2023

Programas de Vigilancia Microbiológica. Centro Nacional de Microbiología. Volumen 2 2021-2022

GOBIERNO DE ESPAÑA
MINISTERIO DE CIENCIA, INNOVACIÓN Y UNIVERSIDADES
Instituto de Salud Carlos III
Centro Nacional de Microbiología

Centro Nacional de Microbiología
Instituto de Salud Carlos III
Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades

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

Publicación incluida en el Programa Editorial 2023 del suprimido Ministerio de Ciencia e Innovación, y editada por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, de acuerdo con la reestructuración ministerial establecida por Real Decreto 829/2023, de 20 de noviembre.

Catálogo general de publicaciones oficiales:
https://cpage.mpr.gob.es/

Para obtener este informe de forma gratuita en Internet:
https://publicaciones.isciii.es/

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

Edita: Instituto de Salud Carlos III
Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades
NIPO pdf : 834230215
NIPO Epub: 83423020X
DOI: 10.4321/repisalud.16683

Diseño: Editorial MIC
Maquetación: Diseño Gráfico Gallego y Asociados, S. L.

Editores:

Juan Emilio Echevarría Mayo

Jesús Oteo Iglesias

Isabel Jado García

Cita sugerida:

Echevarria Mayo J. E.; Oteo Iglesias J.; Jado Garcia I. (editores). Programas de Vigilancia Microbiológica Centro Nacional de Microbiología. Volumen 2. 2021-2022 Majadahonda (Madrid); Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología: 2023.

ÍNDICE

Prólogo 5
Enfermedad Meningocócica Invasiva (2020-2022) 8
Listeriosis, 2021-2022 14
Infección Gonocócica.Sensibilidad Antimicrobiana, 2021-2022 21
Streptococcus pneumoniae 29
Enfermedad invasiva por *Streptococcus pyogenes* o estreptococo del grupo A 37
Haemophilus influenzae 42
Resistencia a Antibióticos 49
Infecciones estafilocócicas 58
Infecciones entéricas bacterianas transmitidas por agua y alimentos. CNM 64
Legionelosis 77
Infecciones causadas por especies toxigénicas del género *Corynebacterium*. CNM 86
Resistencias en el complejo tuberculoso 91
Micobacterias no tuberculosas 100
Gripe 107
SARS-CoV-2 114
Enterovirus y Parálisis Flácida en menores de 15 años 121
Parotiditis 128
Sarampión y Rubeola 133
Varicela y Herpes Zóster 140
Enfermedades Víricas Transmitidas por Vector 147
Rabia 152
Variantes del Virus de la Hepatitis B de Impacto en Salud Pública y Estudio de Brotes de Hepatitis 159
Leishmaniasis Humana en la Comunidad de Madrid 161
Enfermedad de Chagas 171
Resistencia a los antifúngicos en España 179
Brotes epidémicos estudiado en el Centro Nacional de Microbiología durante el periodo 2019-2023 186
Respuesta rápida a alertas microbiológicas y crisis sanitarias 193
- Origen, funcionamiento y actividad del SRR del CNM 194
- Fiebres hemorrágicas víricas 196
- Enfermedades por ortopoxvirus 200
- Enfermedad por coronavirus emergentes 203
- Antrax 207
- Peste 212
- Ricina 215

Agradecimientos 218

Prólogo

En la segunda mitad del siglo XX tuvieron lugar importantes avances sanitarios, como la introducción de los antimicrobianos en la práctica clínica y el desarrollo de vacunas, todo ello, junto con las mejoras sociales e higiénicas, propiciaron un descenso muy significativo de la morbilidad y mortalidad asociadas a las enfermedades infecciosas, que alcanzaron valores bajos, fundamentalmente en los países más avanzados. Sin embargo, y aún hoy en día, persisten grandes diferencias entre las regiones del norte y los países del hemisferio sur, menos favorecidos, en términos del impacto que producen las enfermedades transmisibles. Se estima que alrededor de una quinta parte de la población mundial no tiene acceso a ningún tipo de atención médica, lo que implica la falta de tratamientos antimicrobianos, vacunas o cualquier otro tipo de medicación de soporte. Esta situación se acentúa en lugares afectados por crisis prolongadas ocasionadas por hambrunas, sequías, conflictos bélicos y desplazamientos poblacionales por causas políticas, religiosas o climáticas. Por consiguiente, la pobreza continúa siendo la enfermedad más letal, según la Organización Mundial de la Salud.

A pesar de los antecedentes mencionados, la pandemia de COVID-19, que pronto cumplirá 4 años de su inicio, representó uno de los mayores desafíos de nuestra era. Supuso un evento sin precedentes a escala global que nos hizo conscientes sobre el gran impacto que aún pueden tener las enfermedades infecciosas, no solo sobre la salud de los ciudadanos, sino también en aspectos cruciales de la vida como la actividad personal, mental, social y económica. Esta reflexión se hizo aún más evidente en los países desarrollados, donde parecía impensable que una infección respiratoria pudiera alterar, e incluso paralizar, el llamado estado de bienestar. La pandemia de COVID-19, con todas sus consecuencias, nos dejó una lección clara: necesitamos invertir mucho más y mejor en la investigación sobre las enfermedades infecciosas y fortalecer nuestra capacidad de respuesta.

Uno de los pilares más relevantes para comprender, prevenir y controlar estas enfermedades implica desarrollar herramientas eficaces que nos ayuden a comprender y detectar en tiempo real lo que está sucediendo, cómo son y cómo evolucionan los microorganismos causantes de las enfermedades. Estos interrogantes forman la base de la vigilancia microbiológica y de la vigilancia epidemiológica, que deben ir siempre de la mano para resolver de manera eficiente los problemas en un mundo en constante cambio e intensamente interconectado.

Posteriormente a la crisis sanitaria del SARS-CoV-2 en 2020, se han producido otros eventos relevantes, como la emergencia de la enfermedad Mpox, ocasionada en 2022 por un virus de viruela símica, que ha acumulado hasta el momento más de 90 mil casos confirmados, 157 muertes afectando al menos a 117 países. Esta nueva pandemia, otras alertas sanitarias, brotes de agentes desconocidos junto con nuevas situaciones excepcionales, como los recientes conflictos bélicos y el cada vez más evidente cambio climático, subrayan que las enfermedades infecciosas siguen siendo una amenaza fundamental y que sólo podremos combatir a través de la ciencia y la cooperación internacional. La investigación científica es, sin duda, la mejor herramienta para comprender, prevenir y controlar las enfermedades infecciosas y, por lo tanto, debe ser apoyada y financiada, fomentando la colaboración multidisciplinar y la innovación en este ámbito.

El Centro Nacional de Microbiología (CNM) se enfoca, además de su actividad investigadora, en proporcionar asistencia científico-técnica al Sistema Nacional de Salud en la vigilancia, control y prevención de las enfermedades infecciosas. Esto incluye la detección rápida de infecciones emergentes y/o poco frecuentes, la descripción de nuevas variantes circulantes y la caracterización de brotes, entre otros importantes objetivos. Estas actividades forman parte de la vigilancia microbiológica, que en el CNM se estructura en los Programas de Vigilancia, abarcando tareas de referencia y caracterización de los principales agentes patógenos para el ser humano. El CNM se coordina estrechamente, para el cumplimiento de estos objetivos, con el ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) y con la Organización Mundial de la Salud. En los últimos años en los laboratorios del CNM se ha comenzado a trabajar en la caracterización microbiológica a través de la vigilancia genómica, que implica la secuenciación de genomas completos dentro de los Programas de Vigilancia. Esto incluye, la vigilancia de nuevas variantes de SARS-CoV-2 y el análisis de bacterias multirresistentes transmitidas en el ámbito hospitalario. Además, se centra también en el estudio de brotes de listeriosis, otras enfermedades transmitidas por agua y alimentos, cepas multirresistentes de gonococo y tuberculosis, entre otros. Este enfoque se está impulsando y expandiendo a otros grupos de enfermedades y patógenos, lo que supone una nueva perspectiva y hoja de ruta en la vigilancia, lo que permitirá en un futuro cercano intervenciones más precisas y tempranas para el control de las enfermedades infecciosas.

Este libro representa una nueva edición actualizada de las tareas realizadas dentro de los Programas de Vigilancia Microbiológica del CNM, en comparación con la edición anterior publicada a finales de 2021. Su lectura proporciona una visión integrada de las características microbiológicas de los principales agentes infecciosos en nuestro país y las amenazas infecciosas que más preocupan en Salud Pública. Se

trata de una iniciativa que busca continuación en próximas ediciones, lo que permitirá el seguimiento de las tendencias evolutivas en el tiempo y también según el área geográfica en estudio. Se puede considerar un libro de gran interés en el campo de la Microbiología de las enfermedades infecciosas, que debe complementarse necesariamente con la visión epidemiológica. Cabe destacar también el papel crucial del CNM y de sus Programas de Vigilancia Microbiológica en el desarrollo de Planes Nacionales para abordar problemas sanitarios de preocupación en constante evolución y también en los Planes de Control, Eliminación o Erradicación, para enfermedades como la polio, rabia, el sarampión y enfermedades desatendidas como el Chagas y la leishmaniasis, entre otras. En esta edición, y por primera vez, se ha incluido un capítulo dedicado al Grupo de Respuesta Rápida del CNM, que trabaja ininterrumpidamente las 24 horas del día, los 365 días del año desde su creación en 2014, en la detección rápida y el diagnóstico de microorganismos emergentes y/o altamente patógenos implicados en alertas sanitarias a nivel nacional, proporcionando apoyo al SNS y a las CC. AA. que lo requieran.

Estar preparados ante una amenaza de naturaleza infecciosa implica una planificación exhaustiva y coordinada que abarca múltiples aspectos, incluidos los sistemas de salud, las infraestructuras, la capacidad de respuesta multidisciplinar y la colaboración internacional. Adoptar un enfoque integral nos permitirá mejorar nuestra capacidad para hacer frente a los problemas generados por los agentes infecciosos. En este contexto, resulta fundamental generar e interpretar datos microbiológicos de alta calidad basados en las tecnologías de secuenciación de genomas completos, lo que posiblemente contribuirá a reducir su impacto en la Salud de la población y también en la economía. La labor de vigilancia de las enfermedades transmisibles, llevada a cabo en los laboratorios del CNM, desempeña un papel fundamental en la detección temprana, el diagnóstico preciso y la respuesta efectiva en el control y prevención de las amenazas de naturaleza infecciosa para la Salud Pública en nuestro país.

Isabel Jado

Enfermedad Meningocócica Invasiva (2020-2022)

Informe elaborado por R. Abad, C. Navarro, C. García-Amil, E. Martín, M. Montes, J. Camacho 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. 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 nuestro entorno europeo, el *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) refleja en 2018 (último año para el que hay datos accesibles) 3.233 casos confirmados, lo que supone una tasa de 0,62 casos por cada 100.000 habitantes en la Unión Europea. Ese mismo año España registró una tasa de 0,82 que es ligeramente superior a la que se observa en la Unión Europea en su conjunto. En general se viene observando una tendencia a la baja en el número de casos en Europa desde el año 2000, aunque desde el año 2015 esa tendencia se frenó y el número de casos se mantiene similar o ligeramente superior en los últimos 4 años disponibles. Una figura muy similar se observaba 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 y que en España han resultado en 5 ondas epidémicas desde que existen registros epidemiológicos,

la primera en los años 40 del siglo XX, con una tasa máxima de 5 x 10^5, la segunda en los años 60 con una tasa similar, la tercera entre 1970 y 1974 con tasa de 10, seguida de una cuarta, que es la más importante cuantitativamente, entre los años 1979 a 1985 en la que se alcanzó el pico máximo en 1981, con una tasa de 13,2, siendo la quinta y última entre los años 1996 al 2000, con el mayor pico en 1997, con 5,8 casos por cada 100.000 habitantes.

El CNM lleva realizando la vigilancia microbiológica de la EMI desde los años 70 a través de su Programa de Vigilancia Microbiológica de EMI cuyo diseño, objetivos y resultados previos pueden consultarse en http://gesdoc.isciii.es/gesdoc-controller?action=download&id=08/02/2022-fc27d35665

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

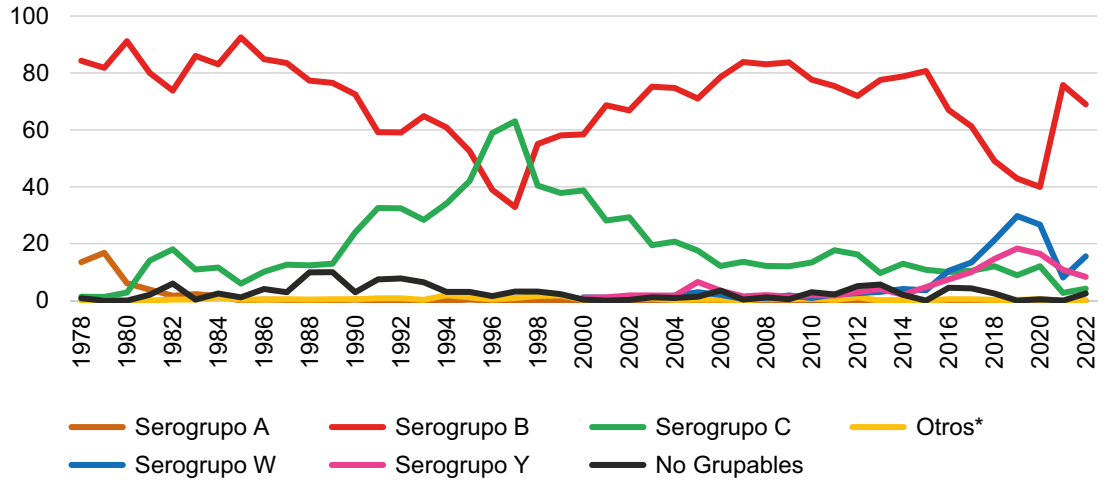
Representatividad de la muestra recibida en el Programa: Desde el año 2000 hasta 2019, la representatividad de la muestra recibida en el LRM osciló entre un 67% y un 72% comparando con los casos confirmados y declarados a RENAVE. En 2020 la representatividad fue de un 64%, en 2021 de un 62% y en 2022 de un 76,8%. Es evidente que durante el periodo pandémico de COVID-19, la representatividad ha sido algo inferior, aunque se ha mantenido en unos niveles aceptables, recuperándose una vez pasada la pandemia.

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 2022. 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. Distribución anual de serogrupos de *Neisseria meningitidis* en España (%) (1978-2022).



En ambos casos se ha constatado la eficacia de la información generada desde el Laboratorio de Referencia de la Enfermedad Meningocócica (LRM) del CNM para la detección precoz de este tipo de eventos con implicaciones en Salud Publica.

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 aumenta a principios de este siglo mientras que va disminuyendo significativamente el 19, 15. En el momento actual, las cepas 19, 15 sólo representan un 5% mientras que las caracterizadas como 22, 14 suponen un 33% de las de serogrupo B en 2020, un 45% en 2021 y un 32% en 2022. Aquellas caracterizadas como 22,9 solo representan un 3,3% en 2020, un 14% en 2021 y un 9% en 2022. Las 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, de forma que el genosubtipo 5, 2 representa un 76% de las cepas W en 2020, un 67% en 2021 y un 80% en 2022.

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 36% de las cepas de serogrupo B son del cc213, y sólo un 6,8% pertenecen al cc41/44. El cc32, frecuente en países de nuestro entorno, sólo representa un 9% en España. El cc11 ha sido el mayoritario tanto para las cepas de serogrupo C como para las de serogrupo W, suponiendo un 80% de las cepas W en 2022.

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 20% en 2020, un 3% en 2021 y un 12% en 2022. 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 el 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

- Los datos que se muestran para los años 2020, 2021 y 2022 deben ser tomados con cierta precaución al tratarse de años en los que el número de casos de EMI ha bajado drásticamente debido a las medidas de aislamiento social y por lo tanto a una mucho menor circulación de las cepas entre la población.
- 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 un determinado nivel de caracterización en ausencia de cultivo, la vigilancia de la susceptibilidad a los antimicrobianos, 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 redunda 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.

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 Feb;17(2):85-9. doi: 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 Mar 7;11(3):e0150721. doi: 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 Dec;75(6):511-520. doi: 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 Mar 13;9(2):e00036-18. doi: 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 Apr;82(4):37-44. doi: 10.1016/j.jinf.2021.01.030
6. Castilla J, García Cenoz M, Abad R, Sánchez-Cambronero L, Lorusso N, Izquierdo C, Cañellas Llabrés S, Roig J, Malvar A, González Carril F, Boone

ALD, Pérez Martín J, Rodríguez Recio MJ, Galmés A, Caballero A, García Rojas A, Juanas F, Nieto M, Viloria Raymundo LJ, Martínez Ochoa E, Rivas AI, Castrillejo D, Moreno Pérez D, Martínez A, Borràs E, Sánchez Gómez A, Pastor E, Nartallo V, Arteagoitia JM, Álvarez-Fernández B, García Pina R, Fernández Arribas S, Vanrell J, García Hernández S, Mendoza RM, Méndez M, López-Tercero MM, Fernández-Rodríguez Á, Blanco Á, Carrillo de Albornoz FJ, Ruiz Olivares J, Ruiz-Montero R, Limia A, Navarro-Alonso JA, Vázquez JA, Barricarte A. Effectiveness of a Meningococcal Group B Vaccine (4CMenB) in Children. N Engl J Med. 2023 Feb 2;388(5):427-438. doi: 10.1056/NEJMoa2206433.

7. Peterson ME, Li Y, Bita A, Moureau A, Nair H, Kyaw MH; Meningococcal Surveillance Group (in alphabetical order); Abad R, Bailey F, Garcia IF, Decheva A, Krizova P, Melillo T, Skoczynska A, Vladimirova N. Meningococcal serogroups and surveillance: a systematic review and survey. J Glob Health. 2019 Jun;9(1):010409. doi: 10.7189/jogh.09.010409

Listeriosis, 2021-2022

Informe elaborado por R. Abad, C. García-Amil, J. Camacho, C. Navarro, E. Martín, M. Montes 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 0,51 casos por 100.000 habitantes (2.268 casos confirmados) en Europa y de 0,99 (450 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 (96,5%) y mortalidad (13,7%) (3).

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.

El CNM lleva realizando la vigilancia microbiológica de la listeriosis desde los años 90 a través de su Programa de Vigilancia Microbiológica de Listeriosis, cuyo diseño, objetivos y resultados previos pueden consultarse en http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=08/02/2022-fc27d35665 (4).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En 2021 y 2022, el CNM recibió 145 y 191 aislados clínicos de *L. monocytogenes* procedentes de pacientes de 15 y 14 CC. AA, respectivamente (Tabla 1). En cuanto a la representatividad de estos datos, el CNM recibió el 38,7% y 42,4% del total de casos de listeriosis confirmados notificados a la RENAVE en 2021 y 2022 (2).

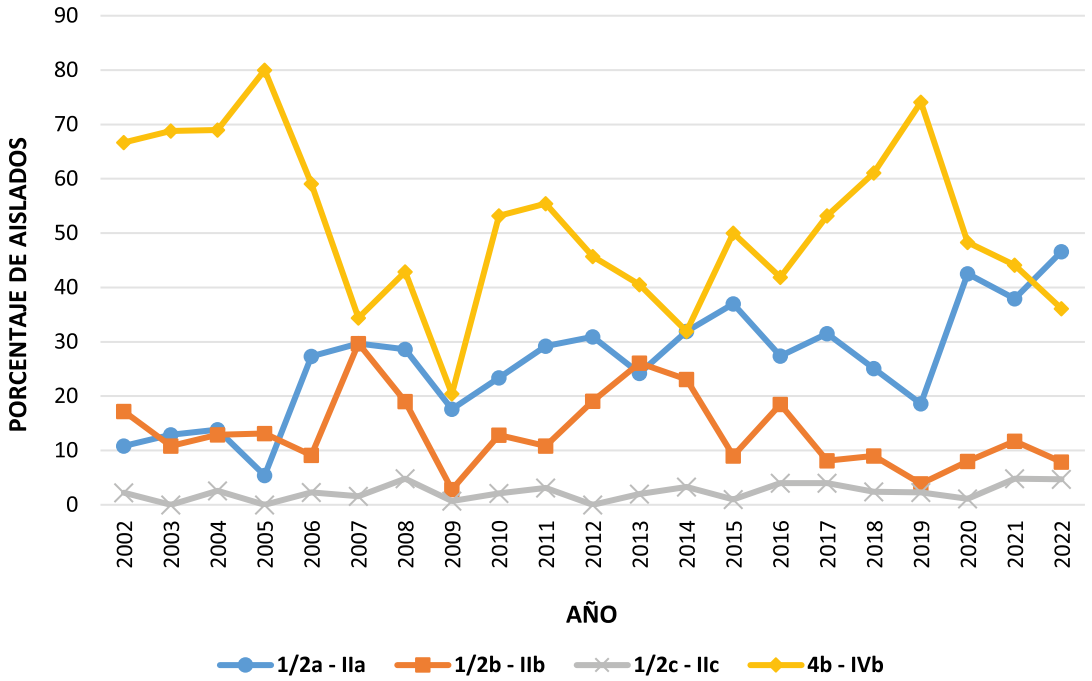
Hasta 2021 el serogrupo IVb continúa siendo el más prevalente (n= 64, 44,1%), como ha venido ocurriendo desde que se tienen registros, seguido de los serogrupos IIa (37,9%, n=55), IIb (11,7%, n=17) y IIc (4,8%, n=7). Sin embargo, en 2022, el serogrupo IIa ha pasado a ser el mayoritario (46,6%, n=89), seguido de los serogrupos IVb (36,1%, n=69), IIb (7,9%, n=15) y IIc (4,7%, n=9) (Figura 1), datos que coinciden con lo detectado a nivel europeo donde en 2022 también el serogrupo IIa ha pasado a ser el más representativo (45,2%) (5).

Tabla 1. Aislados clínicos de *Listeria monocytogenes* recibidos por CC. AA., 2015-2022.

	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Andalucía	8	5	27	48	256	29	33	53
Aragón	4	9	5	7	6	1	6	11
Asturias	0	0	0	0	3	0	1	6
Baleares	1	2	2	4	6	0	6	4
Canarias	1	1	4	9	6	6	6	3
Cantabria	0	0	0	0	6	0	0	0
Castilla la Mancha	9	11	6	18	17	6	14	12
Castilla y León	14	20	13	16	22	5	17	20
Cataluña	6	15	11	9	21	1	7	4
C. Valenciana	11	10	4	4	5	2	2	0
Extremadura	0	0	0	1	3	0	1	0
Galicia	6	7	3	12	5	6	7	10
Madrid	9	6	14	14	45	9	13	34
Murcia	0	1	0	0	1	1	0	2
Navarra	10	5	8	4	7	8	6	14
País Vasco	21	28	23	16	17	10	25	17
La Rioja	0	4	4	5	6	0	1	1
Ceuta	0	0	0	0	0	0	0	0
Melilla	0	0	0	0	0	0	0	0
Desconocido	-	-	-	-	-	3	-	-
TOTAL	100	124	124	167	441	87	145	191
RENAVE	256	382	299	432	665	319	375	450
Representatividad	39,1%	32,5%	41,5%	38,7%	66,3%	27,3%	38,7%	42,4%

RENAVE: Número de casos confirmados de listeriosis notificados por la RENAVE (2).
Representatividad: Proporción de casos de listeriosis recibidos en el CNM del total de casos confirmados notificados por la RENAVE.

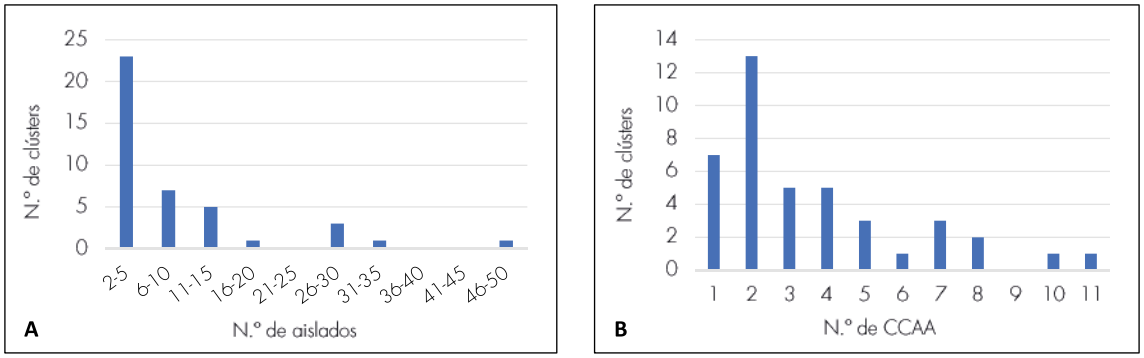
Figura 1. Distribución de los aislados clínicos de *Listeria monocytogenes* recibidos en el CNM por serotipo-serogrupo y año, 2002-2022.



Entre los aislados clínicos recibidos en 2021 y 2022 se han identificado 36 y 39 STs diferentes, agrupados en 30 y 32 complejos clonales (CC), respectivamente. Al igual que en años anteriores el CC1, asociado al serogrupo IVb, sigue siendo el mayoritario, suponiendo el 19,7% y 18,6% de los casos recibidos en 2021 y 2022. Estos datos coinciden con lo observado a nivel europeo, donde el CC1 es también el más prevalente (1). Los CC8, CC3 y CC9 son los CC más prevalentes entre las cepas de serogrupo IIa, IIb y IIc, respectivamente.

Tras el análisis comparativo de las secuencias genómicas con las históricas disponibles en la base de datos del laboratorio, se identificaron 21 nuevos clústeres, 13 en 2021 y 8 en 2022, que incluían en total 49 y 25 aislados, respectivamente. Además, hubo otros 72 nuevos aislados que se incluyeron en 20 clústeres identificados antes del 2021. De estos 41 clústeres en total, 22 se correspondían con aislados del serogrupo IIa (n=185), 15 con aislados del serogrupo IVb (n=161), 3 con aislados del serogrupo IIb (n=20), y 1 con aislados del serogrupo IIc (n=3). La mayoría de estos clústeres incluían entre 2 y 5 aislados cada uno, con una mediana de 5 aislados por clúster (intervalo de 2 a 50) y una mediana de 3 CC. AA. involucradas en cada clúster (intervalo de 1 a 11) (Figura 2).

Figura 2. Número de aislados (A) y CC. AA. (B) implicados en los clústeres[a] de listeriosis activos[b] en 2021 y 2022.



[a] Se consideran aislados pertenecientes a un mismo clúster aquellos que presentan 4 o menos diferencias alélicas en el perfil alélico de cgMLST (6). [b] Se consideran clústeres activos aquellos que incluyen aislados de 2021 y/o 2022.

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, en 2021 y 2022 se recibieron 37 aislados alimentarios y 8 ambientales procedentes de 7 CC. AA. (Aragón, Castilla la Mancha, Cataluña, Islas Baleares, Madrid, Navarra y País Vasco). Además, a través de un acuerdo de transferencia recíproca de secuencias genómicas entre el CNM y la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud, se recibieron las secuencias genómicas de 101 aislados alimentarios y 13 de superficie obtenidos en Andalucía entre 2021 y 2022. El estudio comparativo a nivel de secuenciación genómica de estos 159 aislados alimentarios/ambientales con los aislados clínicos disponibles en la base de datos del CNM, ha permitido relacionar 40 de ellos con 116 aislados clínicos en 16 clústeres. La mayoría de estos 40 aislados alimentarios/ambientales procedían de productos cárnicos (65%, n=26), fundamentalmente de carne de cerdo (n=15), y superficies de trabajo (22,5%, n=9); el resto de aislados procedían de queso fresco (7,5%, n=3) y salmón (5%, n=2). De los 16 clústeres en los que se relacionan genómicamente aislados clínicos con aislados alimentarios/ambientales hay 3 que estarían relacionados con alertas alimentarias:

- Clúster IVb/ST-1_16: agrupa 11 aislados clínicos obtenidos entre 2015 y 2022, 5 aislados alimentarios obtenidos en 2020 y 2022, y el aislado alimentario correspondiente a la alerta alimentaria con expediente ES2019/179 (*Listeria monocytogenes* en morcilla de cerdo ibérico procedente de España).
- Clúster IVb/ST-1_27: agrupa 5 aislados clínicos obtenidos entre 2021 y 2022 (uno de ellos potencialmente relacionado con la alerta alimentaria Ref. 2022/092: «Alerta por presencia de *Listeria monocytogenes* en cabeza de cerdo procedente de España» de la AESAN (https://www.aesan.gob.es/

AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/ampliacion/2022_92.htm); y 2 aislados alimentarios (embutido: cabeza de cerdo) obtenidos en 2022.

- Clúster IIa/ST-155_10: agrupa 2 asilados clínicos y 2 aislados alimentarios obtenidos en España en 2022, y 2 aislados representativos de la alerta alimentaria emitida por Italia a través del Sistema de Alerta Rápida de Alimentos RASFF 2022.4497 (https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/563256).

Esta información, además de ser transmitida tanto a la RENAVE como a los Servicios de Salud Pública de las diferentes CC. AA., es compartida a nivel europeo a través del portal europeo para la vigilancia de enfermedades infecciosas (EpiPulse (7)) coordinado por el ECDC, con el objetivo de detectar clústeres afectando a diferentes países. En este sentido, en 2021 y 2022 se investigaron 10 clústeres de listeriosis a nivel europeo con implicación de aislados españoles.

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*.
- Hasta el 2021, la mayoría de los casos de listeriosis son producidos por cepas de serogrupo IVb. En 2022, sin embargo, se produce un cambio, tanto en España como a nivel europeo, y el serogrupo IIa pasa a ser el más prevalente entre los casos clínicos de listeriosis.
- La utilización de la secuenciación genómica ha permitido detectar entre 2021 y 2022 21 nuevos clústeres, que se suman a otros 20 identificados con anterioridad pero que se mantienen activos en ese periodo de tiempo. En 16 de los clústeres se ha establecido vinculación con potenciales fuentes de contaminación (productos cárnicos, superficies de trabajo, queso fresco y salmón), de los cuales 3 clústeres se han relacionado con las alertas alimentarias ES2019/79, 2022/092 y RASFF 2022.4497.
- 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

mejorar la representatividad del programa y poder contar con la información genómica de la mayoría de los casos clínicos de listeriosis.

- 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. European Centre for Disease Prevention and Control. Listeriosis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2021. Stockholm: ECDC; 2022.
2. Informes epidemiológicos sobre la situación de la listeriosis en España. Años 2015-2018, 2019-2020, 2021 y 2022. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III.
3. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2022. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. EFSA Journal 2022;20(12):7666, 273 pp. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666
4. R Abad, C Garcia-Amil, C Navarro, E Martín y JA Vazquez. Programa de Listeriosis. En.: Echevarría Mayo, JE; Oteo Iglesias, J (Ed.). Centro Nacional de Microbiología. Programas de Vigilancia Microbiológica. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2021.
5. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Surveillance Atlas of Infectious Diseases. Stockholm, Sweden: ECDC; 2022. Available from: https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=33
6. Van Walle I, Björkman J, Cormican M, Dallman T, Mossong J, Moura A, Pietzka A, Ruppitsch W, European Listeria WGS typing group, Takkinen J. «Retrospective validation of whole genome sequencing-enhanced surveillance of listeriosis in Europe, 2010 to 2015». Euro Surveill. 2018 Aug;23(33). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.33.1700798
7. EpiPulse - the European surveillance portal for infectious diseases. https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/epipulse-european-surveillance-portal-infectious-diseases

Infección Gonocócica. Sensibilidad Antimicrobiana, 2021-2022

Informe elaborado por R. Abad, E. Martín, M. Montes, C. García-Amil, C. Navarro, J. Camacho 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 2019 se notificaron un total de 117.881 casos de IG (tasa de notificación: 31,6 casos por 100.000 habitantes), lo que supone un incremento del 19.2% 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 2021 se declararon en España un total de 15.338 casos de IG (tasa de incidencia: 32,41 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 llevar a cabo programas de vigilancia microbiológica que nos permitan detectar de manera precoz la aparición de resistencias antimicrobianas y evitar la propagación de cepas multiresistentes.

El CNM lleva realizando la vigilancia microbiológica de la IG desde principios de los años 90 a través de su Programa de Vigilancia Microbiológica de IG cuyo diseño, objetivos y resultados previos pueden consultarse en http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=08/02/2022-fc27d35665 (4).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En 2021 y 2022 el CNM recibió, respectivamente, 676 y 1.125 aislados de *N. gonorrhoeae* para su caracterización. Teniendo en cuenta el número de casos notificados (probables más confirmados) por la RENAVE (3), en 2021 el CNM recibió el 4,4% (n=676) de los 15.338 casos notificados, porcentaje algo mayor a lo recibido en 2020 (3,6%), pero inferior al porcentaje de casos recibidos en años anteriores (Tabla 1). Asumiendo que todos los casos notificados en 2020 y 2021 por la RENAVE son confirmados y que aproximadamente solo el 30% (3.085 y 4.601, respectivamente) lo han sido por aislamiento de la bacteria, los 373 y 676 aislados recibidos en el CNM podrían suponer el 12,1% y el 14,7% del total de aislamientos realizados.

En cuanto a la representatividad, ésta varía en función de las CC. AA. (Tabla 2). Teniendo en cuenta la totalidad de los casos notificados por la RENAVE (3) en los últimos 4 años (2019-2022), Asturias y Navarra serían las CC. AA. mejor representadas (el programa recibe más del 90% de los casos de IG notificados en estas CC. AA.), seguidas de Castilla y León, Galicia, Castilla la Mancha, Extremadura e Islas Canarias (se reciben entre el 10-40% de los casos notificados por estas CC. AA.); menos representadas estarían Andalucía, Madrid y Cataluña (<10%). Del resto de CC. AA. (Aragón, Islas Baleares, Cantabria, C. Valenciana, Murcia, País Vasco, La Rioja y Ceuta) no se dispone de ningún aislamiento de los últimos años por lo que no estarían representadas.

En el año 2022 se recibieron a través del programa un total de 1.125 aislados de *N. gonorrhoeae* procedentes de 11 CC. AA. (Tabla 2), de los cuales el 84,3% (n=948) eran casos de IG en hombres y el 15,3% en mujeres. Aunque la mayoría de los aislados recibidos fueron obtenidos de muestras genitales (n=970, 86,2%), un 7,4% (n=83) y un 4% (n=45) 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*.

Tabla 1. Características de los aislados de *Neisseria gonorrhoeae* recibidos en el CNN, 1995-2022.

	N.º Casos Notificados RENAVE (3)	Aislados recibidos CNM								
			Sexo			Aislamiento				
		Total N (%)[a]	Hombre N (%)	Mujer N (%)	Desconocido N	Genital N (%)	Faríngeo N (%)	Anorrectal N (%)	Otros N (%)	Desconocido N
1995	4.599	67 (1,5)	ND[b]	ND[b]	ND[b]	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	6.366	483 (7,6)	424 (87,8)	59 (12,2)	0	449 (93,0)	13 (2,7)	14 (2,9)	7 (1,4)	0
2017	8.751	539 (6,1)	469 (87,0)	70 (13,0)	0	499 (92,6)	17 (3,2)	20 (3,7)	3 (0,6)	0
2018	11.156	790 (7,1)	695 (88,0)	95 (12,0)	0	717 (90,8)	24 (3,0)	41 (5,2)	8 (1,0)	0
2019	12.910	947 (7,3)	814 (86,0)	132 (13,9)	1	880 (92,9)	12 (1,3)	40 (4,2)	15 (1,6)	0
2020	10.283	373 (3,6)	301 (80,7)	72 (19,3)	0	312 (83,6)	20 (5,4)	33 (8,8)	8 (2,1)	0
2021	15.338	676 (4,4)	571 (84,5)	103 (15,2)	2	571 (84,5)	34 (5,0)	56 (8,3)	15 (2,2)	0
2022	ND[b]	1.125 (--)	948 (84,3)	172 (15,3)	5	970 (86,2)	45 (4,0)	83 (7,4)	27 (2,4)	0

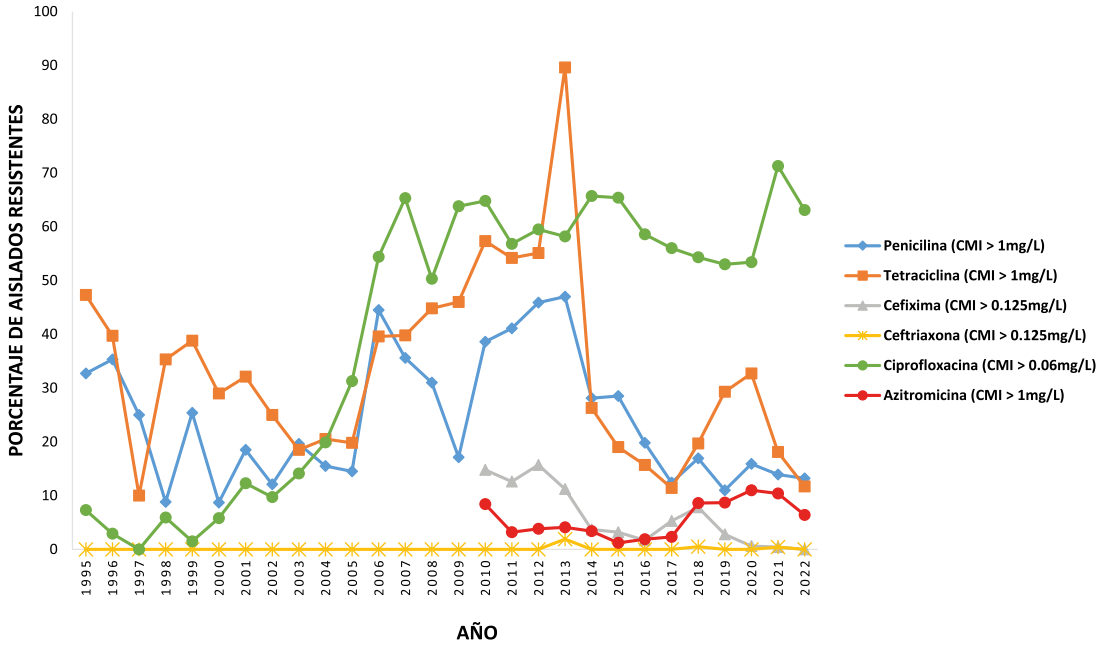
a) Proporción de aislados recibidos en el CNM del total de casos notificados (probables + confirmados) a la RENAVE (3).
b) ND: Información No Disponible.

Tabla 2. Aislados de Neisseria gonorrhoeae recibidos vs casos de IG notificados por CC. AA., 2019-2022.

	2019		2020		2021		2022	
	RENAVE	CNM N (%)	RENAVE	CNM N (%)	RENAVE	CNM N (%)	RENAVE	CNM N (%)
Andalucía	1.263	94 (7,4)	697	36 (5,2)	1.118	67 (6,0)	ND	53
Aragón	263	0	209	1 (0,5)	144	0	ND	1
Asturias	138	77 (55,8)	90	14 (15,6)	57	78 (136,8)	ND	139
Baleares	422	0	222	0	451	0	ND	0
Canarias	399	54 (13,5)	330	23 (7,0)	304	44 (14,5)	ND	76
Cantabria	91	0	50	0	92	0	ND	0
Castilla la Mancha	212	67 (31,6)	87	22 (25,3)	116	17 (14,7)	ND	17
Castilla y León	131	30 (22,9)	87	9 (10,3)	144	34 (23,6)	ND	45
Cataluña	5.762	69 (1,2)	4.592	23 (0,5)	6.657	49 (0,7)	ND	135
C. Valenciana	1.414	43 (3,0)	840	5 (0,6)	1.245	0	ND	0
Extremadura	54	2 (3,7)	17	3 (17,6)	18	3 (16,7)	ND	5
Galicia	295	125 (42,4)	178	43 (24,2)	228	43 (18,9)	ND	103
Madrid	1.384	271 (19,6)	1.967	76 (3,9)	3.471	150 (4,3)	ND	305
Murcia	121	0	185	0	279	0	ND	0
Navarra	168	115 (68,5)	112	118 (105,4)	205	189 (92,2)	ND	246
País Vasco	742	0	594	0	778	0	ND	0
La Rioja	48	0	26	0	31	0	ND	0
Ceuta	2	0	0	0	0	0	ND	0
Melilla	1	0	0	0	0	2 (--)	ND	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 (%).
ND: Información No Disponible.

Figura 1. Porcentaje de aislados resistentes* de *Neisseria gonorrhoeae* por antibiótico y año, 1995-2022.



**Según criterios actuales del EUCAST (5).*

La evolución de la resistencia a penicilina, tetraciclina, cefixima, ceftriaxona, ciprofloxacino y azitromicina, siguiendo los actuales criterios del EUCAST (5), se muestra en la Figura 1.

Para el resto de antibióticos incluidos en el estudio (espectinomicina y gentamicina) apenas se encontraron resistencias: 3 aislados en el caso de la espectinomicina (en 2002, 2013 y 2019) y 1 para gentamicina (en 2018).

En los dos últimos años, 2021 y 2022, se observa, respectivamente, un 13,9% y 13,2% de aislados resistentes a penicilina, valores que se vienen manteniendo más o menos estables desde 2017. En el caso de la tetraciclina, lo que se observa es una tendencia descendente desde el año 2020, pasando del 32,7% de aislados resistentes al 11,7% en 2022.

La resistencia a ciprofloxacino sigue siendo la más extendida desde 2014, el 71,3% y 63,1% de los aislados en 2021 y 2022, respectivamente, mostraron resistencia a este antibiótico.

A lo largo del periodo de tiempo analizado (1995-2022) se han detectado 10 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), 3 aislados en Madrid en

2018 y 2 aislados en 2021 en la Comunidad de Madrid y Andalucía. De ellos, 8 aislados 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), 1995-2022.

Año	CC. AA.	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)
2021	Madrid	ST-10386	0,19 (R)	0,19 (R)	0,125 (S)	0,75 (I)	1.5 (R)	8 (R)
2021	Andalucía	ST-19843	0,19 (R)	0,047 (S)	0,38 (S)	1 (I)	8 (R)	6 (R)

R: Resistente; I: Sensible, cuando se incrementa la exposición; S: Sensible (Actuales criterios EUCAST (5)).

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, estos valores han ido disminuyendo, situándose en 2021 en un 0,4%, y no habiéndose observado ningún aislado resistente a cefixima en 2022. En cuanto a la resistencia a azitromicina, aunque en 2021 y 2022 siguen observándose niveles preocupantes de aislados con una CMI > 1 mg/L (EUCAST ECOFF), 10,4% y 6,4% de aislados, respectivamente, parece observarse una ligera tendencia descendente que habrá que vigilar de cerca en los próximos años para confirmar su evolución. Sin embargo, lo que sí ha aumentado notablemente, es el número de aislados con un «alto nivel de resistencia a azitromicina» (CMI ≥ 256 mg/L), identificándose 18 aislados en 2021 y 4 en 2022. La mayoría de estos aislados proceden de Navarra (n=20) y presentan el mismo perfil molecular: ST (MLST) - 9363, ST (NG-MAST) - 3935. Los otros dos aislados con alto nivel de resistencia a azitromicina proceden de Asturias y Madrid y presentan un perfil molecular diferente.

CONCLUSIONES

- En 2021 y 2022 el CNM recibió, respectivamente, 676 y 1.125 aislados de *N. gonorrhoeae* para su caracterización. Los aislados procedían de: Madrid (25,3%), Navarra (24,2%), Cataluña (10,2%), Asturias (12%), Galicia (8,1%), Andalucía (6,7%), Islas Canarias (6,7%), Castilla y León (4,4%), Castilla la Mancha (1,9%), Extremadura (0,4%), Aragón (0,1%) y Melilla (0,1%).
- En 2021 y 2022 se siguen manteniendo unos niveles bajos de resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro, cefixima y ceftriaxona, actualmente la última opción de tratamiento empírico de primera línea de la IG. En 2022 no se detecta ningún aislado con resistencia a cefixima ni a ceftriaxona.
- En el caso de la azitromicina, aunque el número de aislados por encima del ECOFF se mantiene más o menos estable (10,4 - 6,4%), éstos presentan unos niveles de resistencia mayor. Este aumento, sumado a la detección de un mayor número de aislados con altos niveles de resistencia (CMI ≥ 256 mg/L), 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 2019. Stockholm: ECDC; 2023. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/GONO_AER_2019_Report.pdf
3. Unidad de vigilancia de VIH, ITS y hepatitis B y C. Vigilancia epidemiológica de las infecciones de transmisión sexual, 2021. Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III/División de Control de VIH,

ITS, Hepatitis virales y Tuberculosis, Dirección General de Salud Pública; 2023.

4. R Abad, E Martin, C Garcia-Amil, C Navarro y JA Vazquez. Programa de Infección Gonocócica. Sensibilidad Antimicrobiana, 1991-2020. En.: Echevarría Mayo, JE; Oteo Iglesias, J (Ed.). Centro Nacional de Microbiología. Programas de Vigilancia Microbiológica. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2021.
5. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022. http://www.eucast.org

Streptococcus pneumoniae

Informe elaborado por J. Sempere*, C. Pérez-García, S. Hita, A. Úbeda, E. J. Vidal, M. Domenech*, 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

Streptococcus pneumoniae, también llamado neumococo, es un patógeno respiratorio asociado a altas tasas de morbilidad y mortalidad globalmente. Esta bacteria coloniza la nasofaringe de forma asintomática tanto en la población pediátrica (20-40%) como a la población adulta (5-10%). La colonización es un prerrequisito para producir diferentes patologías, siendo la más grave la enfermedad neumocócica invasiva (ENI). Este microorganismo es la causa más importante de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior, siendo el principal agente etiológico de la neumonía bacteriana adquirida en la comunidad, otitis media aguda, meningitis no epidémica y es una de las principales causas de sepsis. Los grupos más susceptibles a la infección son la población pediátrica menor de 5 años y los adultos por encima de los 60 años. La prevención de la ENI es uno de los mayores desafíos en salud pública ya que la incidencia de la enfermedad es muy elevada a pesar de la existencia de vacunas y del uso de antibióticos. Actualmente hay descritos hasta 103 serotipos 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 dicho polisacárido. Esto se debe a que tras el uso sistemático de las actuales vacunas suelen aumentar los casos producidos por serotipos no-vacunales, es lo que se conoce como fenómeno de reemplazo de serotipos. Por lo tanto, la vigilancia microbiológica de esta enfermedad es esencial y de gran utilidad en salud pública, para identificar cuáles son los serotipos más prevalentes 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 la vacunación frente a neumococo incluida en el calendario de vacunación (recomendaciones del Ministerio de Sanidad). Su elevada variabilidad y el fenómeno previamente explicado de reemplazo de serotipos justifican la necesidad de la vigilancia microbiológica de este microorganismo desde el punto de vista de la salud pública. 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 pediátrico 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 producidos por serotipos no vacunales, así como la aparición de casos producidos por aislados clínicos de serotipos incluidos en las actuales vacunas, que puedan estar asociados a fallo vacunal.
- Caracterizar la presencia de cepas de neumococo con sensibilidad disminuida a los antibióticos y analizar el impacto de la vacunación en el control de la resistencia antimicrobiana.

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. Además, en muestras de cultivo negativo, la unidad de neumococos ha desarrollado una PCR a tiempo real que detecta 3 genes específicos de neumococo que es de gran utilidad para el diagnóstico de muestra directa.

