

Muestras, condiciones de envío y análisis de laboratorio:

Tabla 1. Muestras y determinaciones.

	Fase aguda Infección congénita* Reactivación aguda**	Fase crónica
Tipo de muestra	Sangre completa en EDTA	Suero o plasma
Técnicas de elección para el diagnóstico	Observación directa*** Microhematocrito***	Serologías para la detección de anticuerpos IgG (combinación de dos técnicas de diferentes antígenos y principios)
Técnicas complementarias	Cuantificación de la parasitemia****	PCR para la detección de parasitemia Cuantificación de la parasitemia****

*Cuando la madre tiene diagnóstico positivo para EC. **Cuando fue diagnosticado previamente por estudios serológicos como caso de infección crónica. *** Si se envía la muestra el mismo día que fue obtenida. ****Si se realiza seguimiento en un mismo individuo.

Las muestras pueden ser enviadas a temperatura ambiente en invierno o en refrigeración en verano.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

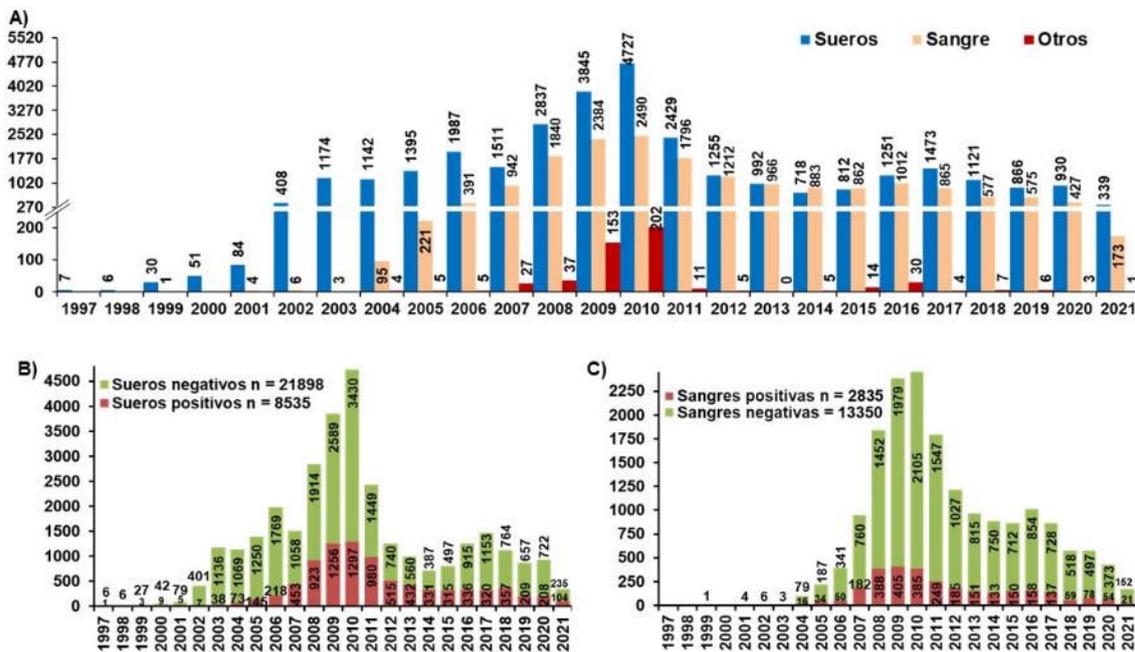
Cribado y confirmación en el diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas

En este informe describimos una revisión de las actividades en el diagnóstico de la EC en la Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas desde 1997 a mayo 2021 que justifica la existencia de este programa. Como se observa en la Figura 2, las peticiones de la EC aumentaron de forma paralela a la evolución de la población procedente de Latinoamérica hasta 2010 (Figura 1), lo que permitió contar con datos sobre la prevalencia de la EC en esos tiempos. Desde el año 2011 hasta antes de la implementación del programa en 2014, las peticiones fueron disminuyendo como consecuencia del coste de las pruebas. En ese periodo, colaboramos con algunos grandes hospitales en la implementación de sus propias herramientas serológicas. Cabe destacar que, a raíz del control de la EC en centros de transfusión, la industria invirtió en el desarrollo de sistemas automatizados de alto rendimiento para la detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi*, y por ello, actualmente, existe un amplio abanico de pruebas, incluso superior a los disponibles en áreas endémicas.