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

Por último, se determina 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 2009-2022 se han caracterizado 29.231 aislados clínicos invasivos de neumococo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evolución de la ENI en población pediátrica y adulta

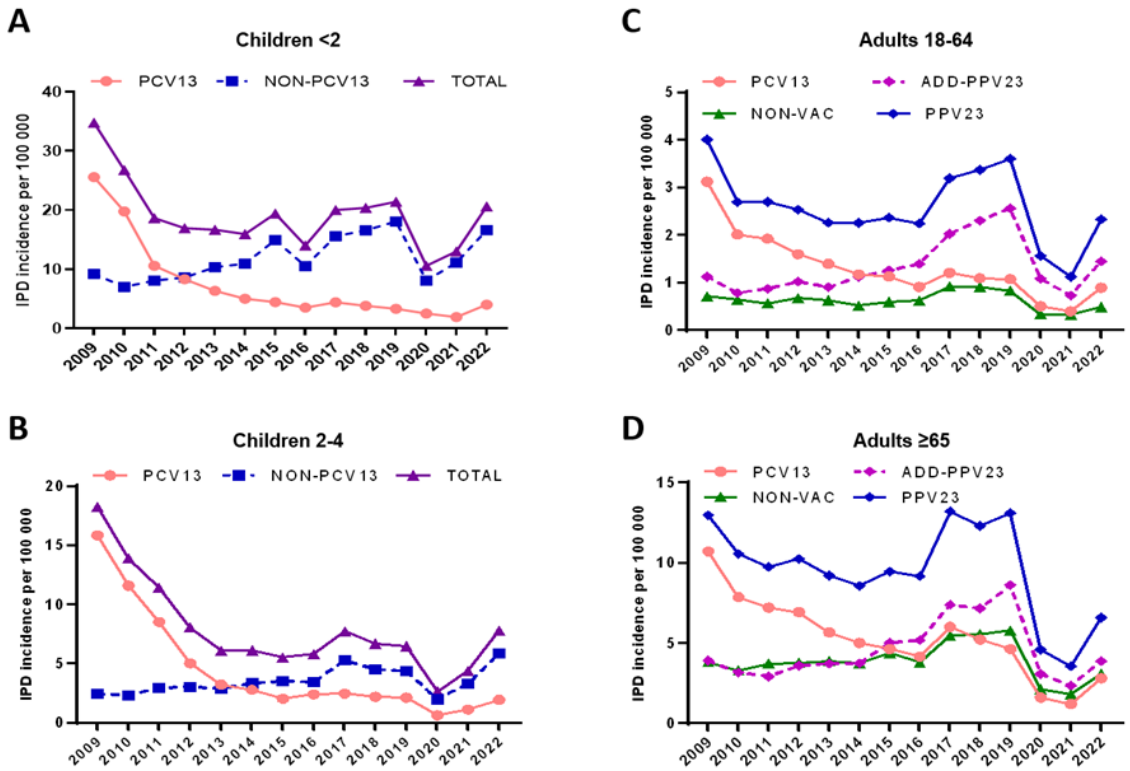
En el periodo 2009-2019, previo a la pandemia COVID-19, los resultados obtenidos muestran que el uso de la vacuna conjugada 13-valente (PCV13), que se introdujo en el mercado privado en 2010 y posteriormente en el calendario nacional pediátrico en 2016, ha disminuido la incidencia de ENI. Esto confirma la eficacia de esta vacuna para controlar la carga de enfermedad por serotipos vacunales (Figura 1A-B). La incidencia por serotipos no-PCV13 aumentó de manera moderada en el periodo vacunal tardío 2018-2019, siendo más destacable en la población menor de 2 años (Figura 1A-B). En el primer año de pandemia (2020), se produjo una reducción brusca de casos de ENI en la población pediátrica, recuperándose ligeramente en 2021. En el año 2022, coincidiendo con la relajación de las medidas no farmacológicas frente a la pandemia COVID-19, se observa una recuperación completa de los casos de ENI a niveles pre-pandémicos.

En el caso de la población adulta, también se observó una reducción de casos de ENI por serotipos PCV13 al comparar el periodo 2009 vs 2018-2019, demostrando la importancia de la protección indirecta en todos los grupos que se analizaron (Figura 1C-D). Por el contrario, la incidencia de serotipos adicionales de la vacuna polisacarídica 23-valente (PPV23), que son aquellos no incluidos en la PCV13, mostró un incremento constante desde el 2015, coincidiendo con el uso sistemático de la vacuna conjugada. Los serotipos no-vacunales también aumentaron en los últimos años pre-pandémicos (Figura 1C-D). En el primer año de pandemia (2020), se produjo una reducción dramática de los casos de ENI a un nivel similar a lo ocurrido en población pediátrico. Sin embargo, en 2021 continuó esta disminución y en 2022 se observó una recuperación parcial de la incidencia de ENI, aunque a niveles aún inferiores al último año pre-pandémico (2019) (Figura 1C-D).

La pandemia por COVID-19 no sólo ha mostrado impacto en la incidencia de la ENI, sino también en la distribución de serotipos circulantes de neumococo. En la población pediátrica, en 2022, se ha observado un aumento importante del serotipo 3 (de 25 casos en 2019 a 46 casos en 2022) y serotipo 10A (de 12 casos en 2019 a 28 casos en 2022). Además, los serotipos 24F y 8 son importantes en

esta población. Respecto a la distribución de serotipos en el adulto, los serotipos predominantes en los últimos años fueron los serotipos 8 y 3, representando más del 30% de la ENI en mayores de 65 años. Previo a 2022, el serotipo predominante en el adulto era el serotipo 8, pero en 2022 el serotipo 3 se ha convertido en la primera causa de ENI en el adulto mayor de 65 años, coincidiendo con la primera causa de ENI en la población pediátrica.

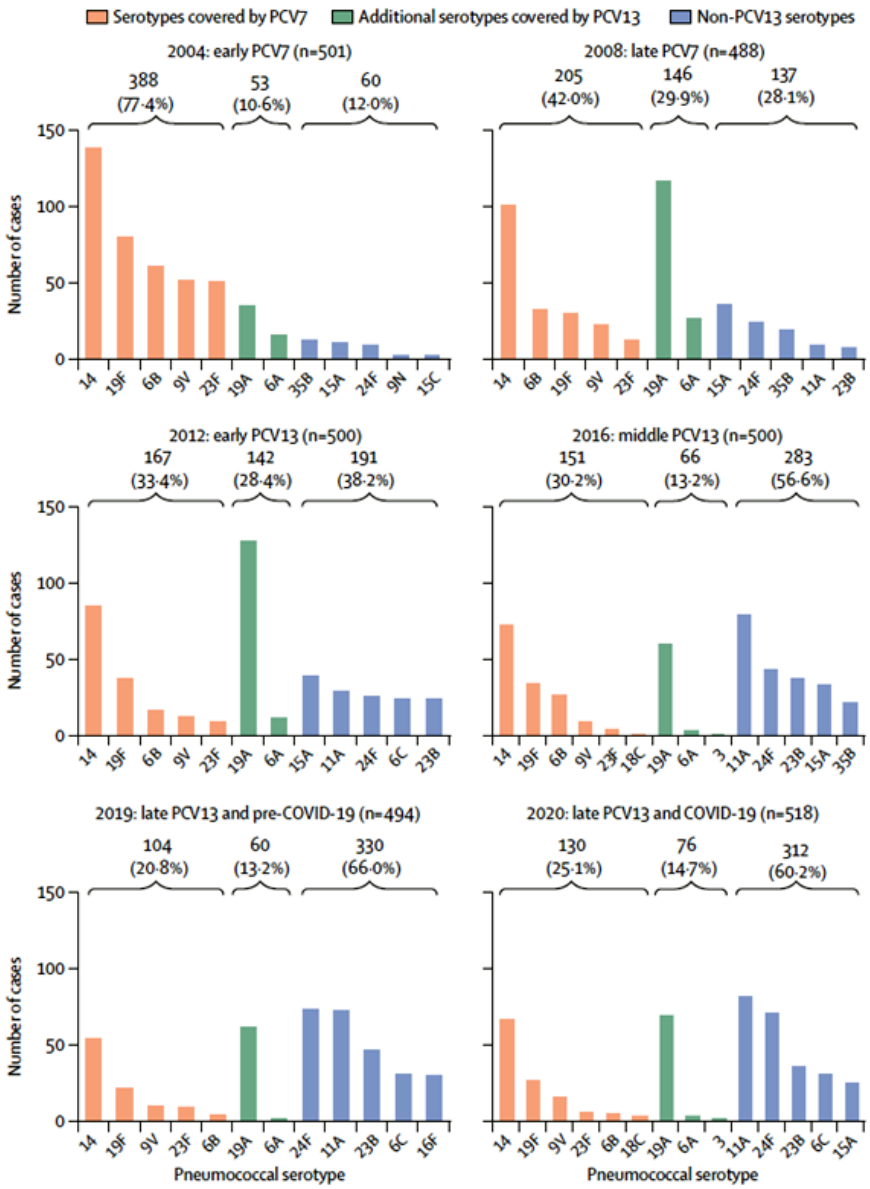
Figura 1. Tendencias de ENI en España en población pediátrica y adulta durante el periodo 2009-2022. Los datos muestran las tasas de incidencia para la población de 0-2 años (A), 2-4 años (B), 18-64 años (C) y el grupo de 65 años o más (D). PCV13 representa los casos de ENI debido a serotipos incluidos 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 rosa 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 rombos).



Aumento de aislados clínicos no-PCV13 asociados a resistencia antibiótica

La vigilancia de casos de ENI asociados a resistencia antibiótica es esencial. Previo a observar el efecto de las vacunas conjugadas (2004), específicamente la 7-valente (PCV7), los serotipos 14, 19F y 6B eran los principales causantes de ENI que mostraban resistencia a antibióticos β-lactámicos (Figura 2). Gracias a la PCV7, disminuyeron los casos de ENI resistente a antibióticos por serotipos PCV7, pero emergieron los casos de ENI por el serotipo 19A, asociado a resistencia a β-lactámicos y macrólidos (Figura 2). Después de la introducción de la PCV13, que incluía este serotipo, 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 (Figura 2). Entre estos serotipos, destacan el 24F que suele asociarse a pacientes pediátricos, y el serotipo 11A del que hemos detectado hasta 3 genotipos diferentes (secuenciotipos ST62, ST838 y ST6521), los dos últimos relacionados con altos niveles de resistencia a amoxicilina y cefotaxima.

Figura 2. Evolución de los serotipos de neumococo con susceptibilidad reducida a penicilina en el periodo 2004-2020. Se representan el número de casos de ENI y proporción de los serotipos incluidos en la PCV7, adicionales de la PCV13 o serotipos no vacunales, que son susceptibles con concentración incrementada o resistentes a penicilina.



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 población adulta sigue existiendo una elevada carga de enfermedad por serotipos incluidos en la vacuna PCV13 como el serotipo 3, observándose un aumento muy marcado por serotipos específicos de la vacuna PPV23 de los que destacan el 8 y el 22F.
- La pandemia por COVID-19 redujo los casos de ENI en población pediátrica y adulta, pero al relajar las medidas no farmacológicas para prevenir la pandemia, se han recuperado por completo los casos de ENI en población pediátrica totalmente y de forma parcial en población adulta.
- Existe un aumento de casos por cepas resistentes a antibióticos producido por serotipos no incluidos en la vacuna conjugada, especialmente los serotipos 11A y 24F.
- Desde la perspectiva de salud pública, es fundamental continuar con la labor de vigilancia microbiológica 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
2. 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
3. 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
4. Sempere J, Llamosí M, López Ruiz B, Del Río I, Pérez-García C, Lago D, Gimeno M, Coronel P, González-Camacho F, Domenech M, Yuste J. Effect of pneumococcal conjugate vaccines and SARS-CoV-2 on antimicrobial resistance and the emergence of *Streptococcus pneumoniae* serotypes with reduced susceptibility in Spain, 2004-20: a national surveillance study. Lancet Microbe. 2022 Oct;3(10):e744-e752. doi: 10.1016/S2666-5247(22)00127-6

5. Sempere J, González-Camacho F, Domenech M, Llamosí M, Del Río I, López-Ruiz B, Gimeno M, Coronel P, Yuste J. A national longitudinal study evaluating the activity of cefditoren and other antibiotics against non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* strains during the period 2004-20 in Spain. J Antimicrob Chemother. 2022 Mar 31;77(4):1045-1051. doi: 10.1093/jac/dkab482

Enfermedad invasiva por *Streptococcus pyogenes* o estreptococo del grupo A

Informe elaborado por P. Villalón, M. J. Medina-Pascual, N. Garrido, M. Valiente y S. Valdezate

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

INTRODUCCIÓN

La infección invasiva por *Streptococcus pyogenes* o estreptococo del grupo A (SGA) ha aumentado en incidencia durante los últimos años. Algunas patologías frecuentemente relacionadas con esta bacteria; como celulitis, neumonía, fascitis necrotizante, sepsis y el síndrome del shock tóxico estreptocócico (SSTS); se asocian a una elevada morbimortalidad.

El Centro Nacional de Microbiología (CNM) realiza la vigilancia microbiológica de los aislados invasivos del SGA a nivel nacional. 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. Los objetivos principales del Programa son detectar los principales *emm* tipos (serotipos) y subtipos implicados, determinar el perfil de genes de exotoxinas de las cepas circulantes, y conocer la susceptibilidad a los antibióticos utilizados para el tratamiento y control de la infección.

El diseño del Programa está detallado en la página web del Instituto de Salud Carlos III (https://cnm-laboratorios.isciii.es/Customization/News/Publicaci%c3%b3n_archivos/Page427.htm) y también en la edición anterior de este libro donde se reflejan los datos obtenidos hasta el año 2020.

RESULTADOS 2021-2022 Y DISCUSIÓN

Este informe muestra el análisis de 177 aislados de *S. pyogenes* del periodo 2021-2022. Durante 2021 se recibieron 34 aislados y durante 2022 fueron 143. Se

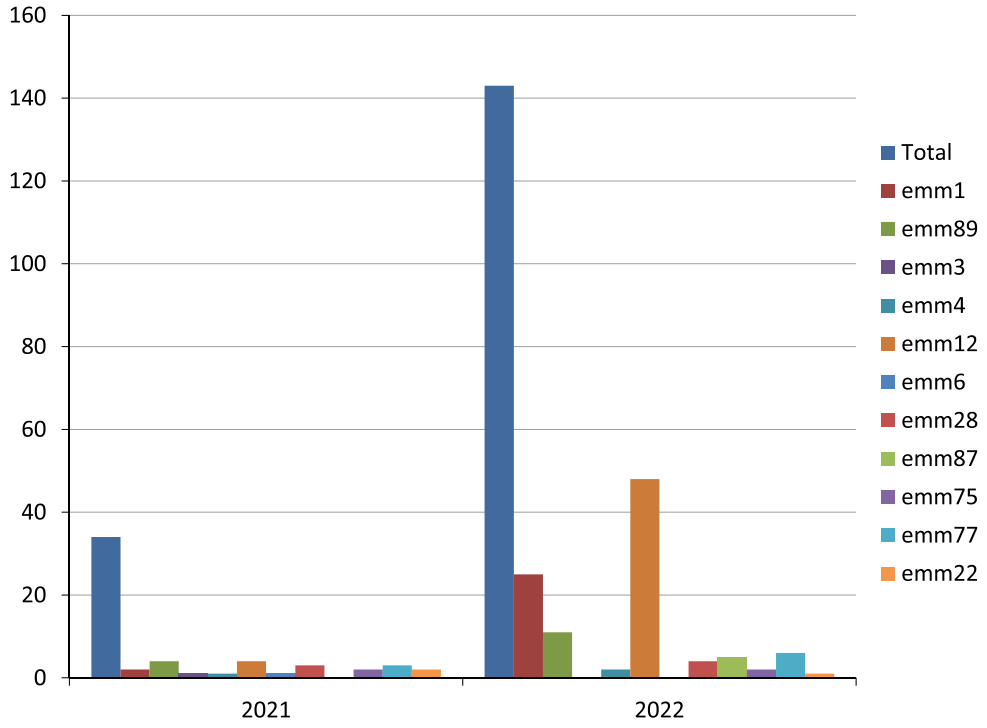
recibieron cepas de 12 CC. AA., siendo País Vasco y Madrid las más participativas. Las edades extremas fueron las más representadas; el 24,3% de los casos tenían 0-4 años, el 9,6% tenían 5-9 años y el 16,4% eran mayores de 75 años. La mayoría de los aislados de *S. pyogenes* se obtuvieron de sangre (n=117, 66,1%), y el cuadro clínico más frecuente fue la sepsis (95, 53,7%). La puerta de entrada de la infección más común fue respiratoria (50, 28,2%), seguida de cutánea (26, 14,7%), aunque fue desconocida en el 52,5% de los casos.

Se detectaron 34 *emm* tipos en total. Los más frecuentes fueron *emm*12 (52, 29,4%), *emm*1 (27, 15,3%), *emm*89 (15, 8,5%) y *emm*77 (9, 5,1%). Se detectaron siete aislados (4,0%) de *emm*28 y *emm*49; cinco aislados (2,8%) de *emm*11, *emm*44, *emm*81 y *emm*87; cuatro aislados (2,3%) de *emm*75; tres aislados (1,7%) de *emm*4, *emm*22, y *emm*102; dos aislados de *emm*9, *emm*33, *emm*58, *emm*90, *emm*94, *emm*132 y *emm*169; y un aislado (0,6%) de *emm*3, *emm*6, *emm*29, *emm*63, *emm*65, *emm*66, *emm*82, *emm*86, *emm*116, *emm*118, *emm*145, *emm*168 y *emm*183.

Estos resultados muestran los cambios epidemiológicos experimentados por la enfermedad invasiva por *S. pyogenes* en los últimos años. Desde el inicio de la pandemia de COVID-19 en marzo del 2020 se registró una disminución drástica en el n.º de casos; situación que ha perdurado durante 2021 y gran parte del año 2022. Sin embargo, en octubre del 2022, igual que en varios países europeos (2), se inicia un aumento continuo en el n.º de casos. Este ascenso ha continuado en 2023 y será necesario analizar los datos de este último año para entender la magnitud y características de este brote.

La distribución de *emm* tipos durante este bienio difiere de la registrada en España los últimos años (1). La Figura 1 muestra la distribución en 2021 y 2022 de los 12 *emm* tipos más frecuentes durante 2007-2019. En 2021 y hasta septiembre del 2022, hay una clara alteración del patrón habitual de *emm* tipos; i.e. *emm*1, *emm*3 y *emm*4 se detectan de forma residual. Desde octubre del 2022 y hasta final de este año, se registra inicialmente un aumento drástico de *emm*12 y posteriormente de *emm*1. La Figura 2 muestra la evolución en el tiempo del n.º total de aislados y de *emm*1 y *emm*12.

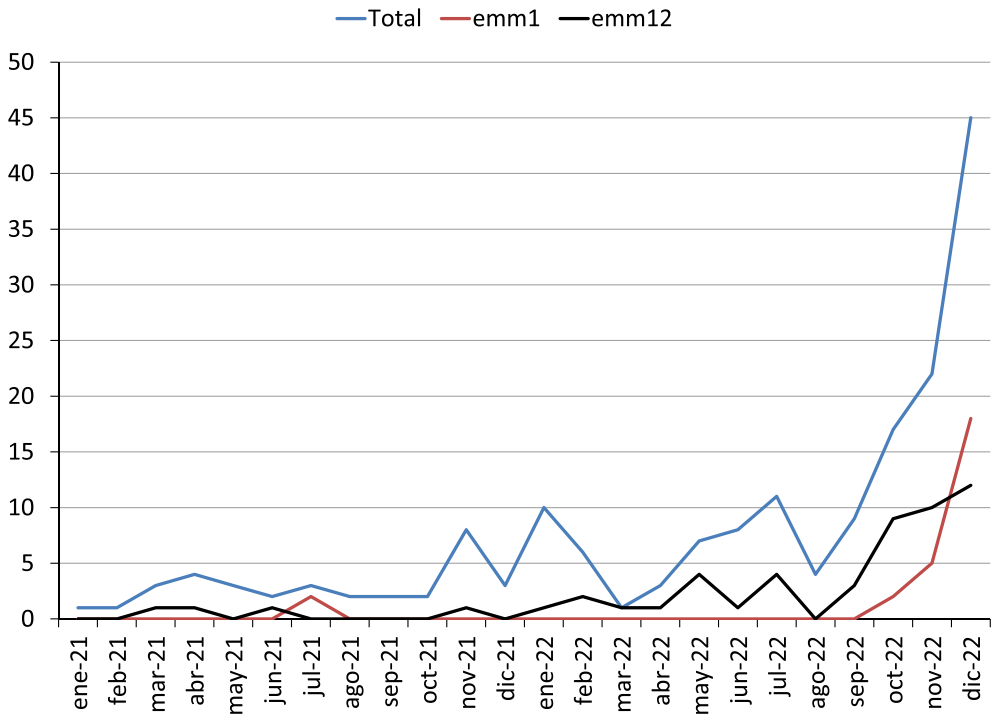
Figura 1. Distribución de los emm tipos tradicionalmente frecuentes en España, 2021-2022.



Todos los aislados fueron sensibles a penicilina. En 2021, la resistencia a tetraciclina fue la más común (14, 41,2%), seguida de la resistencia a eritromicina (8, 23,5%) y clindamicina (6, 17,6%). En 2022, las tasas de resistencia fueron 25,2% (n=36), 18,2% (26) y 10,5% (15) respectivamente.

Los datos de resistencia también presentan alteraciones respecto a los tradicionalmente observados (1,3). Las tasas de resistencia son más elevadas, especialmente las de tetraciclina que se duplican respecto a la media de 2007-2019. La presencia de *emm* tipos poco comunes resistentes a tetraciclina como *emm*81, *emm*94, *emm*102, *emm*118, *emm*119 y *emm*183; unido a la baja incidencia de *emm*1, *emm*3 y *emm*89, habitualmente sensibles; explicarían el aumento en las tasas de resistencia.

Figura 2. Evolución temporal de los casos de enfermedad invasiva por *S. pyogenes* en España según el Programa de Vigilancia del CNM, 2021-2022.



CONCLUSIONES

- La pandemia de COVID-19 ha supuesto una disminución drástica en el número de cepas invasivas de *S. pyogenes* remitidas al CNM que ha perdurado desde marzo del 2020 hasta septiembre del 2022. Durante este tiempo también se detectan cambios en los *emm* tipos detectados; disminuyen los *emm* tipos habituales y *emm* tipos infrecuentes adquieren mayor peso cuantitativo. Estos cambios conllevan un aumento en las tasas habituales de resistencia a antimicrobianos.
- En octubre del 2022 se inicia en España una epidemia de infecciones invasivas por *S. pyogenes* que también se detecta en el resto del mundo. Hay una explosión inicial de *emm*12 y posteriormente de *emm*1. Esta situación se prolonga durante varios meses en 2023.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Villalón P, Sáez-Nieto JA, Rubio-López V, Medina-Pascual MJ, 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
2. Guy R, Henderson KL, Coehlo J, Hughes H, Mason EL, Gerver SM, *et al.* Increase in invasive group A streptococcal infection notifications, England, 2022. Euro Surveill. 2023; 28(1): 2200942. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2023.28.1.2200942
3. Villalón P, Bárcena M, Medina-Pascual MJ, Garrido N, Pino-Rosa S, Carrasco G, Valdezate S. National surveillance of tetracycline, erythromycin and clindamycin resistance in invasive *Streptococcus pyogenes*: a restrospective study of the situation in Spain, 007-2020. Antibiotics. 2023; 12:99. doi: 10.3390/antibiotics12010099

Haemophilus influenzae

Informe elaborado por M. Pérez Vázquez*†, B. Aracil García*†, S. García Cobos, V. Bautista Sánchez, N. Lara Fuella, 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.

* CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC).

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

INTRODUCCIÓN

Haemophilus influenzae (Hi) es uncocobacilo 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 (serotipos a, b, c, d, e, f), o no capsuladas (no tipificables) en función de la producción o no de una cápsula polisacárida. Las cepas capsuladas se han asociado a infecciones invasivas.

La introducción en la década de 1980 de una vacuna eficaz y segura frente a *H. influenzae* serotipo b (Hib) ha reducido drásticamente la tasa de enfermedad invasiva en niños pequeños. Además, ha generado un escenario diferente en el perfil de la infección por esta especie caracterizado por el descenso de enfermedad invasiva por Hib en niños, la aparición 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, a cepas no capsuladas.

Por otra parte, la creciente prevalencia de fenotipos resistentes a los antibióticos reportados en este patógeno limita la elección de un tratamiento antibiótico adecuado.

Alineado con las principales instituciones internacionales (ECDC), el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) considera el seguimiento de las enfermedades bacterianas prevenibles mediante vacunación una de sus prioridades, constituyendo la temática de uno de los Programa de Vigilancia Microbiológica del Centro Nacional de Microbiología (PVHi-CNM) que financia el ISCIII. En la edición previa de «Programas de Vigilancia Microbiológica. Centro Nacional de Microbiología» (2021) (http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=08/02/2022-fc27d35665) se

detallan los aspectos relacionados con los objetivos y diseño del PVHi-CNM, que se resume y sustenta en las siguientes ideas básicas:

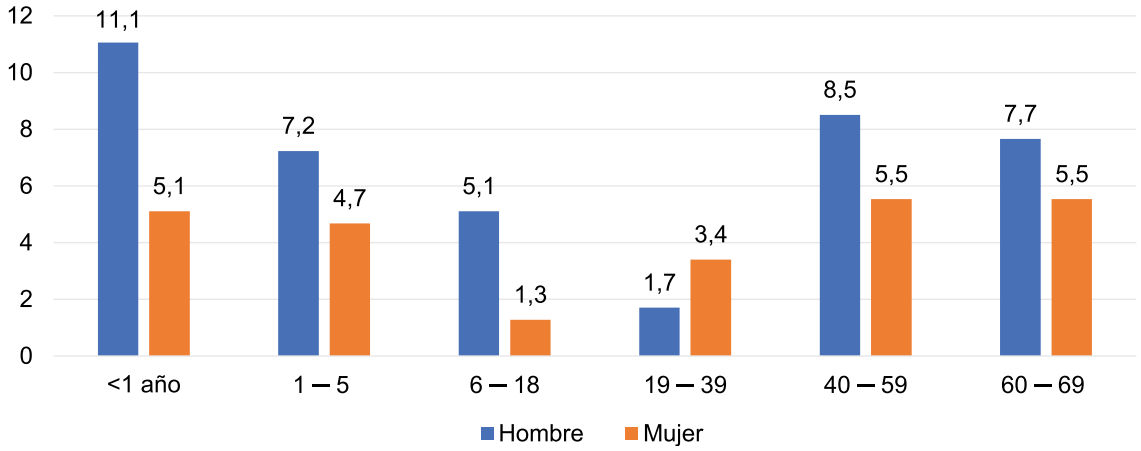
- Vigilancia de los serotipos y clones de Hi causantes de enfermedad invasiva.
- Conocer y vigilar el aumento creciente de la morbilidad y mortalidad de la enfermedad invasiva y no invasiva en niños y adultos por Hi no capsulado.
- Conocer y vigilar la susceptibilidad a los antibióticos utilizados para 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 CC. AA. y el ECDC para la mejora de la cobertura y del conocimiento de la enfermedad causada por Hi de declaración no obligatoria.

RESULTADOS 2021-2022 Y DISCUSIÓN

Entre los años 2021-2022, el PVHi-CNM estudió un total de 241 cepas de *Haemophilus* spp. implicadas en patología invasiva en humanos; los aislamientos procedieron de 87 hospitales distribuidos entre 39 provincias.

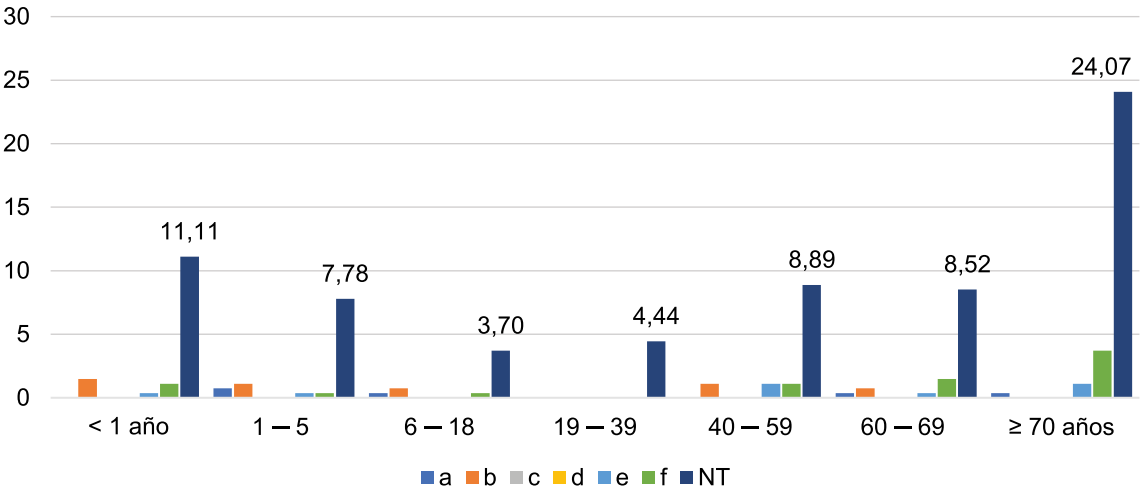
La distribución de edades y sexo de los pacientes se muestra en la Figura 1, se observa que en todos los grupos de edad hay un mayor número de hombres salvo en el grupo de 19-39 años (3,3% de mujeres y 1,9% de hombres).

Figura 1. Distribución de casos de patología invasiva debida a *Haemophilus influenzae* según las edades y sexo de los pacientes (%) (2021-2022).



La especie mayoritaria fue *H. influenzae* con 235 aislados (97,51%), que se clasificaron, según serotipos, en 183 (77,87%) cepas no capsuladas, 22 (9,36%) del serotipo f, 14 (5,95%) del serotipo b, 9 (3,82%) del serotipo e y 5 (2,12%) del serotipo a, no se detectaron cepas de los serotipos c y d. El resto de los aislamientos pertenecieron a la especie *Haemophilus parainfluenzae* (6; 2,49%). Las cepas no capsuladas predominaron en todos los grupos de edad, siendo mayoritarias en el grupo de mayores de 70 años (24,07%) (Figura 2). Tras las no capsuladas, los serotipos más frecuentes fueron los serotipos f y b, que predominaron en los grupos de mayores de 70 años y de 0-5 años, respectivamente.

Figura 2. Distribución de casos de patología invasiva debida a *Haemophilus influenzae* según el tipo de cápsula y las edades de los pacientes (2021-2022).



La edad media de los pacientes infectados por Hib fue de 21,28 años, pero el mayor número de casos se correspondía con niños menores de 4 años (57,14%) detectando un único caso en pacientes mayores de 65 años. El serotipo a también predominaba en niños menores de seis años. En lo que se refiere a la evolución de los serotipos en el tiempo, observamos una tendencia al aumento de todas las cepas tanto capsuladas como no capsuladas hasta el 2019, en especial los serotipos a y b. Esta tendencia se ve interrumpida, posiblemente por el efecto de la pandemia (2020), pero se mantiene al alza en los dos últimos años (Figuras 3 y 4).

Figura 3. Evolución temporal de patología invasiva debida a *Haemophilus influenzae* capsulado y no capsulado (NT, 2015-2022).

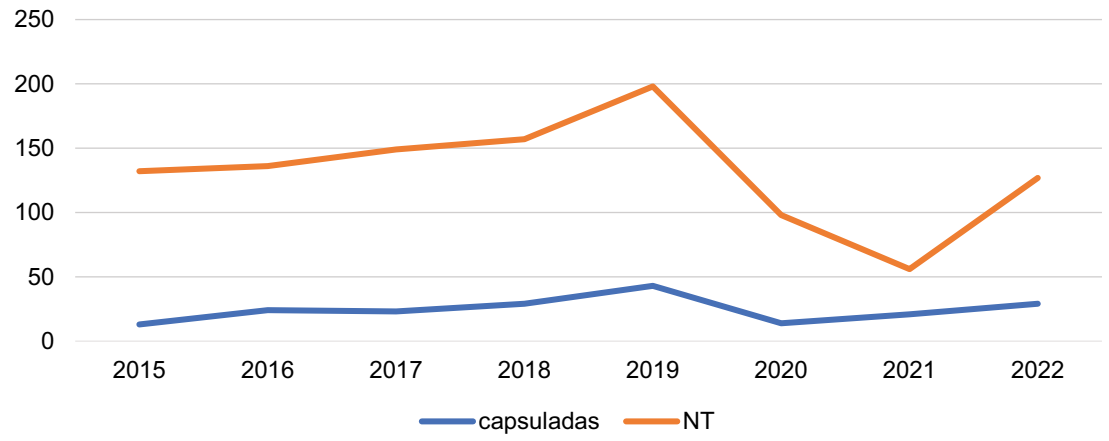
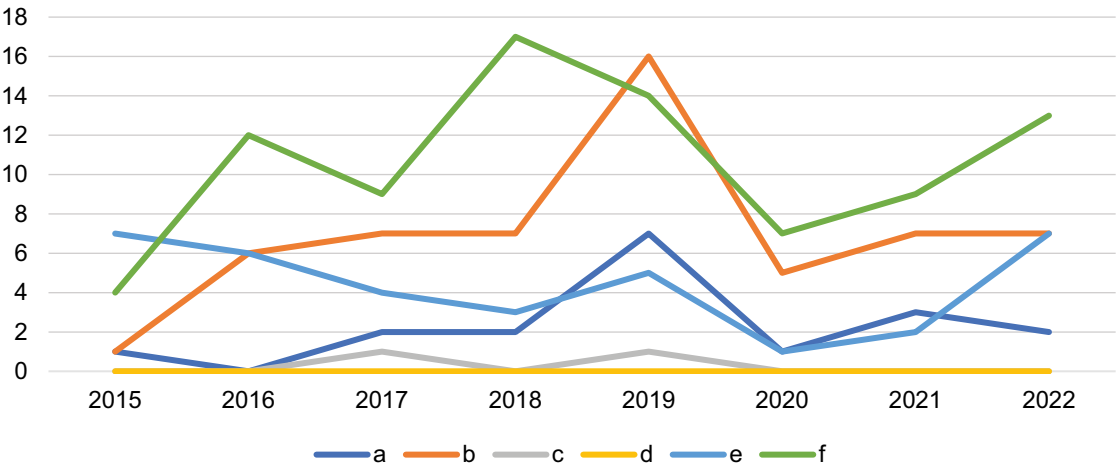
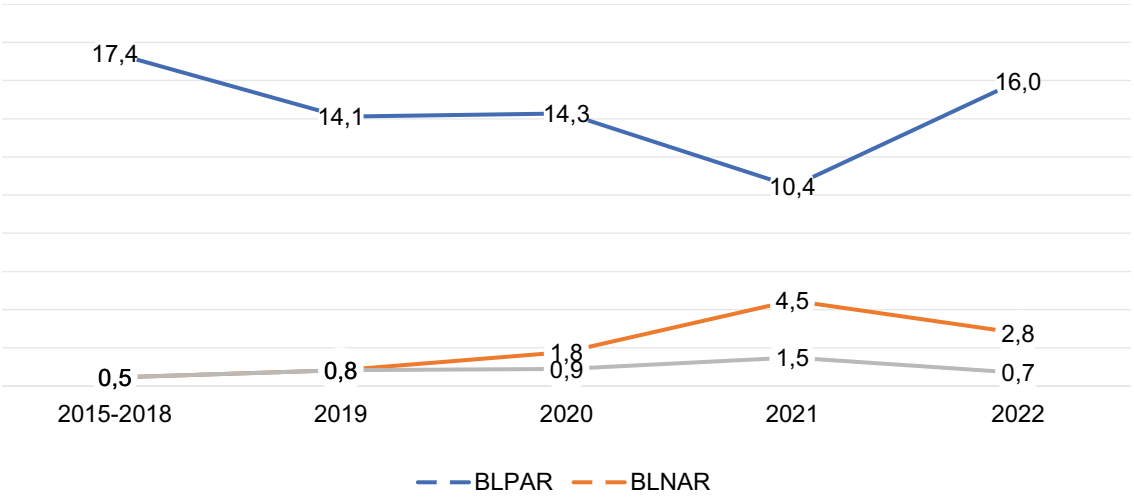


Figura 4. Evolución temporal de patología invasiva debida a *Haemophilus influenzae* capsulado (2015-22).



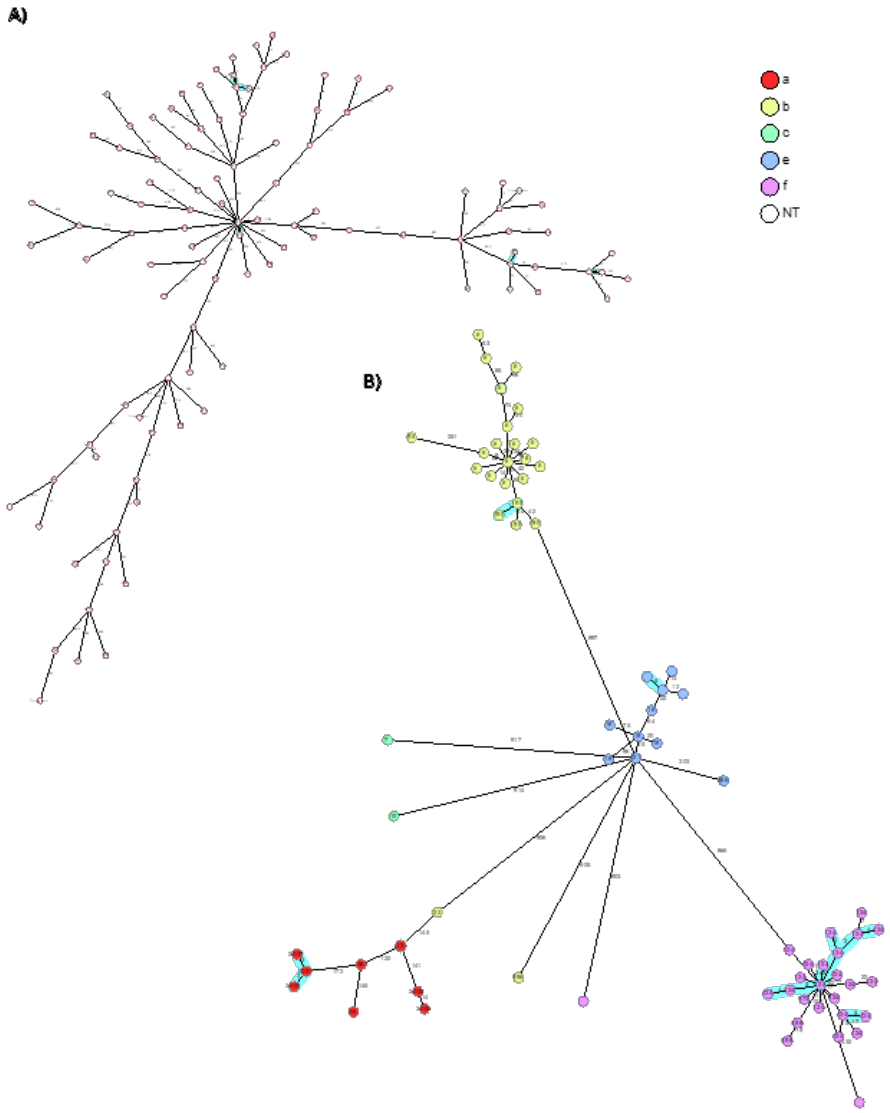
Se analizó la sensibilidad a antibióticos betalactámicos de forma conjunta incluyendo todos los aislados del período 2015-2022, observando que el 82,28% (1.012/1.230) de los aislados eran sensibles a ampicilina y no productores de β-lactamasa (fenotipo BLNAS); el 15,93% (196/1.230) eran productores de β-lactamasas, y por tanto resistentes a ampicilina, y sensibles a amoxicilina/clavulánico (fenotipo BLPAR), el 1,14% (14/1.230) eran no productores de β-lactamasa y resistentes a ampicilina (fenotipo BLNAR). Observamos una tendencia al aumento de la prevalencia de los fenotipos BLNAR y BLPACR si comparamos los años pre-pandemia (2015-2019) y pos-pandemia (2020-2021) que parece reducirse en el 2022, pero manteniéndose por encima de los valores observados en la etapa pre-pandémica. Cabe destacar también el aumento del fenotipo BLPAR observado en el 2022 (Figura 5). En las cepas con fenotipos de resistencia a antibióticos β-lactámicos por modificación de la PBP3 que fueron secuenciadas, se detectaron modificaciones en los motivos STVK, SSN, y/o KTG de la PBP3. La producción de β-lactamasa en las cepas secuenciadas se debía a los genes *blaTEM*$^{-1}$ (84%) y *blaROB*$^{-1}$ (16%).

Figura 5. Distribución de los porcentajes de cepas de los fenotipos BLPAR y BLNAR en la etapa pre-pandemia y años posteriores.



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 los años 2019-2021, nos muestran la estructura poblacional que se refleja en la Figura 6. Al igual que habíamos observado en años previos, se detecta una mayor diversidad en de STs en cepas NT, mientras que en cepas capsuladas hay unos STs mayoritarios: ST6, Hib; ST18, Hie; ST124, Hif.

Figura 6. *Minimum spanning tree* que representa la estructura poblacional de 177 cepas de *Haemophilus influenzae* responsables de patología invasiva aisladas en el periodo 2019-2021. A) El esquema de cgMLST utilizado contiene 1.026 genes y ha sido diseñado utilizando la totalidad de genomas completos de *Haemophilus influenzae* disponibles el NCBI. A) Cepas no capsuladas B) Cepas capsuladas. Las sombras azules representan cepas con menos de cinco alelos de diferencia.



CONCLUSIONES

- La mayoría de los casos de enfermedad invasiva estudiados se deben a HiNT, seguido de los serotipos Hif y Hib.

- La población más afectada por patología invasiva debida a Hi son pacientes adultos (> 65 años) y niños < 5 años.
- El serotipo b parece afectar a población infantil en una mayor proporción con respecto a los otros grupos de edad.
- Observamos una tendencia al alza de los casos debidos al serotipo b, que probablemente se ha visto afectada por la disminución en el número de casos analizados durante la pandemia.
- 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
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
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
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
5. Gastmeier P, Schwab F, Bärwolff S, Rüden 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

Resistencia a Antibióticos

Informe elaborado por M. Pérez Vázquez*†, B. Aracil García*†, V. Bautista Sánchez, N. Lara Fuella, E. Ramirez de Arellano*, J. E. Cañada García*†, 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.

* CIBER de Enfermedades Infecciosas. CIBERINFEC.

† Red de Laboratorios para la Vigilancia de los Microorganismos Resistentes (RedLabRA).

INTRODUCCIÓN

La resistencia a antibióticos (RA) es una amenaza sanitaria reconocida como prioritaria por instituciones internacionales como la Comisión Europea, el G7, el G20, el ECDC, la OMS y el CDC, entre otras. Los patógenos bacterianos resistentes a la mayor parte de las alternativas terapéuticas disponibles frente a ellos son los que generan un mayor impacto clínico, epidemiológico, social y económico. 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. La RA también tiene un gran impacto 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.

Alineado con las principales instituciones internacionales, el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) considera la RA una de sus prioridades, constituyendo la temática de uno de los Programa de Vigilancia Microbiológica del Centro Nacional de Microbiología (PVRA-CNM) que financia el ISCIII. En la edición previa de «Programas de Vigilancia Microbiológica. Centro Nacional de Microbiología» (2021) (http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=08/02/2022-fc27d35665) se detallan los aspectos relacionados con los objetivos y diseño del PVRA-CNM, que se resume y sustenta en las siguientes ideas básicas:

- Dar soporte al SNS y guiar actuaciones de salud pública en función de los resultados obtenidos; así como servir de conexión con los programas y proyectos europeos impulsados al respecto por el ECDC (redes europeas *EARS-Net*, *EURGen-Net* y *EURGen-RefLabCap*).
- Detectar y caracterizar precozmente los mecanismos de resistencia emergentes y las modificaciones de los ya conocidos, los clones de alto riesgo multirresistentes circulantes y los brotes que puedan generar.
- Promover la integración de la secuenciación de genomas completos (WGS) en la vigilancia de la RA.
- Alineado con las recomendaciones de la OMS, el PVRA-CNM prioriza los problemas de multirresistencia relacionados con la resistencia a antibióticos carbapenémicos en bacilos gram-negativos como *Enterobacterales*, *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas* spp., y la resistencia a glucopéptidos y linezolide en enterococos.

Desde el PVRA-CNM estos objetivos se abordan a tres niveles que se complementan mutuamente:

- 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 sujetas a vigilancia.
- Coordinación de la red EARS-Net a nivel nacional filtrando, analizando y enviando al ECDC datos de sensibilidad a antibióticos de aislamientos invasivos de *Escherichia coli*, *Staphylococus aureus*, *Streptococus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* procedentes de alrededor de 40 hospitales centinelas.
- Puesta en marcha y coordinación en 2021 de la Red de Laboratorios para la Vigilancia de Microorganismos Resistentes (RedLabRA), que en la actualidad vigila la dispersión de clones de *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Enterobacter cloacae* complex productores de carbapenemasas mediante WGS a nivel nacional (http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=08/03/2023-5129d36c2c).

Este documento presenta los resultados más relevantes obtenidos por el PVRA-CNM sobre las tendencias evolutivas de los principales problemas de multirresistencia en España en 2021-2022.

RESULTADOS 2021-2022 Y DISCUSIÓN

Cepas estudiadas y principales mecanismos de resistencia detectados

Entre los años 2021-2022, el PVRA-CNM estudió un total de 3.879 aislamientos con problemas de multirresistencia, estos aislamientos procedieron de 106 hospitales distribuidos en 44 provincias.

La mayor parte de ellos correspondieron a especies de *Enterobacterales* (2459; 63,4%) distribuidas de la siguiente forma: *K. pneumoniae* (1440; 37,1%), *E. coli* (494; 12,7%), *Enterobacter cloacae* complex (298; 7,7%), *Klebsiella oxytoca* (85; 2,2%), *Citrobacter* spp. (58; 1,5%), y otros (84; 2,2%). Otros géneros bacterianos estudiados incluyen *Pseudomonas* spp. (417; 10,7%), *Acinetobacter* spp. (95; 2,4%), *Enterococcus* spp. (466; 12%).

Producción de carbapenemasas en Enterobacterales. De los 2.459 aislados de *Enterobacterales* estudiados, 1.432 (58,2%) producían carbapenemasas distribuidas en los siguientes tipos: 933 (65,1%) fueron OXA-48-like, 218 (15,2%) VIM, 213 (14,9%) KPC, 81 (5,6%) NDM, 10 (0,7%) IMP y 2 (0,1%) GES; 25 (1,7%) aislados produjeron más de una carbapenemasa. Dentro de la familia de la OXA-48-like, se detectaron 10 cepas con una carbapenemasa diferente a la OXA-48 propiamente dicha, entre las que destacaron 4 con OXA-181 y 3 con OXA-244. La especie que se detectó con más frecuencia produciendo carbapenemasas fue *K. pneumoniae* (985/1432; 68,8%).

Resistencia a carbapenémicos en Acinetobacter spp. multirresistente. Durante el periodo de estudio, un total de 80 *Acinetobacter* spp. (84,2% de los aislamientos recibidos) fueron resistentes a antibióticos carbapenémicos por la producción de carbapenemasas: 69 (86,3%) produjeron OXA-23, 13 (16,3%) NDM, 9 (11,2%) OXA-24-like, y una (1,2%) IMP; en una (1,2%) cepa se detectó la hiperproducción de la enzima cromosómica OXA-51-like y en 13 (16.2%) la producción de doble carbapenemasa. Cabe destacar la ausencia de OXA-58 y la aparición de NDM, aunque la mayoría de los casos detectados pertenecieron a un mismo brote por una cepa productora de OXA-23 y NDM-1.

Resistencia a antibióticos carbapenémicos mediada por carbapenemasas en Pseudomonas spp.multirresistente: Un total de 96 (23% de los aislamientos recibidos) *Pseudomonas spp*. fueron resistentes a antibióticos carbapenémicos por la producción de carbapenemasas: 77 (80,2%) produjeron VIM, 11 (11,5%) IMP, 6 GES (6,2%) y 2 (2,1%) NDM-1. Entre las carbapenemasas de tipo VIM predominaron las VIM-2 (84,1%).

Resistencia a vancomicina y linezolid en enterococos. En el periodo de estudio se caracterizaron un total 316 cepas resistentes a glucopéptidos portadoras de los genes adquiridos *van*A (178, 56,3%) o *van*B (139, 44%); una cepa portaba ambos genes. El 97,1% de las cepas resistentes a vancomicina estudiadas fueron *E. faecium*.

La aparición de los genes transferibles *optr*A y *poxt*A de resistencia a linezolid es una amenaza creciente que requiere vigilancia, en total se han estudiado 84 cepas resistentes a linezolid de los cuales el 72,6% (n=61) tenía el gen *optr*A, el 17,9% (n=15) la mutación G2576T en la subunidad 23S del ARNr, y el 15,5% (n=13) el gen *poxt*A; el 5,9% (n=5) de las cepas tenían más de un mecanismo de resistencia a linezolide. El gen *optr*A fue más frecuente en *E. faecalis* (54/61; 88,5%) que en *E. faecium* (7/61; 11,5%), mientras que el gen *poxt*A predominó en *E. faecium* (11/13; 84,6%).

Clones de alto riesgo circulantes en España

La vigilancia de determinados clones multirresistentes exitosos, que perpetúan y diseminan mecanismos de resistencia, es uno de los objetivos prioritarios para el control de la RA. A continuación, se exponen algunos hallazgos novedosos al respecto que complementan los resultados de años previos.

K. pneumoniae multi-resistente productora de carbapenemasas. Se detectaron un total de 84 secuenciotipos de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas, nueve de los cuales fueron predominantes (ST307, ST11, ST512, ST15, ST147, ST392, ST39, ST17 y ST405) y se aislaron en al menos 5 hospitales y 3 comunidades autónomas diferentes. ST307 fue el más ampliamente distribuido, detectándose en 27 hospitales y 12 comunidades autónomas diferentes.

P. aeruginosa multirresistente productora de carbapenemasas. Los principales brotes por *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos estudiados por el PVRA-CNM durante 2021-2022 estuvieron producidos por cepas pertenecientes a los secuenciotipos ST111, ST175, ST179 y ST253 productoras de la carbapenemasa VIM-2.

E. faecalis y E. faecium resistentes a linezolid. La dispersión del gen *optr*A se ha asociado principalmente a los secuenciotipos de *E. faecalis* ST59, ST480, ST585 y ST1008; mientras que *poxt*A se socia principalmente a *E. faecium* del complejo clonal 17 (ST117 principalmente).

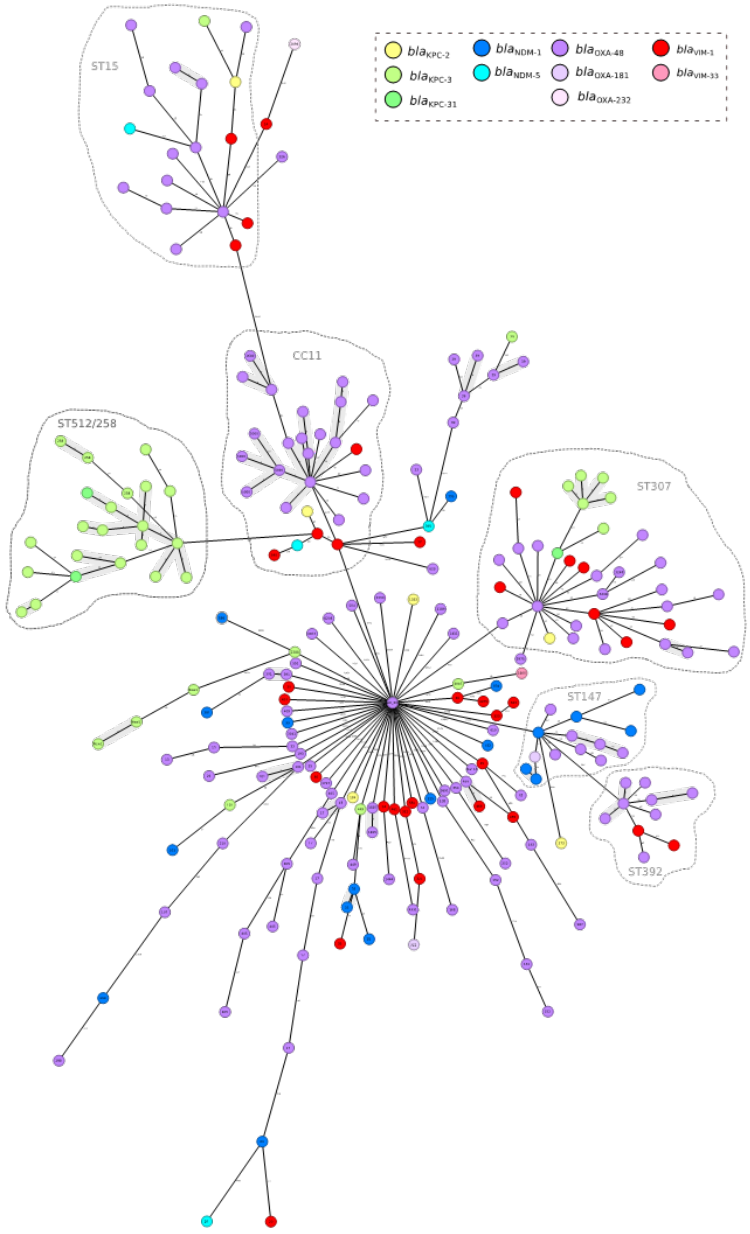
E. faecium resistente a vancomicina portador del gen vanA. Los resultados obtenidos por el PVRA-CNM muestran que los principales clones implicados en brotes hospitalarios por este patógeno fueron durante 2021-2022 el ST117, ST80, ST612 y ST1421.

RedLabRA: Diseminación interregional de ***K. pneumoniae*** productora de carbapenemasas

La integración de la WGS en la vigilancia a través de RedLabRA permitió hacer análisis filogenéticos mediante *core genome* MLST (cgMLST; esquema de 2.358 genes) de cepas representativas a nivel nacional con el objetivo de estudiar una posible diseminación interhospitalaria en 2021. Considerando las agrupaciones que se establecieron con un máximo de 10 alelos de diferencia por cgMLST, se detectaron agrupaciones de cepas de *K. pneumoniae* aisladas de diferentes hospitales de una misma comunidad autónoma en el ST307/OXA-48, ST15/OXA-48, ST512/KPC-3/KPC-31, ST258/KPC-3, ST147/OXA-48 y ST392/OXA-48. Aplicando el mismo criterio, se observaron agrupaciones de cepas aisladas en hospitales de diferentes comunidades autónomas en el ST307/KPC-3.

La Figura 1 muestra la estructura poblacional de 238 aislados representativos (uno por hospital/secuenciotipo/tipo de carbapenemasa en 2021) de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas según cgMLST.

Figura 1. *Minimun spanning tree* que representa la estructura poblacional de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas (2021). Se muestran las distancias genéticas basadas en cgMLST de 2.358 genes. El color del sombreado de los círculos indica el gen de la carbapenemasa que porta, y el número marcado en el interior de las líneas discontinuas indica el secuenciotipo por MLST. El sombreado gris representa agrupaciones aplicando un punto de corte de 10 alelos.



Caracterización de brotes por bacterias multirresistentes

Durante el periodo comprendido entre enero de 2021 y diciembre de 2022, se caracterizaron 38 brotes producidos por las especies de bacterias multirresistentes previamente mencionadas. En total comprendieron 281 aislados con un rango de 2 a 27 aislados por brote. Estos brotes se detectaron en 23 hospitales de 13 provincias y una ciudad autónoma. Un total de 16 (42,1%) brotes fueron producidos por enterobacterales, 9 productores de carbapenemasas (3 OXA-48, 2 KPC-3, 2 NDM-1, uno VIM-1 y uno NDM-1) más β-lactamasas de espectro extendido (BLEE), y 8 productores solo de la BLEE CTX-M-15. Los brotes debidos a *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa pertenecieron a los clones ST147/OXA-48 (n=2), ST512/KPC-3 (n=2), ST307/VIM-1 (n=1), ST392/NDM-1 (n=1) y ST11/OXA-48 (n=1).

En 17 (44,7%) brotes, las bacterias causantes fueron bacilos gram-negativos no fermentadores productores de carbapenemasas: 7 por *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos (4 productores de VIM-2 y 3 sin producción de carbapenemasas), 6 por *A. baumannii* productores de carbapenemasas (4 OXA-23, uno OXA-72 y uno OXA-24), 3 por *Stenotrophomonas maltophilia* y uno por *Elizabethkingia* spp.

Por último, se detectaron 5 (13,2%) brotes por *E. faecium* portador del gen *van*A.

CONCLUSIONES

La vigilancia microbiológica de la resistencia a antibióticos 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 CNM participa activamente. En este sentido caben destacar el Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos y la Red de Laboratorios para la Vigilancia de los Microorganismos Resistentes (RedLabRA), coordinada desde el PVRA-CNM.

A nivel internacional, la integración en la vigilancia de la secuenciación de genomas completos nos ha permitido alinearnos con el ECDC, con el que el PVRA-CNM colabora activamente a través de *The European Antimicrobial Resistance Genes Surveillance Network (EURGen-Net)* participando en el estudio de brotes transfronterizos.

Tendencias reseñables detectadas por el PVRA-CNM en los dos últimos años han sido:

- Dispersión de *K. pneumoniae* ST512/KPC-3 y ST307 productora de diferentes tipos de carbapenemasas.

- Aparición de cepas de diferentes especies bacterianas produciendo la carbapenemasa NDM, incluidas *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, antes restringida en España a *K. pneumoniae* y *E. coli*.
- Detección de cepas de *K. pneumoniae* con una alta homología genética de secuenciotipos/tipos de carbapenemasas específicos en diferentes hospitales y regiones geográficas.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, Colomb-Cotinat M, Kretzschmar ME, Devleesschauwer 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
2. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outterson K, Patel J, Cavaleri 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
3. Cañada-García JE, Moure Z, Sola-Campoy PJ, Delgado-Valverde M, Cano ME, Gijón D, González M, Gracia-Ahufinger I, Larrosa N, Mulet X, Pitart C, Rivera A, Bou G, Calvo J, Cantón R, González-López JJ, Martínez-Martínez L, Navarro F, Oliver A, Palacios-Baena ZR, Pascual Á, Ruiz-Carrascoso G, Vila J, Aracil B, Pérez-Vázquez M, Oteo-Iglesias J; GEMARA/GEIRAS-SEIMC/REIPI CARB-ES-19 Study Group. CARB-ES-19 Multicenter Study of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from all Spanish provinces reveals interregional spread of high-risk clones such as ST307/OXA-48 and ST512/KPC-3. Front Microbiol. 2022 Jun 30;13:918362. doi: 10.3389/fmicb.2022.918362
4. Cañada-García JE, Grippo N, de Arellano ER, Bautista V, Lara N, Navarro AM, Cabezas T, Martínez-Ramírez NM, García-Cobos S, Calvo J, Cercenado E, Aracil B, Pérez-Vázquez M, Oteo-Iglesias J; Spanish IMP Study Group. Phenotypic and molecular characterization of IMP-producing Enterobacterales

in Spain: Predominance of IMP-8 in *Klebsiella pneumoniae* and IMP-22 in *Enterobacter roggenkampii*. Front Microbiol. 2022 Sep 28;13:1000787. doi: 10.3389/fmicb.2022.1000787. PMID: 36246266; PMCID: PMC9554532

5. RedLabRA. Cañada-García JE, Pérez-Vázquez M y Oteo-Iglesias J (editores). Vigilancia molecular de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* complex y *Escherichia coli* productores de carbapenemasas en España. Informe anual RedLabRA 2021. Majadahonda (Madrid); Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología: 2023. Disponible en http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=08/03/2023-5129d36c2c

Infecciones estafilocócicas

Informe elaborado por Silvia García Cobos*, Verónica M.ª Casquero García, Federico Román, Jesús 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.

* CIBER de Enfermedades Infecciosas. CIBERINFEC.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones producidas por estafilococos, principalmente por *Staphylococcus aureus*, están entre las más relevantes de las relacionadas con la asistencia sanitaria (IRAS); siendo uno de los microorganismos aislados con más frecuencia en hemocultivos. *S. aureus* tiene una gran capacidad de desarrollar resistencia a los antibióticos utilizados en el tratamiento de las infecciones que produce, así como de producir diferentes toxinas causantes de cuadros clínicos como el síndrome de la piel escaldada, el síndrome del shock tóxico o cuadros enterotoxigénicos.

El Programa de Vigilancia de infecciones por estafilococos está en periodo de actualización y mejora, tanto en los objetivos como en las técnicas a utilizar. Durante el último año, periodo en el que la gestión de dicho Programa ha cambiado de responsables debido a la jubilación de los investigadores previamente responsables, se ha realizado un análisis de su funcionamiento y se ha estado trabajando en la optimización y actualización de las técnicas empleadas.

Teniendo en cuenta las recomendaciones y hoja de ruta de organismos internacionales como el *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), y de redes nacionales como la Red de Laboratorios para la Vigilancia de los Microorganismos Resistentes (RedLabRA), se propone, a partir de 2023, centrar la vigilancia en aquellas infecciones producidas por *S. aureus*, con especial atención a *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) potenciando la representatividad geográfica. Se quiere promover además la integración de la secuenciación completa de genomas en la vigilancia para poder ofrecer así estudios epidemiológicos a nivel molecular de mayor profundidad y resolución, incluyendo la caracterización de brotes.

La vigilancia estará basada en el diseño de estudios de corte transversal, que nos permitan conocer la prevalencia de *S. aureus* y su asociación con determinadas infecciones, los principales clones circulantes y los perfiles de resistencia a antibióticos. Además, se ofrecen técnicas para la detección de los genes codificantes para las exotoxinas estafilocócicas de mayor relevancia, como la leucocidina de Panton-Valentine (LPV), la toxina-1 del síndrome de shock tóxico (TSST-1) y las toxinas exfoliativas A y B (ETA, ETB), pues su producción puede desembocar en efectos sistémicos graves, por ej. lesiones de la piel, *shock*, insuficiencias orgánicas e incluso muerte.

A continuación, se muestra un resumen de los casos estudiados durante los años 2021-2022, de acuerdo al diseño descrito en el primer número, dónde se mostraron resultados de 2018-2020.

RESULTADOS 2021-2022 Y DISCUSIÓN

Durante los años 2021-2022 un total de 30 hospitales de 28 provincias diferentes participaron en el Programa de Vigilancia. Se remitieron un total de 855 cepas de estafilococos para su caracterización microbiológica en el CNM, 81,4% (696/855) *S. aureus* y 22,1 % (189/855) estafilococos coagulasa negativo (SCN). Según informaron los centros peticionarios, el 47% correspondían a infecciones adquiridas en el hospital, 47,5% (331/696) en *S. aureus* y 37,6% (71/189) en SCN, y el 50,7% a infecciones comunitarias. Además, se recibieron 129 cepas del Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses.

Un 47,1% de las cepas recibidas (328/696) presentaron resistencia a meticilina por el gen *mec*A (327) o gen *mec*C (1). La detección del gen codificante para la toxina LPV se realizó en 456 cepas, de las cuales el 30,7% (140/456) fueron positivas; la mayoría de ellas, 93,6% (131/140) fueron resistentes a meticilina y un 58,6% (82/140) se consideraron de origen comunitario. La detección de los genes codificantes para la toxina TSST-1 (*tsst-1*) y para las toxinas exfoliativas A *(eta*) y B (*etb*), se realizó en 17 cepas; tres de las cuales (17,6%, 3/17) fueron positivas para el gen *tsst-1* y se asociaron con bacteriemias e infección respiratoria. Cuatro cepas (23,5%, 4/17) fueron positivas para los genes *eta* y *etb*, y tres cepas (0,4%) sólo para el gen *eta*, todas estas cepas excepto una asociada a septicemia, estaban relacionadas con infecciones de la piel y eran de origen comunitario.

El 69,8% (132/189) de las cepas de SCN en las que se estudió la resistencia a linezolide, presentó modificaciones en la secuencia de aminoácidos de la subunidad 23S del ARNr asociadas con esta resistencia, el 45,5% (86/189) tenían la mutación G2576T y el 24,3% (46/189) tenían la mutación G2603T. Una cepa (0,5%) con

la mutación G2603T también fue positiva para el gen *cfr*, situado en un plásmido y que codifica una metiltransferasa que induce cambios postranscripcionales en la diana del antibiótico.

Respecto a las cepas recibidas del Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses (n=129), se analizó la presencia de genes codificantes de las toxinas ETA, ETB, TSST y LPV, y se llevó a cabo la tipificación molecular mediante determinación del *spa*-tipo.

Además, el Programa de Vigilancia colaboró en la vigilancia de *S. aureus* resistente a meticilina de origen comunitario (SARM-CA) causante de infección en la población pediátrica, mediante la caracterización microbiológica y molecular por secuenciación completa de genomas de las cepas implicadas. La vigilancia incluyó a tres hospitales centinela españoles y detectó 98 casos. Además de la resistencia a meticilina, el 42,9% de estos aislados fueron resistentes a eritromicina, el 27,5% a tobramicina, el 19,4% a levofloxacino y moxifloxacino y el 15,3% a gentamicina.

Las cepas SARM-CA de infecciones pediátricas pertenecieron a 21 STs y 42 *spa*-tipos diferentes. Siendo el ST8 (34%) y el t008 (28%) los más frecuentes. Otros STs detectados fueron el ST30 (9,2%), el ST88 y el ST1472 (7,1%), el ST2802 y el ST22 (6,1%) (Figura 1). Según el análisis filogenético basado en una comparación gen-a-gen utilizando un esquema de 1.861 genes – cgMLST, del inglés *core-genome multilocus sequence typing* – la mayoría de las cepas no estaban genéticamente relacionadas. Sin embargo, se observaron dos grupos de 2-3 cepas, con menos de cinco diferencias alélicas, lo que podría indicar diseminación de las cepas SARM-CA de infecciones pediátricas (Figura 2).

El 75% de las cepas SARM-CA de infecciones pediátricas eran positivas para los genes (*lukSF*) codificantes de la leucocidina Panton-Valentine (LPV); el 10% para el gen (*tsst-1*) codificante de la toxina TSST-1 (síndrome del shock tóxico), asociada mayoritariamente al ST22 y ST5; y el 3% eran positivas para los genes (*eta*, *etb*) codificantes de las toxinas exfoliativas.

Figura 1. STs y spa-tipos asociados a las cepas SARM-CA de infecciones (n=98).

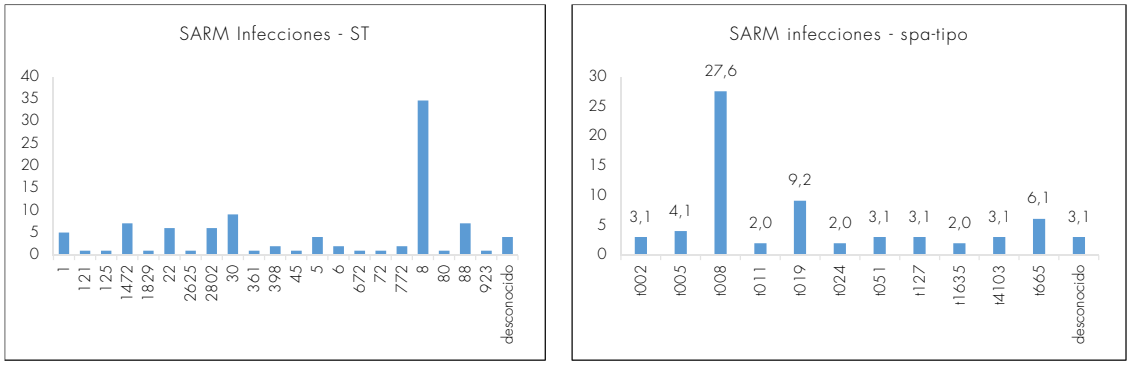
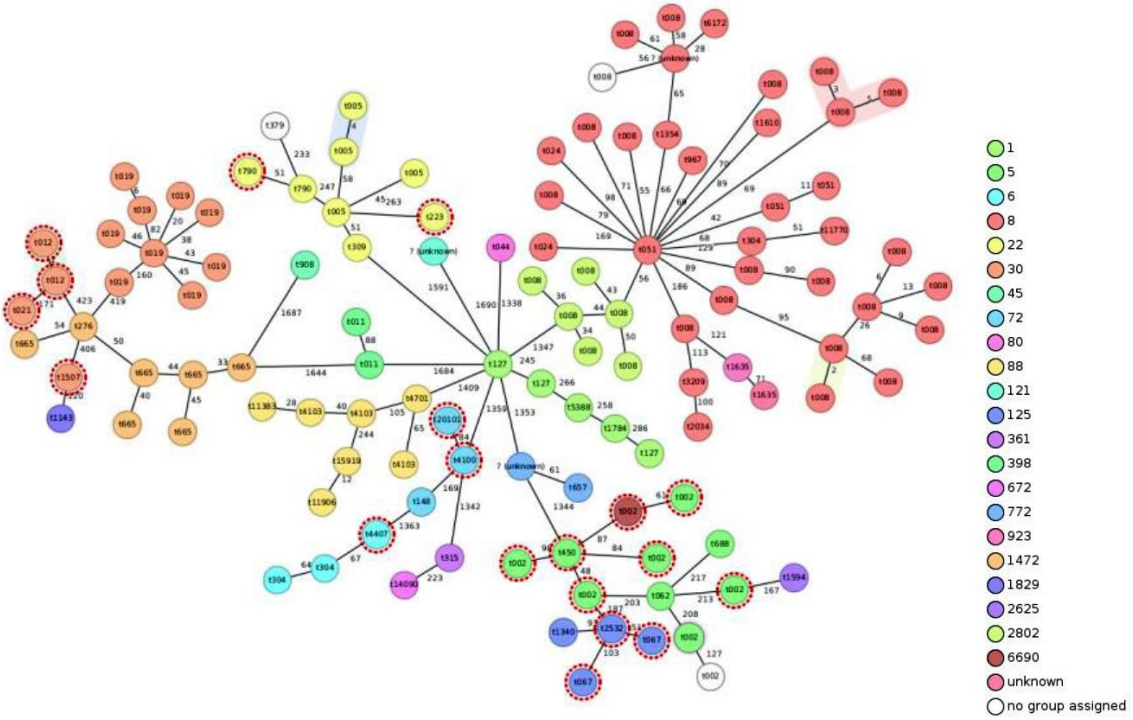


Figura 2. Árbol de distancias mínimas (*minimum spanning tree*) que representa la distancia genética entre las cepas de SARM-CA provenientes de infección aplicando un esquema de cgMLST de 1.861 genes. Cada círculo representa una cepa. El número de las ramas señala la distancia genética: número de diferencias alélicas (la longitud de las ramas no es equivalente a la distancia genética). Las ramas sombreadas muestran cepas que presentan 0-5 alelos de diferencia. Color según ST, el color blanco indica que no se asignó un ST. No se pudo determinar el spa-tipo de dos cepas (color blanco).



CONCLUSIONES

- Dada la importancia de *S. aureus* resistente a meticilina como patógeno nosocomial y también asociado a infecciones de origen comunitario, se está en proceso de reestructuración del diseño del Programa de Vigilancia de Infecciones Estafilocócicas con dos objetivos prioritarios:
  1. Asegurar una vigilancia prioritaria y representativa a nivel nacional de este patógeno.
  2. Promover la implementación de la secuenciación completa de genomas tanto en la vigilancia como en la investigación de brotes alineándose con las recomendaciones de organismos internacionales como el ECDC, y de redes nacionales como RedLabRA.
- La capacidad de producción de múltiples exotoxinas de este patógeno puede agravar el pronóstico clínico provocando infecciones graves. En este sentido y dada la demanda de identificación de las mismas, se han actualizado las técnicas moleculares para ofrecer la detección simultánea y rápida de las exotoxinas más frecuentes.
- Los aislados de SARM-CA de infecciones en la población pediátrica estaban asociados a una alta prevalencia del gen codificante para la toxina LPV y estaban mayoritariamente asociados al ST8, t008. Los resultados del análisis por cgMLST de cepas SARM causantes de infecciones podrían indicar la diseminación de cepas SARM-CA de infecciones en niños.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC strategic framework for the integration of molecular and genomic typing into European surveillance and multi-country outbreak investigations 2019–2021. Stockholm: ECDC; 2019
2. J Rodríguez-Baño, C Bischofberger, F Álvarez-Lerma, A Asensio, T Delgado, D García-Arcal, *et al.*, Grupos de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH) y de Infección en el Paciente Crítico (GEIPC) de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) y Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene (SEMPSPH). Vigilancia y control de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en hospitales españoles. Documento de consenso GEIH-SEIMC y SEMPSPH. Enferm Infecc Microbiol Clin., 26 (2008), pp. 285-298.

3. The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. Edited by Shymaa Enany and Laura E. Crotty Alexander. 2017.
4. Denayer S, *et al.* Food-Borne Outbreak Investigation and Molecular Typing: High Diversity of Staphylococcus aureus Strains and Importance of Toxin Detection. Toxins 2017, 9(12), 407; https://doi.org/10.3390/toxins9120407
5. Román F, Mendez-Echevarria A, Del Rosal T, Garcia-Vera C, Escosa-Garcia L, Agud M, *et al.* Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains colonizing the nostrils of Spanish children. Microbiologyopen. 2021 Oct 1;10(5).
6. Lagos AC, Sundqvist M, Dyrkell F, Stegger M, Söderquist B, Mölling P. Evaluation of within-host evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by comparing cgMLST and SNP analysis approaches. Sci Rep. 2022 Dec 1;12(1).

Infecciones entéricas bacterianas transmitidas por agua y alimentos. CNM

Informe elaborado por Silvia Herrera León en nombre de Lorena Vigón Hernández, Silvia del Pino Rosa y Vanessa Rodríguez Paredes

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

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) son un conjunto de enfermedades producidas por la ingestión de un alimento, incluido el agua, 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. 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 zoonósicos desde el punto de vista microbiológico (resistencia antimicrobiana, detección de clones virulentos, etc.) como epidemiológico (detección e investigación de brotes, generación de información que permita la evaluación de las fuentes y tendencias pertinentes).

En el presente documento se presentan los datos recogidos en la Unidad de Enterobacterias durante los años 2021-2022 como continuación de los datos presentados en el anterior informe en el que se recogían los datos del período 2014-2020.

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 al 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 CC. AA.. En el caso de laboratorios privados se realizarán los estudios de referencia a través de la cartera de servicios (precio público) del CNM.

Muestras, condiciones de envío y análisis de laboratorio

La Unidad de Enterobacterias trabaja con aislamientos bacterianos de los géneros *Salmonella, Shigella, Yersinia, Campylobacter* y *Vibrio*. En el caso de *Escherichia 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. A nivel metodológico, actualmente el programa de vigilancia incluye las siguientes determinaciones:

- Diagnóstico y aislamiento primario de *E. coli* productor de diarrea a partir de muestra clínica (heces) o placa de coprocultivo primario.
- Confirmación/identificación a nivel de especie mediante 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.
- Caracterización fenotípica de la sensibilidad a antimicrobianos según criterios EUCAST.
- Determinación de la estructura poblacional de especies/serotipos de interés y estudio de brotes mediante secuenciación de genomas completos (MLST, cgMLST y filogenia mediante SNPs).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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 una de ellas los resultados más relevantes. Para el análisis no se tuvieron en cuenta las muestras procedentes de alimentos/animales/medio ambiente, aquellas en las que no se recuperó el microorganismo esperado o muestras procedentes del mismo paciente en las que se obtuvo el mismo resultado o resultaron negativas en los coprocultivos de seguimiento.

Salmonelosis: se recibieron 5.107 aislamientos, aunque en este análisis se incluyen 4.359. El programa de vigilancia cuenta con una buena representación geográfica ya que se recibieron aislados de las 50 provincias, así como de Ceuta y Melilla. En cuanto a la representatividad poblacional, el CNM recibió un 26,9% y un 36,8% del total de casos confirmados declarados a TESSy en 2021 y 2022, respectivamente. No existió diferencia en la afectación de hombres y mujeres con una razón hombre-mujer de 1,06. La distribución de los casos en nuestra población se concentró en los siguientes intervalos de edad: mayores de 64 años (24,1%) seguido de los menores de 5 años (21,5%) y del intervalo de 5 a 14 años (17%). De los 4.359 aislamientos, el 90,1% procedían de heces, el 6,1% de sangre, el 2,6% de orina y el resto de diversas localizaciones.

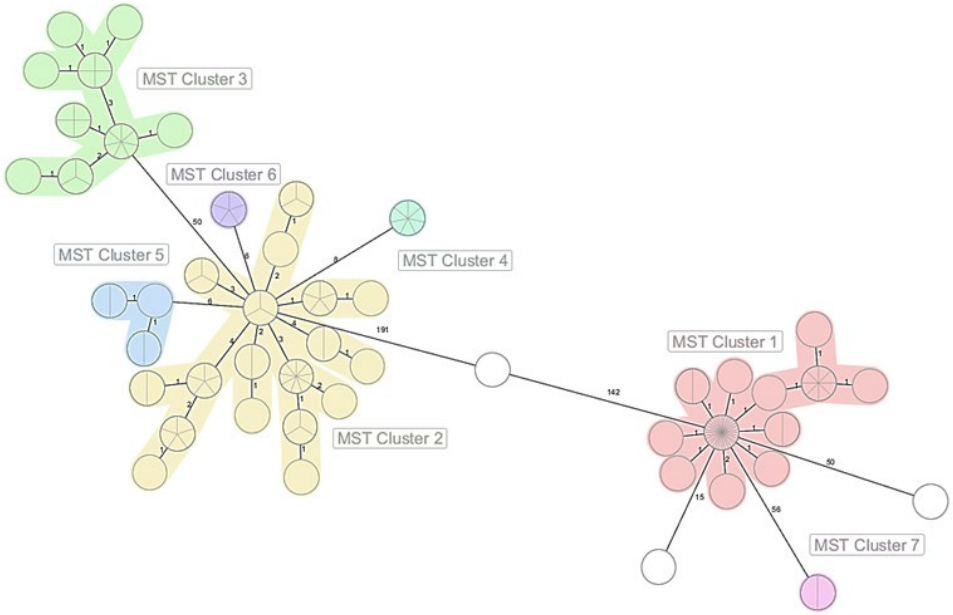
El 96,6% de los aislamientos de *Salmonella* pertenecieron a la especie *enterica* subespecie *enterica*. Los cinco serotipos más frecuentes fueron: Enteritidis (29,3%), Typhimurium y su variante monofásica (25,8%), Infantis (3,3%), Virchow (2,9%) y Newport (2,6%). Tal y como sucede en el resto de Europa, los casos de fiebres tifoideas (producidas por S. Typhi - 0,7%) y fiebres paratifoideas (producidas por S. Paratyphi A - 0,2% y S. Paratyphi B sensu stricto-0,07%) son anecdóticos y se asociaron en gran proporción con viajes principalmente a India y Pakistán.

El análisis de series temporales de los datos obtenidos en el laboratorio permitió: i) colaborar en la evaluación de los programas de control y prevención de la salmonelosis: cabe destacar la emergencia de *S.* Virchow, serotipo sujeto a estos programas en aves y cuya frecuencia en nuestra serie de datos de 2017-2019 se situaba en torno al 0,7%; ii) detectar de brotes o clones emergentes: detección de incrementos inusuales de ciertos serotipos ya sea a nivel nacional (*S.* Poona, *S.* Goettingen) o local (*S.* Mishmarhaemek) y iii) dar respuesta a las *urgent inquiries* emitidas por diferentes estados miembros en la red de vigilancia del ECDC.

El CNM participó en el estudio de 43 brotes. El serotipo implicado en el 74,4% de los casos fue *S.* Enteritidis donde la secuenciación de genomas completos supuso el aumento de la discriminación del secuencio-tipo ST11. Aunque ST11 es altamente

clonal, la combinación de datos epidemiológicos junto con el análisis de cgMLST permitió la diferenciación de 7 clústeres así como la asociación de varios brotes de una misma provincia/CC. AA. y/o muestras de origen humano, alimentario y/o animal o brotes nacionales con brotes internacionales que permitieron la evaluación conjunta de estos brotes (1). En este sentido vale la pena señalar la detección de casos de *S.* Typhimurium ligado al brote de salmonelosis por consumo de chocolate en el que la secuenciación masiva fue clave para identificar casos asociados en nuestro país (2).

Figura 1. *Minimun spanning tree* que representa la estructura poblacional de 146 aislamientos de *S. Enteritidis* ST-11 representativas de brotes en 2021-2022. Imagen obtenida aplicando un esquema de cgMLST de 3.002 genes. Los colores representan los distintos clústeres detectados.



Para llevar a cabo la vigilancia de la resistencia antimicrobiana, el CNM realiza el antibiograma de forma sistemática a uno de cada dos aislamientos recibidos. En este periodo se realizaron 2.682 antibiogramas. El análisis de los porcentajes de resistencia en comparación con el resto de los países europeos se puede consultar en el último informe publicado por la EFSA y el ECDC (3). Es importante indicar que este análisis debería realizarse teniendo en cuenta los distintos serotipos. Por razones de espacio, en este informe se presentan datos globales. Los mayores porcentajes de resistencias se obtuvieron a ampicilina (27,3%), tetraciclina (27,2%), sulfametoxazol (26%) y fluoroquinolonas (22,3%). Estos porcentajes reflejan la prevalencia de la variante monofásica del serotipo Typhimurium ST-34 cuyo perfil de resistencia incluye ampicilina, sulfametoxazol, tetraciclina y estreptomicina. La

resistencia a fluoroquinolonas viene explicada por los serotipos cuyo reservorio principal son aves y productos derivados: Enteritidis, Virchow, Infantis, Hadar, Kentucky y Ohio. La resistencia a cefalosporinas de tercera generación es inferior al 1% y ésta no se asocia a ningún serotipo o clon predominante. No se encontraron resistencias a carbapenémicos.

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, la Unidad de Enterobacterias lleva a cabo el aislamiento y/o caracterización de todos los grupos productores de diarrea. En el periodo de estudio se recibieron 1.239 heces, coprocultivos primarios y/o aislamientos, aunque en este análisis solo se han incluido 1.176. En 631 muestras (53,6%) se identificó alguno de los principales grupos causantes de diarrea (Tabla 1).

Durante este periodo se recibieron muestras de 15 CC. AA. y Melilla. Sin embargo, el 86,7% de las muestras analizadas fueron enviadas por Castilla y León (25,99%), Navarra (17,7%), Madrid (16,2%), País Vasco (15,4%) y Castilla La Mancha (11,4%).

Tabla 1. 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.

	ECVT	ECEP	ECET	ECEA	ECEI	ECND	Total
2021	209	58	3	8	2	263	543
2022	174	61	17	57	42	282	633
Total	383	119	20	65	44	545	1.176

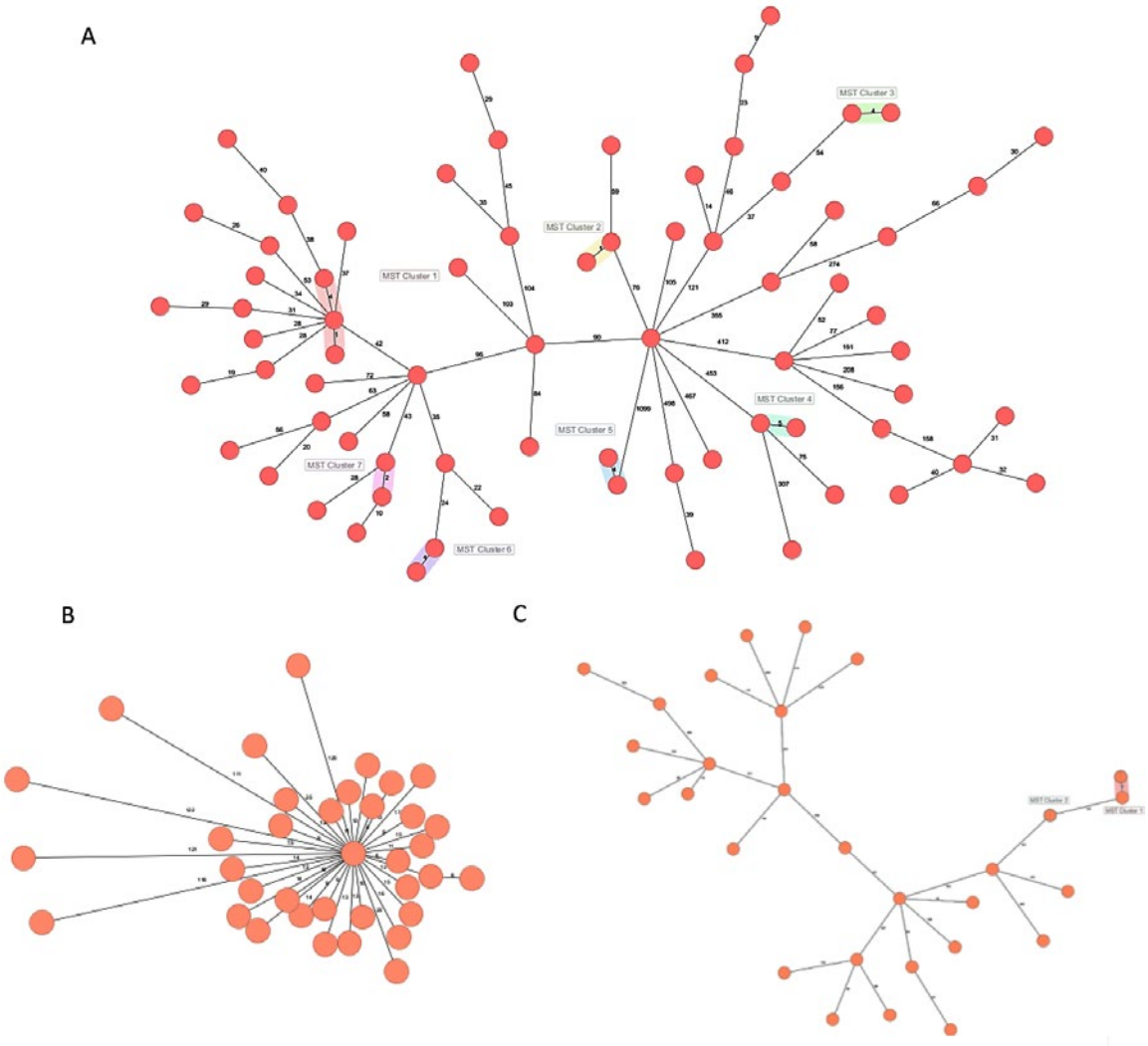
ECVT: *E. coli* verotoxigénico; ECEP: *E. coli* enteropatógeno; ECET: *E. coli* enterotoxigénico, ECEA: *E. coli* enteroagregativo; *ECEI:* E. coli enteroinvasivo.

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 49,5% y del 36,8% del total de casos confirmados declarados a TESSy en 2021 y 2022. En este último año se aprecia una disminución con respecto a periodos anteriores que vendrían explicados por la mayor notificación a la RENAVE a partir de la incorporación en los hospitales de ensayos múltiples que permiten un diagnóstico etiológico rápido y simultáneo de infecciones gastrointestinales. No existieron diferencias en la afectación de hombres y mujeres con una razón hombre-mujer de 0,93. La distribución de los casos en nuestra población se concentró en los siguientes intervalos de edad: menores de 5 años (24%), 5 a 14 años (20,4%) y mayores de 64 años (21,1%). La manifestación clínica más frecuente fue diarrea (62,9%) seguida de

diarrea sanguinolenta (16,2%) y, por último, síndrome urémico hemolítico (SUH) (5,5%). En un 2,3% de los casos los casos eran asintomáticos.

Se llevó a cabo la caracterización de 262 aislamientos de ECVT (68,4%) ya que no en todas las muestras positivas por RT-PCR se recupera la cepa patógena. Se identificaron un total de 45 serotipos distintos siendo los más frecuentes O157:H7 (29%), O128:H2 (14,5%), O91:H14 (11,83%), O26:H11 (4,96%) y O146:H21 (5,34%).

Figura 2. *Minimun spanning tree* que representa la estructura poblacional de los aislamientos de *Escherichia coli* O157:H7 (A), O128: H2 (B) y O91:H14 (C) en 2021-2022. Imágenes obtenidas aplicando un esquema de cgMLST de 3.152 genes.



***O157:H7*:** el análisis de genomas completos mostró una amplia diversidad genética (Figura 2A). Se detectaron siete clústeres. Cuatro de ellos correspondían a aislamientos procedentes del mismo paciente. En dos se agruparon casos de distintas CC. AA.. El aislamiento se realizó en el mismo periodo de tiempo por lo que se consideraron posibles brotes. El último clúster agrupaba dos casos de un brote ocurrido de Navarra. Los aislamientos de O157:H7 se caracterizaron por poseer la isla de patogenicidad LEE, el plásmido de virulencia pECEH y verotoxinas tipo 1 y/o tipo 2. En el 67,1% de los aislamientos se identificó *vtx*1 y en el 97,4% *vtx*2. El perfil más común fue *vtx*2c/*vtx*1a (47,4%). Los aislamientos con *vtx*2c son considerados altamente virulentos por su evolución hacía cuadros clínicos más graves: diarrea sanguinolenta y SUH (4).

***O128:H2*:** el análisis de genomas completos muestra una estructura poblacional mucho más homogénea (Figura 2B). A pesar de ello, no se detectaron *clústeres*. Los aislamientos de este serotipo caracterizaron por carecer de la isla LEE y por poseer la citotoxina subtilasa, plásmido de virulencia pECEH y verotoxinas tipo 1 (15,8%) y/o tipo 2 (97,4%). El perfil más común fue *vtx*2b (92,1%). Este tipo de verotoxina se ha asociado con cuadros clínicos leves (4). En nuestra población, un 97,4 % de los casos con este serotipo presentaron diarrea.

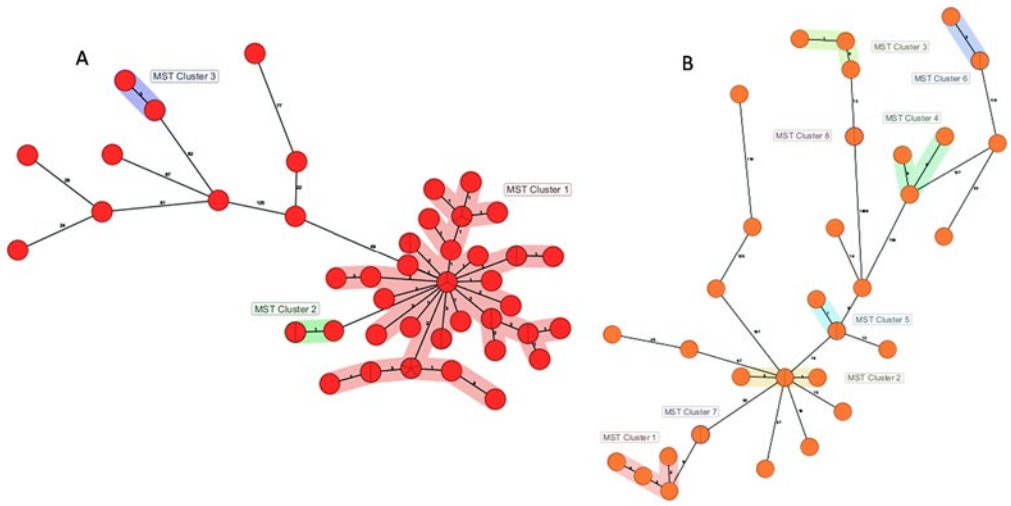
O91:H14: el análisis de genomas completos mostró una amplia diversidad genética (Figura 2C). Se detectaron dos clústeres. En uno de ellos se agruparon tres casos de Navarra mientras que en el segundo los dos casos procedían de Navarra y Valladolid. En ambos los aislamientos fueron obtenidos en el mismo periodo de tiempo por lo que se consideraron posibles brotes. El perfil de virulencia de este serotipo fue muy diverso. Todos carecían de la isla de patogenicidad LEE, el 48,4% presentaban el plásmido de virulencia pECEH, el 96,8% tenían *vtx*1a y el 67,7% *vtx*2b. El perfil más común fue *vtx*1a/*vtx*2b (54,5%). Este tipo de verotoxinas se han asociado con cuadros clínicos leves (4). En nuestra población, un 96,7% de los casos con este serotipo presentaron diarrea.

Shigelosis: este análisis incluye 228 aislamientos de 258 recibidos en el periodo de tiempo estudiado (28,45% de los casos confirmados declarados a TESSy). En este análisis se incluyen 228. Se recibieron muestras de 13 CC. AA. y Melilla. Sin embargo, el 78,7% de las muestras analizadas fueron enviadas por Madrid (40%), Navarra (19,6%), Comunidad Valenciana (7,1%), Cataluña (6,2%) y País Vasco (5,8%). En este caso, existe una mayor afectación de los hombres razón hombre-mujer de 3,41. El rango de edad fue de 0-84 años. grupo de edad más afectado es el de 25-34 años (29,8%). Los grupos entre 15 y 54 años engloban el 75,1% de los casos. Las dos especies identificadas fueron *Shigella flexneri* (53,3%) y *Shigella sonnei*

(46,2%), no existiendo diferencias significativas en la distribución de sexo o grupo de edad afectados.

En 2022, el Reino Unido alertó de un brote de *Sh. sonnei* extremadamente resistente (XDR) en hombres que tienen sexo con hombres (HSH). El CNM colaboró con el CNE y el CCAES en la elaboración de una evaluación rápida de riesgo. A raíz de esta evaluación se decidió realizar antibiograma y secuenciación de genoma completo a todos los aislamientos multirresistentes de *Shigella* spp. Se secuenciaron 58 aislamientos MDR de *Sh. sonnei* (20 del año 2021 y 38 del año 2022). Se detectó un *clúster* mayoritario en el que se encontraban genomas representativos de la alerta europea (Figura 3A). El 100% fueron resistentes a sulfametoxazol y trimetoprima, el 93,1% fueron resistentes a fluoroquinolonas, el 91,4% presentaron resistencia a cefalosporinas de tercera generación (siendo $bla_{\text{CTX-M-27}}$, indicativa del clúster mayoritario, el gen codificante de BLEE más frecuente), el 81,7% presentaron resistencia a azitromicina y el 55,2% a tetraciclina. En el caso de *Sh. flexneri* la variabilidad genética es mucho mayor (Figura 3B). Se secuenciaron 37 genomas (4 de 2021 y 33 de 2022) detectándose 8 *clústeres* con un número máximo de cuatro genomas. En este caso también se encontraron asociaciones con *clústeres* internacionales ligados a transmisión entre HSH. En este caso el 94,7% fueron resistentes a tetraciclina, el 84,2% a trimetoprima, 71% a fluoroquinolonas, el 55,3% a azitromicina y el 34,2% a sulfametoxazol. En el 28,5% se detectó $bla_{\text{CTX-M}}$ ($bla_{\text{CTX-M-27}}$ en el 21%) y en el 26,8% $bla_{\text{OXA-1}}$.