Mediante convenios y/o proyectos propios, hemos validado y/o verificado las propiedades de estas herramientas, permitiéndonos brindar asesoría en la interpretación de resultados serológicos.

En este contexto, el PVEC principalmente confirma los resultados del cribado serológico que es realizado en los hospitales, apoya con el cribado serológico a aquellos hospitales que por la escasa población de riesgo de sus áreas de influencia no disponen de pruebas para realizar el cribado *in situ*, facilitando de esta manera el cribado serológico de mujeres embarazadas y la detección y seguimiento de la infección congénita.

Figura 2. Revisión de las muestras analizadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas:
A) todas las muestras, B) muestras de sueros y C) muestras de sangre.

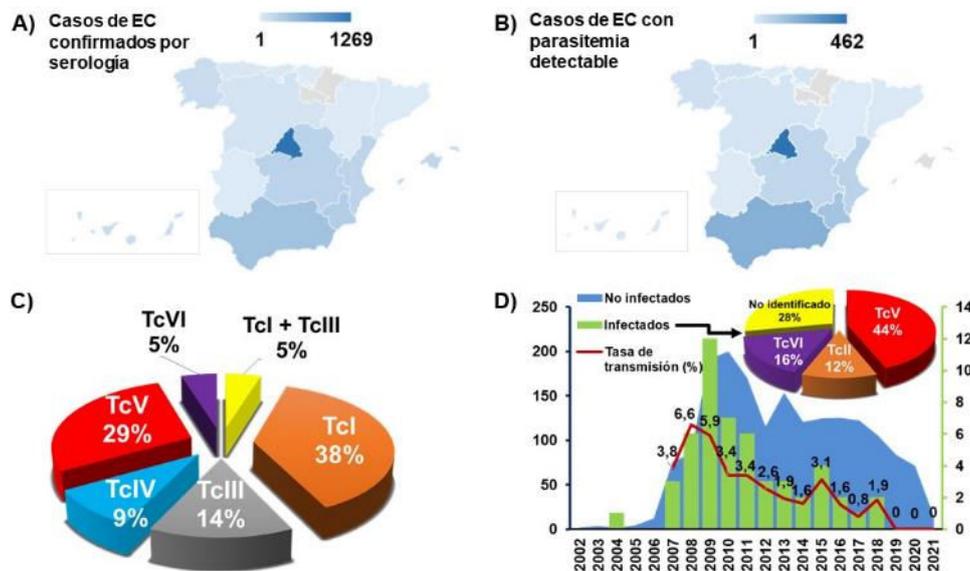


Por otro lado, mediante convenios, colaboramos también con organizaciones no gubernamentales como la Fundación Mundo Sano (FMS) y Salud Entre Culturas en el desarrollo de programas de cribados comunitarios para la detección activa de población afectada y que por su situación social y vulnerabilidad no siempre están cubiertos por los programas de cribado del Sistema Nacional de Salud (SNS). Los cribados serológicos en general confirman que la población más afectada procede de Bolivia, y que su prevalencia varía entre el 10 y el 20% según la región geográfica de España y el perfil de la población extranjera.

Según nuestros datos, la población afectada está distribuida en todo el territorio español (Figura 3A), la diferencia con respecto a las estimaciones presentadas en la Figura 1C, se debe a que no confirmamos todos los casos detectados en los hospitales que realizan la serología por cuenta propia. Un panorama similar, se observa en la distribución de los afectados con parasitemia positiva (Figura 3B), y como era de esperar, la caracterización molecular de los genotipos de *T. cruzi*, refleja lo descrito en Latinoamérica (Figura 3C). Aunque debemos mejorar esta identificación en muestras con baja carga parasitaria.