Figura 3: *Minimun spanning tree* que representa la estructura poblacional de los aislamientos de A) *Sh. sonnei* y B) *Sh. flexneri* en 2021-2022. *Imágenes obtenidas aplicando un esquema de cgMLST de 2.515 genes.*



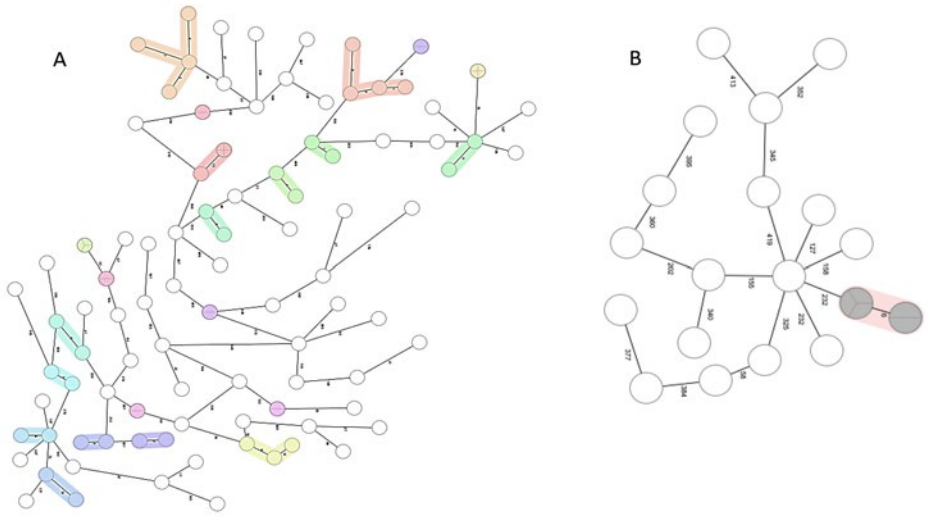
Campilobacteriosis: se recibieron 1.808 aislamientos que representaron un 4,3% de los casos confirmados declarados a TESSy. Este análisis incluye 1.741. Se recibieron muestras de 10 CC. AA. siendo Madrid (66,5%), Andalucía (16%) y Castilla y León (14,4%) las más participativas. El 99,1% procedían de heces. Tal y como se ha descrito en otros informes, los hombres están ligeramente más afectados que las mujeres siendo la razón hombre-mujer de 1,4. El grupo de edad que acumuló mayor número de casos correspondió a los menores de 5 años, descendiendo paulatinamente con el aumento de la edad hasta aumentar de nuevo en el grupo de >55 años.

La especie más frecuente fue *Campylobacter jejuni* (83,1%) seguida de *Campylobacter coli* (16,5%). Se identificaron también *Campylobacter fetus* (0,1%), *Campylobacter upsaliensis* (0,1%), y *Campylobacter lari* (0,06%). Por primera vez desde que se creó el programa de vigilancia para este microorganismo se identificó la especie *Campylobacter lanienae* en dos pacientes de la Comunidad de Madrid. Esta especie se describió asociada a un cuadro intestinal en trabajadores de matadero en el año 2000. Su reservorio parece ser la carne de cerdo, aunque en España se puede encontrar en animales salvajes como el jabalí o ciervo.

Se realizó el antibiograma a 1.371 aislamientos (78,7%). Los resultados se muestran por especie ya que los puntos de corte clínicos son diferentes. En el caso de *C. coli* se encontraron porcentajes de resistencia elevados a fluoroquinolonas (93,7%), tetraciclina (90,2%) y eritromicina (17,6%). Los porcentajes en *C. jejuni* fueron: 88,7% para fluoroquinolonas, 67,6% para tetraciclina y 8,5% para eritromicina. Estos porcentajes posicionan a España como uno de los países europeos con mayor problemática en cuanto a resistencias en este microorganismo, siendo superado únicamente por Portugal (3).

Durante el primer trimestre de 2021 se llevó a cabo un estudio piloto para evaluar la aplicación de genomas completos en la vigilancia de *Campylobacter* spp. Se seleccionaron todos los aislamientos de *C. jejuni* (Figura 4A) y *C. coli* (Figura 4B) con fecha de toma de los tres primeros meses del año procedentes de Madrid, Andalucía o Castilla León. El análisis de genomas reveló una amplia variabilidad genética para ambas especies pero fue capaz de detectar 22 clusters de *C. jejuni* y uno de *C. coli*.

Figura 4. *Minimun spanning tree* que representa la estructura poblacional de los aislamientos de A) *C. jejuni* B) *C. coli* en el primer trimestre de 2021. *Imágenes obtenidas aplicando un esquema de cgMLST de 637 genes. Los colores indican los diferentes* clústeres *detectados.*



Yersiniosis: este análisis incluye 355 de 377 aislamientos recibidos (19,7% de los casos confirmados declarados a TESSy). Se recibieron muestras de 13 CC. AA. siendo las más activas Cataluña (29,8%), Madrid (16,8%), Comunidad Valenciana (16,3%) y Navarra (11,6%). Las mujeres mostraron un nivel de afectación ligeramente superior que el de los hombres siendo la razón hombre-mujer de 0,87.

La especie más frecuente fue *Yersinia enterocolitica* (89,9%) seguida de *Yersinia frederiksenii* (7,3%) y *Yersinia kristensenii* (1,1%). Se identificó en menor proporción *Yersinia intermedia* (0,6%), *Yersinia massiliensis* (0,6%), *Yersinia hibernica* (0,3%) y *Yersinia bercorvieri* (0,3%). De las doce especies de este género bacteriano solo *Y. enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis* son consideradas patógenas para el hombre, aunque el resto puede causar infecciones oportunistas. *Y. enterocolitica* es un grupo heterogéneo que tradicionalmente se clasifica mediante en 6 biogrupos de los cuales cinco (1B y 2-5) se consideran patógenos. Por ello, el ECDC recomienda la identificación del biotipo y/o la caracterización de los factores de virulencia. En nuestro caso, el 37,3% de los aislamientos recibidos se identificaron como biotipo 1A y carecían de los determinantes de virulencia *ail* y *vir*F. *Y. enterocolitica* biotipo 1A se excluye de la definición europea de caso por lo que la declaración de casos confirmados a TESSy por parte de la RENAVE puede estar sobreestimado.

Vibriosis: se recibieron 169 aislamientos, aunque en este análisis únicamente se recogen 46 ya que el resto pertenecían al género Aeromonas, no crecieron, o no se aisló *Vibrio* spp. a partir de muestra clínica. El 76,1% de las muestras positivas a

Vibrio spp. procedían de casos humanos, 62,8% se aislaron en heces, el 22,9% en sangre, el 8,6% en exudado de oído y un 5,7% en líquido biliar y líquido cefalorraquídeo. El 23,9% fueron muestras de agua recogidas en el contexto de diferentes investigaciones epidemiológicas. Se recibieron muestras de 10 CC. AA. siendo las más activas Madrid (25,7%), Cataluña (20%) y Andalucía (14,3%).

La especie identificada con más frecuencia fue *Vibrio cholerae* (77,1%), *Vibrio alginolyticus* (8,6%), *Vibrio parahaemolyticus* (5,7%), *Vibrio fluviales* (2,9%), *Vibrio mimicus* (2,9%) y *Vibrio cincinnatensis* (2,9%). En el caso de *V. cholerae* no se detectó ninguna cepa positiva a la toxina colérica, aunque sí estaban presentes otros factores de virulencia como citotoxinas y hemolisinas. Cabe destacar que el porcentaje de hospitalización fue de un 58,8%, el más alto de las enfermedades incluidas en el programa. En los últimos años son numerosos los estudios que indican un aumento de los aislamientos de *V. cholerae* no toxigénico debido al cambio climático. En nuestra serie temporal constatamos un aumento significativo de casos en los últimos años con un pico a finales de verano de 2022.

En este periodo se colaboró en el estudio ambiental de dos casos de infección por *V. cholerae* no toxigénico. En ambos existía una evidencia epidemiológica fuerte de la fuente de infección (agua) pero, aunque se aislaron diversas cepas de *V. cholerae* en las muestras ambiental no se puedo encontrar la cepa causante de la infección en humanos.

Aplicación de la secuenciación de genomas completos: durante este periodo se estableció la secuenciación rutinaria de genomas completos en el contexto de investigación de brotes. Se estudiaron 43 brotes de salmonelosis, tres ligados a infecciones por *E. coli*, dos de shigelosis, dos de campilobacteriosis y un acúmulo de casos de yersiniosis.

Limitaciones: El envío de muestras al programa de vigilancia se realiza de manera voluntaria por lo que la representatividad geográfica y poblacional no es homogénea para las distintas enfermedades.

CONCLUSIONES

- Las enfermedades con mejor y peor porcentajes de representatividad geográfica y poblacional son la salmonelosis y la campilobacteriosis respectivamente. En este último caso, y como consecuencia de un esfuerzo a la hora de mejorar los datos obtenidos en el análisis del periodo 2014-2020, se ha duplicado el porcentaje de casos confirmados con respecto al total de casos declarados recibidos en el CNM.

- En el caso de ECVT y yersioniosis sería necesario disponer de los datos de confirmación microbiológica (método de diagnóstico utilizado y variable analizadas) ya que se sospecha de una sobreestimación de los casos recogidos en las CC. AA..
- En el caso de la salmonelosis, ECVT y shigelosis la vigilancia de laboratorio ha permitido hacer un seguimiento continuo de la dinámica evolutiva de los distintos serotipos, mecanismos de resistencia y clones circulantes, lo que redunda en el establecimiento de alertas precoces y en una mayor eficacia de las medidas a implementar.
- En el caso de la vibriosis se constata un aumento de casos producidos por *V. cholerae* no toxigénico en los últimos años que puede estar influenciado por las mejoras en las técnicas diagnósticas y/o cambio climático. En este caso la secuenciación de genomas completos no ha resultado de utilidad para confirmar las fuentes de infección debido a la alta diversidad en las poblaciones de vibrios que se encuentran en el agua.
- El estudio piloto de secuenciación de genomas completos realizado en aislamientos de *Campylobacter* spp. del primer trimestre de 2021, demostró que a pesar de la gran heterogeneidad genética que presenta este género bacteriano y de la creencia generalizada de que el número de brotes es escaso, se encuentran agrupaciones con relación epidemiológica.
- Por último, la incorporación a la vigilancia de la secuenciación de genomas completos ha resultado una herramienta imprescindible en la detección e investigación de brotes o acúmulos de casos. Como objetivo de mejora sería deseable disponer de una herramienta de uso común entre las diferentes administraciones que permitiera la comparación de genomas obtenidos en animales, alimentos y humanos.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority, 2022. Multi-country outbreak of Salmonella Enteritidis sequence type (ST)11 infections linked to eggs and egg products - 8 February 2022.
2. European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority, 2022. Multi-country outbreak of monophasic Salmonella Typhimurium sequence type (ST) 34 infections linked to chocolate products - 12 April 2022.

3. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2023. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021. EFSA Journal 2023; 21(3):7867, 232 pp. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7867
4. 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.
5. Trinanes J, Martinez-Urtaza J (2021). Future scenarios of risk of Vibrio infections in a warming planet: a global mapping study. The Lancet Planetary Health. Vol (5), issue 7, e426-e435.

Legionelosis

Informe elaborado por F. González-Camacho y A. Cascajero

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 una enfermedad causada por diferentes especies del género *Legionella*, siendo *Legionella pneumophila* la especie principal responsable de la mayoría de los casos. Esta enfermedad puede cursar con neumonía grave, pudiendo llegar incluso a un desenlace fatal. Desde el año 1996, esta enfermedad es de declaración obligatoria en España, y se hace a través de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE).

En este contexto, es necesario conocer los resultados microbiológicos de los aislados, tanto de los procedentes de pacientes como de los aislados ambientales, relacionados con los casos/brotes. También son objeto de estudio los aislados ambientales procedentes de las instalaciones que, por sus características, están obligadas a realizar una vigilancia para la prevención de la enfermedad.

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos para los años 2021 y 2022 siguiendo los objetivos y la metodología del Programa de Vigilancia de la legionelosis en el CNM, publicado anteriormente para el período 2012-2020 (1).

RESULTADOS 2021-2022 Y DISCUSIÓN

En este documento se analizan los resultados obtenidos de las muestras y cepas recibidas durante los años 2021 y 2022. El material que se recibió y procesó en el laboratorio correspondió a: muestras clínicas de origen humano (esputo, lavado broncoalveolar, etc.), cepas bacterianas aisladas de pacientes, o cepas aisladas de fuentes ambientales (Tabla 1).

En el periodo de tiempo estudiado, se recibieron 142 muestras clínicas y 71 cepas procedentes de pacientes. De las 142 muestras clínicas se obtuvieron 42 aislados; mientras que del ADN de las muestras clínicas sin aislado positivo (100

muestras) se consiguió obtener información a nivel de genotipado (Sequence-Based Typing-SBT) en 17 casos.

En relación a las muestras de origen ambiental, se analizaron 868 aislados en los dos años de estudio, procedentes de estudios de brotes/casos o de programas de vigilancia y prevención.

Tabla 1. Muestras recibidas a través del Programa de Vigilancia de la Legionelosis para los años 2021-2022 desglosado por años.

MUESTRAS DE ORIGEN HUMANO			
	2021	2022	Total
N.º Muestras	84	129	213
Aislados recibidos	34	37	71
M. clínica	50	92	142
Cultivos realizados	45	70	115
Aislados obtenidos	17	25	42
M. clínicas con Nested-PCR SBT interpretable	3	14	17

MUESTRAS DE ORIGEN AMBIENTAL			
	2021	2022	Total
N.º Muestras (aislados)	405	463	868

De los aislados obtenidos de origen humano, el 97,3 % se identificaron como *L. pneumophila*, y de ellos, el 85% se correspondieron con el serogrupo 1 (SG1). El resto de aislados se repartieron en proporciones minoritarias entre otros serogrupos y otras especies según se describe en la Tabla 2.

Tabla 2. Distribución de aislados de origen humano por especies y serogrupos.

Especie y serogrupo (SG)	N.º Muestras 2021	N.º Muestras 2022	%
L. pneumophila	49	61	97,34
SG1	42	54	84,95
SGs 2-15			
SG2	1	1	1,77
SG3	2	0	1,77
SG4	1	0	0,88
SG5	2	1	2,65
SG6	0	1	0,88
SG7	1	2	2,65
SG10	0	1	0,88
Otros SGs	0	1	0,88
Otras especies	2	1	2,65
L. longbeachae	0	1	0,88
L. micdadei	1	0	0,89
Sin identificar	1		0,88
Total	51	62	100

Estos datos continúan en la línea con literatura donde se indica que el SG1 es el principal causante de enfermedad del legionario.

El análisis de tipificación mediante anticuerpos monoclonales del panel de Dresde (2) para *L. pneumophila* SG1 (Tabla 3) muestró que la mayoría de los aislados (77,1 %) fueon MAb 3/1 positivos, lo que se relaciona con el grupo Pontiac. Estos datos están en consonancia con los resultados previamente publicados en los que se muestra que la *L. pneumophila* SG1 grupo Pontiac es la más frecuente en los casos clínicos.

Tabla 3. Asignación de grupos y subgrupos de *L. pneumophila* mediante tipificación con anticuerpos monoclonales.

Subgrupo de *L. pneumophila* SG1 (tipificación con AcMo)	N.º Muestras 2021	N.º Muestras 2022	%
Pontiac (MAb 3/1 +)	33	41	77,08
Knoxville	11	5	16,67
Philadelphia	5	2	7,29
Benidorm	0	5	5,21
France/Allentown	5	2	7,29
Subgrupo no determinado	12	27	40,63
MAb 3/1 -	9	13	22,92
Olda			
OLDA	2	2	4,17
Oxford	0	0	
Heysham	0	0	
Camperdown	0	0	
Olda/Bellingham	7	11	18,75
Total	42	54	100

El estudio de genotipificación mediante el análisis del SBT mostró que el ST más frecuente en cepas de origen humano fue el ST1 (Tabla 4) con casi un 25% (n= 27) del total de casos, seguido de ST23 (n=11) que se correspondía con un 10% del total, y el ST42 (n=6) con un porcentaje cercano al 6%.

De estos análisis se refleja que más del 45% de las muestras genotipadas se distribuyeron entre STs infrecuentes con un número bajo de casos. Estos datos indican que existe una gran diversidad genética en la población de esta especie causante de enfermedad, posiblemente debido a que las principales causas asociadas al desarrollo de patología están relacionadas con la susceptibilidad individual de cada paciente (edad, estado de salud previa, etc.) más que con la diferente virulencia de la cepa.

Estos datos muestran la misma tendencia que se describió para el período anterior (2012-2020), donde los ST más frecuentes fueron el ST1, ST23 y ST42.

Tabla 4. Secuenciotipos obtenidos para *L. pneumophila*.

Secuenciotipo (ST) de *L. pneumophila* (genotipificación)	N.º Muestras 2021	N.º Muestras 2022	%
ST1	14	13	24,55
ST20	1	3	3,64
ST23	5	6	10,00
ST42	1	5	5,45
ST181	0	5	4,55
STs nuevos	6	0	5,45
STs incomplentos	0	1	0,91
Otros STs	22	28	45,45
Total	49	61	100

Por otro lado, durante estos dos años de estudio se recibieron en el laboratorio 868 aislados de *Legionella* de origen ambiental (Tabla 5). El 82,7% de estos aislados se identificaron como *L. pneumophila* siendo el SG1 el más frecuente (56%).

Un 17% de las muestras de origen ambiental se identificaron como otras especies diferentes a *L. pneumophila*, siendo *L. anisa* la más frecuente con un 12,3 % de los casos. En los aislados ambientales es notable la diversidad encontrada, tanto de serogrupos como de especies diferentes a *L. pneumophila*, aunque con una baja frecuencia.

Tabla 5. Distribución de los aislados de origen ambiental de *Legionella* en serogrupos y especies.

Especie y serogrupo (SG)	N.º Muestras 2021	N.º Muestras 2022	%
L. pneumophila	332	386	82,72
L. pneumophila no tipable	0	6	0,69
SG1	210	277	56,11
SGs 2-15			
SG3	14	22	4,15
SG4	18	9	3,11
SG5	14	19	3,80
SG6	7	13	2,30
SG7	1	1	0,23
SG8	41	24	7,49
SG9	2	0	0,23
SG10	13	8	2,42
SG11	1	0	0,12
SG14	0	1	0,12
No tipable	11	6	1,96
Otras especies	73	75	17,05
L. anisa	60	47	12,33
L. santicrucis	1	1	0,23
L. taurinensis	0	4	0,46
L. feeleii	0	4	0,46
L. rubrilucens	2	8	1,15
L. taurinensis	1	0	0,12
L. erythra	5	3	0,92
L. bozemanii	0	3	0,35
L. dumofii	0	1	0,12
L. londiniensis	0	3	0,35
Legionella maceachernii	0	1	0,12
L. quinlivanii	1	0	0,12
Sin identificar	3	0	0,35
Sin determinar	0	2	0,23
Total	405	463	100

Los aislados pertenecientes al SG1 de *L. pneumophila* se tipificaron mediante anticuerpos monoclonales para asignarles un grupo, y en el caso de tratarse de aislados procedentes del estudio de un brote, para asignarles un subgrupo (Tabla 6). A diferencia de lo que ocurre con los aislados de origen clínico en los que predominan mayoritariamente los MAb3/1 positivos (Grupo Pontiac), en los aislados de origen ambiental los resultados negativos a MAb 3/1 (Grupos Olda o Bellingham) son más frecuentes (56% y 67%, respectivamente).

Tabla 6. Tipificación de grupos y subgrupos del SG1 y genotipificación de *L. pneumophila* para muestras ambientales.

Subgrupo de *L. pneumophila* SG1 (tipificación con AcMo)	N.º Muestras 2021	N.º Muestras 2022	%
Pontiac (MAb 3/1 +)	84	124	42,71
Knoxville	15	11	5,34
Philadelphia	3	2	1,03
Benidorm	10	1	2,26
France/Allentown	0	1	0,21
Subgrupo no determinado	56	109	33,88
MAb 3/1 -	122	153	56,47
Olda			
OLDA	8	10	3,70
Oxford	1	3	0,82
Heysham	0	0	0,00
Camperdown	0	0	0,00
Olda/Bellingham	113	140	51,95
No tipables / No determinado	4	0	0,82
Total	210	277	100

En cuanto al genotipado, sólo se realiza en muestras que están relacionadas con estudio de brotes. En este contexto el ST que aparece con mayor frecuencia es el ST1 con un 37,3 % de los casos (n=25).

Cabe destacar que los dos STs que muestran un mayor número de casos tras el ST1, lo hacen asociados o a un único brote (ST42, n=10) o al estudio de una misma instalación (ST80, n=14).

Tabla 7. Secuenciotipo de cepas ambientales relacionadas con estudio de brotes.

Secuenciotipo (ST) de *L. pneumophila* (genotipificación)	N.º Muestras 2021	N.º Muestras 2022	%
ST1	7	18	37,31
ST7	1	0	1,49
ST42	10	0	14,93
ST435	2	0	2,99
ST2028	2	0	2,99
ST80	0	14	20,90
Otros	0	13	19,40
Total	22	45	100

ST42 (2021) - 10 muestras de el brote 1057/El Palmar El Palmar, Murcia.
ST1 (2021) - 2 muestras del brote 1057/19 El Palmar y 3 muestras del brote 1072/21, Los Palacios.
ST80 - todos procedentes de la misma instalación.

CONCLUSIONES

- Es necesario continuar incidiendo en la necesidad de obtener cepas representativas de origen humano a nivel nacional, lo que permitiría mejorar la caracterización microbiológica de la población de *L. pneumophila* circulante. caracterizar completamente los aislados clínicos. Por otro lado, permitirían realizar estudios epidemiológicos de las cepas circulantes al igual que la realización estudios posteriores.
- A nivel europeo, el estudio y vigilancia de la legionelosis tiene por delante el reto de actualizar las técnicas de caracterización, superar el empleo de los anticuerpos monoclonales y saltar del estudio genético de siete genes (SBT) al genoma completo (WGS), mediante la estandarización coordinada por el ECDC de métodos alternativos y actuales.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Bellido B y Pelaz C: Programa de Legionelosis. En Echevarría Mayo JE y Oteo Iglesias J (Editores). Programas de Vigilancia Microbiológica pags: 74-80. Centro Nacional de Microbiología, Madrid: Instituto de Salud Carlos III, 2021.

2. Helbig JH, Bernander S, Castellani Pastoris M, Etienne J, Gaia V, Lauwers S, Lindsay D, Lück PC, Marques T, Mentula S, Peeters MF, Pelaz C, Struelens M, Uldum SA, Wewalka G y Harrison TG (2002) Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: Distribution of Legionella pneumophila serogroups and monoclonal subgroups. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2002; 21(10): 710–716. https://doi.org/10.1007/s10096-002-0820-3

Infecciones causadas por especies toxigénicas del género *Corynebacterium*. CNM

Informe elaborado por L. Herrera-León* y S. Herrera León

Centro Nacional de Microbiología.

* 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: *C. belfantii* (se corresponde con la biovariedad Belfanti de la especie *C. diphtheriae)* y *C. 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.

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 pertecenientes 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 para la detección temprana de posibles casos o brotes, así como incrementar el cono-

cimiento 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 dificil de implementar en los laboratorios por la dificultad de adquisición de los reactivos necesarios para llevarla 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 estos ensayos.

Por todo ello, los objetivos de este programa son:

- Proporcionar al Sistema de Vigilancia datos de laboratorio con los que poder completar 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 rápi-

damente 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* pero desde el año 2019 se realiza mediante secuenciación del genoma completo.

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 en el periodo 2020-2021 puesto que la serie de casos del periodo 2014-2020 ya fueron analizados en el informe anterior. En el periodo 2020-2021 se han recibido en el Laboratorio de Difteria del CNM 48 muestras clínicas o aislados no duplicados, para su identificación, confirmación, estudio de toxigenicidad y/o caracterización molecular. Los aislados procedieron de muestras respiratorias (frotis nasofaríngeo, aspirados, esputos, biopsia nasal y faríngea), muestras cutáneas, exudado óticos y/o abscesos 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 45 muestras clínicas o aislados recibidos, en 20 (41,7%) se identificó *C. diphtheriae*. De estos 20, uno correspondía a un portador asintomático identificado en el estudio de contactos de un caso en el que se identificó *C. diphtheriae* no toxigénico que se ha excluido del estudio descriptivo. Los 19 aislados o muestras clínicas restantes procedían de 8 CC. AA.: Andalucía (4), Castilla La Mancha (2), Castilla y León (2), Cataluña (1), Galicia (1), Madrid (6), País Vasco (2) y Comu-

nidad Valenciana (1). El número de determinaciones positivas fue de 11 (2021) y 8 (2022). Todos los aislados fueron identificados como *C. diphtheriae.*

Estudio de toxigenicidad y características de los aislados toxigénicos

Sobre los 20 aislados totales: el estudio de toxigenicidad (PCR + Elek) identificó 17 aislados como no-toxigénicos (incluyendo el aislado del portador asintomático identificado en el estudio de contactos), y 3 aislados como toxigénicos. Excluyendo el aislado del contacto, el rango de edad de los pacientes varió de 7 a 97 años y el 57,9% (11/19) eran hombres. La media de edad de los pacientes con cepas no toxigénicas fue de 34 años frente a los 44 de los pacientes con cepas toxigénicas. La razón hombre/mujer fue 1,4 (10/7) para los aislados no-toxigénicos y 0,5 (1/2) para los toxigénicos.

En la Tabla 1 se detallan las características de los casos toxigénicos estudiados en el Laboratorio de Difteria.

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

Especie	Año	CC. AA.	Edad	Sexo	Muestra	Clínica	Biovariedad	Gen *tox* (PCR)	Producción de toxina (ELEK)	ST*
C. diphtheriae	2022	Galicia	56	Hombre	Cutánea	Úlcera de pie	Mitis	Positivo	Positivo	377
	2022	Castilla la Mancha	42	Mujer	Cutánea	Lesión indurada crónica	Mitis	Positivo	Positivo	100
	2022	Cataluña	35	Mujer	Cutánea	---	Mitis	Positivo	Positivo	574

En cuanto al país de origen, dos de los tres casos procedían de África (Senegal y Nigeria) mientras que se desconoce el país de procedencia del tercer caso.

Tipificación molecular

La tipificación mediante MLST mostró tres secuenciotipos (STs) diferentes (Tabla 1). De los ST identificados, únicamente el ST377 había sido identificado con anterioridad en dos casos en los que se identificó *C. diphtheriae* toxigénica. El análisis mediante cgMLST mostró una diferencia de 19 y 285 alelos descartando una posible relación entre estos tres aislados a pesar de 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 toxigénicas en nuestro país.

CONCLUSIONES

- La mayoría de las cepas identificadas son no-toxigénicas. Durante el año 2021-2022 no se han identificado aislados de la especie *C. ulcerans.*
- En nuestro país no existen clones circulantes, sino que se tratan en su mayoría de casos importados de países con elevada incidencia de difteria. Sería recomendable mantener una vigilancia basada en la secuenciación del genoma completo coordinada por el ECDC dada las características de los casos.
- Es necesario mantener la capacidad diagnóstica y aumentar la sospecha clínica ante heridas de tórpida evolución.

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. Diphtheria. N Sharma, A Efstratiou, I Mokrousov, A Mutreja, B Das and T Ramamurthy. Nature Reviews. 2019.

Resistencias en el complejo tuberculoso

Informe elaborado por Laura Herrera León y Estefanía Abascal

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

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 (CC. AA.) 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. El envío al Centro Nacional de Microbiología es de carácter voluntario.

La TB-MDR[1] y XDR[2] 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 (2). 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

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 (levofloxacino/moxifloxacino, bedaquilina y linezolid).

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.

En este documento se recogen los datos recogidos en la Unidad de Micobacterias durante los años 2021 y 2022 continuando con los resultados mostrados en el anterior resumen del programa donde se analizaron los resultados del periodo 2014-2020.

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. 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.

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 asilados 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 de sensibilidad se hace siguiendo las recomendaciones de la OMS (3). 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 secuenciación del genoma completo (WGS).

RESULTADOS 2021-2022 Y DISCUSIÓN

Durante el periodo 2021-2022 se estudiaron en la Unidad de Micobacterias 1.072 aislados únicos pertenecientes al complejo tuberculoso. 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. 46 aislados fueron recibidos en el año 2021 aunque su fecha de toma fue de 2020 por lo que han sido excluidos en el descriptivo (n=46).

Se han recibido aislados de 67 hospitales diferentes de 12 Comunidades Autónomas y Ceuta (Tabla 1). El 46,0% proceden de la Comunidad de Madrid, seguido por Castilla y León (15,8%), Castilla la Mancha (9,2%), Comunidad Valenciana (7,9%), Navarra (6,9%), Cantabria (3,9%), Andalucía (2,0%), y País Vasco (1,8%). El resto de CC. AA. tiene una representación menor al 1% sin que se hayan recibido aislados de Asturias, Cataluña, Galicia, Murcia o Melilla. 25 aislados (2,4%) procedían de MEGALAB por lo que se desconoce la C. A. de origen.

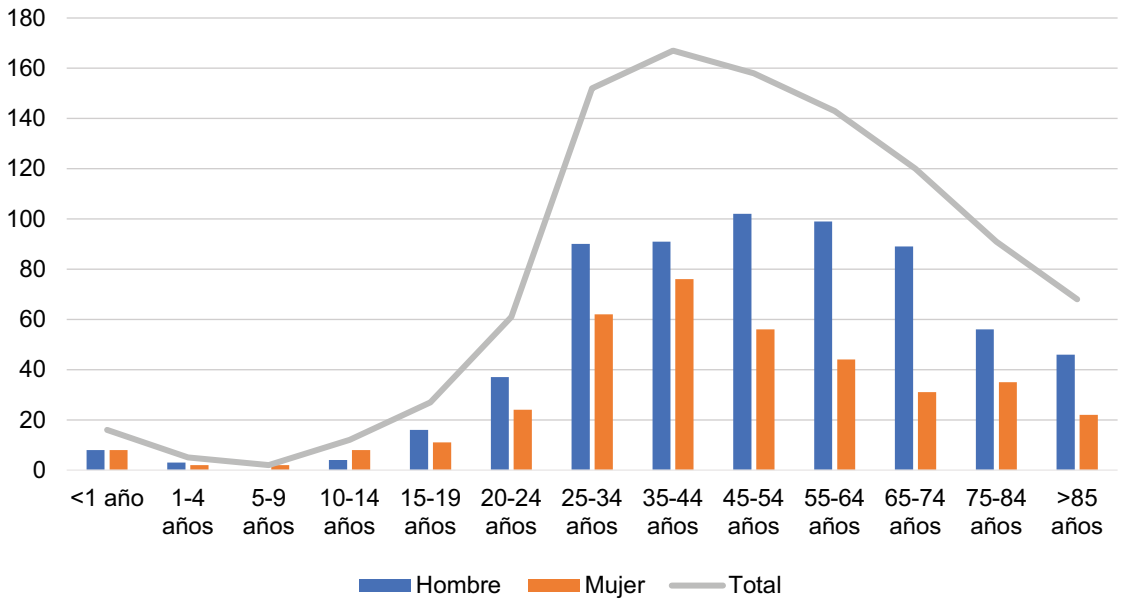
Tabla 1. Aislados enviados al CNM en relación al número de casos notificados por cada Comunidad Autónoma a la RENAVE (datos cedidos por Zaida Herrador del Centro Nacional de Epidemiología).

RENAVE/CNM	2021	2022	Total
ANDALUCIA	520/11	539/10	1059/21
ARAGON	111/0	100/0	211/0
ASTURIAS	80/0	57/0	137/0
ISLAS BALEARES	71/0	71/2	142/2
CANARIAS	101/9	157/7	258/16
CANTABRIA	35/24	38/16	73/40
CASTILLA LA MANCHA	91/40	90/54	181/94
CASTILLA Y LEON	155/93	146/69	301/162
CATALUÑA	969/0	1005/0	1974/0
VALENCIA	393/45	319/36	421/81
EXTREMADURA	42/8	27/1	71/9
GALICIA	354/0	314/0	683/0
MADRID	477/249	578/223	1055/472
MURCIA	114/0	130/0	251/
NAVARRA	29/39	40/32	88/0
PAIS VASCO	182/9	239/10	421/19
LA RIOJA	27/0	19/0	46/0
CEUTA	17/2	25/3	44/5
MELILLA	7/0	6/0	20/0
Total	**3800/551**	**3927/475**	**7727/1026**
Total (%)	**14,4**	**12,1**	**13,3**

Características de los casos

El mayor número de los casos se produjo en hombres (641 casos, 62,48% del total), con una razón hombre/mujer de 1,6. La media de edad fue de 51 años (RIC: 35-68) en hombres y 46 (RIC: 30-62) en mujeres. La distribución de casos por edad y sexo se muestra en la Figura 1. Durante el periodo 2021-2022 se estudiaron 35 aislados de menores de 15 años (16 menores de un año, 5 entre 1 y 4 años, 2 entre 5 y 9 años y 12 entre 10 y 14 años).

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



De los 1.026 aislados recibidos, el 78,46% procedían de muestras respiratorias, el 7,31% de muestras ganglionares y el 0,97% de muestras meníngeas. El resto de los aislados (13,26%) procedían de otras localizaciones.

El 96,39% de los casos eran nuevos (sin tratamiento previo antituberculoso). El 3,61% restante lo habían recibido anteriormente.

De los 1.026 aislados estudiados se informó del país de origen en 636. El 38,0% (242) procedía de un país distinto de España. Las personas nacidas en Marruecos (56) y Rumania (40 casos) representaron el grupo más numeroso. Se recogieron 36 nacionalidades diferentes. El porcentaje de los nacidos fuera de España fue de un 34,8% en 2021 frente a un 41,3% en el 2022.

En el 92,30% de los casos no se específica ningún factor de riesgo asociado. En el 5,26% se indica inmunosupresión, en el 1,27% SIDA y en el 1,17% alcoholismo. Dada la tasa de co-infección VIH-TB recogida en los indicadores del Plan para la prevención y control de la tuberculosis, pensamos que esta variable no se está cumplimentando correctamente a la hora de realizar la solicitud.

Características de los aislados

El 92,5% (949) fueron identificados como *M. tuberculosis*, el 3,02% (31) como *Mycobacterium bovis,* el 2,83% (29) como *M. bovis*-BCG, el 0,88% (9) como *Mycobacterium africanum* y el 0,78% (8) como *Mycobacterium caprae*. La instilación

con BCG se utiliza para conseguir la estimulación de la inmunidad celular aunque puede provocar efectos adversos, normalmente locales y, en un pequeño porcentaje de casos, reacciones sistémicas. El 79,31% (23) de los aislados identificados como *M. bovis*-BCG procedían de orina, el 6,90% (2) de abscesos y el 3,45% (1) de localización pulmonar. El resto procedían de diversas localizaciones (solo uno de estos aislados procedía de sangre completa). Tanto *M. bovis* como *M. caprae* están consideradas como zoonosis. En España, los casos de TB en humanos debido a estas dos especies representan una baja proporción de los casos totales y suelen estar asociados a exposición ocupacional (ámbito veterinario y ganadero) o a casos procedentes de países endémicos para la TB bovina. La diferenciación a nivel de especie es importante ya que *M. bovis* es resistente a pirazinamida mientras que *M. caprae* es sensible. De los 39 casos en los que se identificó una de estas dos especies, se conocía el país de origen en 25. De estos 25, 20 fueron aislados de casos autóctonos mientras que los 5 restantes procedían de Marruecos. 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. De los 9 aislados identificados como *M. africanum*, se conoce el país de origen en 7. De estos siete, dos procedían de Senegal, uno de Guinea Ecuatorial, y uno de Mauritania.

Estudio de susceptibilidad

Se realizó el estudio de susceptibilidad a 1.014 aislados (Tabla 2). El 82,0% fueron sensibles a los fármacos antituberculosos. El porcentaje de TB-MDR, pre-XDR y XDR global fue de un 2,7% (27), 0,3% (3) y 0,1% (1) respectivamente. De los 27 casos MDR, 24 de ellos no habían recibido tratamiento previo. Cabe destacar que los 3 casos identificados como pre-XDR y el único caso identificado como XDR, figuran como que no habían sido tratados con anterioridad lo que nos indica que la interpretación de los datos atendiendo a esta variable (tratamiento previo) debe realizarse con cautela.

Analizando la información disponible atendiendo al origen del caso, 14 de los 15 MDRs, dos de los 3 pre-XDR y el único caso XDR eran nacidos fuera de España identificándose 11 nacionalidades diferentes.

Tabla 2. Resistencia a los fármacos de primera y segunda línea. Polirresistencia: cualquier combinación de más de una resistencia excluida isoniacida + rifampicina; pre-XDR: MDR más resistente a fluoroquinolona; XDR: pre-XDR más resistencia frente a otro fármaco del grupo A.

	Nunca tratados		Previamente tratados		Total	
	Número	%	Número	%	Número	
Total aislados recibidos	**989**	**96,4**[1]	**37**	**3,6**[1]	**1.026**	
Total antibiogramas realizados	**977**	**98,8**[2]	**37**	**100**[2]	**1.014**	
	Numero	%	Numero	%	Numero	%
Resistencia solo a isoniacida	29	28,1[3]	3	75,0[3]	32	26,2[3]
Resistencia solo a rifampicina	1	1,0[3]	0		1	0,8[3]
Resistencia solo a etambutol	2	1,9[3]	0		2	1,6[3]
Resistencia solo a estreptomicina	24	23,3[3]	1	25,0[3]	25	20,5[3]
Resistencia solo a pirazinamida	62	66,0[3]	0		62	50,8[3]
Total monoresistencia	**118**	**12,0**[4]	**4**	**10,8**[4]	**122**	**12,0**[4]
Total MDR	**24**	**2,5**[4]	**3**	**8,1**[4]	**27**	**2,7**[4]
Pre-XDR	**3**	**3,4**[4]	**0**		**3**	**0,3**[4]
XDR	**1**	**0,1**[4]	**0**		**1**	**0,1**[4]
Total polirresistencia	**28**	**2,9**[4]	**1**	**2,7**[4]	**29**	**2,9**[4]
Sensibles	**803**	**82,2**[4]	**29**	**78,4**[4]	**832**	**82,0**[4]

[1] Porcentaje de aislados no tratados/tratados previamente con respecto al total de aislados recibidos (n=1026).
[2] Porcentaje de antibiogramas realizados con respecto al total de aislados recibidos en cada categoría (no tratados/tratados).
[3] Porcentaje de aislados monorresistentes a cada uno de los fármacos con respecto al total de cepas monorresistentes.
[4] Porcentaje de aislados por categoría de resistencia (mono, MDR, pre-XDR, XDR, polirresistencia y sensibles) con respecto al número total de aislados con antibiograma realizado por categoría (tratados/no tratados).

Estudio de mutaciones

Se estudió la región determinante de resistencia del gen *rpo*B en 30 de los 36 aislados resistentes a rifampicina. El 100% presentaba alguna mutación siendo las mayoritarias la mutación Ser450Leu (70,0%) e His445Tyr (6,7%). De los 84 aislados con resistencia a **isoniacida**, se estudió el gen *kat*G en 71. En el 70,42% de ellos se detectó una mutación que provocaba el cambio de la Ser localizada en el codón 315 asociadas a un alto nivel de resistencia mientras que el 40,0% presentaba alguna mutación en la zona promotora del operon *mab*A-*inh*A asociada a bajo nivel de resistencia. Ocho aislados presentaron mutaciones en las dos regiones estudiadas. De los 15 aislados resistentes a **pirazinamida** identificados como *M. tuberculosis*, todos excepto dos tenían alguna mutación en el gen *pnc*A sin que se observe una mutación

predominante. Todos los aislados identificados como *M. bovis* o *M. bovis*-B.C.G tenían la mutación especifica His57Asp (cac/Gac). Se han identificado 12 mutaciones diferentes a lo largo de todo el gen. El 80,0% de los aislados resistentes a **etambutol** presentaban alguna substitución en el codón 306 o 406 en el gen *emb*B. Entre los aislados resistentes a **estreptomicina**, sólo 24,5% presentaban alguna mutación el gen *rps*L en las posiciones asociadas a resistencia siendo las mayoritarias las substituciones Lys43Arg (aag/aGg) y Lys88Arg (aag/aGg) (20,4% y 4,1%, respectivamente) y el 13,0% presentaba alguna mutación asociada a resistencia a estreptomicina en el gen *rrs*. En un aislado se identificó la mutación A1401G responsable también de resistencia a **amikacina, capreomicina y kanamicina**. Todos los aislados resistentes a **fluroquinolonas** tenían mutación en el gen *gyr*A.

Estudio de agrupaciones mediante cgMLST

Durante el periodo 2021-2022 se han secuenciado 677 aislados identificándose 71 agrupamientos diferentes. El 72,9% de ellos son agrupamientos de 2 aislados, el 19,7% son agrupamientos de 3 aislados, 4,2% son agrupamientos de 4 aislados y 1,4% eran agrupamientos de 5 y 7 aislados.

CONCLUSIONES

- Aunque es difícil realizar una estimación precisa debido al carácter voluntario del envío de los aislados resistentes, parece que el porcentaje de formas resistentes se mantiene estable. Los aislados MDR, pre-XDR y XDR se dan en mayor porcentaje en población no autóctona.
- 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.
- Se debe incorporar la epidemiologia molecular en el análisis de agrupamientos que puedan pasar desapercibidos en los estudios clásicos de epidemiologia.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Asamblea Mundial de la Salud, 44. (1991). 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. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Madrid, 2013. Disponible en: https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/PROTOCOLOS/PROTOCOLOS%20EN%20BLOQUE/PROTOCOLOS_RENAVE-ciber.pdf
3. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Dipònible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275469/9789241514842-eng.pdf?ua=1%20

Micobacterias no tuberculosas

Informe elaborado por L. Herrera-León* y Estefania Abascal Saiz

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. 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.

En el presente documento se presentan los datos recogidos en la Unidad de Micobacterias durante los años 2021-2022 como continuación de los datos presentados en el anterior informe en el que se recogían los datos del período 2014-2020.

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.

El objetivo principal del programa de vigilancia de las MNT 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.

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 CC. AA.. 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.

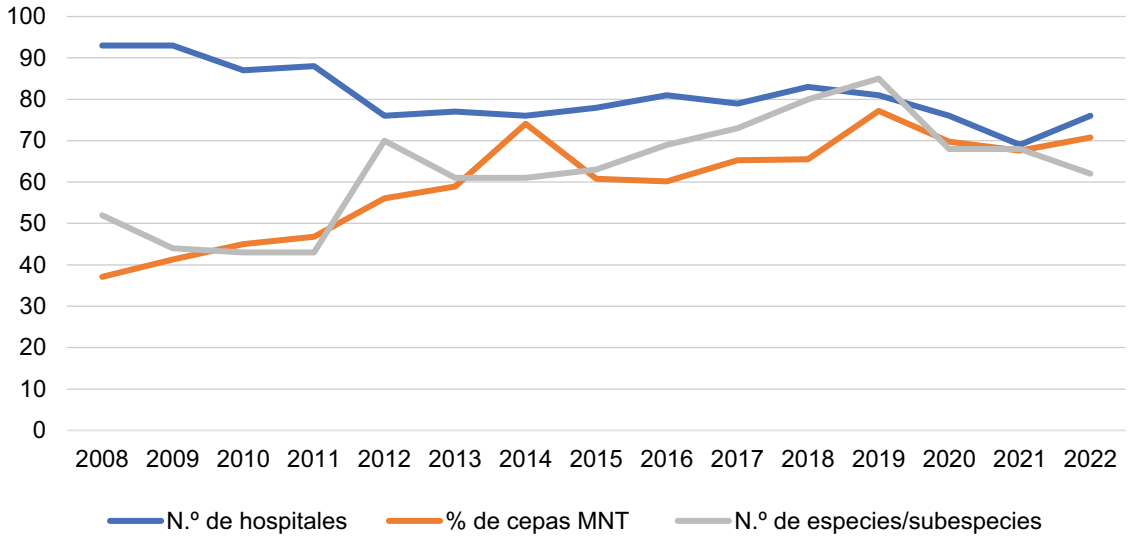
Las muestras que se procesarán son cepas humanas y las cepas ambientales siempre que éstas pudieran estar asociadas a un brote, identificadas previamente como no tuberculosas, teniendo en cuenta que las condiciones del envío cumplan las normas de bioseguridad.

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 272 especies de MNT reconocidas y 24 subespecies. En los últimos años se venía observado un incremento en el número de cepas identificadas como MNT frente al complejo tuberculoso y en el número de especies y subespecies diferentes identificadas en el Laboratorio (Figura 1). Sin embargo, para el periodo 2021-2022 se observa una disminución en el número de especies/subespecies diferentes (68 en el 2021 y 61 en el 2022) a pesar del que, tanto el número de hospitales que utilizan el programa de vigilancia como el porcentaje de aislados MNT con respecto al total

de muestras recibidas en el laboratorio aumentó en el año 2022 con respecto al 2021. En el periodo 2021-2022 se han estudiado un total de 2.215 aislados.

Figura 1. Evolución del número de hospitales, número de cepas y número de especies/subespecies en el periodo 2021-2022. Los datos del 2020 deben tomarse con precaución debido a la situación sanitaria que se produjo como consecuencia de la pandemia por el virus SARS-Cov2 respectivamente.



Se recibieron cepas de 81 hospitales 13 Comunidades Autónomas (CC. AA.) y Ceuta (Tabla 1). MEGALAB remitió 89 aislados sin que se pueda conocer la procedencia de cada uno de ellos.

Tabla 1. Número de aislados por CC. AA.

CC. AA.	2021	2022	Total
Andalucía	20	26	46
Aragón	12	9	21
Canarias	27	46	73
Cantabria	29	35	64
Castilla Leon	127	155	282
Castilla la Mancha	164	137	301
Extremadura	19	6	25
Galicia	0	4	4
Madrid	685	667	1.352
Murcia	12	5	17
Navarra	7	16	23
País Vasco	8	9	17
C. Valenciana	73	75	
Ceuta	1	4	5

Identificación de especies

Se han identificado un total de 85 especies diferentes. Al igual que en el periodo 2014-2020, el complejo MAC (*Mycobacterium avium* complex) continúa siendo el más frecuente (n=940), seguido por *M. lentiflavum* (n=264), *M. gordonae* (n=168) y complejo *Mycobacterium abscessus* (n=139).

En cuanto al tipo de muestra, el 66,4% de los aislados procedían de esputo sin que se especifique, en la mayoría de los casos, si se trata del primer aislamiento o no, lo que impide la correcta valoración del valor clínico del aislamiento y, por tanto, de la necesidad o no de la realización del estudio de sensibilidad.

En las muestras de origen cutáneo, las especies más identificadas fueron *Mycobacterium marinum* y las especies del complejo *M. fortuitum.*

El tratamiento de las MNT, con la excepción de la lepra, está menos estandarizado que el de la tuberculosis, con amplias variaciones entre especies, por lo que es imprescindible la identificación previa del aislado antes de llevar a cabo los estudios de sensibilidad. Para la mayoría de las especies de crecimiento lento la base del tratamiento son la claritromicina, el etambutol y la amikacina, complementadas con otros fármacos como quinolonas, rifamicinas, o linezolid. Con respecto a los aislados

identificados como pertenecientes al complejo MAC (n=640), se realizó estudios de sensibilidad a todos ellos y sólo 6 presentaron resistencia a claritromicina. En todos estos casos se detectó una mutación en el gen *rrl* que asociada a resistencia frente a macrólidos. En el caso de la amikacina, se realizaron 241 estudio de sensibilidad y únicamente 14 de los aislados fueron resistentes. Al igual que en el caso de la claritromicina, los aislados resistentes tenían mutaciones en el gen *rrs* asociadas con resistencia frente a aminoglucósidos.