En 2008, se confirmó el último caso asociado a transfusión sanguínea, como el cribado serológico es obligatorio en donantes de sangre por el Real Decreto 1088/2005, se podría indicar que esta vía de transmisión está controlada. La única vía de transmisión pendiente de control es la transmisión vertical. En este sentido, la comunidad sanitaria-científica, fundaciones privadas y asociaciones de pacientes estamos trabajando en dos estrategias: tratamiento de la mujer en edad fértil y detección y tratamiento temprano de los niños infectados durante el embarazo o el parto. Según nuestros datos, el 2008 y 2009 fueron los años en los que más casos de infección congénita se detectaron. Por el contrario, el 2019 y 2020 no se confirmó ninguno. Queda pendiente evaluar si estos resultados son la consecuencia del tratamiento de mujeres en edad fértil, la implementación de pruebas moleculares en los hospitales o los fallos en la cobertura de detección, ya que también se observa disminución en el número de niños con riesgo de infección (Figura 3D). Igualmente, los genotipos de *T. cruzi* asociados a la transmisión vertical fueron los mismos descritos en Latinoamérica (Figura 3D), predominando TcV.

Figura 3. A) Distribución geográfica de los casos en fase crónica y B) de la población afectada con parasitemia detectable, datos de 2014 a mayo de 2021. C) Genotipos de *T. cruzi* detectados en la población con infección crónica. D) Evolución de la detección de la transmisión congénita desde 2002 a mayo 2021 y genotipos de *T. cruzi* detectados en los niños infectados.



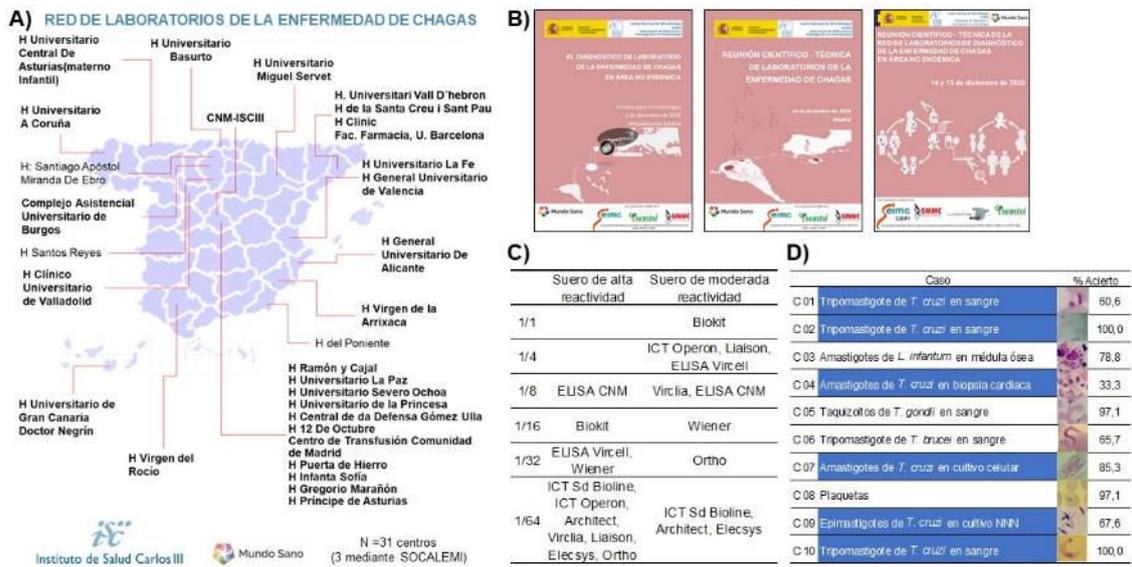
Red de laboratorios de Chagas en España

Para la OMS, España es la región modelo para verificar la interrupción de la transmisión por transfusión sanguínea y trasplantes de órganos, eliminar la transmisión congénita y alcanzar que el 75% de la población afectada reciba tratamiento, cuatro de los cinco objetivos de la estrategia de control de la EC para el 2030. Para cumplir estos objetivos, la calidad de los resultados de laboratorio es fundamental. Por ello, en 2018, con la finalidad de armonizar y facilitar la comparabilidad de las pruebas de laboratorio disponibles para el diagnóstico de la EC en España, y con el apoyo de la FMS, se conformó una Red Laboratorios de Chagas que está integrado por los Servicios de Microbiología de 30 hospitales de

12 Comunidades Autónomas y el Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología del CNM. Hasta el 2020, se celebraron 3 jornadas científicas, un ejercicio de comparabilidad de pruebas serológicas y otro de intercomparación de imágenes microscópicas digitalizadas. Los resultados de estos ejercicios muestran que disponemos de pruebas serológicas de alta sensibilidad analítica, destacando los sistemas automatizados, y que la eficiencia del diagnóstico por microscopía requiere mayor formación (Figura 4).

Como en serología, se priorizó la sensibilidad analítica, se ha generado un nuevo desafío: desarrollar herramientas que permitan monitorizar desde el laboratorio: el seguimiento del postratamiento y así facilitar la clasificación entre portador tratado *vs* no tratado.

Figura 4. A) Hospitales que conforman la Red de Laboratorios de Chagas. B) Carteles de las jornadas científico-técnicas celebradas desde 2018 a 2020. C) Resumen del ejercicio de comparabilidad de las pruebas serológicas. D) Resumen de los resultados del ejercicio virtual de microscopía.



CONCLUSIONES

El apoyo a los programas de cribado permite la detección oportuna de los portadores asintomáticos, su vinculación con el SNS, su atención integral y su tratamiento.

La detección temprana de los niños infectados permite el establecimiento temprano de un tratamiento específico, y en conjunción con el tratamiento de mujeres en edad fértil, contribuye a que, la tasa de transmisión congénita sea del 0%.

Las características de la infección por *T. cruzi* en España son el reflejo de las características de la infección en los países de origen. Los genotipos de *T. cruzi* que circulan en España y los asociados a la transmisión vertical son los mismos descritos en Latinoamérica, predominando TcV.

Este programa contribuye en el cumplimiento de los objetivos para el control de la EC propuestos en el plan estratégico 2021-2030 de la OMS.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. WHO. 2021. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis) [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). 2021. Fact sheets.
2. Flores-Chávez M, De Fuentes I, Gárate T, Cañavate C. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25 Supl 3:29-37.

Programa de la Resistencia a los antifúngicos en España

Informe elaborado por A. Alastruey-Izquierdo*, L. Alcázar-Fuoli*, M. J. Buitrago*, A. Gómez-López*, E. Mellado*, C. Rueda* y Ó. Zaragoza*.

Laboratorio de Referencia e Investigación en Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

*CIBER de Enfermedades Infecciosas. CIBERINFEC.

INTRODUCCIÓN

El aumento de prevalencia de las infecciones fúngicas es un hecho incuestionable. Además, su todavía elevada morbi-mortalidad y la escasa rentabilidad de las técnicas diagnósticas disponibles han propiciado un aumento en la utilización profiláctica y empírica de los tratamientos antifúngicos, cuyo uso se ha incrementado significativamente (hasta un 30%) desde el inicio del nuevo milenio.

Según algunas estimaciones, la incidencia anual de infecciones fúngicas invasoras en España se sitúa entre 5.000 y 8.000 casos. Otros 20.000 enfermos son tratados de forma empírica y profiláctica con antifúngicos. Además, existen infecciones no invasoras en las que también se utilizan antifúngicos. Se calcula que existen 11.000 casos anuales de candidiasis orofaríngea y unas 800.000 mujeres españolas con candidiasis vaginal. El gasto anual en antifúngicos se estima en 1.000-1.500 millones de euros.