Las especies de crecimiento rápido son resistentes a los fármacos antituberculosos clásicos y tienen también a la claritromicina como base del tratamiento. Sin embargo, las especies del complejo *M. fortuitum*, pueden tener resistencia inducible frente a claritromicina, así como el 80-85% de los aislamientos de *M. abscessus*. Dentro del complejo *M. fortuitum,* la mayor parte de los aislados identificados como *M. fortuitum* presentaron resistencia inducible frente a claritromicina mientras que en las especies menos comunes como *M. senegalense* o *M. peregrinum* no se presentaba esta resistencia inducible. El complejo *M. abscessus* presenta resistencia frente a un amplio número de fármacos utilizados en el tratamiento por lo que se requiere un estudio mas amplio y personalizado. En nuestra serie de datos, las recidivas por *M. abscessus* son frecuentes y el cambio de régimen terapéutico hace que se solicite el estudio de sensibilidad frente a fármacos para los que no están definidos los puntos de corte ni la correlación de la CMI con la respuesta terapéutica.

Solo se recomienda la realización de pruebas de sensibilidad en los aislados clínicamente significativos para los cuales se haya demostrado una correlación entre los resultados in vitro con los resultados in vivo. El estudio de sensibilidad se realiza siguiendo las indicaciones del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).

Debido a la ausencia de información muchas veces es difícil establecer la necesidad de realización del antibiograma en nuestro laboratorio puesto que desconocemos si se cumplen los criterios clínicos y microbiológicos de enfermedad. Por ejemplo, se sabe que *M. gordonae* es una especie no patógena y, sin embargo, es de las más identificadas en muestras respiratorias se cree que por ser de las especies más prevalentes en el ambiente. Se desconoce la correlación entre los resultados de los estudios de sensibilidad y la evaluación del paciente y a pesar de ello muchas veces se requiere por parte del laboratorio remitente la realización de antibiograma. Esto explica el elevado número de estudios de sensibilidad realizados en el laboratorio. En el año 2021 de un total de 1.091 aislados, se realizó el estudio de sensibilidad a 812 (74,4%) y en el año 2022 de un total de 1.124 se realizó el estudio de sensibilidad a 867 (77,1%).

En el periodo 2021-2022 únicamente se ha realizado el estudio de un posible brote hospitalario causado por *M. fortuitum* que fue descartado mediante el estudio de cgMLST.

CONCLUSIONES

- A pesar de que el número de hospitales que remiten aislados para su identificación y estudio de sensibilidad ha aumentado en los años 2021 y 2022, el número de especies y subespecies identificadas ha disminuido en el 2022.
- 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. abscessus* y las del grupo *M. fortuitum*. Esta distribución se mantiene a lo largo del tiempo (ver informe 2014-2020).
- Se observa un elevado envío de aislamientos previamente no identificados. Actualmente existen métodos comerciales que permiten la identificación de las especies más comunes. La no identificación previa hace que se produzca un retraso en la notificación de los resultados de sensibilidad ya que es primordial la realización de la identificación previa (diferentes antibióticos a testar y diferentes criterios de interpretación).
- Se observa un elevado número de peticiones de antibiograma de forma simultánea a la identificación. Esto hace que la carga de trabajo del laboratorio se vea innecesariamente incrementada ya que en la mayoría de las ocasiones no se debería realizar el estudio de sensibilidad atendiendo a los criterios de las guías clínicas actuales ya sea porque la especie identificada no requiera tratamiento o porque la pauta de tratamiento a instaurar se realice de forma empírica dada la baja correlación entre los estudios de sensibilidad y la respuesta clínica del paciente para determinadas especies y determinados fármacos.
- Se recomienda realizar el estudio de sensibilidad solo en aquellos casos en los que se cumplan los criterios clínicos y microbiológicos de enfermedad y siempre y cuando el paciente no evolucione de forme favorable o se produzca un fracaso terapéutico.
- En el caso de claritromicina y amikacina, fármacos de elección para el tratamiento de micobacterias de crecimiento lento, existen alternativas de estudio molecular que permiten una rápida detección de resistencias.

- El complejo *M. abscessus* presenta una elevada resistencia a los fármacos utilizados en los tratamientos por lo que las combinaciones terapéuticas son más variadas y requieren un estudio de sensibilidad personalizado.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. McGrath EE, Anderson PB. Increased prevalence of nontuberculous mycobacteria infection. Lancet. 2007;370:28.
2. Lee, Y-M; Kim, M-J; Kim,Y-J 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 https://lpsn.dsmz.de/search?word=Mycobacterium (accessed on 25 Octubre 2023).
4. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. Eur Respir J.2020 Jul 7;56(1): 2000535. doi: 10.1183/13993003.00535-2020
5. Consensus management recommendations for less common non-tuberculous mycobacterial pulmonary diseases. Lancet Infect Dis. 2022 Jul;22(7):e178-e190. doi: 10.1016/S1473-3099(21)00586-7
6. M62. Performance Standards for susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardia spp, and other aerobic Actinomycetes. Clinical and Laboratory Standards Institute. 1st Edition. 2018.

Gripe

Informe elaborado por Inmaculada Casas*, Francisco Pozo*, Sonia Vázquez-Morón*, María de la Montaña Iglesias-Caballero, Mar Molinero, Sara Camarero, Noelia Reyes, Silvia Moreno, M.ª Jose Casas, Vanessa Montero

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

La emergencia de COVID-19 durante febrero y marzo de 2020 produjo una distorsión de estos sistemas de vigilancia, tanto en la vigilancia centinela en Atención Primaria como en la vigilancia en los hospitales. Se afectó profundamente su funcionamiento obligando a replantear y adaptar la vigilancia de la gripe. El Programa de Vigilancia ha sufrido tras la pandemia de SARS-CoV-2 una profunda transformación. Actualmente se ha pasado desde «la Vigilancia de la infección producida por el virus de la gripe» en el que participaban el Sistema de Vigilancia de Gripe en España (SVGE) que tomaban 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, a la actual «Estrategia de Vigilancia Centinela de infección respiratoria aguda en atención primaria (IRA) y hospitales (IRAG)».

Basándose en el ScVGE ya explicado en la anterior edición, los sistemas de vigilancia centinela se han replanteado tanto en atención primaria como en los hospitales con el objetivo de vigilar gripe, COVID-19 y VRS conjuntamente empezando en la temporada 2021-22 (1,2) y con idea de consolidarse definitivamente en la temporada 2023-2024. Estos sistemas deben permanecer en el tiempo como sistemas de *Vigilancia centinela de IRA en Atención Primaria* (IRAs) y *Vigilancia centinela de Infección respiratoria aguda grave* (IRAG) en hospitales, y con ellos se podrá vigilar cualquier otro virus respiratorio o posible agente etiológico viral respiratorio emergente en el futuro. La transición entre los sistemas de vigilancia tradicionales de gripe y la implementación de los nuevos sistemas de vigilancia supuso, y supone, un reto para los sistemas asistenciales en atención primaria y hospitalarios de

las comunidades autónomas (CC. AA.). Desde 2020 esta vigilancia ha tenido que convivir con la vigilancia universal de COVID-19. A día de hoy las CC. AA. se han ido incorporando a estas estrategias de vigilancia centinela de IRAs e IRAG progresivamente, y actualmente se sigue avanzando en su consolidación.

La justificación, objetivos y actividades a realizar como NIC de OMS (TOR) dentro del Programa de Vigilancia de Gripe ya quedaron reflejados en la anterior versión, así como el tipo de muestra y las condiciones de su envío. El diseño del programa a partir de 2021 cambia en cuanto a los sujetos de estudio que son: 1. Caso seleccionado con los criterios de la vigilancia centinela que presente un cuadro de IRA que acuda a médicos centinela en atención primaria o a los hospitales seleccionados como centinelas; 2. Casos en brotes epidémicos; 3. Casos de pacientes vulnerables con IRA/IRAG; 4. Casos hospitalizados positivos que requieran un estudio virológico. En cuanto a las técnicas virológicas en cartera de servicios en la unidad de Gripe y Virus Respiratorios se ha incluido la secuenciación NGS de genomas completos de Gripe A, B y C.

RESULTADOS 2021-2022 Y DISCUSIÓN

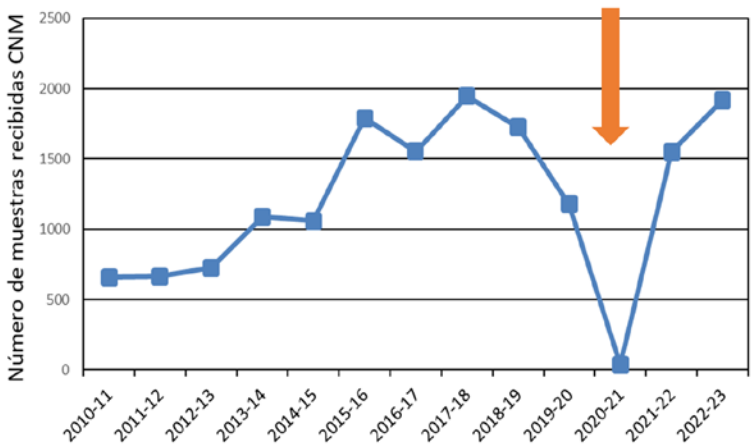
El sistema ofrece información centinela de IRAs, casos de gripe en la comunidad que acuden a las consultas de atención primaria centinelas y en la actualidad de IRAG, casos de gripe hospitalizados en hospitales centinela. Además, se recoge la información no centinela que procede de otras fuentes, hospitales no centinela, laboratorios, centros institucionales y ayuda al conocimiento de forma más completa de la circulación. La coordinación del sistema se lleva a cabo de manera conjunta entre CNE y el CNM. Está integrado en la European Influenza Surveillance Network (EISN-ECDC). La información se almacena en la página web del ISCIII (3) que recoge los informes semanales y los documentos de inicio y cierre de temporada.

La disminución del número de virus y muestras respiratorias estudiadas en la temporada 2019-20 se debió a la instauración de medidas para evitar la propagación de SARS-CoV-2 en España que desplazó completamente la circulación de otros virus respiratorios de circulación epidémica. El número de muestras caracterizadas aumentó en la temporada 2021-22 y en la última 2022-23 debido a la implementación cada vez más consolidada de la vigilancia de IRAs e IRAG (Tabla 1 y Figura 1).

Tabla 1. Muestras recibidas en el Programa de Vigilancia de la gripe desde el 1/09/2010 hasta 21/09/2023. Se destaca la distorsión asociada a la pandemia por SARS-CoV-2.

	Programa de Vigilancia Gripe
2010-11	659
2011-12	665
2012-13	727
2013-14	1088
2014-15	1059
2015-16	1791
2016-17	1555
2017-18	1948
2018-19	1725
2019-20	1177
2020-21	38
2021-22	1551
2022-23	1919

Figura 1. Muestras recibidas en el Programa de Vigilancia de la gripe desde el 1/09/2010 hasta 21/09/2023. Se destaca la distorsión asociada a la pandemia por SARS-CoV-2.



Vigilancia de la gripe tras la pandemia de COVID-19

Temporada 2020-21 (semana 40/2020 hasta 39/2021) (4)

Fue la primera en la que se puso en marcha la vigilancia centinela de IRAs e IRAG. El objetivo se centró en la posible circulación simultánea de gripe junto con el SARS-CoV-2, vigilado mediante vigilancia universal de COVID-19.

- **Vigilancia centinela de gripe:** IRAs: Se notificaron 20.232 casos en atención primaria, con 4.814 muestras, de ellas 2.727 fueron positivas a SARS-CoV-2, 2 fueron positivas a gripe. En las IRAG: Se notificaron 31.321 casos hospitalizados, con 6.497 muestras, de ellas 3.813 detecciones positivas de SARS-CoV-2 y una positiva a gripe A no subtipado.
- **Vigilancia no centinela de gripe:** se notificaron 35 virus de la gripe, 23 de tipo A: 5 A(H3N2), 3 A(H1N1)pdm09 y 15 A no subtipados, 11 virus tipo B y un virus tipo C.

Temporada 2021-22 (semana 40/2021 hasta 39/2022) (5)

Segunda temporada con el sistema SiVIRA, y en la que se fueron incorporando más CC. AA.. El objetivo desde SiVIRA se centró en conocer la situación epidemiológica tan especial debido a posible co-circulación de SARS-CoV-2, gripe y además Virus Respiratorio Sincitial (VRS).

- **Vigilancia centinela de gripe:** la circulación del virus de la gripe tuvo dos ondas epidémicas, la segunda más intensa que la primera y su presentación fue más tardía y duradera que en otras temporadas. IRAs: Se tomaron 18.710 muestras, de ellas 1.952 fueron positivas a gripe. En las IRAG: Se tomaron 5.468 muestras de pacientes hospitalizados, de ellas 2.807 detecciones positivas de SARS-CoV-2, 224 positivas a gripe y 392 positivas a VRS.
- **Vigilancia no centinela de gripe:** se notificaron 9.353 detecciones de virus de la gripe, de las cuales, 9.263 fueron tipo A, de las cuales 7.010 A no se subtiparon, 2.244 fueron A(H3) y 9 A(H1)pdm09, 76 fueron de tipo B y 14 de tipo C.

En la unidad de Gripe y Virus Respiratorios del CNM se comenzó a secuenciar los virus gripales mediante un sistema de secuenciación NGS adaptado al laboratorio para gripe A y para gripe B. Cuando la carga viral fue baja se secuenciaron los segmentos HA y NA según requerimientos epidemiológicos.

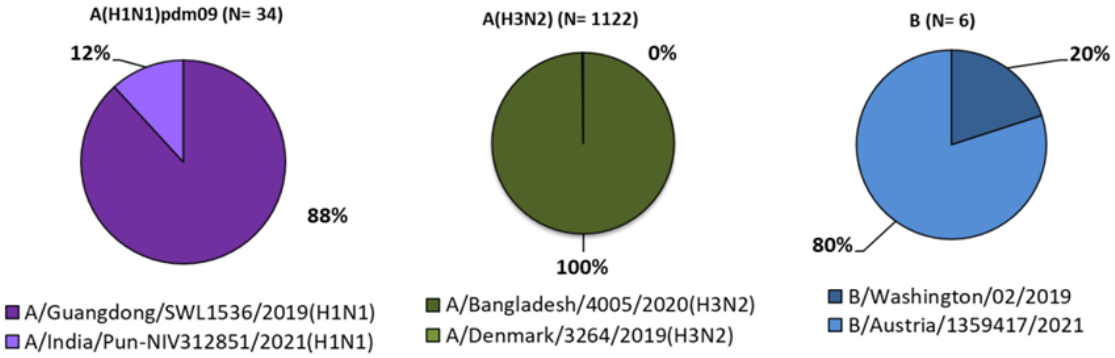
Se caracterizaron **1.266 virus A(H3N2)**, la mayoría del grupo 3C.2a1b.2a.2 (grupo Bangladesh), definido por Y159N, K160I, L164Q, R186D y D190N en

el gen HA, 2 del grupo 3C.2a1b.1A (grupo A/Denmark/3264/2019) definido por T135K, A138S y I192F, entre otras. Estos grupos son antigénicamente diferentes al virus H3 vacunal de la temporada 2021-22 A/Cambodia/e0826360/2020. Además, se caracterizaron **43 virus A(H1N1)pdm**, 30 de ellos pertenecientes al grupo 6B.1A.5a.1 (A/GuangdongMaonan/SWL1536/2019), definido por N130K, K156N, I161L, D187A, Q189E y A250V, 13 pertenecen al grupo 6B.1A.5a.2 (vacunal A/Victoria/2570/2019) presentando mutaciones adicionales que los hacen antigénicamente diferentes (Figura 2).

Los **6 virus B** son todos del linaje Victoria, 2 del grupo del virus vacunal B/Washington/02/2019, y los 4 restantes del grupo representado por B/Austria1359417/2021, definido por A127T, R133G, P144L, N150K, G184E, S197D, K203R y R279K (Figura 2).

El análisis de la susceptibilidad a antivirales en **616 virus AH3**, **26 AH1** y **3 virus B** no ha evidenciado mutaciones asociadas con resistencia a oseltamivir, zanamivir o baloxavir. Sin embargo, se ha detectado en todos los virus AH3 y AH1 la presencia de S31N o S31D en el gen de la matriz, asociadas con resistencia a los adamantanos.

Figura 2. Caracterización de la gripe en la temporada 2021-22. Sistema centinela y no centinela.



CONCLUSIONES

- 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 las características biológicas de virus gripales circulantes.
- La emergencia de COVID-19 durante febrero/marzo de 2020 produjo una distorsión del sistema de vigilancia de gripe en las redes de vigilancia centinela

tanto en atención primaria como en hospitales, afectando su funcionamiento en todas las CC. AA. Esta distorsión continuó en las temporadas 2020-21, 2021-22 y la vigilancia, no del todo implementada, se va consolidando en la temporada 2022/23.

- Siguiendo las recomendaciones del ECDC y OMS se propuso establecer nuevos sistemas de vigilancia centinela en atención primaria (IRA) y hospitalaria (IRAG). El objetivo es vigilar la infección respiratoria aguda asociada a la co-circulación de gripe, SARS-CoV-2 y VRS.
- La transición e implementación entre los sistemas de vigilancia pre y post-pandémicos surgió como necesidad ante la nueva situación epidemiológica de la circulación de los virus respiratorios a nivel mundial. Por ello, durante la pandemia de COVID-19, esta transición supuso una presión adicional en atención primaria y hospitales, y en el personal implicado en la vigilancia epidemiológica y virológica en las CC. AA.
- En la actualidad, la vigilancia IRA e IRAG se está implementando con éxito y a finales del 2023 todas las CC. AA. están implicadas en este nuevo sistema, reorganizando los servicios de salud pública y los laboratorios que trabajan en red.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. End-to-end integration of SARS-CoV-2 and influenza sentinel surveillance: revised interim guidance. 31 January 2022. COVID-19: Surveillance, case investigation and epidemiological protocols. https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Integrated_sentinel_surveillance-2022.1
2. Operational considerations for respiratory virus surveillance in Europe, 18 July 2022. https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/operational-considerations-respiratory-virus-surveillance-europe
3. SVcGE. Sistema de Vigilancia de la Gripe y otros virus respiratorios en España. https://vgripe.isciii.es/inicio.do
4. SiVIRA. Informe de Vigilancia de la Infección Respiratoria Aguda en España. Temporada 2020-2021 (Desde la semana 40/2020 hasta la semana 39/2021). https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/GRIPE/Informes_Anuales_IRAs_IRAG/Informe_Vigilancia_IRA_4020-3921_16nov2021.pdf

5. SiVIRA. Informe SiVIRA de Vigilancia de gripe, COVID-19 y VRS España, temporada 2021-2022 (Desde la semana 40/2021 hasta la semana 39/2022) https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/GRIPE/INFORMES%20ANUALES/Informe%20SiVIRA%20de%20Vigilancia%20de%20gripe%2c%20COVID-19%20y%20VRS_temporada%202021-22_v14112022.pdf

SARS-CoV-2

Informe elaborado por Inmaculada Casas*, Francisco Pozo*, Sonia Vázquez-Morón*, Maria Iglesias-Caballero, Vicente Mas, Mar Molinero, Sara Camarero, Noelia Reyes, Silvia Moreno, M.ª José Casas, Vanessa Montero, Olga Cano, Monica Vázquez, Teresa 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

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 fue 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 (1). Existe preocupación acerca de la aparición de una variante que escape al control viral de los anticuerpos neutralizantes generados tras una infección previa o tras la vacunación, lo que podría condicionar casos de reinfección y una pérdida de la eficacia vacunal. El Programa de vigilancia SARS-CoV-2, se basa en el estudio las variantes de preocupación, interés y bajo monitorización VOC, VOI y VUM, por sus siglas en inglés *Variant of Concern, Variant of Interest y Variant under monitoring*, y ya fue descrito en la anterior edición.

La vigilancia de las variantes se ha realizado a través de la integración de información genómica en la base de datos nacional de casos individualizados SiViEs y ha sido imprescindible para el seguimiento de la situación epidemiológica y la toma de decisiones de Salud Pública (2). Actualmente, siguiendo las recomendaciones internacionales del Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) los sistemas de vigilancia se han replanteado y se ha utilizado el marco del Sistema de Vigilancia de la Gripe para vigilar conjuntamente SARS-CoV-2, gripe y otros virus respiratorios, empezando en la temporada 2021-22 (3,4).

Estos sistemas deben permanecer en el tiempo como sistemas de vigilancia centinela en atención primaria (IRAs) y vigilancia centinela de infección respiratoria

aguda grave (IRAG) en hospitales, con los que se podrá vigilar cualquier otro virus respiratorio y posible agente etiológico viral respiratorio emergente en el futuro. Desde 2020, la vigilancia conjunta ha tenido que convivir con la vigilancia universal de SARS-CoV-2. A día de hoy las CC. AA. se han ido incorporando a esta nueva estrategia de vigilancia centinela de IRAs e IRAG a través del sistema SiVIRA y actualmente se sigue avanzando en su consolidación.

La justificación, objetivos y actividades a realizar dentro del Programa de Vigilancia de SARS-CoV-2 ya quedaron reflejados en la anterior versión, así como el tipo de muestra y las condiciones de su envío. El diseño del programa a partir de 2021-22 cambia en cuanto a los sujetos de estudio que son 1. Caso seleccionado con los criterios de la vigilancia centinela que presente un cuadro de IRA que acuda a médicos centinela en atención primaria o a los hospitales seleccionados como centinelas; 2. Casos en brotes epidémicos; 3. Casos de pacientes vulnerables con IRA/IRAG; 4. Casos hospitalizados positivos que requieran un estudio virológico.

En España la unidad de Gripe y Virus Respiratorios del CNM coordina las actividades de RELECOV desde su creación mediante la ejecución de dos proyectos europeos:

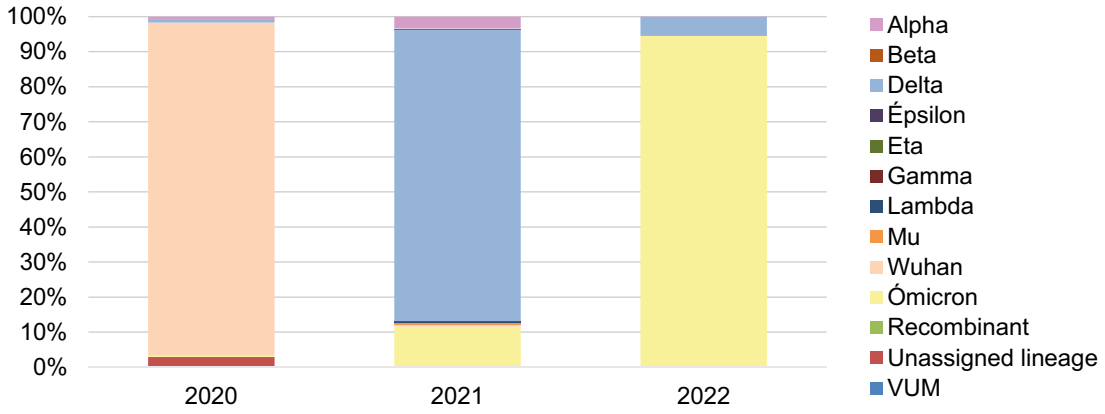
1. HERA-Incubator Grant/2021/PHF/23776/RELECOV, ***Enhancing Whole Genome Sequencing (WGS) national infrastructures and capacities to respond to the COVID-19 pandemic in Spain***, con un presupuesto de 5.484.986 € y participación de las 17 CC. AA., las 2 Ciudades Autónomas y un total de 39 laboratorios, con un periodo de ejecución de 13 meses (01/09/2021 hasta 30/09/2022).
2. EU4Health Programme EU4H/2023/101113109/RELECOV 2.0, ***Consolidation of WGS for SARS-CoV-2 in Spain towards sustainable use and integration of enhanced infrastructure and capacities in the RELECOV network,*** con un presupuesto de 2.200.421,27 € y participación de las 17 CC. AA., las 2 Ciudades Autónomas y un total de 48 laboratorios, con un periodo de ejecución de 24 meses (01/07/2023 hasta 30/06/2025).

RESULTADOS 2021-2022 Y DISCUSIÓN

Desde 2021 a 2022 la vigilancia genómica demostró los cambios muy relevantes tanto en la epidemiología de la pandemia como en la estrategia de vigilancia en nuestro país. El dominio de la variante Ómicron fue absoluto y solamente se secuenciaron algunos virus de la variante Delta en las primeras semanas del año. En marzo de 2022, tras el mayor pico de incidencia registrado de toda pandemia,

se puso en marcha una nueva estrategia que centró la realización de pruebas diagnósticas a los grupos más vulnerables incluyendo pacientes con enfermedad grave. Estos cambios se reflejaron en la secuenciación. Durante 2022 la red RELECOV continuó con las actividades de vigilancia genómica de SARS-CoV-2 incorporando los datos necesarios. Las principales actividades desempeñadas fueron:

Figura 1. Porcentaje por año de secuencias de diferentes variantes en GISAID depositadas por miembros de RELECOV 05.09.2021-08.03.2022.



Seguimiento de las secuencias depositadas en GISAID por la red

Desde 06/12/2021 a 08/03/2022 se recuperaron las secuencias disponibles en GISAID depositadas por los miembros de la red RELECOV (Figura 1).

Un total de 28.143 secuencias virales fueron depositadas por 30 laboratorios miembros de la red, correspondiendo a 172 linajes diferentes: 72 Alfa, 2 Beta, 12.733 Delta, 4 Gamma, 15 Mu, 15.251 Ómicron, 1 recombinante (XG), 49 a otros linajes (NA) y 16 con linaje no asignado.

Los resultados obtenidos permitieron monitorizar la co-circulación de las variantes Ómicron y Delta, así como la rápida propagación de la variante Ómicron en los 2 primeros meses del año. Desde la semana 40/2022 hasta agosto 2023 el número total virus secuenciados fue 27.003 con asignación a 614 linajes de Ómicron diferentes.

Seguimiento de mutaciones de la variante Ómicron

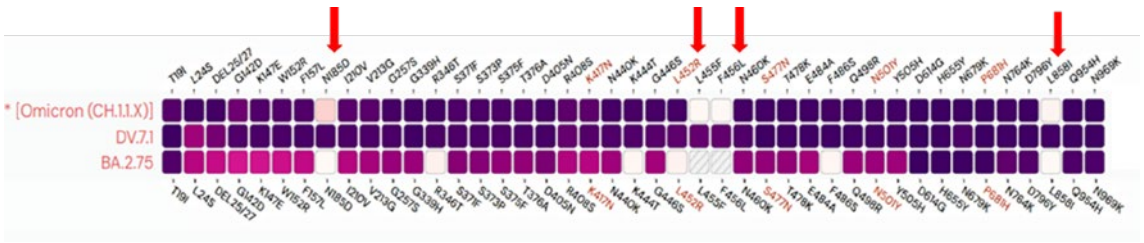
La red incorporó el seguimiento de las mutaciones definitorias de linajes detectadas a nivel mundial para la variante Delta en el 2021 que continuó durante el

2022 y además incorporó las mutaciones definitorias de los linajes de la variante Ómicron desde su inicio de circulación.

Hasta octubre 2022 se incluyeron un total de 205 linajes y sublinajes mostrando un total de 343 mutaciones, siendo las más frecuentes: ORF1a (P3395H y T3255I); ORF1b (P314L e I1566V); S (G142D, G339D, S373P, S375F, S447N, T478K, E484A, Y505H, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, Q954H y N969), E (T19I); M (Q19E y A63T); ORF8 (S84L); y N (P13L, R203K y G204R).

Solamente las mutaciones en ORF1a (T3255I y P3395H); S (D614G, H655Y, N679K, D796Y, Q954H y N969) y M (A63T) se presentaban en todos los linajes y sublinajes de Ómicron concluyendo que 27 estaban presentes en más del 95% de los linajes/sublinajes de Ómicron y solo 9 en todos ellos localizados la mayoría en el gen S (Figura 2).

Figura 2. Mapa de mutaciones de diferentes linajes de Omicron.



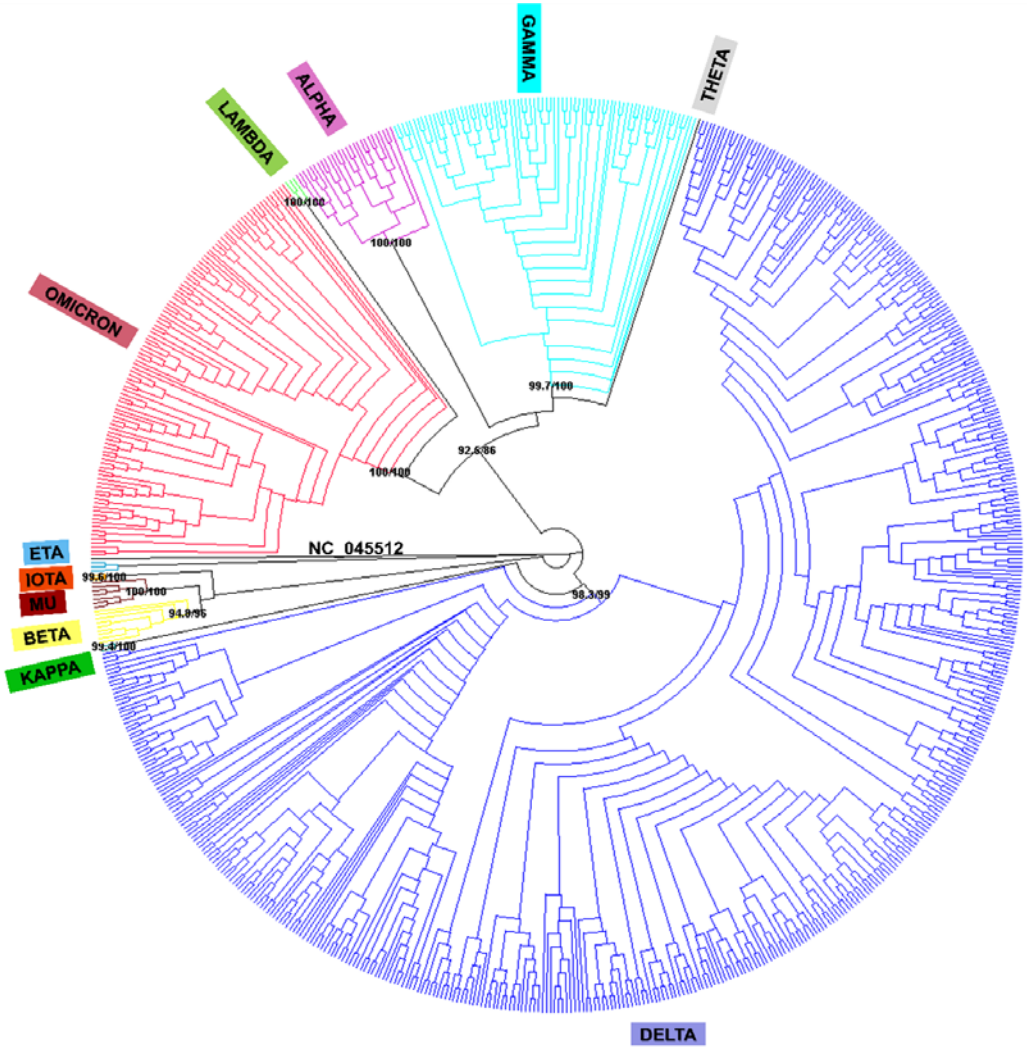
Evaluación de los resultados del control de calidad (QCA) de secuenciación SARS-CoV-2 organizado por el CNM

Desde el inicio de 2022 se analizaron los resultados del 1er QCA de RELECOV para la evaluación de su actividad. En total, 37 de los 38 participantes de RELECOV (97,4%) informaron sus resultados con una tasa de éxito en asignación completa del 94,59% para la identificación de variante y un 64,86% para el linaje. El análisis desagregado por muestra QCA mostró muy buenos resultados tanto para la asignación de la variante como para el linaje, con un 95 % y 85 %, respectivamente. Estos resultados resaltan la complejidad inherente de comparar las asignaciones de linaje de varios laboratorios que utilizan diferentes tecnologías de secuenciación y análisis bioinformáticos para generar las secuencias consenso de SARS-CoV-2.

Implementación de herramientas para el análisis filogenético de SARS-CoV-2

La matriz de referencia de secuencias de SARS-CoV-2 ha sido completada incluyendo los linajes de Ómicron con un total de 713 secuencias a nivel mundial con secuencias de Alpha, Beta, Gamma, Delta, Eta, Iota, Kappa, Lambda, Mu y Theta y Ómicron (Figura 3).

Figura 3. Cladograma del gen S de 713 secuencias de referencia que representan a 76 países y territorios diferentes recuperadas de GISAID y NCBI NC_045512.2 SARS-CoV-2.



Los análisis filogenéticos se realizaron para establecer una matriz de referencia y un árbol que contenga secuencias mundiales incluyendo diferentes linajes y variantes como herramienta para fines de vigilancia. El uso de herramientas de análisis filogenético proporciona rápidamente conocimiento sobre la evolución molecular

reflejada en los *clusters* que involucran cambios moleculares y que podrían estar asociados con características biológicas relevantes para la vigilancia viral en el sistema de salud pública (5).

CONCLUSIONES

- La detección precoz de la circulación de las variantes, linajes/sublinajes proporciona una información esencial y crítica para la vigilancia de SARS-CoV-2 a nivel nacional, europeo y mundial. Esta información se debe integrar en los sistemas de Vigilancia.
- La mejora de los laboratorios RELECOV y la sostenibilidad de su actividad en el tiempo es prioritario para la Comisión Europea, ECDC y OMS y se podrá utilizar para el control de enfermedades tras-fronterizas emergentes. A nivel nacional es esencial que se mantenga RELECOV en el futuro.
- El conocimiento genómico proporciona la base para una correcta evaluación del impacto de las variantes a nivel de su transmisibilidad, la asociación con la gravedad de la enfermedad y los posibles escapes a la inmunidad proporcionada por las vacunas.
- Es básico evaluar desde el punto de vista virológico la causa de cualquier variación en los porcentajes de cobertura vacunal/dosis de refuerzo en poblaciones diana con los beneficios que se adquieren desde el punto de vista de la protección a la enfermedad grave.
- La vigilancia de las variantes a través de la integración de información genómica en la base de datos de casos con datos individualizados primero en SiViEs y actualmente en SiVIRA ha sido importante para el seguimiento de la situación epidemiológica del SARS-CoV-2.
- Los linajes dominantes de Ómicron que se van sucediendo han tenido repercusión en la incidencia, originando nuevas ondas epidémicas de magnitud mucho menor y con una gravedad similar o menor que la de la primera onda de Ómicron de 2022.
- En los años 2022 y 2023, no se han detectado nuevas VOC diferentes a Ómicron aunque la enorme diversidad de linajes de Ómicron detectados han generado nuevas VOIs y VUMs que están en seguimiento en la actualidad.
- Se debe mantener el aislamiento en cultivo celular de los principales virus que se van imponiendo en el tiempo con el objetivo de evaluar las características virales que pudieran tener relevancia.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. WHO World Health Organization- Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Situation Report-83 2020. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200412-sitrep-83-covid-19.pdf
2. Informes anuales de la red de laboratorios de secuenciación de SARS-CoV-2 (RELECOV) https://www.sanidad.gob.es/areas/alertasEmergenciasSanitarias/alertasActuales/nCov/variantesSARS-COV-2/informeRELECOV.htm
3. End-to-end integration of SARS-CoV-2 and influenza sentinel surveillance: revised interim guidance. 31 January 2022. COVID-19: Surveillance, case investigation and epidemiological protocols. https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Integrated_sentinel_surveillance-2022.1
4. Operational considerations for respiratory virus surveillance in Europe, 18 July 2022. https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/operational-considerations-respiratory-virus-surveillance-europe
5. Vázquez-Morón S, Iglesias-Caballero M, Lepe JA, Garcia F, Melón S, Marimon JM, García de Viedma D, Folgueira MD, Galán JC, López-Causapé C, Benito-Ruesca R, Alcoba-Florez J, Gonzalez Candelas F, Toro M, Fajardo M, Ezpeleta C, Lázaro F, Pérez Castro S, Cuesta I, Zaballos A, Pozo F, Casas I, On Behalf Of Relecov Network Members. Enhancing SARS-CoV-2 Surveillance through Regular Genomic Sequencing in Spain: The RELECOV Network. Int J Mol Sci. 2023 May 10;24(10):8573. https://doi.org/10.3390/ijms24108573

Enterovirus y Parálisis Flácida en menores de 15 años

Informe elaborado por María Cabrerizo[1*], M.ª Dolores Fernández-García[1*], Nerea García-Ibáñez[1], Yolanda Lao-Ramírez[1] y Red Nacional de Laboratorios para la Vigilancia de PFA y Vigilancia de Enterovirus[#]

[1] Laboratorio de Referencia e Investigación en Enfermedades Víricas Inmunoprevenibles, Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. WHO-Euro Polio Lab Network;

* CIBER de Epidemiología y Salud Pública. CIBERESP.

INTRODUCCIÓN

El **sistema de vigilancia de la poliomielitis** en todo el mundo se basa en la Vigilancia de la Parálisis Flácida Aguda (PFA) en niños, pero en la actualidad y debido a la proximidad de la erradicación, la OMS recomienda complementarla con otros sistemas como es la vigilancia ambiental (en aguas residuales) y la vigilancia de enterovirus (EV) en muestras clínicas de pacientes con síndromes neurológicos y respiratorios principalmente (1).

En España, la vigilancia de polio se realiza con la notificación obligatoria de los casos de PFA en un menor de 15 años o cualquier sospecha de poliomielitis, que desencadena un proceso de investigación epidemiológica, clínica y de laboratorio con los objetivos de 1) descartar o confirmar la presencia de poliovirus (PV) y, si procede, 2) caracterizar, clasificar el/los PV (wild-type-WT, vacunal o derivado de vacuna-PVDV) y determinar su procedencia, y 3) activar una respuesta de salud pública con las medidas de intervención adecuadas para evitar la transmisión (2).

En el anterior informe (3) se describe con mayor profundidad en que consiste el Programa de Vigilancia de Enterovirus y Parálisis Flácida en menores de 15 años del CNM y los resultados obtenidos hasta 2020. Brevemente, La investigación microbiológica de todos los casos de PFA o sospechosos de poliomielitis (que incluyen personas sin parálisis o con un trastorno de inmunodeficiencia primaria que pueda estar excretando PV) debe ser realizada por uno de los tres laboratorios que forman actualmente la red de Vigilancia de PFA (H. Virgen de las Nieves para Andalucía, H. Santa Creu i San Pau para Cataluña, y Laboratorio de Enterovirus y Gastroen-

teritis Víricas del CNM, acreditado como Laboratorio Nacional de Polio (LNP) por la OMS, para el resto de las CC. AA.). Se deben enviar dos muestras de heces para analizar la presencia de PV utilizando métodos de cultivo viral en células RD y L20B, según el protocolo recomendado por la OMS. La respuesta y resultado de laboratorio debe estar disponible antes de 14 días. En el caso de positividad para PV (aislamiento en células L20B), en el LNP se lleva a cabo la caracterización intratípica (ITD) del/los PV detectados y, si se tratara de un WT o PVDV, la secuenciación de la región VP1 completa.

Con respecto la Vigilancia de Enterovirus, en España se realiza desde 1998 y es voluntaria, al igual que en la mayoría de países europeos. Su objetivo es caracterizar los EV que se han aislado en células RD o que se han detectado directamente en muestras clínicas mediante métodos moleculares con la finalidad de demostrar la ausencia de PV circulantes y, simultáneamente, tener información epidemiológica de las infecciones por EV no-polio en España. El LNP recibe muestras EV-positivas (muestra respiratoria, fecal, LCR, sangre, suero, exudado vesicular/conjuntival, biopsia) procedentes de diferentes hospitales del Sistema Nacional de Salud que realizan la detección de EV como parte del diagnóstico de rutina. Señalar que, aunque el envío es voluntario, algunos de los laboratorios colaboran de manera estable proporcionando muestras y datos clínicos y epidemiológicos. Los principales cuadros clínicos que se incluyen son: meningitis, encefalitis y otras patologías neurológicas, infecciones respiratorias, enfermedad mano-pie-boca (EMPB) u otro tipo de exantemas inespecíficos, miocarditis, fiebre sin foco o sepsis neonatal. Este programa también admite el envío de las muestras parechovirus (HPeV)-positivas para genotipar.

RESULTADOS 2021-2022 Y DISCUSIÓN

Durante 2021 y 2022, en España se notificaron 76 casos de PFA en <15 años, pero solo se estudiaron adecuadamente (recogida y envío a uno de los 3 laboratorios de polio de una o dos muestras de heces dentro de los primeros 14 días tras la aparición de los síntomas) 59 de los casos (23 en 2021 y 36 en 2022), lo que supone una tasa de notificación de 0,5 y 0,7, respectivamente. En total, se analizaron 103 muestras de heces procedentes de los 59 casos y otras 50 tomadas de 25 contactos. Sólo en un caso de PFA se detectó PV. En 17 muestras (de casos y contactos) se detectó un EV no-polio, lo que supone un de 11% de prevalencia.

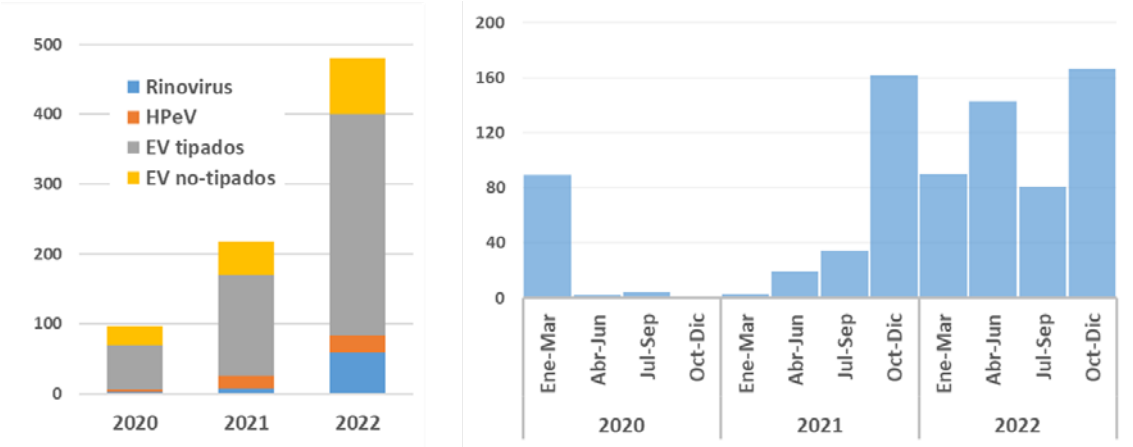
El caso positivo fue un caso importado de PV detectado en un menor procedente de Senegal que había ingresado en un hospital de Murcia en agosto de 2021 para recuperarse de una parálisis y que posteriormente estuvo de acogida familiar. El caso

fue notificado y una muestra de heces fue estudiada en el LNP donde se detectó un PVDV tipo 2, caracterizándose como una cepa cercana a las que estaban circulando en Senegal ese mismo año causando diversos brotes. Inmediatamente después de la detección, se activó el protocolo de «Respuesta ante la detección de poliovirus en España» (2) poniéndose en marcha las medidas de salud pública correspondientes. También se analizaron muestras de los contactos más cercanos al caso (n=25) que descartaron la trasmisión y, por tanto, la circulación de dicho PVDV. Toda la información sobre el caso y las actuaciones realizadas están publicadas (4,5).

Con respecto a la Vigilancia de EV no-polio, durante 2021 se recibieron en el CNM 199 muestras EV-positivas para genotipar y 18 en las que se había detectado un HPeV. En 2022, fueron 456 EV-positivas y 24 HPeV (Figura 1A). En 2021, la mayoría de las infecciones por EV (74%) se produjeron en el último trimestre del año, mientras que durante 2022 ya se observa una circulación de EV más acorde con lo que había ocurrido antes de la pandemia Covid-19, con una mayor incidencia de casos en primavera y otro pico en otoño, si bien éste fue notablemente mayor que en las series anteriores (Figura 1B).

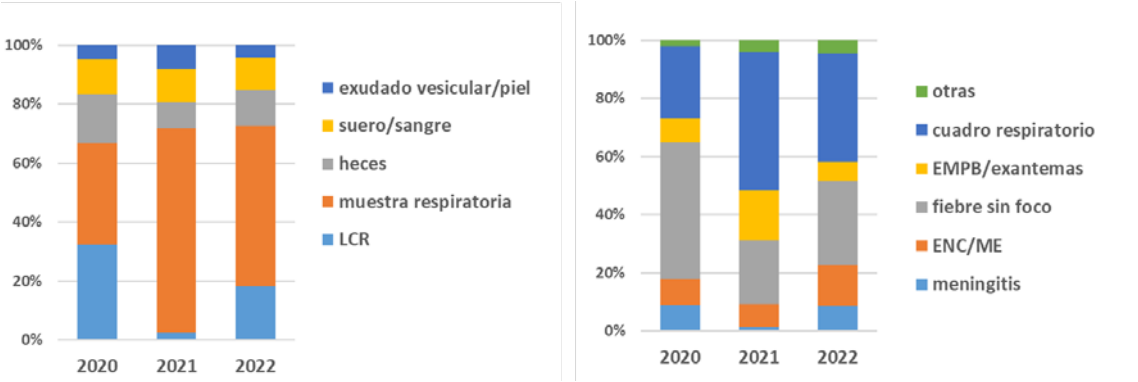
Ente el 75 y el 80% de los EV pudieron ser genotipados (144 en 2021 y 317 en 2022) mientras que en todos los HPeV se identificó el tipo específico. Además, un 4% y un 12% de los EV recibidos en 2021 y 2022 respectivamente, no fueron realmente identificados como EV sino como rinovirus (Figura 1A).

Figura 1.A) Evolución en los últimos 3 años (2020-2022) del número de muestras clínicas positivas para EV y HPeV recibidas en el CNM para la vigilancia microbiológica. B) Distribución de las infecciones por EV y HPeV detectadas cada año trimestralmente.



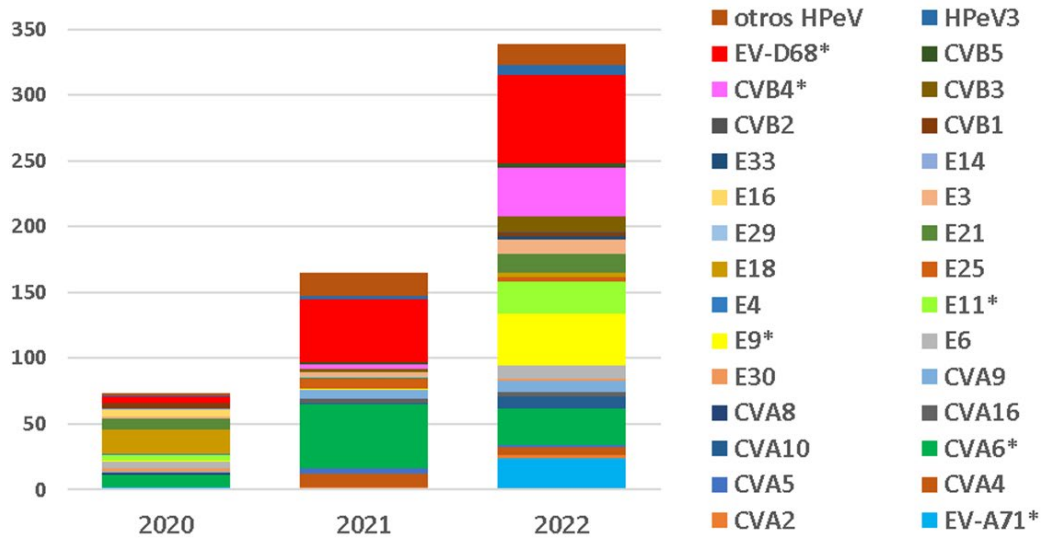
El tipo de muestra recibido con mayor frecuencia fue la respiratoria (fundamentalmente exudados o frotis faríngeos/nasofaríngeos), seguida del LCR (Figura 2A). Correlacionado con el tipo de muestra, los principales cuadros clínicos asociados a las infecciones por EV fueron respiratorios y neurológicos (Figura 2B).