Un factor adicional a tomar en consideración es la utilización masiva de antifúngicos en agricultura como control de plagas. Algunos de estos plaguicidas, como los DMIs (inhibidores de la 14 α esterol demetilasa), pertenecen a familias farmacológicas que comparten el mecanismo de acción de los azoles, que son los antifúngicos más empleados en infecciones humanas. No existen datos fiables en España, pero cada año se utilizan miles de toneladas de estos antifúngicos como plaguicidas en explotaciones agrícolas, parques y jardines.

Como resultado de estas prácticas, la resistencia a los antifúngicos empieza a ser un asunto que debe tomarse en consideración. Actualmente se dispone de tres familias de antifúngicos para el tratamiento de la infección fúngica invasora: los polienos, los azoles y las equinocandinas. Los antifúngicos más utilizados son los azoles, por su buen índice terapéutico, precio y escasa toxicidad. Los datos más recientes indican que un 15% de los casos de candidiasis invasora están causados por cepas con resistencia/sensibilidad reducida a los azoles. En algunos países, se han descrito porcentajes de resistencia en *Aspergillus* superiores al 20% y existen evidencias que la asocian al uso de plaguicidas en agricultura, como se ha indicado en un estudio publicado por el ECDC. Además, hay que considerar la aparición de infecciones producidas por especies que presentan resistencia intrínseca a los azoles, que según estudios recientes supondrían el 5 - 10% de todas las infecciones fúngicas invasoras. Las equinocandinas son una familia de fármacos más recientes y

se han convertido en el tratamiento de elección para la mayoría de candidiasis invasoras, siendo recomendadas como tratamiento de primera línea en las últimas guías europeas.

La resistencia adquirida a equinocandinas es aún poco frecuente, aunque ya se ha descrito en múltiples especies de *Candida* como *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, y *Candida glabrata*, y además se espera que aparezca principalmente en los próximos años con la generalización de su uso.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

Considerando el posible aumento de la resistencia y su relevancia clínica se diseñó el programa de vigilancia a antifúngicos en el Centro Nacional de Microbiología (CNM). Su principal objetivo es el análisis de los posibles mecanismos de resistencia a los antifúngicos y su distribución en España mediante la aplicación de metodologías fenotípicas y moleculares.

DISEÑO DEL PROGRAMA

Sujetos del estudio: Cepas aisladas de pacientes con sospecha de Infección fúngica seleccionadas desde el laboratorio de microbiología hospitalario, que puedan ser resistentes a los antifúngicos según métodos fenotípicos o por ausencia de respuesta clínica en el paciente.

Participantes: Abierto. Cualquier laboratorio de microbiología hospitalaria de la red pública y los laboratorios de salud pública de las CCAA.

Muestras, condiciones de envío y análisis de laboratorio: Cepas de los complejos de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *Candida tropicalis* que se sospeche puedan ser resistentes a los antifúngicos.

Metodología: Se realiza una determinación del perfil de sensibilidad a los antifúngicos mediante la técnica de referencia EUCAST. Las cepas clasificadas como resistentes según los puntos de corte establecidos por el EUCAST son identificadas molecularmente a nivel de especie.

Además, se caracterizan molecularmente los mecanismos resistencia a antifúngicos en estas cepas, mediante amplificación y secuenciación de genes implicados en resistencia como son *ERG11* y *FKS* para especies de *Candida* y *cyp51* en especies de *Aspergillus*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El programa de vigilancia de resistencia a antifúngicos se estableció en el CNM en junio de 2014. En este informe se incluye el análisis de los resultados obtenidos desde su implementación hasta el 31 de diciembre de 2020. La [tabla 1](#) resume el número de cepas recibidas según la especie y por año en el periodo estudiado.

Tabla 1. Número de cepas recibidas por año y especie.

Especie	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
<i>C. albicans</i>	0	8	15	31	16	9	12	91
<i>C. parapsilosis</i>	0	7	6	7	0	5	25	50
<i>C. glabrata</i>	0	7	26	30	9	9	0	81
<i>C. tropicalis</i>	0	3	5	10	5	14	6	43
<i>C. krusei</i>	0	3	2	3	0	1	0	9
Otras especies de <i>Candida</i>	0	1	10	15	19	7	3	55
<i>A. fumigatus</i>	6	19	23	61	26	32	47	214
<i>A. flavus</i>	0	7	8	11	7	9	4	46
<i>A. niger</i>	0	1	1	1	1	0	4	8
<i>A. terreus</i>	1	7	4	29	14	8	15	78
Otras especies de <i>Aspergillus</i>	0	9	7	19	12	14	25	86
Total	7	72	107	217	109	108	141	761

Además, se recibieron por el programa de vigilancia un total de 67 cepas pertenecientes a especies no incluidas en el mismo y cuyo estudio molecular no se realizó.

Por otro lado, se analizó la distribución territorial de las cepas recibidas por las comunidades autónomas y por año (tabla 2).

Tabla 2. Distribución por comunidades autónomas.

Comunidad autónoma	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
ANDALUCIA	1		1	2	6	14	3	27
ARAGON		7	2	5		4	3	21
ASTURIAS		1		1			3	5
CANTABRIA							3	3
CASTILLA LA MANCHA	1		2	19		2	3	27
CASTILLA Y LEON	1	10	5	16	19	8	4	63
CATALUÑA	1	7	7	9	16	6	5	51
EXTREMADURA					2			2
GALICIA	1	1	4	3	1	1	1	12
ISLAS BALEARES			1					1
ISLAS CANARIAS		3			2		2	7
MADRID	2	32	80	156	52	69	110	501
MELILLA					3			3
MURCIA			1		3			4
NAVARRA		1		1	2	1	1	6
PAIS VASCO		7	2		1	1	3	14
VALENCIA		3	2	5	2	2		14
Total	7	72	107	217	109	108	141	761

Análisis de resistencia

De acuerdo a los puntos de corte definidos por EUCAST las cepas se analizaron para cada tipo de antifúngico y se clasificaron como sensibles y resistentes.

Resistencia a polienos

La resistencia a la anfotericina B es poco habitual por lo que para las cepas incluidas en el programa de vigilancia del género *Candida* ninguna cepa con puntos de corte disponibles según EUCAST se clasificó como resistente. Una cepa de *A. fumigatus* del año 2017 superó en una dilución el punto de corte de resistencia para anfotericina B (>1mg/L) dentro de las especies analizadas de *Aspergillus*.

Resistencia a los azoles

La resistencia a los azoles se ha descrito tanto en especies de *Cándida* como de *Aspergillus*. Para las especies de *Cándida* incluidas en el programa de vigilancia se analizó el número de aislados resistentes por año y distribuidos por especies (Tabla 3).

Tabla 3. Número y porcentaje (%) de cepas resistentes por año de las distintas especies de *Cándida* incluidas en el programa.

Especie*	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
<i>C. albicans</i>	3 (37,5)	3 (20)	3 (9,7)	0	2 (22,2)	1 (8,3)	12 (13,2)
<i>C. parapsilosis</i>	0	1 (16,7)	2 (28,6)	0	3 (60)	18 (25)	24 (48)
<i>C. glabrata</i>	2 (28,6)	7 (26,9)	14 (46,7)	5 (55,5)	1 (11,1)	0	29 (35,8)
<i>C. tropicalis</i>	1 (33,3)	2 (40)	5 (50)	1 (20)	5 (35,7)	1 (16,7)	15 (34,9)
Total	6 (24)	13 (25)	24 (30,8)	6 (20)	37 (29,7)	20 (46,5)	30 (30,2)

**C. krusei* no tiene puntos de corte definidos para ningún azol.

La resistencia a azoles entre las especies de *Aspergillus* está asociada fundamentalmente en *A. fumigatus* aunque también se han descrito casos de otras especies de *Aspergillus* con valores de CMI elevados frente a azoles, como *A. terreus* y *A. flavus*. La tabla 4 muestra un resumen del número de cepas de *Aspergillus* resistentes a los azoles en el periodo de este estudio.