Figura 2. Evolución en los últimos 3 años (2020-2022) de A) los tipos de muestras recibidas en el CNM para la vigilancia microbiológica y B) del tipo de patología asociada a la infección por EV. EMPB, enfermedad mano-pie-boca; ENC/ME, encefalitis/meningoencefalitis.



Con respecto a los genotipos de EV, se identificaron 28 tipos diferentes (Figura 3). Los más frecuentes en 2021 fueron coxsackievirus (CV)A6 (34%) y EV-D68 (33%), seguidos de lejos por CVA4 (7%), CVA9 y echovirus (E)25 (5% cada uno). En 2022, el tipo de EV más prevalente fue de nuevo EV-D68 (21%), seguido de E9 (13%), CVB4 (12%), CVA6 (9%), E11 y EV-A71 (8% cada uno).

Figura 3. Tipos de EV y HPeV identificados en el periodo de estudio 2020-2022. Los más frecuentes están indicados por*.



CONCLUSIONES

El sistema de Vigilancia de PFA en España está consolidado y ha seguido funcionado durante y después de la pandemia y, aunque anualmente no se declaran todos los casos que se producen, se estudian adecuadamente más del 80% de los notificados, lo cual permite descartar la circulación de PV en nuestro territorio. Así, se pudo identificar un caso importado de parálisis por PV que no había sido detectado previamente en su país de origen. La respuesta tanto a nivel microbiológico como de salud pública fue rápida y coordinada de manera que se pudo garantizar que no hubo transmisión ni circulación endémica.

Además, la vigilancia microbiológica de las infecciones por EV no-polio ha demostrado que fueron casi indetectables durante el periodo de confinamiento por la pandemia pero que, tras el relajamiento de las medidas de contención, estos virus han vuelto a circular, aunque en 2022 todavía no se ha alcanzado el número de muestras EV-positivas que se recibían en el CNM antes de 2020. La remergencia de las infecciones por EV se produjo en otoño de 2021 con la aparición de nuevas cepas de EV-D68, evento descrito también en otros países europeos (6). Otro EV que emergió con fuerza tras la pandemia CVA6, asociado a casos y brotes de EMPB en niños pequeños. En 2022, ya se observa el patrón de circulación más característico de los EV en países templados, con picos de incidencia en primavera, y con mayor

número de casos de meningitis y fiebres en neonatos y lactantes causados por EV de la especie B. Por último, destacar que el pronunciado pico de incidencia en otoño de 2022 se debió a que EV-D68 continuó circulando causando cuadros respiratorios. En este sentido, en los últimos años, el número de muestras respiratorias EV-positivas ha aumentado considerablemente con respecto a series anteriores, desplazando al LCR como principal muestra recibida para analizar (3).

#Red de Vigilancia de Parálisis Flácida Aguda y de Enterovirus: CNE, CIBERESP, ISCIII: N López-Perea, J Masa-Calles. Laboratorios: Andalucía: S Sanbonmatsu, I Pedrosa Corral, JM Navarro, Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada); Cataluña: C Berengua Pereira, M del Cuerpo Casas, Hospital Santa Creu i Sant Pau (Barcelona); Gran Canarias: E Lagarejos, A Bordes Benítez, Hospital Universitario Dr. Negrín; Murcia: A Moreno-Docón, Hospital Virgen de la Arrixaca; Pamplona: A Navascués, Complejo Hospitalario de Navarra; Vigo: S Pérez-Castro, Hospital Meixoeiro; Barcelona: A Perez-Argüello, C Muñoz-Almagro, Hospital San Joan de Deu. CIBERESP; Madrid: A Gutiérrez Arroyo, I Falces, Hospital La Paz; Bilbao: M Arazamendi, Hospital de Cruces; Burgos, G Megias, Complejo Hospitalario de Burgos.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. World Health Organization. Global Polio Eradication Initiative. Disponible en https://polioeradication.org/
2. PLAN DE ACCIÓN EN ESPAÑA PARA LA ERRADICACIÓN DE LA POLIOMIELITIS 2016. Disponible en https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/polio/docs/Plan_erradicacion_poliomielitis.pdf (actualización en proceso).
3. Echevarría Mayo, Juan Emilio, Oteo Iglesias, Jesús. Centro Nacional de Microbiología. Programas de Vigilancia Microbiológica. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2021 [Internet]. Disponible en: http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=08/02/2022-fc27d35665
4. Chirlaque López MD, Cabrerizo M, Guzmán Herrador BR, Masa-Calles J, Alarcón-Linares ME, Allende A, Aznar Cano E, *et al.*.An imported case of vaccine-derived poliovirus type 2, Spain in the context of the ongoing polio Public Health Emergency of International Concern, September 2021. Euro Surveill. 2021;26:2101068. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.50.2101068
5. Fernandez-Garcia MD, Faye M, Diez-Fuertes F, Moreno-Docón A, Chirlaque-López MD, Faye O, Cabrerizo M. Metagenomic sequencing,

molecular characterization, and Bayesian phylogenetics of imported type 2 vaccine-derived poliovirus, Spain, 2021.Front Cell Infect Microbiol. 2023 2; 13:1168355. doi: 10.3389/fcimb.2023.1168355

6. Benschop KS, Albert J, Anton A, Andrés C, Aranzamendi M, Armannsdóttir B, Bailly JL, *et al.* Re-emergence of enterovirus D68 in Europe after easing the COVID-19 lockdown, September 2021. Euro Surveill. 2021;26:2100998. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.45.2100998

Parotiditis

Informe elaborado por J.E. Echevarría[1*], A Fernández-García[1*], M.T. Pérez-Olmeda[2†], A. Gavilán[1*], J. Masa-Calles[*&], N. López-Perea[*&], A. Castellanos[1*], I. González-Martínez[1*], J.M. Berciano[1*], S. Ruíz-Velázquez[1*], J. de la Fuente[2†], P. Balfagón[2†], M.A. Murillo[2†], M. Castillo[2†], I. Pérez-Grajera[2†]

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

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

[*] CIBER de Epidemiología y Salud Pública. CIBERESP.

[†] CIBER de Enfermedades Infecciosas. CIBERINFEC.

[&] Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III.

INTRODUCCIÓN

La parotiditis es una enfermedad de declaración obligatoria causada por el virus de la parotiditis (VP) e incluida desde 1981 en el calendario vacunal, lo que ha supuesto un importante descenso en la incidencia de la enfermedad. Sin embargo, y pese a las altas cobertura vacunales existentes en la población, la parotiditis sigue siendo endémica y se presenta en forma de ciclos epidémicos plurianuales que afectan a población inmunizada. La eficacia de la vacuna de la parotiditis no alcanza para que pueda ser considerada una enfermedad eliminable, a diferencia del sarampión y la rubéola, cuya vacuna se administra conjuntamente (vacuna triple vírica). Actualmente se siguen investigando las razones del escape vacunal, siendo las hipótesis más importantes la evanescencia de la inmunidad, la deriva antigénica o la variabilidad genotípica.

Los detalles de la epidemiología de la parotiditis en España en los últimos dieciocho años acaban de ser descritos en detalle en un reciente análisis realizado por el Centro Nacional de Epidemiología que se cita al final de este capítulo (1,2). Por otra parte, la justificación y objetivos de este programa, así como su diseño y resultados desde 2013 a 2020 fueron descritos en detalle en el anterior informe, que también se cita, sin que hayan cambiado desde entonces (3).

RESULTADOS 2021-2022 Y DISCUSIÓN

De las 287 muestras recibidas en 2021 (Tabla 1) para diagnóstico de parotiditis, solo 120 (41,7%) entraron por programa de vigilancia, siendo el resto cursadas como estudio de diagnóstico etiológico. La proporción de mantuvo en 2022 con 180 (43,5%) de 414. Por consiguiente, más de la mitad de las peticiones de diagnóstico de infección por virus de la parotiditis fueron cursadas por diagnóstico etiológico, a pesar de que podrían haber entrado a través del programa de vigilancia tras su declaración a la Red Naciona de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE).

Le entrada de muestras en estos dos años ha sido muy inferior a la de 2019 y 2020, rompiendo la tendencia ascendente que se venía observando desde la instauración del programa en 2013. Muy probablemente ha venido causada por la disminución de la incidencia de la enfermedad producida por las medidas de control poblacional asociadas a la pandemia de COVID 19.

Tabla 1. Resultados de vigilancia de parotiditis en el CNM. 2021-2022.

	2021	2022
Casos totales SIVIES	1051	2377
Casos Confirmados SIVIES	132	292
Casos estudiados CNM	201	294
Casos confirmados CNM (% Confirmados SIVIES	5 (3,8%)	10 (3,4%)
Casos genotipados CNM (% confirmados SIVIES)	0	2
Muestras PCR estudiadas CNM (% positivas)	187 (0%)	282 (0,7%)
Sueros estudiados CNM (%positivas)	100 (5%)	132 (6%)

Diez de las 19 comunidades y ciudades autónomas (CC. AA.) contribuyeron al programa. Destacan Castilla y León, Castilla la Mancha, Comunidad de Madrid, Comunidad Valenciana y Murcia, con aportaciones proporcionalmente superiores al tamaño de su población, de forma similar a años anteriores. Estas cinco comunidades autónomas aportaron el 78% de las muestras. Andalucía, Aragón, Asturias, Cantabria, Cataluña, Ceuta, Navarra, La Rioja y País Vasco no enviaron ninguna muestra durante este período. Al tratarse de un período de baja incidencia, la ausencia de muestras de estos territorios podría deberse a que se han declarado pocos casos sospechosos. Sin embargo, en la mayoría de los casos, esta ausencia de demanda del programa ya se observaba con anterioridad, tal y como se recoge en el anterior informe (3). El problema podría estribar en una deficiente difusión del programa, o en que algunos territorios disponen de recursos propios para hacer estas deter-

minaciones. En este último caso, sería conveniente arbitrar mecanismos para que toda la información disponible pueda analizarse conjuntamente a nivel nacional.

En 2021 se confirmaron en el CNM cinco casos de parotiditis, que suponen un 3,8% de los confirmados declarados a RENAVE. Todos ellos se diagnosticaron por detección de IgM en suero (no hubo ningún positivo a PCR en 2021), por lo que no se pudo hacer genotipado. En 2022 se confirmaron diez casos (3,4% de los confirmados declarados a la RENAVE). En dos de ellos con resultado positivo a PCR se pudo realizar genotipado por secuenciación. En uno de ellos el virus detectado resultó ser de genotipo G, el mismo que ha venido circulando de forma mayoritaria desde que emergió en el año 2005. Sin embargo, mientras que en años anteriores la inmensa mayoría de las variantes identificadas derivaban de la original MuVi/Sheffield.GBR/1.05/ (4-6), la asociada a esta muestra (MuVs/Madrid.ESP/45.22) resultó ser nueva y de origen diferente, de acuerdo a su posición disyunta en los árboles filogenéticos. Esto concuerda con la abrupta bajada en la incidencia observada tras la adopción de las medidas poblacionales para el control de la pandemia de COVID-19 (1,2) y sugiere que ha habido una interrupción de la circulación del linaje MuVi/Sheffield.GBR/1.05. Si esta nueva variante detectada establecerá, o no, circulación, es algo que solo el mantenimiento de la vigilancia microbiológica nos revelará. En el otro caso positivo de 2022 se encontró cepa vacunal Jerryl-Lynn, lo que concuerda con el hecho de que el paciente tenía antecedentes recientes de vacunación. Contrariamente a lo que ocurre con la vacuna de la rubéola y especialmente con la de sarampión, que producen exantemas post-vacunales con cierta frecuencia, es la primera vez que diagnosticamos una parotiditis post-vacunal asociada a la cepa Jerryl-Lynn. Como únicos antecedentes teníamos una mujer venezolana en 2011 y una niña rusa en 2016 con antecedentes recientes de vacunación con cepa Leningrad-Zagreb en sus respectivos países de origen. Si bien existen numerosos antecedentes de parotiditis post-vacunal por cepa Leningrad-Zagreb descritos en bibliografía, son muy escasos los antecedentes de parotiditis post-vacunal causados por cepa Jerrly-Lynn, que se considera más segura.

CONCLUSIONES

- Durante 2021 y 2022 se ha producido un notable descenso del número de muestras recibidas para diagnóstico de parotiditis en el CNM que coincide con una importante disminución en la incidencia tras la pandemia de COVID-19, de acuerdo a los estudios epidemiológicos publicados.

- La distribución territorial de las muestras recibidas no es homogénea y algunas CC. AA. no demandan peticiones analíticas al CNM para diagnóstico de parotiditis.
- Se observa un descenso muy acusado en los casos positivos detectados con respecto al período anterior a la pandemia de COVID-19. Durante estos dos años solo se han diagnosticado quince casos de parotiditis, la mayoría de ellos por determinación de IgM en suero sin que hubiese muestra adecuada para PCR.
- La única cepa salvaje detectada resultó ser de genotipo G, aunque de un linaje diferente al que venía circulando en España desde 2005, lo que apoya que ha habido interrupción de la circulación del virus como sugiere el fuerte descenso en la incidencia.
- Se ha diagnosticado un caso de parotiditis post-vacunal causado por la cepa Jerryl-Lynn que supone el primero de estas características del que tenemos noticia en España.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Centro Nacional de Epidemiología. CIBERESP. ISCIII. Informe epidemiológico sobre la situación de la parotiditis en España, 2005-2021. Madrid, abril 2023. Presentación de PowerPoint (isciii.es).
2. Horcas de Frutos A, López-Perea N, Fernández-García A, Gavilán AM, Echevarría JE, Olivares-Quintanar D, Masa-Calles J. Vigilancia epidemiológica y virológica de la parotiditis en España, 2005-2022. Boletín Epidemiológico Semanal. Enviado a publicación.
3. Echevarría JE, Fernández-García A, de Ory F, Pérez-Olmeda MTP, Gavilán A, Castellanos A, González-Martínez I, Berciano JM, Hoyas C, Salvador F, Rúiz-Velázquez S, de la Fuente J, Balfagón P, Murillo MA, Castillo M, Pérez Grajera, I. Programa de parotiditis. Centro Nacional de Microbiología. Programas de Vigilancia Microbiológica. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2021.108 páginas. N.I.P.O. e-pub: 834210318. http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=08/02/2022-fc27d35665
4. Gavilán AM, Fernández-García A, Rueda A, Castellanos A, Masa J, López-Perea N, Torres de Mier MV, de Ory F, Echevarría JE. Genomic non-coding sequences reveal hidden patterns of mumps virus circulation in Spain, Eurosurveillance,2018, 23(15): 1-8.

5. Gavilán AM, Díez-Fuertes F, Sanz JC, Castellanos AM, López-Perea N, Jiménez SM, Ruiz-Sopeña C, Masa-Calles J, García-Comas L, de Ory F, Pérez-Olmeda M, Fernández-García A, Echevarría JE. Increase of diversity of mumps virus genotype G SH variants circulating among a highly immunized population: Spain, 2007-2019. Journal of Infectious Diseases. 2022. 227(1):151-160. Q1.
6. Gavilán AM, Reijnen L, Castellanos AM, Woudenberg T, López-Perea N, Masa-Calles J, Echevarría JM, Fernández-García A, Bodewes R. Compared circulation patterns of Mumps virus in The Netherlands and Spain (2015-2020). Frontiers in Microbiology. 2023.16;14:1207500. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1207500.

Sarampión y Rubeola

Informe elaborado por A. Fernández-García[1,*], J. E. Echevarría[1,*], J. Masa-Calles[&*], N. López-Perea[&*], M. T. Pérez-Olmeda[2,†], E. Calonge [2,†], J. M. Berciano[1], A. M. Castellanos[1,*], S. Ruíz-Velázquez[1], A. M. Gavilán[1,*], I. Pérez-Grajera[2], P. Balfagón[2], J. de la Fuente[2], M. A. Murillo[2], M. Castillo[2]

[1] Laboratorio de Referencia e Investigación en Enfermedades Víricas Inmunoprevenibles, Centro Nacional de Microbiología (CNM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

& Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

* CIBER de Epidemiología y Salud Pública, ISCIII.

[2] Laboratorio de Serología, CNM, ISCIII.

† CIBER de Enfermedades Infecciosas, ISCIII.

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 congénito (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 Organización Mundial de la Salud (OMS).

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. Asimismo, aumenta la frecuencia de casos de sarampión en personas correctamente vacunadas. 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. Entre el año 2017 y 2020, hasta la llegada de la pandemia de COVID-19, se produjo un aumento de los casos de sarampión, coincidente con el notable aumento de casos a

nivel mundial. Debido a las medidas de control de la pandemia, incluyendo la ausencia de movilidad a nivel global, los casos de sarampión disminuyeron notablemente en todo el mundo. Sin embargo, la OMS advierte del riesgo de aparición de grandes brotes de sarampión, debido a la interrupción de las campañas de vacunación y de la vigilancia en muchos países durante la pandemia.

El último Plan Estratégico para la eliminación del sarampión y la rubeola en España (2021-2025) (1) se aprobó en 2021. En este Plan se recogen los nuevos algoritmos diagnósticos para países en eliminación (Anexo III) y se pone de manifiesto la importancia de la integración de los datos epidemiológicos y moleculares para la vigilancia. Para evaluar la calidad de la vigilancia y verificar la eliminación, OMS-Europa solicita a los países miembros un informe anual en cuya elaboración participan el CNE, el CNM y el Ministerio de Sanidad (grupo de trabajo del Plan). El programa específico de vigilancia microbiológica (PEVM) se lleva a cabo en el Laboratorio Nacional de Referencia para Sarampión y Rubeola (LNR-SR) del CNM, acreditado por la OMS. Sus características fueron descritas en detalle en el primer número de esta serie (2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según los datos publicados en los informes anuales del Plan de Eliminación de sarampión y rubeola (3-5), entre abril y diciembre del año 2020 sólo se notificaron dos casos confirmados, otros dos en 2021 y uno en 2022. Según los citados informes, en la mayoría de los casos sospechosos de sarampión notificados en 2021 y 2022 se realizó investigación de laboratorio (92% y 100%), con lo que se superan los criterios de calidad de la vigilancia de la OMS. En el 52% de los casos notificados en 2021 (4) y en el 75% de los de 2022 (5) se recogieron muestras tanto para serología como para RT-PCR. Todos los casos confirmados fueron genotipados y analizados para identificar la variante de la secuencia N450, superando el estándar de calidad de la OMS (80% de las cadenas de transmisión). En rubeola, todos los casos notificados en 2021 (4) y en 2022 (5) fueron descartados, con investigación de laboratorio en todos ellos, aunque solo en el 43% se hizo RT-PCR además de serología y en el 50% avidez de IgG. Se obtuvo un diagnóstico alternativo en 7 de ellos (50%) (4,5): un caso de rubeola post-vacunal, tres de varicela, uno de infección por EBV, uno de infección por CMV y uno de infección por adenovirus.

En cuanto al PEVM del CNM, en la mayoría de las muestras se solicitó la detección de ARN vírico por RT-PCR en sarampión (Tabla 1) y en rubeola (Tabla 2), lo que representa un cambio de tendencia en rubeola. Esto ha permitido además

llevar a cabo un diagnóstico diferencial identificando otro patógeno en el 35,7% de las muestras estudiadas mediante RT-PCR (Tabla 2).

Tabla 1. Resultados de vigilancia microbiológica de sarampión en el CNM en 2021 y 2022.

PEVM SARAMPIÓN	2021	2022	TOTAL
Casos totales notificados (SIVIES)[a]	25	20	45
Casos estudiados por laboratorio (SIVIES)[a] (% de notificados)	23 (92,0)	20 (100,0)	43
Casos confirmados (SIVIES)[a]	2	1	3
Casos confirmados por laboratorio (SIVIES)[a] (% de confirmados)	2 (100,0)	1 (100,0)	3
Casos genotipados (SIVIES)[ab] (% de confirmados)	2 (100,0)	1 (100,0)	3
Número de brotes (SIVIES)[a]	1	0	1
Número de brotes genotipados (SIVIES)[a] (% de brotes)	1 (100,0)	NA	1
Casos estudiados en CNM (% de estudiados por laboratorio)	13 (56,5)	13 (65,0)	26 (60,5)
Casos genotipados en CNM[b] (% respecto a genotipados)	2 (100,0)	1 (100,0)	3 (100,0)
Muestras estudiadas en CNM[c]	26	22	48
Muestras estudiadas para PCR en CNM	17	19	36
PCR positivas (% de las estudiadas para PCR)	2 (11,8)	2 (10,5)	4(11,1)
Ex. Faríngeos positivos (% del total de PCR pos)	2 (100,0)	1 (50,0)	3 (75,0)
Orinas positivas (% del total de PCR pos)	0 (0,0)	1 (50,0)	1 (25,0)
Sueros positivos (% del total de PCR pos)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Muestras suero estudiadas para serología en CNM	9	3	12
IgM positivas (% de las estudiadas por serología)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Avidez de IgG sarampión estudiadas	3	2	5
Diagnóstico diferencial: PVB19 positivos por PCR	0	0	0
Diagnóstico diferencial: RUB positivos por PCR	0	0	0
Diagnóstico diferencial: Otros positivos por PCR	0	0	0

[a] Datos analizados por Noemí López Perea y Josefa Masa Calles, del Centro Nacional de Epidemiología (ISCIII), e incluidos en los informes anuales.
[b] Se excluyen los casos de genotipo A[vac], descartados.
[c] Se presentan los datos de las muestras totales, generalmente más de una por cada caso estudiado (suero y exudado faríngeo/orina).

Tabla 2. Resultados de vigilancia microbiológica de rubeola en el CNM entre 2021 y 2022.

PEVM RUBEOLA	2021	2022	TOTAL
Casos totales notificados (SIVIES)[a]	4	10	14
Casos estudiados por laboratorio (SIVIES)[a] (% de notificados)	4 (100,0)	9 (90,0)	13 (92,8)
Casos confirmados (SIVIES)[a]	0	0	0
Casos confirmados por laboratorio (SIVIES)[a] (% de confirmados)	NA	NA	NA
Casos genotipados (SIVIES)[ab] (% de confirmados)	NA	NA	NA
Número de brotes (SIVIES)[a]	0	0	0
Número de brotes genotipados (SIVIES)[a] (% de brotes)	NA	NA	NA
Casos SRC confirmados[a]	0	0	0
Casos SRC genotipados[a]	NA	NA	NA
Casos estudiados CNM (% de estudiados por laboratorio)	0 (0,0)	7 (77,7)	7 (77,7)
Casos genotipados en CNM[b] (% respecto a genotipados)	NA	NA	NA
Muestras estudiadas en CNM[c]	0	19	19
Muestras estudiadas para PCR en CNM	NA	14	14
PCR positivas (% de las estudiadas para PCR)	NA	0 (0,0)	0 (0,0)
Ex. Faríngeos positivos (% del total de PCR pos)	NA	NA	NA
Orinas positivas (% del total de PCR pos)	NA	NA	NA
Sueros positivos (% del total de PCR pos)	NA	NA	NA
Muestras suero estudiadas para serología en CNM	NA	5	5
IgM positivas (% de las estudiadas por serología)	NA	2 (40,0)	2 (40,0)
Avidez de IgG rubeola estudiadas	NA	2	2
Diagnóstico diferencial: PVB19 positivos por PCR	0	0	0
Diagnóstico diferencial: SAR positivos por PCR	0	0	0
Diagnóstico diferencial: Otros positivos por PCR	2	3	5

[a] Datos analizados por Noemí López Perea y Josefa Masa Calles, del Centro Nacional de Epidemiología (ISCIII), e incluidos en los informes anuales.
[b] Se excluyen los casos de genotipo A[vac], descartados.
[c] Se presentan los datos de las muestras totales, generalmente más de una por cada caso estudiado (suero y exudado faríngeo/orina).

El análisis molecular de los virus del sarampión en los tres casos confirmados permitió validar el origen de la importación, poniendo de manifiesto la relevancia de la integración de los datos epidemiológicos y genómicos para la vigilancia. Así los dos casos del mismo brote del año 2021 fueron de genotipo B3, de una variante circulante en Afganistán (MVs/Wisconsin.USA/35.21/[B3]), país de importación del caso índice. En el único caso confirmado en 2022 se identificó una variante de

genotipo D8 (MVs/Victoria.AUS/6.11/ [D8]) circulante en la India, país de origen de la importación. En los últimos años previos a la pandemia sólo circularon en Europa dos variantes predominantes de genotipo B3 y D8, lo que limita la capacidad del análisis recomendado por la OMS para trazar las cadenas de transmisión y vincular casos entre sí. En el LNR-SR (CNM), se ha desarrollado un protocolo basado en el análisis molecular de una región no codificante del genoma del virus del sarampión (MF NCR) (6) para la vigilancia. Este método permite identificar cadenas de transmisión e importaciones simultáneas, que pasan desapercibidas cuando solo se utiliza el método recomendado por la OMS para el genotipado y análisis de variantes, que está basado en la secuenciación de la región N450.

En los últimos años, los requisitos de la OMS en cuanto a supervisión y garantía de calidad vienen siendo crecientes y actualmente se recomienda que todos y cada uno de los laboratorios que realicen diagnóstico de sarampión y rubéola estén acreditados por una entidad nacional autorizada o supervisados por un laboratorio acreditado por la OMS. En el nuevo Plan estratégico para la eliminación del sarampión y la rubeola en España (2021-2025) (1), se incluyó la realización de un análisis de la situación de la calidad de los laboratorios implicados en la vigilancia del sarampión y la rubeola. Con este fin, durante el año 2022 se llevó a cabo una encuesta, a través de la plataforma «LimeSurvey» del ISCIII, elaborada por el LNR-SR con el soporte técnico de la Unidad de Tecnologías de la Información del ISCIII y consensuada con el grupo de trabajo del Plan de Eliminación. Esta encuesta se distribuyó a los diferentes laboratorios a través de los Servicios de Salud Pública de las diferentes Comunidades Autónomas. El análisis de esta encuesta se está llevando a cabo en la actualidad.

CONCLUSIONES

- El PEVM de Sarampión y Rubeola del CNM sigue manteniendo el fin de cumplir con las recomendaciones del Plan Estratégico para la Eliminación de Sarampión y Rubeola, que a su vez se ajusta a las recomendadas por la OMS, y se ha adaptado a los nuevos algoritmos de diagnóstico incluidos en el citado plan.
- El diagnóstico de laboratorio de sarampión y rubeola se realiza fundamentalmente en los laboratorios de origen de las CC. AA.; el LNR-SR (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, para asesorar sobre los diferentes aspectos del diagnóstico y la vigilancia de laboratorio, haciendo especial mención a los nuevos algoritmos de diagnóstico

adaptados para países en eliminación, y para la notificación de los datos de laboratorio a la OMS.

- El diagnóstico molecular cobra especial importancia en la situación de eliminación en la que nos encontramos, y los datos del PEVM revelan un aumento de la proporción las muestras recibidas para ello en rubeola. Sin embargo, un resultado negativo por RT-PCR no permite descartar el caso, si no hay un diagnóstico alternativo de otro patógeno, por lo que sigue siendo relevante disponer del juego completo de muestras para hacer serología en paralelo y tener un adecuado rendimiento diagnóstico.
- El diagnóstico diferencial en rubeola ha ido también en aumento, de acuerdo con los nuevos algoritmos para países en eliminación como el nuestro.
- 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 la confirmación del origen de los casos y la vinculación de los casos.
- Se ha desarrollado un protocolo (6) para aplicar el análisis de la región MF NCR del genoma del virus del sarampión para la vigilancia, aumentando la resolución en la vinculación de los casos, revelando cadenas de transmisión e importaciones simultáneas que pueden pasar desapercibidas utilizando exclusivamente el método estándar de la OMS basado en la región N450.
- Se ha llevado a cabo una encuesta para conocer la calidad de los laboratorios implicados en la vigilancia del sarampión y la rubeola en las diferentes Comunidades Autónomas. Los resultados de esta encuesta ayudarán a definir la estructura de la red de laboratorios que realizan la vigilancia en la fase post-eliminación del sarampión y la rubeola en nuestro país.

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. Fernández-García A, Echevarría JE, de Ory F, Pérez-Olmeda MT,. Castellanos A, Ruiz-Velazquez S, Gavilan AM, Perez-Grajera I, Balfagon P, de la Fuente J, Murillo MA, Castillo M. Programa de sarampión. Centro Nacional de

Microbiología. Programas de Vigilancia Microbiológica. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2021.108 páginas. N.I.P.O. e-pub: 834210318.

3. Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), CIBERESP y Ministerio de Sanidad. Plan de Eliminación del Sarampión y la Rubeola en España. Informe anual 202. Madrid, octubre de 2021. https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20A-Z/Sarampi%C3%B3n/Informe_SAR-RUB_2020_FINAL_web.pdf
4. Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), CIBERESP y Ministerio de Sanidad. Plan de Eliminación del Sarampión y la Rubeola en España. Informe anual 2021. Madrid, octubre de 2022. https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/_layouts/15/WopiFrame.aspx?sourcedoc=%7B22B343A8-C705-416B-8A3F-292E06474E51%7D&file=Informe_SAR-RUB_2021.pdf&action=default&IsList=1&ListId=%7BD4561B01-978E-4C8A-84D0-E8D386833B78%7D&ListItemId=1405
5. Centro Nacional de Epidemiología, Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). CIBERESP. Ministerio de Sanidad. Plan de Eliminación del Sarampión y la Rubeola en España. Informe anual 2022. Madrid, septiembre de 2023. https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20A-Z/Sarampi%C3%B3n/Informe_SAR-RUB_2022_VF.pptx.pdf
6. Jacqueline C, Gavilán AM, López-Perea N, Penedos AR, Masa-Calles J, Echevarría JE, Fernández-García A; MMR Study Group. Utility of MF-non coding region for measles molecular surveillance during post-elimination phase, Spain, 2017-2020. Front Microbiol. 2023 May 22; 14:1143933. doi: 10.3389/fmicb.2023.1143933

Varicela y Herpes Zóster

Informe elaborado por D. Tarragó[1*], V. Recio[1], I. González, J. E. Echevarría[1*], J. Masa-Calles[2*]

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

[2] Centro Nacional de Epidemiología.

[*] CIBER de Epidemiología y Salud Pública. CIBERESP.

INTRODUCCIÓN

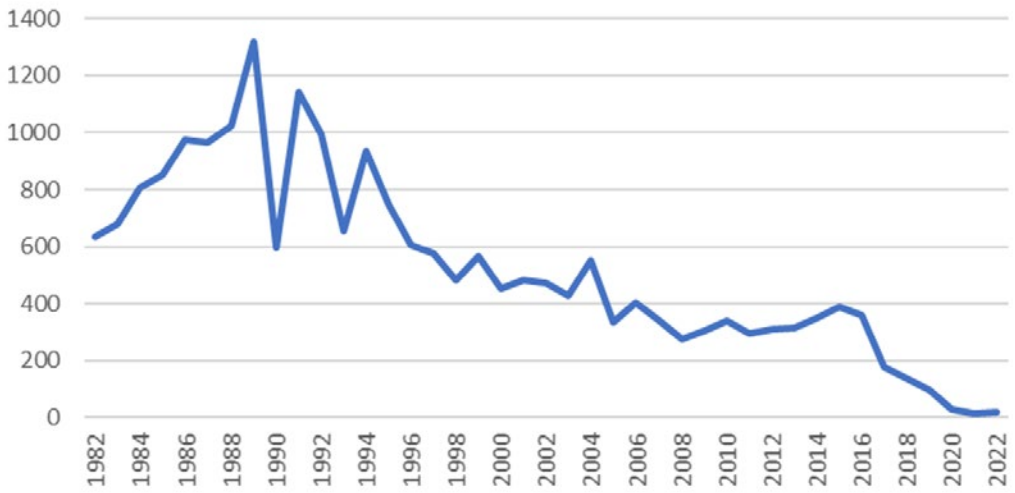
La infección primaria por el virus de la varicela zóster produce una enfermedad febril exantemática altamente trasmisible llamada varicela. Comienza con fiebre, seguida de exantema maculopapular pruriginoso, rápidamente progresivo que evoluciona en 5-7 días a vesículas, pústulas y costras. Tras la infección primaria, el virus queda en estado latente en los ganglios raquídeos de la médula espinal o de los pares craneales, pudiendo reactivarse posteriormente y dar lugar a lo que se conoce como herpes zóster (HZ) caracterizado por producir lesiones distribuidas a lo largo de los dermatomos. La varicela es una enfermedad de distribución mundial. En climas templados, es una de las enfermedades más frecuentes de la infancia y más del 90% de la población la ha padecido antes de los 15 años de edad. En niños sanos la varicela es una enfermedad habitualmente leve y autolimitada. La enfermedad es más grave cuando es congénita y perinatal y también en adultos, especialmente en personas con inmunosupresión y enfermedades crónicas. Entre las complicaciones se incluyen: neumonía, encefalitis, ataxia cerebelosa, síndrome de Reye y sobreinfecciones bacterianas de las lesiones cutáneas. El HZ normalmente es una enfermedad leve, pero en pacientes ancianos o inmunodeprimidos puede producir complicaciones.

En España, la varicela se incluyó como enfermedad de declaración obligatoria en 1904, como diagnóstico diferencial de la viruela. En 1998 la vacuna se introdujo en **grupos de población con especial riesgo de sufrir varicela grave y e**n 2005 se incluyó **en el calendario de vacunación infantil** en los adolescentes que no hubieran pasado la enfermedad con anterioridad.

En el año 2016 se incluyó la vacunación de varicela (Varilrix, Varivax o bien una tetravalente que incluye otros virus) en el calendario de vacunación infantil con dos

dosis a los 15m y a los 3-4 años. (ver calendario https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/calendario-y-coberturas/docs/CalendarioVacunacion_Todalavida.pdf). Desde entonces la incidencia de varicela está cayendo aceleradamente tal y como se observa en la siguiente figura:

Figura 1. Incidencia de Varicela por 100,000 hab. España 1982-2022.



Fuente: Notificación agregada de casos de varicela. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE). Centro Nacional de Epidemiología. ISCIII.

El HZ es una enfermedad frecuente que afecta sobre todo a los adultos a partir de los 50 años. En España desde el año 2007 el HZ es una enfermedad de declaración obligatoria a la RENAVE; la notificación de casos con un conjunto de variables básicas está actualmente en fase de implantación.

La vacuna de subunidades frente a HZ se recomienda para prevenir el HZ y la neuralgia post-herpética (NPH) en población con determinadas condiciones de inmunosupresión y en adultos a los 65 años de edad.

Los estudios epidemiológico-moleculares iniciales realizados en otros países referían a nomenclaturas diferentes según el grupo de estudio y el método usado ya que éste no estaba estandarizado. En el congreso sobre nomenclatura internacional de 2008 se acordó una nomenclatura común para el VZV basada en estudios filogenéticos y se establecieron siete clados: Clado I (E1), Clado 2 (J), Clado 3 (E2), Clado 4 (M2); Clado 5 (M1), Clado VI (M4) y Clado VII (M3). Los clados 1 y 3 son los más frecuentes en Europa occidental y en áreas del mundo predominantemente pobladas por europeos, mientras que el clado 2 predomina en Japón y los países vecinos. Los clados 4 y 5 son principalmente prevalentes en varios países asiáticos y

africanos. La cepa OKA con la que se fabrica las vacunas pertenece al clado 2. Se da la circunstancia que las cepas del virus aisladas de HZ pertenecen a los clados que circularon en el momento de la infección primaria, casi siempre varias décadas antes.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROGRAMA

La confirmación por laboratorio de los casos clínicamente sospechosos es necesaria y la determinación más apropiada es la PCR. Se recomienda incluir el genotipado en la vigilancia para estudiar la fuente de infección, conocer el patrón de circulación de las diferentes cepas e investigar los casos en que se sospecha una relación con la vacuna. Además, la incidencia de la enfermedad se está reduciendo significativamente y, por tanto, sobre la experiencia ya adquirida mediante la vigilancia en la RENAVE, debemos implementar los siguientes objetivos:

- Proporcionar al Sistema de Vigilancia datos de laboratorio con los que poder elaborar indicadores epidemiológicos fiables en todo el territorio.
- Apoyar la confirmación de los casos y la caracterización microbiológica de casos individuales y brotes.
- El seguimiento permanente del patrón de circulación de genotipos y variantes del virus de la varicela zóster en España como indicador del grado de progreso en su control mediante vacunación:
  - Determinar los casos de varicela producidos por virus vacunal y los producidos por virus salvaje.
  - Determinar HZ producido por virus vacunal.
  - Conocer en profundidad el patrón de circulación de los virus. Estudios moleculares de clados.
  - Investigar la existencia de casos producidos por la recombinación inter- e intraclados que pudieran producir cambios epidemiológicos en la enfermedad.

DISEÑO DEL PROGRAMA

Sujetos de estudio: Paciente con sospecha clínica de varicela o HZ (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	PCR	Genotipado*	Determinación cepa vacunal#
Sangre	SI***	SI	SI	SI
LCR	SI**	SI	SI	SI
Exudado de lesión	SI****	SI	SI	SI

* Solo si la muestra ha sido previamente positiva PCR.
** Solo si hay cuadro neurológico asociado.
*** Solo en caso de varicela.
**** Solo en caso de herpes zóster.
# Solo en pacientes vacunados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El diagnóstico virológico de la varicela mediante PCR se realiza en el Centro Nacional de Microbiología desde hace décadas a través de su cartera de servicios. Además, desde el año 2018 se realiza la determinación de cepa vacunal o salvaje mediante secuenciación. Dado que el programa de vigilancia microbiológica todavía no se ha implementado, la demanda de esta prueba es todavía muy escasa. Hasta la actualidad se han procesado en total 36 muestras clínicas (25 exudados de lesión, 7 LCR, 2 sangre, 2 extractos de ADN), de casos de sospecha de varicela o HZ relacionado con la vacunación, de las cuales 12 casos se ha determinado que son producidos por la cepa vacunal, 14 por cepas salvajes y en 10 casos no ha sido posible la determinación, por baja carga viral en la muestra.

A principios de 2019 se publicó un estudio de genotipos realizado con las muestras clínicas de los casos de varicela y HZ recibidos en el CNM para diagnóstico virológico mediante PCR. El objetivo principal del estudio fue caracterizar las cepas del virus varicela-zoster circulantes en España entre 1997 y 2016. Para ello, determinamos los clados de VZV en 294 pacientes con diferentes patologías (principalmente encefalitis, HZ y varicela) mediante la secuenciación de tres fragmentos dentro de los ORF 22, ORF 21 y ORF 50 y, posteriormente, analizando 7 SNP relevantes para la asignación a cada clado. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

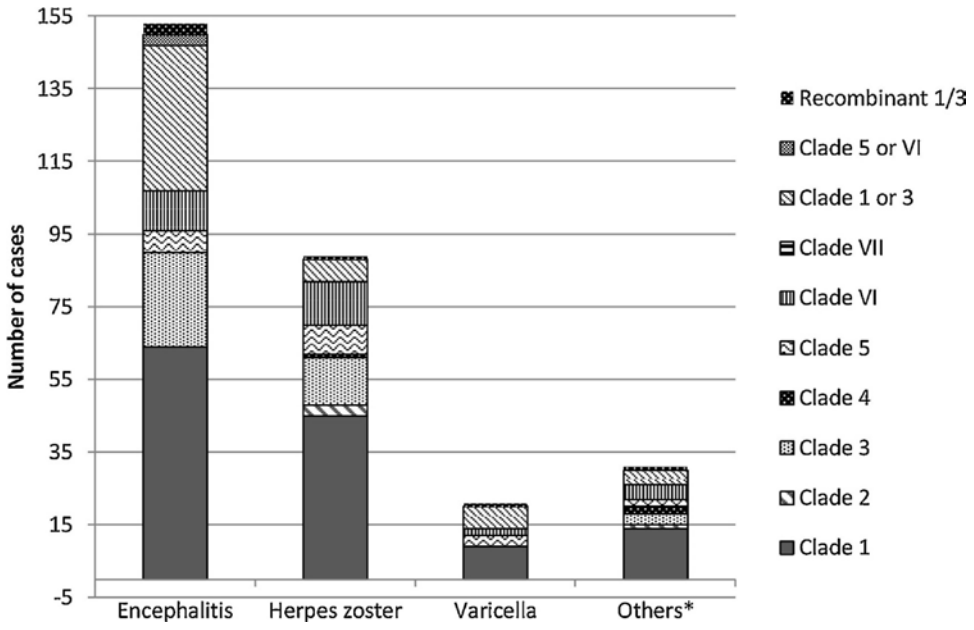
Tabla 2. Distribución de clados y genogrupos en la muestra estudiada.

Clado / Genogrupo	n (%)
1 / E	132 (44,9%)
1 or 3 / E	56 (19,0%)
2 / J	4 (1.4%)
3 / E	42 (14,3%)
4 / M	3 (1,0%)
5 / M	9 (6.5%)
5 or VI / M	3 (1,0%)
Rec* 1-3 / E	6 (2,0%)
VI / M	29 (9,9%)
VII / M	0 (0,0%)

* Grupo recombinante entre el clado 1 y 3.
En cursiva no se pudo discernir entre clado 1 o 3 y entre clado 5 o VI debido a secuencias incompletas.

En el análisis multivariado, la encefalitis se asoció de forma independiente con los clados 1 y 3 y la edad >14 años. (P = 0.035 y P = 0.021, respectivamente). En la Figura 2 se muestra la distribución de los clados del virus de la varicela zóster por patologías.

Figura 2. Distribución de clados de virus de la varicela zóster por patologías.



CONCLUSIONES

Respecto a la distribución de clados en el virus de la varicela zóster en el estudio antes mencionado podemos concluir que hay una mayor prevalencia de clados 1 y 3 que se relacionan más con casos de encefalitis en adultos. Su mayor prevalencia en adultos, nos sugiere una introducción más temprana de este clado en España. Los recombinantes interclados 1 y 3 están circulando en pacientes tanto con encefalitis, como con herpes zoster y varicela. Varios casos estuvieron relacionados con la vacunación vOKA, pero las cepas vacunales no parecen circular en la población general.

Una limitación de este estudio es que no es epidemiológicamente representativo de todos los casos de enfermedad por VZV en España, ya que solo analizamos aquellos casos que fueron enviados al CNM, por ello, las enfermedades neurológicas estaban sobrerrepresentadas. También es posible que se puedan detectar más recombinantes si se estudiara el genoma completo. Por lo tanto, hacen falta estudios filogenéticos y de secuenciación profunda para detectar otras cepas recombinantes y evaluar si los seis recombinantes tienen o no un origen común.

Por todo ello, se hace necesario y oportuno la implantación en España de un programa de vigilancia microbiológico de la varicela y HZ.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. González I, Molina-Ortega A, Pérez-Romero P, Echevarría JE, He L, Tarragó D. Varicella-zoster virus clades circulating in Spain over two decades. J Clin Virol. 2019 Jan;110:17-21. doi: 10.1016/j.jcv.2018.11.008. Epub 2018 Nov 28. PMID: 30517902.
2. J. Breuer, C. Grose, P. Norberg, *et al.* A proposal for a common nomenclature for viral clades that form the species varicella-zoster virus: summary of VZV Nomenclature Meeting 2008, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, 24-25 July 2008 J. Gen. Virol., 91 (2010), pp. 821-828.
3. SCIII. Centro Nacional de Epidemiología. Vigilancia en Salud Pública. Enfermedades transmisibles. A-Z. Varicela https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Paginas/Varicela.aspx
4. ISCIII. Centro Nacional de Epidemiología. Vigilancia en Salud Pública. Enfermedades transmisibles. A-Z. Herpes Zóster Herpes Zóster (isciii.es).
5. Grupo de trabajo de vacunación frente a herpes zóster de la Ponencia de Programa y Registro de Vacunaciones. Comisión de Salud Pública del

Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad, marzo 2021. Disponible en: https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/programasDeVacunacion/docs/HerpesZoster_RecomendacionesVacunacion.pdf

Enfermedades Víricas Transmitidas por Vector

Informe elaborado por M. P. Sánchez-Seco*, A. Vázquez†, A. Negredo*, M. T. Pérez-Olmeda*, E. Calonge*, L. Herrero*, F. Molero, P. Sánchez, L. Guillén, J. de la Fuente, P. Balfagón, M. A. Murillo, 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 Epidemiología y Salud Pública. CIBERESP.

* CIBER de Enfermedades Infecciosas. CIBERINFEC.

INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Víricas Transmitidas por Vector (EVTV), en su mayoría, son consideradas como Enfermedades de Declaración Obligatoria desde 2014 y muchas de ellas, están recogidas, en los protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) aprobados en 2013. En el CNM, desde 2012, son estudiadas dentro del Programa de Vigilancia de EVTV. Los resultados del mismo desde su inicio hasta 2020 se recogen en un capítulo del libro «Programas de Vigilancia Microbiológica. Centro Nacional de Microbiología, (diciembre 2021)».

El estudio se aplica a: 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.

Puede participar cualquier laboratorio de microbiología hospitalaria de la red pública y los laboratorios de salud pública de las CC. AA.

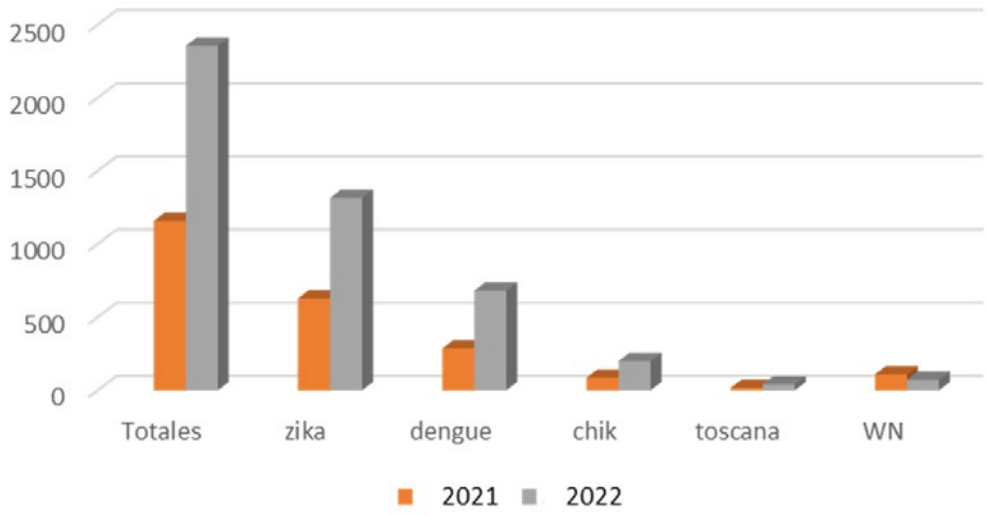
Objetivos: Identificar los casos de infección por agentes víricos exóticos en viajeros internacionales que regresan a España sospechosos de EVTV por criterios

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.

RESULTADOS 2021-2022 Y DISCUSIÓN

En el año 2021 se realizan 1.158 determinaciones reflejando todavía las restricciones en los viajes fruto de la pandemia de COVID-19. En 2022, sin embargo, se alcanzan y superan los niveles prepandémicos habiéndose realizado 2.356 determinaciones. En la Figura 1 se resumen las determinaciones realizadas en los principales patógenos cuyo diagnóstico se vigila en este programa.

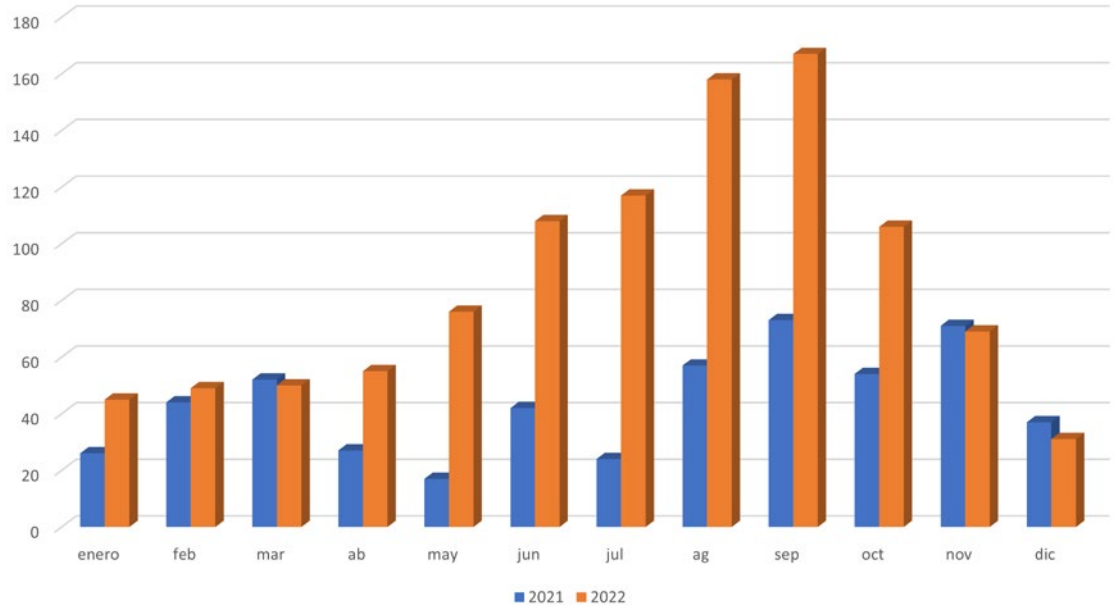
Figura 1. Determinaciones por patógeno y año.



Aunque los límites entre infección importada o autóctona cada vez son menores debido a la gran expansión geográfica de los arbovirus, diferenciaremos el diagnóstico de los virus importados (Zika -VZIK-, Dengue -VDEN- y Chikungunya -VCHIK-, principalmente) de aquellos con circulación autóctona establecida (Toscana -VTOS-, West Nile -VWN- o Linfocoriomeningitis -VLCM).

El número de peticiones para el diagnóstico de los virus implicados en este programa se multiplica en los meses cálidos por la mayor actividad del vector y por el aumento de los viajes vacacionales como puede observarse en la Figura 2.

Figura 2. Determinaciones por mes.



Diagnóstico de viajeros

El mayor número de las determinaciones realizadas corresponde a las peticiones para diagnóstico de VZIK (628 en 2021 y 1.315 en 2022). En 2021 no se detectó ningún caso agudo de infección por VZIK (resultado de PCR o IgM positivo). El número de determinaciones realizadas en pacientes embarazadas para estudios de neutralización del crecimiento del virus en microplaca (microneutralización, microNT) fue de 337 y en 198 muestras (58,7%) pudimos descartar la presencia del virus. En 2022, sin embrago, hubo un gran aumento de determinaciones realizadas para diagnosticar VZIK (688). Encontramos tres casos en varones en los que se detectó un resultado positivo de IgM y dos mujeres con resultado de PCR positivo y positivo sin confirmar en muestras de orina y sangre respectivamente. En el caso de las mujeres no enviaron ninguna muestra adicional para una mejor caracterización de los casos. En cuanto a los ensayos de microNT en embarazadas se realizaron 770 determinaciones de las que 411 (53,4 %) fueron negativas pudiéndose así descartar la infección por este virus.

El siguiente arbovirus más común en cuanto a número de determinaciones realizadas es VDEN. En 2021 se realizaron 286 determinaciones, y en 2022, 681. En 2021 se obtuvieron resultados positivos indicativo de infección reciente (detección de antígeno NS1, IgM y/o resultado positivo por PCR) en 18 muestras correspondientes a 14 pacientes. Los resultados positivos de detección directa fueron 4:

2 por PCR en muestras de sangre completa y 2 de detección de NS1 en suero. En 2022, el número de muestras de pacientes con un resultado indicativo de infección reciente fue de 111 de los cuales 13 presentaban resultado positivo para detección de NS1 y 46 por PCR: 23 muestras de suero, 19 de sangre completa, 4 de orina y 1 correspondiente a un extracto de ácido nucleico. En el caso de la infección por VDEN, se caracterizaron algunos de los genomas virales amplificados en las muestras clínicas y se determinó que la mitad de los casos positivos este año provenían de Cuba siendo detectado el serotipo 3 en la mayoría de ellos.

En el caso de diagnóstico y vigilancia de Chikungunya, estudiamos 42 muestras de pacientes (86 determinaciones) en 2021 y 84 (200 determinaciones) en 2022 y sólo se obtuvo un resultado positivo de IgM en 2022.

Además, se buscaron otros virus importados como Hantavirus (una sospecha negativa en 2021 y una con IgM positiva en 2022 que nos permitió el diagnóstico de un viajero procedente de Nepal) o Fiebre Amarilla (7 pacientes sospechosos en 2021 y 8 en 2022 sin ningún resultado indicativo de infección reciente). Por último, se buscaron marcadores indicativos de infección por el virus de la Encefalitis Transmitida por Garrapatas en tres casos (seis determinaciones) encontrándose en dos pacientes indicadores de infección reciente por este virus.

Adicionalmente, se solicitó el diagnóstico con PCRs genéricas en pacientes en los que, generalmente se han buscado los arbovirus más comunes no habiéndose obtenido ningún resultado positivo. Se buscaron *Alphavirus* (2 pacientes en 2022), *Orthobunyavirus* (1 paciente en 2022), *Flavivirus* (4 pacientes en 2021 y 8 en 2022) y *Phlebovirus* (2 pacientes en 2021) no habiéndose obtenido ningún resultado positivo.

Diagnóstico de infección autóctona

El virus autóctono más común es el virus Toscana. En 2021 se hizo el diagnóstico molecular y/o serológico de 10 pacientes (17 determinaciones) encontrándose tres pacientes con resultado de IgM positivo siendo en uno de ellos el resultado de la detección mediante PCR también positivo. En 2022, se buscaron marcadores de infección en 11 pacientes (41 determinaciones) encontrándose 2 pacientes en los que la PCR fue positiva y en los que se encontró también seroconversión de IgM y de IgG y de IgG sólo, respectivamente.

VLCM sólo se buscó en un paciente en 2021 y en 2 en 2022 con resultado negativo en todos los casos.

Por último, en 2021 se analizaron 109 muestras de 26 pacientes para diagnóstico de West Nile. En 4 pacientes procedentes de Andalucía se obtuvieron resultados positivos, 1 por PCR y los 4 por detección de anticuerpos. En 2022 se analizaron

72 muestras de 17 pacientes. Se obtuvieron resultados positivos indicativos de infección reciente (IgM) en 10 muestras de dos pacientes que provenían de Cataluña. En ellos confirmamos el diagnóstico de esta infección realizado previamente en un hospital regional, actuando como Laboratorio Nacional de Referencia. Al tratarse de un diagnóstico serológico, se realizaron también ensayos de microNT para confirmar este diagnóstico.

CONCLUSIONES

- El presente programa de vigilancia permite la detección y caracterización de los principales arbovirus, tanto aquellos aún exóticos en nuestro medio como los que ya circulan de forma autóctona.
- El panorama general de infecciones sospechadas en viajeros y en pacientes que no han viajado fuera de España refleja el aumento en el número de viajes en 2022 donde las restricciones al movimiento tras la pandemia de COVID fueron desapareciendo.
- Todos los virus estudiados muestran un aumento en 2022 reflejando el aumento de movilidad mencionado excepto para el VWN, para el que el número de determinaciones realizado es mayor en 2021. Este dato se explica por el mayor número de casos positivos en el país en 2021 (6) que en 2022 (4) pero, sobre todo, es reflejo del gran brote sufrido por nuestro país en 2020 con 77 casos.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. García-Cervera C, Iftimie SM, Martínez MJ, Vázquez González A, Parra-Pérez S, Revuelta-López-Cordón L, Gil-Toral J, Vileu Vallverdu RM, Martínez Mateo A, López-Azcona AF, Pujol-Bajador I, Ballester-Bastardie F, Castro-Salomó A. Report on the first two confirmed autochthonous cases of West Nile virus encephalitis in Catalonia, Spain. Infect Dis (Lond). 2023 Jul 20:1-5. doi: 10.1080/23744235.2023.2236703. Epub ahead of print. PMID: 37471287.
2. Sanbonmatsu-Gámez S, Pedrosa-Corral I, Navarro-Marí JM, Pérez-Ruiz M. Update in Diagnostics of Toscana Virus Infection in a Hyperendemic Region (Southern Spain). Viruses. 2021 Jul 23;13(8):1438. doi: 10.3390/v13081438. PMID: 34452304; PMCID: PMC8402649.

Rabia

Informe elaborado por J. E. Echevarría*, J. M. Berciano, M. T. Pérez-Olmeda, E. Calonge**, A. Fernández- García***

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

* CIBER de Epidemiología y Salud Pública. CIBERESP.

** CIBER de Enfermedades infecciosas CIBERINFEC.

INTRODUCCIÓN

La rabia es una enfermedad zoonótica altamente letal producida por lisavirus (gen *Lyssavirus*, fam *Rhabdoviridae*). El virus de la rabia (RABV) se estima que produce anualmente unas 59.000 muertes en el mundo, casi todas derivadas de infecciones transmitidas por el perro y en menor medida por mamíferos terrestres salvajes. El resto de lisavirus (hasta un total de veinte, admitidos por el Comité Internacional de Taxonomía e Virus o simplemente propuestos en artículos científicos), se asocian fundamente a murciélagos y han producido en torno a no más de quince casos de rabia humana en todo el mundo. RABV solo se asocia a murciélagos en América.

España es, desde 1978, un país libre de rabia en mamíferos terrestres, aunque se producen con cierta frecuencia casos en Ceuta y Melilla importados desde Marruecos. Asimismo, en el año 2013 se declaró un caso de rabia canina importado en Toledo. Desde el momento de la eliminación de la rabia canina, solo se han declarado tres casos de rabia humana en España, todos ellos importados desde Marruecos. De los seis lisavirus de murciélago descritos en Europa, se conoce la presencia de dos de ellos en España. Desde 1987 se han declarado más de 50 casos de murciélagos hortelanos (*Eptesicus serotinus*, *E. isabellinus*) infectados por el lisavirus europeo de murciélago tipo 1 o lisavirus Hamburgo (EBLV1). Este virus es el responsable del 95% de los casos declarados en Europa. Finalmente, en 2013 se describió el primer caso de lo que fue un nuevo virus, el lisavirus de murciélago Lleida (LLEBV), que no hemos vuelto a detectar desde entonces, aunque sí ha sido encontrado en Francia. Ninguno de los cinco casos humanos de rabia transmitidos por murciélagos europeos ha ocurrido en España.

En España, la vigilancia de rabia humana se realiza en el contexto de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) (1). La vigilancia de rabia animal (2,3) se basa esencialmente en el estudio de casos en los que ha habido agresión a personas y en las sospechas clínicas. La rabia humana y animal es una enfermedad de declaración obligatoria, tanto a nivel nacional como internacional.

En el primer volumen de esta serie se describieron en detalle las características del programa de vigilancia microbiológica de rabia del CNM y se dio una visión histórica de sus resultados (4).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al igual que en años anteriores, aproximadamente la mitad de las muestras recibidas (55,4% en estos dos años) correspondieron a murciélagos no mordedores, la mayoría procedente de centros de recuperación de especies amenazadas (CREAS) (Tabla 1). Sin embargo, en estos dos años el origen se ha diversificado con respecto a los anteriores en los que Cataluña aportaba el 83,9% de las muestras (4). La Comunidad de Madrid con un 42,4% es la que ha aportado más muestras durante estos dos años, seguida de Cataluña (37,8%), Islas Baleares (11,8%) y Andalucía (6,3%). Los CREAS del resto de territorios no aportan muestras, o lo hacen muy esporádicamente. Se observa una reducción porcentual de muestras aportadas por CREAS de Cataluña que no solo se debe al incremento de las de otras CC. AA., sino también a que, tras diez años en los que gran parte de las muestras aportadas eran de murciélago común (*Pipistrellus pipistrellus/pygmaeus*), sin que ninguna fuese positiva, al igual que ocurre en otros países europeos, se decidió restringir el análisis de muestras de estas especies a casos en los que hubiera habido exposición de riesgo. Esto ha permitido modular la presión de trabajo del Laboratorio permitiendo encajar la diversificación del origen de las muestras. Según se vaya consolidando una experiencia similar con muestras de murciélago común de otras CC. AA. como Madrid, Baleares y Andalucía, y eventualmente se vayan incorporando otras, se podría adoptar una estrategia similar en estos territorios.

El resto de las muestras correspondieron en su mayoría a animales mordedores y/o clínicamente sospechosos. De acuerdo a la población española actual, Madrid Castilla y León, Extremadura, y, muy especialmente, Ceuta y Melilla tendrían mayor representación de lo esperable de este grupo de muestras, Cantabria estaría participando proporcionalmente de acuerdo a su población y el resto estarían infrarrepresentadas. Cinco CC. AA. no enviaron ninguna muestra en este período. Resulta lógico que la participación de Ceuta y Melilla sea particularmente alta de acuerdo

a su especial situación epidemiológica, y que Aragón y la Comunidad Valenciana tengan menos demanda, ya que disponen de laboratorios primarios.

Finalmente, se han estudiado ocho muestras de tres casos de sospecha de rabia humana, todas ellas negativas. Sin embargo, solo en uno de los casos se aportó un conjunto adecuado de muestras para diagnóstico directo (biopsia de piel de nuca, saliva y líquido cefalorraquídeo), acompañadas de suero para detección de anticuerpos. En uno de los dos restantes se omitió la biopsia de piel de nuca y en el otro solo se envió líquido cefalorraquídeo, muestra con un rendimiento diagnóstico muy pobre para el diagnóstico de rabia. Es imprescindible aportar muestra de biopsia de piel de nuca conteniendo folículo piloso para un diagnóstico ante mortem fiable de rabia humana. En cualquier caso, si los resultados son negativos y el paciente fallece sin un diagnóstico alternativo, es aconsejable obtener material de autopsia de tejido encefálico para poder descartar el caso de forma fiable.

Tabla 1. Distribución territorial de las muestras recibidas (2021-2022).

	Murciélago no mordedor	Otros animales	Humanas	Total
Cataluña	83	15	4	101
Comunidad de Madrid	93	35	0	128
Andalucía	14	18	0	29
Extremadura	0	28	0	28
Castilla y León	0	19	0	19
Castilla la Mancha	0	2	0	2
Islas Baleares	26	2	0	28
Melilla	0	25	0	25
Ceuta	0	11	0	11
Región de Murcia	0	4	0	4
Navarra	0	3	0	3
Pais Vasco	0	3	3	5
Galicia	2	2	1	5
Aragón	0	0	0	0
Asturias	0	0	0	0
Cantabria	0	2	0	2
Islas Canarias	0	0	0	0
La Rioja	1	0	0	1
Comunidad Valenciana	0	0	0	0
Andorra	0	1	0	0
TOTAL	219	170	8	397

De los 238 murciélagos estudiados, ocho (3,4%) fueron positivos a EBLV-1 (Tabla 2). Dos de ellos correspondieron a *Eptesicus isabellinus* de Badajoz y Sevilla, que habían mordido a una persona. Los otros seis fueron *Eptesicus serotinus* procedentes de CREAS de Cataluña, donde murieron tras su ingreso sin que consten mordeduras a personas. De uno de ellos se recibió inicialmente un exudado faríngeo que resultó positivo, confirmándose el diagnóstico en el cadáver del animal que murió tres días después de la toma del exudado. Llama la atención que los resultados positivos sigan acumulándose en CREAS de Cataluña, lo que, probablemente, se debe a su mayor aportación de muestras de murciélago hortelano (*Eptesicus serotinus*).

De los 69 perros ensayados, 14 fueron positivos a RABV, uno de Ceuta y 13 de Melilla, lo cual supuso un incremento significativo de casos en esta última ciudad con respecto a años anteriores. Ninguno de los 48 gatos analizados resultó positivo, al igual que las 34 muestras de mamíferos terrestres salvajes. Las secuencias de las muestras positivas de Ceuta y Melilla mostraron que, como era esperable, la cepa era del tipo norteafricano (grupo África 1a).

Tabla 2. Casos analizados por especie.

	Totales	Ceuta y Meliia	Positivos
Perros	69	25	14*
Gatos	48	11	0
Murciélagos	238	0	8**
Zorros	13	0	0
Mustélidos	9	0	0
Roedores	12	0	0
Humanos	3	0	0
TOTAL	392	36	22

*13 de melilla y 1 de Ceuta, **6 de Cataluña, 1 de Andalucía, 1 de Extremadura.

De acuerdo a los informes de 2021 y 2022 sobre las actividades de vigilancia realizadas por los laboratorios nacionales de referencia de rabia europeos (elaborado por el laboratorio de referencia de la Unión Europea AFSA, ANSES- Nancy, Francia) (5), España fue el quinto país de la región europea en cuanto a número de murciélagos estudiados en 2021 y 2022, solo por debajo de Francia (1.063), Polonia (376), Alemania (324) y Austria (259). En cuanto a otros animales salvajes, estudiamos 24, solo por encima de Portugal (0), Holanda (6), Irlanda (0), Dinamarca (0), Suiza (14), Bosnia (12) y Turquía (14) y muy lejos de otros países con campañas de vacunación vulpina activas (por ejemplo Polonia con 3.799) o que sufrieron la epizootia en el pasado (por ejemplo con Alemania 6.916). Finalmente, en 2021-2022 estudiamos 76 animales domésticos, siendo superados por 14 países, la mayoría de ellos con focos vulpinos cercanos. Llaman, sin embargo, la atención los 337 de Alemania o los 2.497 de Francia.

CONCLUSIONES

- En términos generales, la demanda analítica sobre perros y gatos sospechosos se mantiene en 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, sin que conozcamos las causas de la escasa demanda en otros territorios.

- En 2021 y 2022 se han estudiado tres casos humanos sospechosos, todos ellos negativos, aunque solo en uno de ellos se recibió un juego de muestras adecuado.
- En 2021 y 2022 se ha diversificado la entrada de muestras de murciélago procedentes de CREAS, aunque sigue restringida a tan solo cuatro comunidades autónomas. Los casos positivos siguen acumulándose en Cataluña.
- Los casos positivos siguen correspondiendo a perros importados desde Marruecos en Ceuta y, sobre todo, Melilla infectados por RABV y a murciélagos hortelanos (*Eptesicus serotinus/isabellinus)* infectados por EBLV1 en la Península, donde el virus es endémico.
- Nuestra vigilancia de rabia en murciélagos sigue estando entre las mejores de Europa. La de otros animales salvajes se mantiene 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, se mantiene menos intensa que en países con focos activos de rabia vulpina, pero también de otros países libres de rabia como Francia o Alemania que han sufrido casos caninos importados en el pasado.

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; Ministerio e Sanidad, Ministerio de Ciencia e Innovación. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programade-vigilanciadelarabiaversionfinal_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. https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/sanidadExterior/zoonosis/Plan_contingencia_control_rabia.pdf

4. Echevarría JE, Berciano JM, Vera M, Vázquez-Morón S, Sandonís V, Aznar-López C, Avellón A, de Ory F, Pérez-Olmeda MT, Fernández-García A, Tenorio A. En Echevarría JE, Oteo J. Eds. Centro Nacional de Microbiología. Programas de Vigilancia Microbiológica. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2021.108 páginas. http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=08/02/2022-fc27d35665
5. French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety – Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife. Review of the analysis related to rabies diagnosis and follow up of oral vaccination performed in NRLs in 2021. Nancy, France, 2022. https://sitesv2.anses.fr/en/minisite/rabies/2021-report-review-analysis-related-rabies-diagnosis-and-follow-oral-vaccination

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

Informe elaborado por Ana Avellón y Milagros Muñoz Chimeno

Asistencia técnica: Lucía Morago, Vanessa Rodríguez y Nazaret Díaz

Laboratorio de Referencia e Investigación en Hepatitis Víricas:
Unidad de Hepatitis. CIBERESP.

Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

Hospitales participantes: Hospital Universitario de Navarra, Fundacion Hospital Alcorcon, Hospital Universitario Principe de Asturias, Hospital Son Llatzer, UR Salud UTE.

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.

RESULTADOS 2021-2022 Y DISCUSIÓN

En el periodo 2021-2022 se han estudiado un total de 13 casos sospechosos de variantes del VHB (Tabla 1). Los estudios más frecuentes fueron, coexistencia de HBsAg y anti-HBs y estudios de resistencias.

Tabla 1. Casos estudiados en el programa de vigilancia entre 2021 y 2022.

	2021	2022	Total
Hepatitis B en vacunado	2		2
Sospecha de mutante escape	1		1
Sospecha infección oculta	1	1	2
Coexistencia HBsAg/anti-HBs	4		4
Hepatitis aguda		1	1
Resistencias	3		3
Total	11	2	13

Durante 2021 y 2022 se han estudiado dos brotes de hepatitis C y dos brotes de hepatitis B.

CONCLUSIONES

El número de muestras anuales estudiadas ha disminuido respecto de los años anteriores.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Ver documento anterior.

Leishmaniasis Humana en la Comunidad de Madrid

Informe elaborado por R. Molina*†, J. Moreno*†, M. Jiménez*†, J. Nieto*†, I. Martín-Martín*, E. Carrillo*†, C. Chicharro*†

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

* Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis. WHOCC.

† CIBER de Enfermedades Infecciosas. CIBERINFEC.

INTRODUCCIÓN

La Comunidad de Madrid (CM) confirmó a finales de 2010 la existencia de un brote comunitario de leishmaniasis en el suroeste de la región que afectaba a los municipios de Fuenlabrada, Getafe, Leganés y Humanes. Actualmente este brote continúa abierto y el número de casos notificados hasta diciembre de 2022 alcanza los 798, el 40% de ellos de leishmaniasis visceral. La vigilancia de la leishmaniasis humana en la CM se lleva a cabo ininterrumpidamente desde 2011 mediante el presente programa de vigilancia del CNM-ISCIII, cuyas actividades se coordinan con la Consejería de Sanidad de la CM con la que se ha suscrito un contrato de servicios competitivo denominado «**Análisis para la vigilancia del vector y de los reservorios silvestres transmisores de la leishmaniasis en la Comunidad de Madrid».**

El programa comprende tres objetivos:

- la vigilancia de los casos humanos, realizado por el Laboratorio de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas (LLEC) a partir de las muestras clínicas de pacientes con sospecha de leishmaniasis procedentes de los hospitales de la CM y de pacientes inmunodeprimidos que han padecido la enfermedad y de los que se hace seguimiento para evitar recaídas.
- la vigilancia de los vectores, realizado por el Laboratorio de Entomología Médica (LEM) y consistente en un «muestreo intensivo», de mayo a octubre de cada año, para la identificación taxonómica de los flebotomos, el esta-

blecimiento de la fenología de las especies predominantes y la detección y genotipado de *L. infantum* en los flebotomos capturados.

- la vigilancia de los reservorios, que se lleva a cabo por el LLEC mediante análisis de PCR de Leishmania en muestras biológicas de posibles reservorios, especialmente de reservorios silvestres como liebres y conejos que han sido incriminados como nuevos reservorios de la leishmaniasis, aportación realizada por el ISCIII a partir de los estudios realizados en el brote y que ha sido respaldado por investigaciones realizadas con posterioridad en España, Francia, Italia, Grecia, Turquía e Israel.

Los resultados del programa de vigilancia de leishmaniasis correspondientes al periodo 2011-2020 se recogieron en el primer libro sobre Programas de Vigilancia Microbiológica del Centro Nacional de Microbiología publicado en diciembre de 2021. (Molina y col, 2022). En el presente informe se recogen exclusivamente los resultados obtenidos en el bienio 2021-2022.

RESULTADOS 2021-2022 Y DISCUSIÓN

Vigilancia de casos humanos:

En los años 2021 y 2022 se han recibido un total de 1.180 muestras clínicas, cuyo tipo y número se recogen en la Tabla 1, donde también se indica el número de muestras clínicas que resultaron positivas y negativas para leishmaniasis. El procedimiento diagnóstico realizado por el LLEC para el análisis de las muestras fue la PCR específica para *Leishmania* (Chicharro y col, 2023), salvo las muestras de suero y plasma que se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Los resultados obtenidos indican que el número de casos de leishmaniasis en la CM durante los años 2021 y 2022 fueron similares a los observados en los años inmediatamente anteriores, pero superiores a los observados en los años previos al brote comunitario de leishmaniasis. Además, parece que la tendencia del número de casos de leishmaniasis en la CM es a aumentar, ya que en los primeros 6 meses de 2023 hemos detectado tantos casos de leishmaniasis como en todo 2021.

Tabla 1.

TIPO DE MUESTRA CLINICA (test diagnóstico)	AÑO			
	2021		2022	
	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
ASPIRADO MÉDULA ÓSEA (PCR)	13	112	11	132
BIOPSIA CUTANEA (PCR)	24	132	18	121
SANGRE COMPLETA (PCR)	17	178	17	221
SUERO / PLASMA (IFI)	12	79	7	68
OTRAS MUESTRAS (ganglio, cerebro, orofaringea, hepática) (PCR)	1	8	1	8
Total	67	509	54	550

La Tabla 2 recoge la distribución por hospital de los pacientes con sospecha de leishmaniasis cuyas muestras fueron enviadas al LLEC. Los resultados muestran que existe una alta tasa de transmisión del parásito en toda la región. Se puede observar que hay un número importante de casos de leishmaniasis en el H. U. de Fuenlabrada, en la zona del brote comunitario, pero en los años 2021 y 2022 los casos aparecen distribuidos por hospitales de toda la CM, lo que justifica la ampliación de este programa de vigilancia a toda la región.

Tabla 2.

Hospital	AÑO			
	2021		2022	
	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
Fundación Hospital Alcorcon	4	13	1	9
Fundación Jimenez Diaz	5	13	2	51
Hospital U. 12 de Octubre		1	1	1
Hospital C. D. Gomez Ulla	6	10	5	13
Hospital U. Clinico San Carlos	8	26		37
Hospital de El Escorial		2		3
Hospital U. de Fuenlabrada	8	82	7	63
Hospital U. de Mostoles	2	15	1	21
Hospital U. Gregorio Marañon				2
Hospital U. Infantil del Niño Jesus		10	2	4
Hospital U. Puerta de Hierro	4	87	6	64
Hospital U. Ramon y Cajal	11	78	12	116
Hospital U. de Getafe	1	24	1	23
Hospital U. de La Princesa	2	21	3	29
Hospital U. Principe de Asturias	2	5	3	10
Hospital U. Severo Ochoa	2	8	0	17
UR Salud UTE	12	114	10	87
TOTAL	67	509	54	550

Junto con el diagnóstico y confirmación de casos de leishmaniasis, durante 2021 y 2022 el LLEC ha mantenido el seguimiento de respuesta celular específica frente a *Leishmania* en cohortes de pacientes inmunodeprimidos de la zona del brote que habían sufrido leishmaniasis tal y como se describió en el informe anterior sobre los años 2012-2020. Este seguimiento ha permitido mantener la retirada de profilaxis secundaria en estos pacientes sin riesgo de recaídas. Además, en estos dos últimos años se ha incluido en este seguimiento nuevos pacientes inmunodeprimidos tratados de leishmaniasis de la CM que residen fuera de la zona del brote (Botana y col, 2021).

También se mantiene el aislamiento y crecimiento de cepas de *Leishmania* a partir de las muestras clínicas con el fin de realizar la caracterización molecular del parásito y establecer su susceptibilidad a los fármacos mediante ensayos *in vitro*.

Vigilancia del vector

Zona del brote: En 2021 se disecaron 348♀ de las 650♀ capturadas en Leganés y Fuenlabrada, detectándose **2 (0,6%) positivas en Leganés**. En 2022 se diseccaron 223♀ de las 231♀ capturadas en Fuenlabrada, Leganés y Getafe, hallándose **5 positivas** (2,2%), únicamente en **Fuenlabrada** (Tabla 3 y Tabla 4). Las 310♀ de *P. perniciosus* recolectadas por la CM y remitidas al LEM fueron estudiadas solamente por métodos moleculares (Tabla 4). En la Figura 1 se representan, desde 2012, las tasas de flebotomos infectados y el número de casos de leishmaniasis notificado.

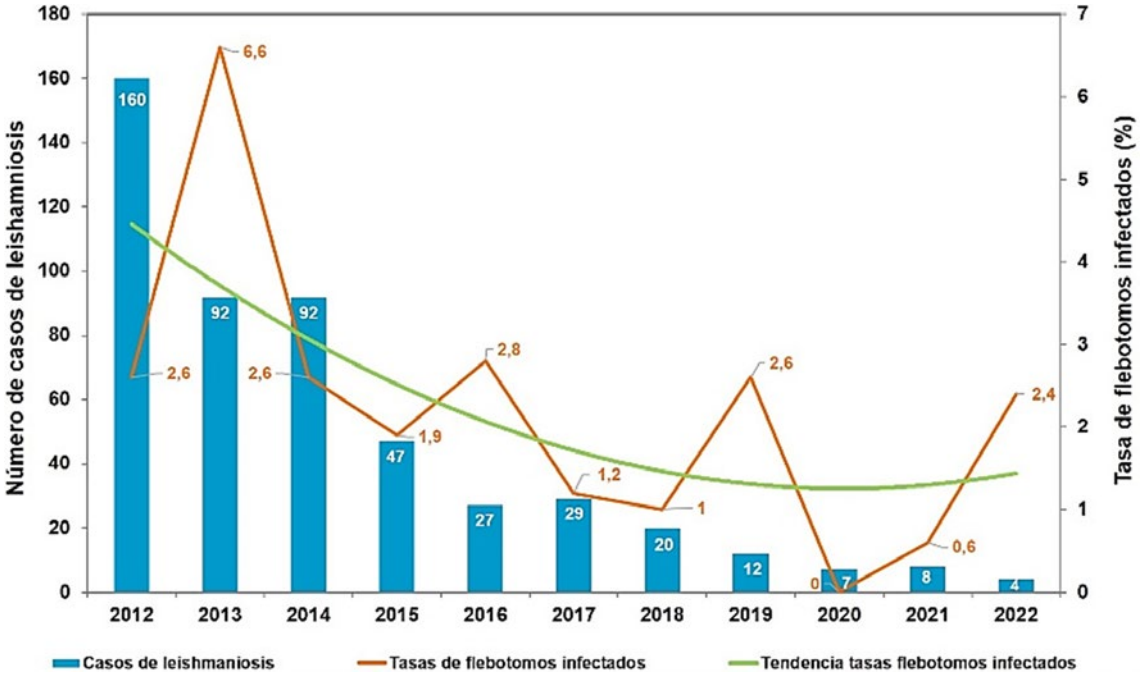
Zonas fuera del brote: En 2021 se disecaron 23♀ de las 38♀ capturadas en Móstoles y Parla, siendo **negativas**. En **Valdebebas** se disecaron 111♀ de 124♀ capturadas en 2021, encontrándose **3 (2,7%) positivas**. En 2022 se disecaron 98♀ de las 98♀ capturadas, resultando **1 (1%) positiva** (Tabla 3 y Tabla 4).

Tabla 3. Tasas de infección por *L. infantum*, mediante disección, en ♀ de *P. perniciosus* recolectadas.

Área de captura	Municipio	Phlebotomus perniciosus capturados (% de ♀) ♀ disecadas / ♀ positivas a Leishmania infantum (%)		
		2021	2022	TOTAL
Brote de Fuenlabrada	Fuenlabrada + Leganés	1837 (35,4%) 348 / 2 (0,6%)	943 (22,8%) 209 / 5 (2,4%)	**2780 (31,1%)** **557 / 7 (1,3%)**
	Getafe	-	98 (16,3%) 14 / 0 (0%)	**98 (16,3%)** **14 / 0 (0%)**
Fuera del brote	Móstoles	22 (50%) 11 / 0 (0%)	-	**22 (50%)** **11 / 0 (0%)**
	Parla	40 (67,5%) 12 / 0 (0)	-	**40 (67,5%)** **12 / 0 (0%)**
	Madrid (Valdebebas)	326 (38%) 111 / 3[a] (2,7%)	286 (34,3%) 98 / 1[b] (1%)	**612 (36,3%)** **209 / 4[c] (1,9%)**
TOTAL		**2225 (47'7%)** **482 / 5[a] (1%)**	**1327 (24,5%)** **321 / 6[b] (1,9%)**	**3552 (39%)** **803 / 11[c] (1,4%)**

[a] *n=1 L. infantum genotipo Lombardi+n=1 L. infantum genotipo A.*
[b] *n=1 L. infantum genotipo Lombardi.*
[c] *n=2 L. infantum genotipo Lombardi+n=1 L. infantum genotipo A.*

Figura 1. Tasas de *P. perniciosus* infectados por *L. infantum* y casos humanos de leishmaniasis.



En relación con los estudios moleculares, se analizaron 416♀ de *P. perniciosus*, capturadas ambos años, en los municipios afectados por el brote, con una tasa de infección por *L. infantum* del 2,6% (Tabla 4). En cuanto a los municipios ajenos al brote, se analizaron 14♀ de *P. perniciosus*, siendo todas negativas a *L. infantum* (Tabla 4).

Tabla 4. Tasas de infección por *L. infantum*, mediante PCR, en ♀ de *P. perniciosus* recolectadas.

Área de captura	Municipio	♀ de Phlebotomus perniciosus analizadas ♀ positivas a Leishmania infantum (%)		
		2021	2022	TOTAL
Brote de Fuenlabrada	Getafe	310 9[a] (2,9%)	17 0 (0%)	**327** **9[a] (2,8%)**
	Fuenlabrada + Leganés	23 **1** (4,3%)	65 **1** (1,5%)	**88** **2 (2,3%)**
	Humanes	-	1 0 (0%)	**1** **0 (0%)**
	TOTAL	333 **10** (3%)	83 **1** (1,2%)	**416** **11 (2,6%)**
Fuera del brote	Parla	3 0 (0%)	-	**3** **0 (0%)**
	Cubas de la Sagra	4 0 (0%)	-	**4** **0 (0%)**
	Madrid (Valdebebas)	6 0 (0%)	1 0 (0%)	**7** **0 (0%)**
	TOTAL	13 0 (0%)	1 0 (0%)	**14** **0 (0%)**
TOTAL		346 **10**[a] (2,9%)	84 **1** (1,2%)	**430** **11**[a] **(2,6%)**

[a] *n=3 Leishmania infantum genotipo Lombardi.*

Tabla 5. Identificación de la sangre ingerida y detección molecular de *L. infantum* en ♀ de *P. perniciosus* capturadas con sangre en sus tubos digestivos.

		♀ de Phlebotomus perniciosus analizadas ♀ positivas a Leishmania infantum (%)		
Año de captura		**2021**	**2022**	**TOTAL**
Fuente de alimentación	Conejo	31 0 (0%)	19 0 (0%)	**50** **0 (0%)**
	Liebre	1 0 (0%)	-	**1** **0 (0%)**
	Gato	2 0 (0%)	-	**2** **0 (0%)**
	Humano	3 1[a] (33,3%)	2 2 (100%)	**5** **3[a] (60%)**
	Sin identificar	4 0 (0%)	-	**4** **0 (0%)**
TOTAL		41 **1[a]** (2,4%)	21 **2** (9,5%)	**62** **3[a] (4,8%)**

[a] *n=1 Leishmania infantum genotipo Lombardi.*

El análisis molecular de la sangre ingerida realizado a 62♀ de *P. perniciosus* de los municipios muestreados, mostró que el 86,2% se había alimentado de sangre de conejo, el 1,7% de liebre y el 3,4% de gato. Ninguna de ellas se encontró infectada por *L. infantum*. Mención aparte merece la identificación de sangre de origen humano, pues se encontró en 5♀ de *P. perniciosus* (8,6%), de las que un 60% estaba infectado por *L. infantum* (Tabla 5).

Por último, cabe señalar que se han genotipado 7 aislados de *Leishmania*, perteneciendo 6 al genotipo Lombardi de *L. infantum*, tanto dentro como fuera de la zona del brote, y una al genotipo A de *L. infantum*, fuera del brote (Parque Forestal de Valdebebas).

Vigilancia de reservorios silvestres

En el informe anterior de 2012-2020 se indicaba que la baja seroprevalencia hallada en la población canina de la zona del brote hizo que dirigiéramos la vigilancia a identificar otros posibles reservorios del parásito, especialmente liebres y conejos, en los que se confirmó la infección en el 30% y 13% respectivamente de los animales y se demostró que eran capaces de transmitir el parásito a los flebotomos. El LLEC ha seguido realizando análisis de muestras biológicas de reservorios silvestres, potenciales y confirmados durante 2021 y 2022 y los resultados de infección

obtenidos para cada especie animal se recogen en la Tabla 6. Los datos muestran la presencia de parásitos en diferentes animales, pero cabe destacar la alta prevalencia observada en gatos, cuya capacidad como reservorio ha sido confirmada por otros autores, y que la prevalencia observada en conejos (14%) es similar a la observada en los años anteriores, lo que podría justificar que no se reduzca el número de casos humanos de leishmaniasis en la CM.

Tabla 6.

Animales estudiados	2021		2022	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Gatos	12	62	14	64
Ratas	8	20	0	5
Murcielagos	0	19	0	14
Conejos	*		31	210

* Muestras pendientes de análisis.

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos muestran que la incidencia de leishmaniasis humana sigue siendo alta, como en los años anteriores, y existe transmisión activa del parásito en toda la CM, no solo en la zona del brote. Los datos parciales de 2023 apuntan a un incremento de casos humanos en la región.
- Los datos contrastan con los obtenidos en 2020, donde no se hallaron hembras de *P. perniciosus* infectadas por disección, y evidencian que *L. infantum* sigue circulando entre flebotomos y lepóridos de la zona del brote.
- Se confirma la amplia circulación del genotipo Lombardi de *L. infantum* entre flebotomos, humanos y lepóridos, tanto en la zona del brote de leishmaniasis de Fuenlabrada como en zonas de la CM ajenas al mismo.
- Es destacable la detección del genotipo A de *L. infantum*, genotipo predominante en perros de la CM, en tan solo una hembra de *P. perniciosus* capturada en Valdebebas.
- El estudio de los reservorios animales confirma el papel de los conejos en la transmisión de Leishmania en la CM. También indica la alta prevalencia de infección en gatos callejeros, por lo que resulta necesario establecer su potencial papel en la transmisión del parásito.

- En conjunto, los datos obtenidos en 2021 y 2022 indican que el ciclo silvestre de la leishmaniasis permanece activo en la CM y sugieren la necesidad de continuar en los próximos años con la vigilancia de casos humanos, los muestreos entomológicos y de reservorios, dentro y fuera de la zona del brote.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Chicharro C, Nieto J, Miguelañez S, Garcia E, Ortega S, Peña A, Rubio JM, Flores-Chavez M. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis in Spain: Development and Validation of Ready-To-Use Gel-Form Nested and Real-Time PCRs To Detect Leishmania spp. Microbiol Spectr. 2023;11(3):e0335422. https://doi.org/10.1128/spectrum.03354-22
2. Molina R, Moreno J, Jiménez M, Nieto J, Carrillo E, Chicharro C. 2022. Programa de vigilancia de leishmaniasis humana en el Area-9 de la Comunidad Autónoma de Madrid. En: *Programas de Vigilancia Microbiológica del Centro Nacional de Microbiología* (JE Echevarría Mayo & J Oteo Iglesias, edits.). Edita: Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III – Ministerio de Ciencia e Innovación. Editorial MIC. N.I.P.O. e-pub: 834210318.
3. González E, Molina R, Iriso A, Hernández S, Ruiz S, Aldea I, Fernández D, Tello A, Jiménez M. Opportunistic feeding behavior and *Leishmania infantum* detection in *Phlebotomus perniciosus* females collected in the human leishmaniasis focus of Madrid, Spain (2012-2018). PLoS Negl Trop Dis. 2021; 15: e0009240. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009240
4. Botana L, Ibarra-Meneses AV, Sanchez C, Matia B, San Martin JV, Moreno J,Carrillo E. Leishmaniasis: A new method for confirming cure and detecting asymptomatic infection in patients receiving immunosuppressive treatment for autoimmune disease. PLoS Negl Trop Dis. 2021 ; 15:e0009662. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009662
5. Jiménez M, González E, Díaz-Regañón R, Iriso A, Molina R. Isolation and characterization of trypanosomatids from *Phlebotomus perniciosus* and *Sergentomyia minuta* collected in the northeast Madrid (en preparación).

Enfermedad de Chagas

Informe elaborado por: M. D. Flores Chavez[1,2], E. García Diez[1], J. Nieto Martínez[1,*] & Red de Laboratorios de Chagas de España

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

[2] Fundación Mundo Sano España.

[*] CIBER de Enfermedades Infecciosas. CIBERINFEC.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas (EC) es una infección parasitaria silente causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. En España, donde el vector que lo transmite no existe, este parásito ha sido transmitido de madre a hijo, por transfusión sanguínea, trasplantes de órganos y accidentes de laboratorio.

Es conveniente recordar que la evolución natural de la infección por *T. cruzi* implica 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 estado infectado o caso (Figura 1A). Siguiendo las recomendaciones tanto de la OMS como la OPS, cuando la infección está en fase aguda, el diagnóstico se realiza mediante el uso de técnicas parasitológicas, de preferencia en muestra de sangre completa en EDTA. En España, la técnica de elección para el diagnóstico de casos en fase aguda es: la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR). La población diana que está en riesgo de estar cursando esta fase son los niños nacidos de madres con serología positiva o personas con riesgo de reciente exposición (< 3 meses). Si la persona expuesta no es diagnosticada ni tratada en fase aguda, la infección progresa hacia la fase crónica, en cuyo caso la infección se confirma mediante la detección de anticuerpos IgG anti *T. cruzi*, utilizando al menos dos técnicas y principios distintos (Figura 1A).

La EC no es una enfermedad de declaración obligatoria, por lo que no existe un sistema de vigilancia. Por ello desde la ULeish-Cha se inició un Programa de Vigilancia de la enfermedad de Chagas (PVEC), que permite apoyar al Sistema Nacional de Salud (SNS) con herramientas de cribado y diagnóstico para determinar la preva-

lencia de la infección, determinar la parasitemia en los individuos afectados, apoyar programas de cribado de los hospitales del SNS, vigilar la transmisión por infección congénita, evaluar en red la comparabilidad de las herramientas tanto serológicas como moleculares y generar evidencia sobre las características de la epidemiología de la enfermedad de Chagas en España, para mayor información revisar la primera edición de este documento (1).

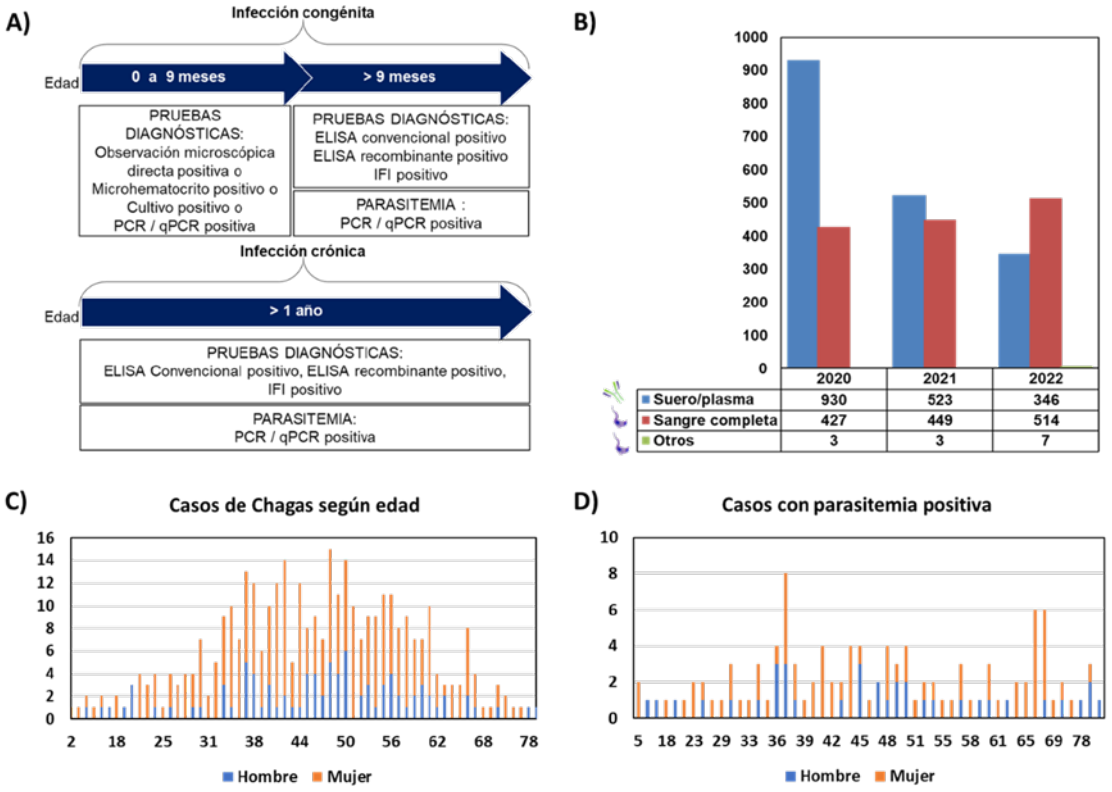
RESULTADOS 2021-2022 Y DISCUSIÓN

Cribado y confirmación

Como en otras enfermedades infecciosas, la pandemia Covid-19 implicó que el 2021 y 2022 se realizaran un menor número de determinaciones de Chagas, 975 y 867, respectivamente (Figura 1 B). Consideramos que la tendencia a la disminución fue consecuencia de la ausencia de las campañas de cribados comunitarios (cribado activo), especialmente en Madrid, por su incompatibilidad con las recomendaciones de control de la Covid-19.

Es interesante mencionar que se recibieron muestras de mujeres 2.8 veces más que la de hombres (1825 vs 425, respectivamente, Figura 1C), sugiriendo que se mantuvieron los programas de cribados en las mujeres embarazadas, aunque con estos datos no se puede valorar la cobertura de los mismos.

Figura 1. A) Definición de caso y pruebas de diagnóstico / detección de la parasitemia. B) Muestras analizadas en el periodo 2020 a 2022 en la ULeish-Cha. C) Frecuencia de casos según edad. D) Frecuencia de casos que presentan parasitemia según edad.