Tabla 4. Número y porcentaje (%) de cepas resistentes por año de las distintas especies de *Aspergillus* incluidas en el programa.

Especie*	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
<i>A. fumigatus</i>	4 (66,7)	0	1 (4,35)	3 (4,92)	7 (26,9)	7 (21,9)	8 (17)	30 (14)
<i>A. flavus</i>	0	1 (14,3)	0	1 (9,09)	1 (14,3)	3 (33,3)	0	6 (13)
<i>A. terreus</i>	0	1 (14,3)	0	5 (17,2)	5 (35,7)	4 (50)	0	10 (19,2)
Total	4 (57,1)	2 (5,9)	1 (2,8)	9 (8,8)	13 (27,1)	14 (28,6)	8 (11,4)	(14,7)

**A. niger* no tiene puntos de corte definidos para ningún azol.

Resistencia a equinocandinas

Las equinocandinas son el tratamiento de primera línea para las infecciones causadas por *Cándida*. Estas especies son generalmente sensibles a equinocandinas, y la incidencia de la resistencia a esta familia de antifúngicos es baja excepto para *C. glabrata* donde el número de casos de resistencia adquirida a equinocandinas está aumentando. En la [tabla 5](#) se describe el número de cepas analizadas de *Cándida* que resultaron resistentes a las equinocandinas.

Tabla 5. Número y porcentaje (%) de cepas resistentes por año de las distintas especies de *Candida* incluidas en el programa.

Especie	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
<i>C. albicans</i>	0	0	0	1 (6,25)	0	1 (8,33)	2 (2,2)
<i>C. parapsilosis</i>	0	0	0		0	0	0
<i>C. glabrata</i>	3 (42,9)	12 (46,2)	7 (23,3)	3 (33,3)	2 (22,2)	0	27 (33,3)
<i>C. tropicalis</i>	1 (33,3)	0	0	0	0	0	1 (2,3)
<i>C. krusei</i>	0	0	0		0	0	0
Total	4 (14,3)	12 (22,2)	7 (8,4)	4 (13,3)	2 (5,3)	1 (2,3)	30 (10,9)

Caracterización de los mecanismos de resistencia.

A continuación, se describen las mutaciones encontradas en el gen *cyp51A* y su promotor en cepas de *A. fumigatus* resistentes a azoles ([Tabla 6](#)) y en los *hot spot* (HS) de los genes *FKS* de las cepas de *C. glabrata* resistentes a equinocandinas ([Tabla 7](#)) por ser las especies en la que se detectaron un mayor número de cepas resistentes.

Tabla 6. Resumen de mecanismos de resistencia encontrados en cepas de *A. fumigatus*

Número de cepas analizadas	Mecanismo de resistencia	Tipo de resistencia	Comunidad autónoma
8	TR+L98H	Resistencia cruzada a azoles	Cataluña, Castilla y León, Andalucía, País Vasco, Madrid
1	TR46/Y121F/T289A	Resistencia cruzada a azoles	Madrid
3	G54R	Resistencia a itraconazol y posaconazol	Cataluña
1	G448S	Resistencia cruzada a azoles	Madrid
9	Sin mutaciones en <i>cyp51A</i>	Resistencia cruzada a azoles	Galicia, Cataluña, Andalucía, Madrid

Tabla 7. Resumen de mecanismos de resistencia encontrados en cepas de *Candida glabrata* resistentes a equinocandinas.

Número de cepas analizadas	Mecanismo de resistencia	Región de la mutación	Comunidad autónoma
1	S629P	<i>FKS1</i> -HS1	Aragón
1	L630R	<i>FKS1</i> -HS1	Madrid
2	F659del	<i>FKS2</i> -HS1	Madrid
1	F659del+D666N	<i>FKS2</i> -HS1	Madrid
1	F659S	<i>FKS2</i> -HS1	Castilla la Mancha
6	S663P	<i>FKS2</i> -HS1	Madrid, Castilla y León
1	L664R	<i>FKS2</i> -HS1	Madrid
3	D666N	<i>FKS2</i> -HS1	Madrid
1	P667T	<i>FKS2</i> -HS1	Aragón
3	Sin mutaciones en los genes <i>FKS</i>		Madrid

CONCLUSIONES

- La adherencia al programa fue incrementándose con el tiempo, desde su implantación en el año 2014 alcanzando su máximo en el año 2017. En el año 2018 hubo una disminución que se ha mantenido durante los tres últimos años.
- Según la representación territorial, los resultados muestran que Madrid es la comunidad autónoma que más cepas envía por este programa. La Rioja y la ciudad autónoma de Ceuta no han mandado ninguna cepa en los años que el programa lleva activo.
- La resistencia a los azoles se sitúa en 30,2 % para *Candida* y 14,7 % para *Aspergillus*.
- El 10,9% de las cepas de *Candida* con puntos de corte disponibles fueron resistentes a equinocandinas.
- Hay que destacar que las tasas de resistencia están sesgadas ya que la sospecha de resistencia es un criterio de inclusión en el programa.
- La mayoría de los mecanismos de resistencia encontrados en las cepas son mecanismos ya descritos en la literatura, aunque hay cepas en las cuales no se ha encontrado el mecanismo que explicaría su fenotipo de resistencia.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Breakpoints and methods for susceptibility testing of yeasts, moulds and dermatophytes are developed and validated by the EUCAST subcommittee on AFST: https://www.eucast.org/ast_of_fungi/
2. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(12):e383-e392.
3. Rodríguez-Tudela JL, Alastruey-Izquierdo A, Gago S, et al. Burden of serious fungal infections in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2015 Feb;21(2):183-9.
4. Guinea J, Zaragoza Ó, Escribano P, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility of yeast isolates causing fungemia collected in a population-based study in Spain in 2010 and 2011. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(3):1529-37.
5. Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Rivero-Menéndez O, et al. Molecular Identification and Susceptibility Testing of Molds Isolated in a Prospective Surveillance of Triazole Resistance in Spain (FILPOP2 Study). *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(9):e00358-18.

AGRADECIMIENTOS

Los programas de vigilancia microbiológica del CNM solo pueden comprenderse en íntima asociación con la vigilancia epidemiológica, con la que conforman una unidad inseparable. En este sentido, nuestro trabajo se realiza en estrecha colaboración con el Centro Nacional de Epidemiología (CNE). Por ello, queremos comenzar este apartado agradeciendo y reconociendo su trabajo a nuestras compañeras y compañeros del CNE.

Estos programas de vigilancia solo se pueden concebir en el contexto de la colaboración con la red pública de laboratorios de Microbiología, muchos de los cuales han sido designados de manera específica como integrantes de Redes de Laboratorios de algunos de los Programas. Por otra parte, tampoco podrían existir sin el concurso de los hospitales y centros de atención primaria, ni el de los servicios territoriales de Salud Pública. Nuestro agradecimiento y reconocimiento a los profesionales de todos ellos.

Muchos de estos programas de vigilancia se desarrollan en el contexto de planes nacionales impulsados y coordinados por la Dirección General de Salud Pública del Ministerio de Sanidad, a cuyos profesionales también queremos reconocer y agradecer su tarea

Finalmente, queremos agradecer a la Dirección del Instituto de Salud Carlos III su respaldo a estos programas y a la realización de esta obra.