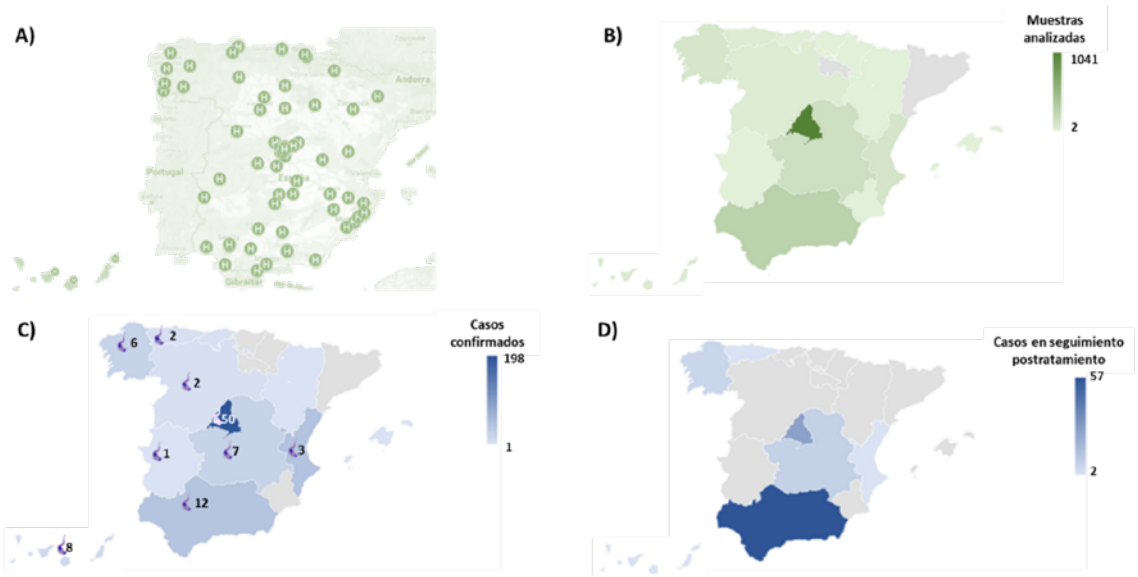


Como se observa en la Figura 1B, el número de muestras de suero y sangre del 2021 y el 2022 fueron muy similares, a diferencia de los años anteriores, en los cuales la demanda del análisis serológico siempre fue mayor. Ya en 2010 se observó una disminución de la demanda de detección de Chagas, debido a que muchos hospitales incorporaron en su rutina la prueba de cribado para Chagas (1), la pandemia Covid-19 motivó a los centros que aún no lo habían hecho, por ello en los últimos años, el PVEC tiende a apoyar en la confirmación de casos previamente detectados y en la resolución de problemas de discrepancias, cuando los hospitales realizan las dos pruebas serológicas recomendadas por la OMS.

Por cercanía, apoyamos principalmente a los hospitales de la Comunidad de Madrid (Figura 2A), por ello analizamos un mayor número de muestras de esta Comunidad (Figura 2B), en consecuencia, detectamos un mayor número de personas afectadas que residen en Madrid. Dependiendo del circuito de cada centro, tras la confirmación serológica apoyamos en la detección de la parasitemia (Figura 1D y 2C) y seguimiento postratamiento (Figura 2D). Dada la procedencia de las muestras que analizamos, observamos mayor parasitemia en personas que residen en

Madrid (Figura 2C). Sin embargo, es en Andalucía donde residen el mayor número de personas que han recibido tratamiento tripanocida. La diferencia entre diagnosticados y tratados (Figuras 2C vs 2D) puede deberse al tiempo que transcurre desde el diagnóstico hasta el inicio del tratamiento, que en algunos casos puede alcanzar un año y que los intervalos de controles postratamiento varían de centro a centro, pudiendo transcurrir un año más, una vez finalizado el tratamiento. La ventaja de contar con la qPCR para la detección de la parasitemia permite demostrar que en España están residiendo personas susceptibles de recibir tratamiento, por lo que se debe reactivar los programas de detección activa. Debe llamarnos la atención que el número de personas mayores de 50 años con parasitemia positiva no es despreciable (Figura 2D), podría estar reflejando el retraso en el ofrecimiento del tratamiento tripanocida y el riesgo de progresión a formas clínicas severas.

Figura 2. A) Mapa indicando los hospitales que solicitaron las determinaciones de Chagas en 2021 y 2022. B) Mapa de calor que indica el número de muestras que fueron analizadas en el periodo antes indicado. C) Mapa de calor que muestra la distribución de los casos de Chagas confirmados, a la vez que describe el número de personas con parasitemia positiva mediante qPCR, n al lado de la forma tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*. D) Mapa de calor que muestra el número de personas que se encuentran en seguimiento postratamiento.

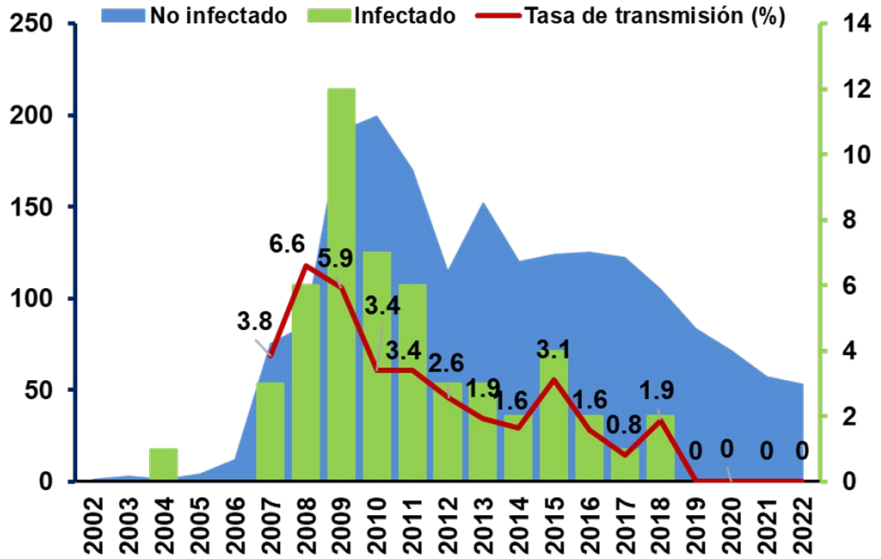


Es conveniente mencionar que nuestros resultados no reflejan la situación de la EC en Cataluña y Murcia, debido a que estas regiones han implementado todos los recursos necesarios para realizar el cribado, la confirmación, detección de la parasitemia y seguimiento postratamiento.

Detección de la infección congénita

Como se observa en la Figura 3, la detección de la infección congénita se mantiene en cero, si bien se observa también una disminución del número de niños en seguimiento, sugiriendo una caída paulatina de la cobertura de detección que debe motivarnos a revisar las estrategias de cribado en la mujer embarazada.

Figura 3. Seguimiento de la detección y la tasa de infección congénita.



Evaluación de una prueba monotest basada en quimioluminiscencia

La pandemia Covid-19 obligó al CNM a focalizar esfuerzos en su control, por ello centros con una población de riesgo reducida se plantearon introducir una prueba de cribado basado en quimioluminiscencia y formato monotest (Chagas Virclia® IgG+IgM, Vircell, España). En este contexto, desde el PVEC se ha apoyado en el diseño y la realización del estudio. Este trabajo conjunto permitió evaluar a la vez un nuevo recurso serológico basado en antígenos de excreción-secreción de *T. cruzi* (TESA Virclia® IgG+IgM, Vircell, España). La sensibilidad del primer monotest fue del 98% y del segundo 92%, estos datos sostienen que la prueba Chagas Virclia® cumple los criterios para constituirse en una herramienta de cribado serológico, mientras que TESA Virclia® parece tener mayor utilidad como recurso de confirmación y discriminación de reacciones cruzadas, quedando pendiente su evaluación a mayor escala en la detección de la caída de anticuerpos maternos en los bebés no infectados o tras el tratamiento. Por el contrario, fue notable la especificidad eleva-

da de ambos ensayos, ya que presentaron baja reactividad cruzada con muestras de pacientes con leishmaniasis, fuente principal de reacciones falso-positivas cuando se utilizan pruebas basadas en antígenos totales (2).

Red de laboratorios de Chagas en España y comparabilidad de pruebas

Continuando la serie de reuniones científico-técnicas que se iniciaron en 2018, el año 2021, se celebró el IV encuentro de la Red de Laboratorios de Chagas, en el que se presentaron los resultados del segundo ejercicio de comparabilidad de pruebas serológicas utilizando un nuevo panel de sueros del Programa Nacional de Control de Calidad de Brasil (PNCQ) y los estándares de la OMS. En este estudio se sumaron un laboratorio de Francia y otro de Italia (Figura 4A). Los resultados obtenidos mostraron que la quimioluminiscencia es la prueba predominante en el 86% de los laboratorios que participaron. Se compararon 2 pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI), 5 ELISAs, 3 pruebas rápidas (ICT), 4 sistemas de quimio/electroluminiscencia (CLIA) y un *Western Blot*. La prueba que presentó mayor sensibilidad analítica fue un ECLIA (Figura 4B). Al concluir el análisis de resultados, algunas pruebas fueron descatalogadas por sus fabricantes, un ELISA con antígenos totales y dos ICTs. Comparando los resultados de este segundo ejercicio con los del primero (1), podemos sugerir que es necesario evaluar periódicamente la comparabilidad de las técnicas disponibles en España y Europa. Estas diferencias de reactividad (Figura 4B), nos muestra la dificultad en la confirmación de muestras con niveles de anticuerpos próximos a la línea de corte y nos invita a seguir profundizando sobre el papel de los recursos serológicos que disponemos.

Figura 4. A) Distribución geográfica de los centros que participan en la Red de Laboratorios de Chagas. B) Comparación de la sensibilidad analítica de las diferentes pruebas serológicas disponibles en el año 2021.

A)

B)

	SUERO DE MODERADA REACTIVIDAD	SUERO DE BAJA REACTIVIDAD	SUERO OMS (186) 1	SUERO OMS (188) 2
1/1	ELISA Vircell	Liaison, Virclia	ELISA Vircell	
1/2		ELISA CNM, ELISA Diapro	ICT Operon, Virclia	ELISA Vircell
1/4	Virclia, IFI CNM	IFI CNM, Ortho, Lisado Wiener, WB LdBIO	ELISA CNM, Liaison	ICT Operon, Virclia
1/8	ICT Sd Bioline, ICT Operon, IFI Vircell, ELISA CNM, Chagatest, Liaison	IFI Vircell, Chagatest	IFI CNM, Ortho, Lisado Wiener, ELISA Diapro	IFI CNM, ELISA CNM, ELISA Diapro, Liaison
1/16	IFI Vircell, Ortho, Architect/Alinity	ICT Sd Bioline, ICT Cypress, Architect/Alinity	IFI Vircell, Chagatest, WB LdBIO	ICT Sd Bioline, IFI Vircell, Ortho, Lisado Wiener, WB LdBIO
1/32	**Lisado Wiener, ELISA Diapro**		**Architect/Alinity**	**ICT Cypress, Chagatest**
1/64	**ICT Cypress, Elecsys, WB LdBIO**	**Elecsys**	**ICT Sd Bioline, ICT Cypress, Elecsys**	**Architect/Alinity, Elecsys**

CONCLUSIONES

- La demanda de determinaciones serológicas ha disminuido a niveles similares a los de la demanda de la detección de parasitemia. Como el cribado serológico se realiza en los hospitales del SNS, el PVEC apoya en la confirmación del diagnóstico, resolución de discrepancias y el seguimiento postratamiento.
- Si bien el cribado serológico en mujeres se ha mantenido, el tratamiento no está siendo ofrecido en igual medida. En España residen personas con parasitemia detectable, por lo que persiste el riesgo de transmisión y progresión de la enfermedad hacia sus formas de mayor severidad.
- La tasa de transmisión congénita se mantiene al 0%, es importante reforzar la vigilancia microbiológica para verificar este resultado y su consistencia.
- En la actualidad, la técnica de detección de anticuerpos predominante en España es la quimio/electroluminiscencia. La evaluación periódica de la comparabilidad de técnicas permite comprender los factores asociados a las discrepancias y valorar las opciones de combinación entre ellas.
- Mediante la colección de muestras del PVEC se puede evaluar las nuevas tecnologías en desarrollo. Los estudios en red permiten determinar el potencial de cada recurso y clasificar su uso como herramienta de cribado,

confirmación y seguimiento de la caída de los niveles de anticuerpos en el seguimiento de los niños nacidos de madres positivas o tras el tratamiento.

- En el contexto actual, son recomendables para el cribado serológico las técnicas de ELISAS basados en antígenos recombinantes y las pruebas basadas en quimioluminiscencia/electroluminiscencia. Es mejor reservar los ICTs, la IFI, los ELISAs con antígenos totales y el *Western Blot* como técnicas confirmatorias.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. Flores-Chavez M *et al.* Programa de Vigilancia de la Enfermedad de Chagas. En: Echevarría Mayo, JE; Oteo Iglesias, J (Editores). Centro Nacional de Microbiología. Programas de Vigilancia Microbiológica. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2021. http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=08/02/2022-fc27d35665
2. García-Bermejo, I, Arana, DM, Zaragoza Vargas, G, Carrasco Fernández, B, García, E, Nieto, J, & Flores-Chávez, MD. Evaluation of the Chagas VirClia® and Chagas TESA VirClia® for the Diagnosis of Trypanosoma cruzi Infection. Pathogens. 2022; 12(1), 50. https://doi.org/10.3390/pathogens12010050

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 (CB21/13/00105), Instituto de Salud Carlos III.

INTRODUCCIÓN

La resistencia antifúngicos está aumentando habiendo sido reconocido recientemente por la OMS como un problema importante publicando la lista de patógenos fúngicos prioritarios.

Actualmente se dispone de tres familias de antifúngicos para el tratamiento de la infección fúngica invasora: los polienos, los azoles y las equinocandinas. 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 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 *C. albicans, C. krusei, C. parapsilosis,* y *C. glabrata,* y además se espera que aparezca principalmente en los próximos años con la generalización de su uso.

El programa de Vigilancia de la Resistencia a los antifúngicos se inició en el año 2014 con resultados ya publicados desde su inicio hasta el año 2020 en el volumen anterior de esta serie. El principal objetivo de este programa 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.

Continuando con el mismo diseño, se han analizado cepas aisladas de pacientes con sospecha de Infección fúngica, que puedan ser resistentes a los antifúngicos. Las especies incluidas en este programa son: los complejos de *Aspergillus fumigatus, Aspergillus terreus, Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Candida albicans, Candida parapsilosis, Candida glabrata, Candida krusei y Candida tropicalis*.

En el laboratorio de referencia e investigación en Micología 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 caracteriza el mecanismo de resistencia mediante amplificación y secuenciación de genes ya descrito e implicados en resistencia como son *ERG11* y *FKS* para especies de *Candida* y *cyp*51 en especies de *Aspergillus*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este informe se incluye una actualización de los resultados obtenidos entre los años 2021 y 2022.

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

Especie	2021	2022	Total
Candida albicans	13	19	32
Candida glabrata	19	16	35
Candida krusei	1	3	4
Candida parapsilosis	145	209	354
Candida tropicalis	9	9	18
Otras especies de *Candida*	8	10	18
Aspergillus flavus	14	17	31
Aspergillus fumigatus	106	77	183
Aspergillus niger	4	14	18
Aspergillus terreus	23	24	47
Otras especies de *Aspergillus*	37	52	89
Total	379	450	829

Además, se recibieron por el programa de vigilancia un total de 43 cepas pertenecientes a especies no incluidas en el mismo y cuyo estudio molecular no se realizó.

Tabla 2. Distribución por comunidades autónomas.

Comunidad autónoma	2021	2022	TOTAL
Andalucia	15	80	95
Aragon	4	5	9
Canarias	11	22	33
Cantabria	19	32	51
Castilla La Mancha	14	8	22
Castilla y Leon	22	33	55
Cataluña	76	19	95
Comunidad de Madrid	236	247	483
Comunidad Foral de Navarra	3	1	4
Comunidad Valenciana	2	7	9
Extremadura	0	1	1
Galicia	3	1	4
Islas Baleares	0	12	12
Pais Vasco	2	2	4
Principado de Asturias	1	4	5
Total	408	474	882

Análisis de resistencia

De acuerdo a los puntos de corte definidos por EUCAST las cepas se clasificaron como sensibles y resistentes.

Resistencia a polienos

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. Diez cepas de *Aspergillus fumigatus* fueron resistentes a anfotericina B, nueve [90%] con CMI= 2mg/L una dilución por encima del punto de corte).

Resistencia a los azoles

Tabla 3. Número y porcentaje (%) de cepas resistentes en cada año de las distintas especies de *Candida* incluidas en el programa con puntos de corte disponibles según EUCAST.

	2021	2022	TOTAL
Candida albicans	3 (23,1)	4 (21,1)	7 (21,9)
Candida glabrata	3 (15,8)	7 (43,75)	10 (28,6)
Candida parapsilosis	102 (70,3)	181 (86,6)	283 (79,9)
Candida tropicalis	2 (22,2)	2 (22,2)	4 (22,2)
Total	110 (56,4)	194 (72,9)	304 (65,9)

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

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

Especie*	2021	2022	TOTAL
A. fumigatus	10 (9,4)	10 (12,9)	**20 (10,9)**
A. flavus	0 (0)	7 (41,2)	**7 (22,6)**
A. terreus	6 (26,1)	12 (50)	**10 (19,2)**
Total	14 (28,6)	8 (11,4)	(38,3)

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

Resistencia a equinocandinas

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

	2021	2022	TOTAL
Candida albicans	2 (15,4)	1 (5,3)	3 (9,4)
Candida glabrata	2 (10,5)	7 (43,8)	9 (25,7)
Candida tropicalis		1 (11,1)	1 (5,6)
Total	4 (2,1)	9 (3,4)	13 (2,8)

Caracterización de los mecanismos de resistencia:

Se describen a continuación las mutaciones encontradas en el gen *cyp51*A y su promotor principalmente en cepas de *C. parapsilosis* y *A. fumigatus* resistentes a azoles y en los hot spot (HS) de los genes *FKS* de las cepas de *Candida glabrata* resistentes a equinocandinas.

En relación a la resistencia a equinocandinas en cepas de *C. glabrata* únicamente se analizó una cepa que presentó la mutación P667H en el HS1 del FKS2.

Tabla 6. Resumen de mecanismos de resistencia encontrados en cepas de *C. parapsilosis* resistentes a los azoles.

AÑO	Mecanismo de resistencia	Número de cepas analizadas	Comunidad autónoma
2021	Y132F	93	Cantabria, Castilla y León, Cataluña y Madrid
	G458S	1	Andalucia y Madrid
	Sin mutación	4	Castilla y León, Cataluña y Madrid
2022	Y132F	112	Cantabria, Castilla y León, Cataluña y Madrid
	G458S	64	Andalucia y Madrid
	Sin mutación	4	Castilla y León, Cataluña y Madrid

Tabla 7. Resumen de mecanismos de resistencia encontrados en cepas de *A. fumigatus* resistentes a los azoles.

Número de cepas analizadas	Mecanismo de resistencia	Tipo de resistencia	Comunidad autónoma
12	TR+L98H	Resistencia cruzada a azoles	Andalucía, Cataluña y Madrid
1	TR46/Y121F/T289A	Resistencia cruzada a azoles	Madrid
1	5SNPs	Resistente a posaconazol	Andalucía
5	Sin mutaciones en *cyp51*A	Resistencia cruzada a azoles (4) y resistente a posaconazol (1)	Andalucía, Galicia y Madrid

CONCLUSIONES

- La adherencia al programa ha seguido incrementando.

- Según la representación territorial, Madrid sigue siendo la comunidad autónoma que más cepas envía por este programa.
- El 2,8% de las cepas de *Candida* con puntos de corte disponibles fueron resistentes a equinocandinas.
- Se observa un fuerte incremento de la resistencia a los azoles en *Candida* que ha pasado de un 25% en el año 2020 a 56,4% y 72,9% en los años 2021 y 2022 respectivamente.
- Hay que señalar que entre los años 2021 y 2022 y asociado a la pandemia de COVID-19 (descrito en la plublicación Trevijano-Contador *et al.*), se han descrito múltiples brotes de *C. parapsilosis* causados por cepas no sensibles al fluconazol y con resistencia cruzada a otros azoles.
  - Los resultados de la caracterización molecular mostraron que la mutación Y132F en el gen ERG11 *de C. parapsilosis* es la mayoritaria.
  - Entre el año 2021 y 2022 se ha visto un aumento de aislamientos con la mutación G458S que además se localiza hasta el año 2022 en dos hospitales diferentes en España (Hospital de Móstoles de Madrid y Hospital Virgen del Rocío de Sevilla).
  - Las cepas que albergaban la mutación G458S son más resistentes a los azoles que las que tenían Y132F, en particular, al voriconazol y al isavuconazol.
- La resistencia a azoles en *Aspergillus* se ha mantenido estable o disminuido en porcentaje, pero el número de cepas resistentes ha sido mayor.
- El mecanismo de resistencia TR34+L98H en *A. fumigatus* es el más frecuentemente encontrado (60%) en las cepas resistentes, pero hay cepas con otros mecanismos de resistencia y otras sin mecanismos de resistencia conocidos.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. 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 Dec;17(12):e383-e392.
3. 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.

4. Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Rivero-Menéndez O, et aI. Molecular Identification and Susceptibility Testing of Molds Isolated in a Prospective Surveillance of Triazole Resistance in Spain (FILPOP2 Study). Antimicrob Agents Chemother. 2018 Aug 27;62(9):e00358-18.

5. Trevijano-Contador N, Torres-Cano A, Carballo-González C, Puig-Asensio M, Martín-Gómez MT, Jiménez-Martínez E, Romero D, Nuvials FX, Olmos-Arenas R, Moretó-Castellsagué MC, Fernández-Delgado L, Rodríguez-Sevilla G, Aguilar-Sánchez MM, Ayats-Ardite J, Ardanuy-Tisaire C, Sanchez-Romero I, Muñoz-Algarra M, Merino-Amador P, González-Romo F, Megías-Lobón G, García-Campos JA, Mantecón-Vallejo MÁ, Alcoceba E, Escribano P, Guinea J, Durán-Valle MT, Fraile-Torres AM, Roiz-Mesones MP, Lara-Plaza I, de Ayala AP, Simón-Sacristán M, Collazos-Blanco A, Nebreda-Mayoral T, March-Roselló G, Alcázar-Fuoli L, Zaragoza O. Global Emergence of Resistance to Fluconazole and Voriconazole in Candida parapsilosis in Tertiary Hospitals in Spain During the COVID-19 Pandemic. Open Forum Infect Dis. 2022 Nov 7;9(11):ofac605. doi: 10.1093/ofid/ofac605. PMID: 36467290; PMCID: PMC9709632.

Brotes epidémicos estudiado en el Centro Nacional de Microbiología durante el periodo 2019-2023

Informe elaborado por G. Fedele, M. Gonzalez Esguevillas, M. C. Perea Fernández

Área de Orientación Diagnostica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III.

El control de los brotes infecciosos es una urgencia en Salud Publica que requiere conocimiento científico, capacidad de gestión, manejo de situación de crisis y capacidad de intervención y resolución.

El objetivo final de la notificación y de la caracterización de un brote es obtener información sobre su etiología y/o factores que favorecen la situación epidemiológica con el propósito de adoptar medidas de control y prevención. Por otro lado, los brotes suelen contener una componente de alarma social qué puede alterar el manejo de las situaciones.

Durante los últimos años ha habido un creciente interés por los brotes de enfermedades infecciosas. La pandemia por SARS-CoV-2, así como las distintas situaciones epidemiológicas que se han presentado en los últimos 20 años causadas por patógenos como como **SARS-CoV,** gripe A, MERS-Coronavirus, virus Chikungunya, virus Ébola, virus Zika, monkeypox virus han mostrado la dificultad de controlar epidemias de incidencia muy alta sin una colaboración y coordinación entre los servicios de salud pública y atención primaria. También la aparición de brotes de infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria (IRAS) es un problema creciente en la mayoría de los países debido al aumento del uso de antimicrobianos, a la aparición y aumento de microorganismos multirresistentes (MMR) y al bajo cumplimiento, en muchas ocasiones, de las medidas de control y prevención de la transmisión de infecciones por parte del personal sanitario.

Varios factores están contribuyendo en el aumento de la aparición de brotes infecciosos:

- El comportamiento humano afecta a la transmisión y a la demografía de las infecciones

- Los cambios climáticos o medioambientales pueden aumentar la incidencia de las enfermedades infecciosas alterando los ciclos de vida de los patógenos o de los reservorios o vectores animales.
- Las enfermedades infecciosas que son frecuentes en una región geográfica pueden introducirse en otra por el aumento de los viajes o el desplazamiento de animales, invertebrados o aves infectados.
- Las presiones selectivas ejercidas sobre las bacterias por el uso tan extendido de los antibióticos.

Aunque los modelos de estudio de transición epidemiológica pretenden explicarnos que ha habido un cambio de los patrones de salud y enfermedad y que hay predominio de las enfermedades no trasmisible, la diversidad y el número de brotes infecciosos ha aumentado en las últimas décadas, así como la debilidad del servicio de salud pública y de la sociedad en general.

Con el objeto de notificación e investigación urgente, se considera brote epidémico cualquiera de las siguientes situaciones:

- La aparición de dos o más casos de la misma enfermedad asociados por características de tiempo, lugar o persona.
- El aumento significativo de casos en relación a los valores esperados.
- El acumulo de casos de una enfermedad en un territorio y en un tiempo comprendido entre el mínimo y el máximo de su período de incubación o latencia.
- La aparición de una enfermedad, problema o riesgo para la salud en una zona hasta entonces libre de ella.
- La presentación de uno o más casos de enfermedades importadas con capacidad de transmisión.
- La presencia de cualquier proceso relevante de intoxicación aguda colectiva, imputable a causa accidental, manipulación o consumo.
- Incidentes, naturales o intencionados, que constituyen un riesgo para la salud pública por la aparición de casos relacionados con ese incidente.

Una de las principales actividades del Centro Nacional de Microbiología (CNM) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) se basa en apoyar al Sistema Nacional de Salud en el control y prevención de las enfermedades infecciosas. Por ello el CNM no solo ofrece un apoyo científico y técnico a través de sus programas de vigilancia que siguen la directriz de European Center for Disease Control and Prevention (ECDC), sino también realiza una caracterización de brotes epidémicos notificados

desde los servicios de epidemiologia de las Consejería de Sanidad de las comunidades autónomas (CC. AA.). Esto garantiza una vigilancia más exhaustiva para poder detectar en tiempo real posible infecciones emergente o reemergente o nuevas variantes problemáticas de microorganismos o nuevos patógenos.

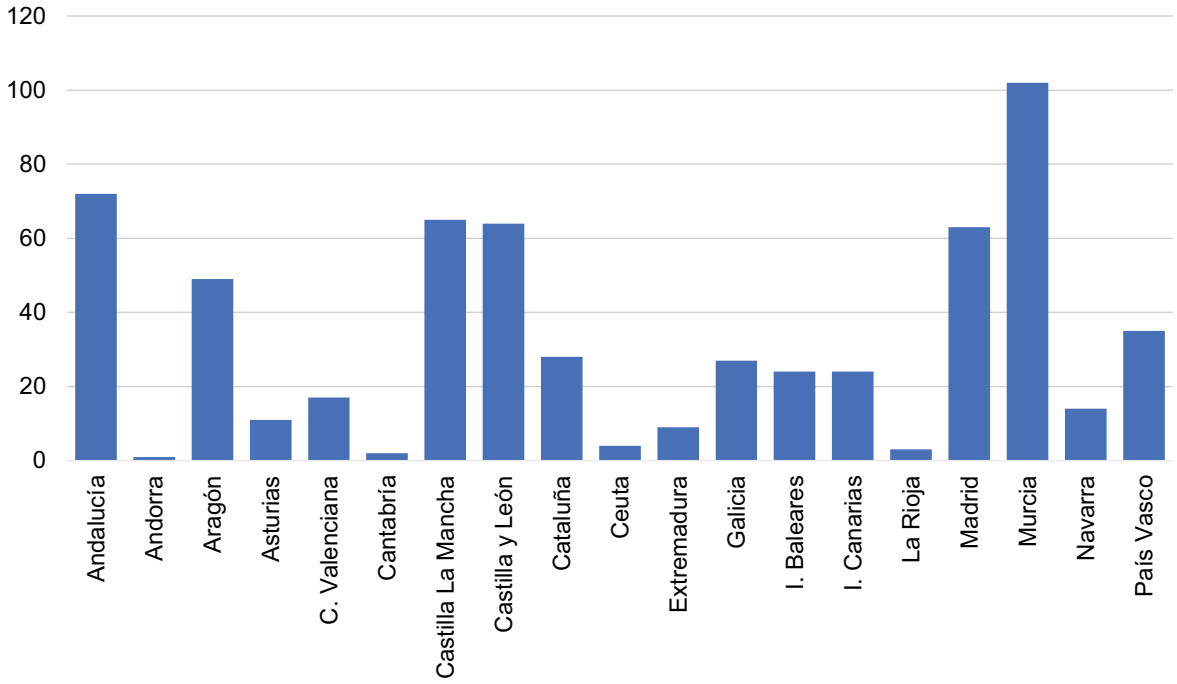
Desde el año 2010 el CNM, a través del Área de Orientación Diagnostica, gestiona la recepción de muestras clínicas o cepas asociadas a brote epidémico que provienen de los laboratorios de microbiología clínica y de salud pública del SNS. El CNM gestiona la entrada de todas las muestras clínicas o cepas a través de la aplicación web GIPI, exclusiva del Instituto de Salud Carlos III, que permite poder recibir peticiones analíticas desde laboratorios externos, codificar de forma física la muestra clínica recibida mediante la lectura del código de barras de la petición y emitir informe de resultado vía WEB.

En el caso de brote, el laboratorio externo tiene que introducir un código facilitado por el Área de Orientación Diagnostica del CNM. El CNM codifica solo brotes que les vienen notificados por los servicios de epidemiología de la Consejería de Sanidad de la C. A. implicada. Esto garantiza que no solo el hospital o centro sanitario pueda recibir el informe de resultado vía WEB sino también los servicios de epidemiologia de las CC. AA. implicadas. Finalmente, el CNM se encarga de enviar al Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES) y al Centro Nacional de Epidemiología (CNE) del Instituto de Salud Carlos III y a la Consejería de Sanidad de la comunidad implicada el informe de brote detallado que incluye la relevancia sanitaria de los hechos, la metodología de laboratorio aplicada y los resultados y las conclusiones obtenidas por el laboratorio.

Como muestra la Figura 1 en el periodo comprendido entre el enero 2019-septiembre 2023 el CNM han estudiado un total de 614 brotes de distintas CC. AA..

Para la caracterización de los brotes se han realizado alrededor de 18.000 determinaciones diagnostica en muestras clínicas de distintas naturaleza o cepa/aislado de muestras clínica. Los métodos diagnostico utilizado han sido técnicas de detección molecular, técnica de detección de anticuerpos específicos, métodos de secuenciación genómica masiva, procedimientos de genotipificación y análisis filogenético del patógeno detectado, cultivo celular y bacteriano, caracterización fenotípica y genotípica de cepas bacteriana, caracterización molecular de nuevos mecanismos de resistencia.

Figura 1. Brotes estudiados por CC. AA. entre 2019 y 2023.

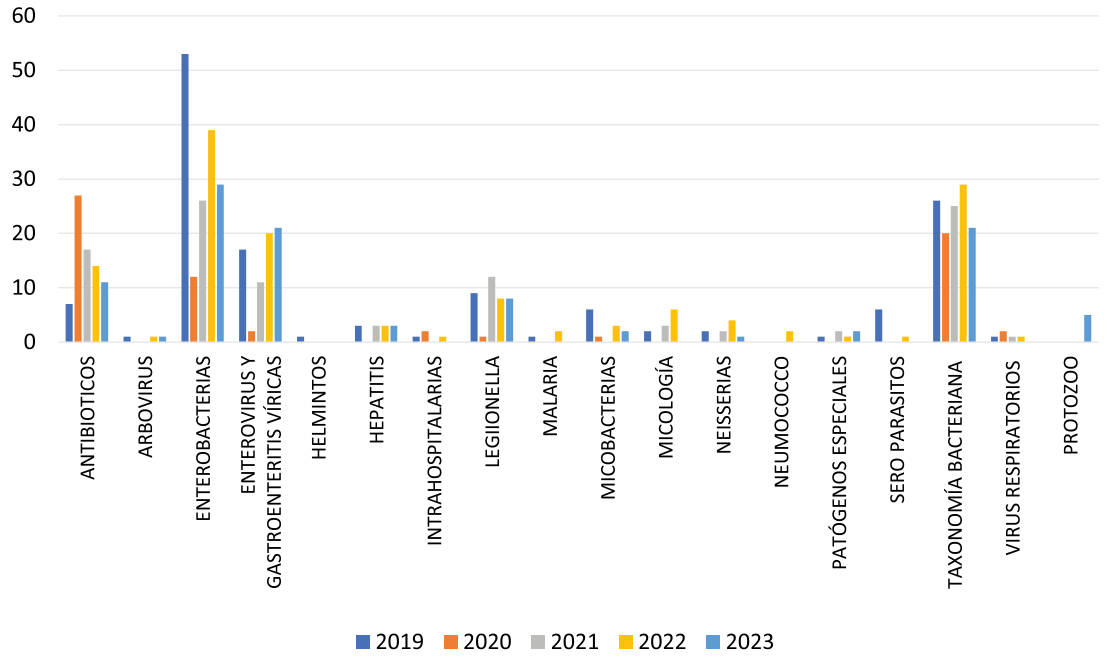


Si se analiza el origen de las notificaciones de brote puede observarse como estas proceden de todas las CC.AA., incluyendo también la ciudad autónoma de Ceuta. Solo para la ciudad autónoma de Melilla nunca se ha estudiado un brote. Según la representación territorial, los resultados muestran que Murcia, Andalucía y Madrid son las comunidades autónomas que con más frecuencia han requerido el estudio y caracterización de los brotes que han notificado. También Castilla la Mancha, Castilla Leon, Cataluña y País Vasco han solicitado el estudio de brotes de manera constante durante el periodo 2019-septiembre 2023.

Por lo tanto**,** las muestras tienen una aceptable representatividad geográfica que indica el amplio soporte científico técnico que el CNM ofrece al Sistema Nacional de Salud.

En la Figura 2 se muestra los Laboratorios de Referencia e Investigación del CNM que han realizado el estudio de los brotes de distinta etiología, presentación clínica y epidemiológica que la Consejería de Sanidad de las CC. AA. han notificado en el periodo enero 2019-septiembre 2023.

Figura 2. Laboratorios emisores de informes de brotes.



La Figura 3 representa el tipo de brote identificado por el CNM según la información inicial recibida desde los servicios de epidemiología de las CC. AA.. Destacan el número de brotes de salmonelosis, gastroenteritis de supuesta etiología vírica o asociado a infecciones por Rotavirus y Norovirus.

También hay que remarcar que en los último 5 años ha habido un aumento de notificación de brote intrahospitalario causado por bacilos gram-negativos multiresistente y definido prioritario como: *Acinetobacter spp, Pseudomonas spp y enterobacterias.*

Finalmente, destacamos algunos eventos epidémicos que el CNM ha estudiado en esto últimos 5 años aportando información de interés científico y técnica a los servicios de salud pública de las CC. AA. y al Ministerio de Sanidad:

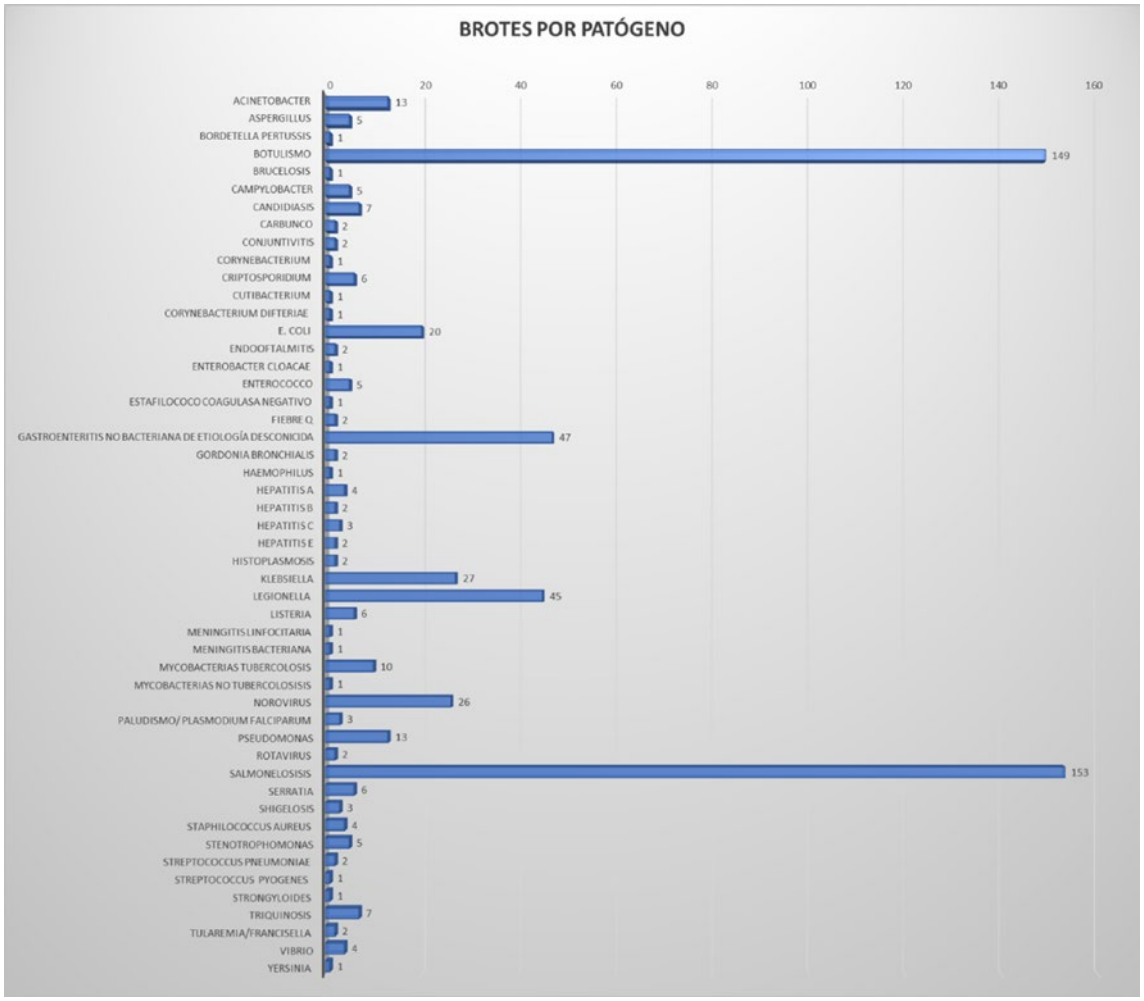
- En la fase previa a la pandemia por SARS-CoV-2 antes de la cuarentena (enero-14 marzo 2020), cuando la situación epidemiológica era todavía considerada como epidémica se realizaron estudio de casos de los primeros contagiado por la infección por SARS-CoV-2. Entre el 24 de enero del 2020, cuando se declaró el primer caso sospechoso y el 14 de marzo del mismo año (1 día antes de la cuarentena) se estudiaron alrededor de 2.000 casos de pacientes proveniente de las 17 CC. AA. y de las dos ciudades Autónomas de Ceuta y Melilla. Finalmente se estudiaron alrededor de 50.000 casos durante la cuarentena y todo el año 2020.

- Se estableció, mediante secuenciación genómica de las cepas, la relación clonal en el brote de listeriosis (*Listeria monocytogenes*) causado por consumo de carne mechada que se produjo en agosto-septiembre de 2019 en Andalucía. El CNM llevó a cabo la secuenciación de las cepas de los casos y del alimento mostrando una estrecha relación genética entre los aislados alimentarios, de superficie y clínicos, confirmando microbiológicamente el origen del brote.
- En el brote de Monkeypox virus entre mayo y agosto 2022 se han realizado estudios de caracterización para 18 de las 19 Comunidades y Ciudades Autónomas. El CNM estudió los casos clínicos y los posibles contactos y aportó información microbiológica importante sobre la variabilidad viral obteniendo la secuenciación completa del genoma del virus y confirmando que el monkeypox virus detectado en España pertenecía al clado **de África Occidental, identificado también en otros países europeo afectado por el brote.**
- Con el objetivo de realizar un seguimiento de la alerta dada por Reino Unido y en coordinación con todas las CC. AA., se han estudiado los casos de hepatitis aguda grave no filiada en menores de 16 años, que se estaban produciendo desde enero de 2022 y relacionados probablemente con un aumento de la incidencia de infección por adenovirus.

Se analizaron 60 casos y se realizó el diagnóstico diferencial para: Adenovirus, virus Hepatitis A, virus Hepatitis E, Astrovirus, Citomegalovirus, virus Epstein Barr, Norovirus, Rotavirus, parvovirus B19 Virus herpes 6, virus Herpes 7 virus varicela Zoster, Leishmania y Leptospira. Se ha detectado ADN de adenovirus en nueve casos. Siguen en marcha los estudios de secuenciación del genoma y genotipificación viral para poder establecer la posible asociación del virus con la forma de hepatitis no filiada.

- Diagnóstico y caracterización de infección por *Clostridium botulinum* de los casos, de declaración individual, asociado al brote del verano de 2023 debido al consumo de una marca comercial de tortilla de patada. El CNM estudió 14 casos principalmente provenientes de la comunidad de Andalucía. Se analizaron un total de 24 muestras clínicas y se detectaron 3 casos de infección por *C. Botulinum* asociado al consumo de tortilla.

Figura 3. Brotes estudiados por patógeno.



Respuesta rápida a alertas microbiológicas y crisis sanitarias

La Ley 33/2011, de 4 de octubre, General de Salud Pública en el punto 3 del artículo 13 contempla que «con el fin de coordinar los diferentes sistemas de vigilancia se creará la Red de Vigilancia en Salud Pública, que incluirá entre sus sistemas el de alerta precoz y respuesta rápida. Este sistema tendrá un funcionamiento continuo e ininterrumpido las veinticuatro horas del día». En este contexto, en 2013 se crea el Sistema de Alerta Precoz y Respuesta Rápida (SIAPR) del Ministerio de Sanidad con el objetivo principal de «detectar rápidamente aquellas amenazas y situaciones que puedan tener un impacto grave en la salud de la población, tengan capacidad de extensión en el territorio nacional y requieran la toma de medidas de forma rápida y coordinada, con el fin de prevenir la propagación y dar una respuesta de salud pública adaptada a la situación detectada». De acuerdo al SIAPR, la alerta es «la comunicación de un evento de salud pública de importancia nacional o internacional que requiere la implementación coordinada de medidas de control».

El Servicio de Respuesta Rápida del CNM (SRR) asegura la atención a solicitudes de determinaciones analíticas durante siete días a la semana con emisión de un resultado en menos de 24 horas tras la recepción de la muestra. La elección de las técnicas incluidas en la cartera de servicios del SRR corresponde a la Dirección del CNM y la puesta a punto y mantenimiento de dichas técnicas son responsabilidad de los laboratorios del CNM especializados en los diferentes patógenos incluidos, así como la realización e informe de las determinaciones durante el horario de trabajo y cualquier estudio adicional de confirmación, caracterización o investigación. El SRR actúa fuera del horario de trabajo en permanente coordinación con dichos laboratorios especializados.

La actividad general del CNM en la caracterización de brotes se describe en otro capítulo específico, así como los programas de vigilancia microbiológica frente a diferentes agentes en el resto de ellos. La COVID-19, inicialmente incluida en la cartera del SRR, dispone actualmente de un programa de vigilancia microbiológica específico, en cuyo capítulo se describen las actividades correspondientes. En el presente capítulo se ofrece una panorámica general del SRR para luego describir de manera específica los diferentes agentes infecciosos incluidos en su cartera.

Origen, funcionamiento y actividad del SRR del CNM

Informe elaborado por I. Jado, M. J. Buitrago, J. E. Echevarría, P. Anda, G. Fedele, L. Herrera, A. Vázquez, S. Vázquez, P. Villalón, B. Bailo, J. M. Berciano, C. García, M. González, L. Herrero, M. Molinero, I. Rodríguez, A. Vila-Coro

Servicio de Respuesta Rápida del Centro Nacional de Microbiología (CNM). Instituto de Salud Carlos III.

La necesidad de dar respuesta a las alertas microbiológicas nace en el año 2003 tras acontecimientos como el brote de SARS en el sudeste asiático y los ataques con carbunco en EEUU en el año 2001. En 2003 se organizó en el CNM un grupo de respuesta rápida compuesto por expertos en diferentes áreas, virologia, bacteriología, micología y parasitología. Sin embargo, el Sistema de Respuesta Rápida (SRR) actual surge en el año 2014 cuando aparece el brote de Enfermedad por Virus Ébola en África. Está compuesto por seis facultativos y seis técnicos de laboratorio que trabajan en parejas (facultativo-técnico) dando respuesta 7d/24h durante todo el año y actuando siempre fuera del horario laboral. La cartera de Servicios del SRR incluye virus respiratorios (SARS-CoV-1, MERS-CoV e inicialmente SARS-CoV-2), virus de nivel 4 (viruela y fiebres hemorrágicas virales), bacterias de nivel de riesgo biológico 3 (*Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*) y la toxina del ricino. Esta cartera de Servicios puede variar incorporando nuevos patógenos en función de la situación epidemiológica del momento.

Tabla 1. Determinaciones asociadas a alertas. 2014-2022.

BROTE / AÑO	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	Total determinaciones
MERS-CoV	-	47	38	23	6	9	-	-	2	125
EVE	180	26	-	-	-	-	-	-	2	208
CARBUNCO	-	14	10	25	6	5	3	0	4	67
LASSA	-	1	7	-	-	-	-	-	1	9
CCHF	-	-	101	26	11	13	51	28	16	246
Monkeypox	-	-	-	-	-	1	-	-	414	415
SARS-CoV-2	-	-	-	-	-	-	32.791	841		33.632
	180	88	156	74	23	28	32.845	869	439	34.702

El SRR se pone en marcha tras una llamada telefónica que puede llegar de diferentes instituciones: un Hospital del Sistema Nacional de Salud, el Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias (CCAES), departamentos de Salud Pública de cualquier Comunidad o Ciudad Autónoma, o, en alertas relacionadas con bioterrorismo a través la RE-LAB (red de laboratorios de alerta sanitaria). Tras recibir la llamada, si es fuera del horario laboral, el SRR debe gestionar la llegada de la muestra y realizar el diagnóstico en un tiempo máximo de 24h. Cuando las circunstancias así lo requieran, puede elaborarse un plan de contingencia que debe ser aprobado por el Director/a del CNM tal y como sucedió con la pandemia de SARS-CoV2 para dar apoyo al laboratorio que lo necesite en cada momento y apoyar al SNS. En la Tabla 1 se recoge el histórico de las determinaciones realizadas para la resolución de alertas por los laboratorios especializados en cada uno de los agentes, el SRR o los operativos especiales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sistema de alerta precoz y respuesta rápida. ministerio de sanidad, servicios sociales e igualdad. 2013. https://www.sanidad.gob.es/areas/alertasEmergenciasSanitarias/siapr/home.htm
2. Orden PCI/1381/2018, de 18 de diciembre, por la que se regula la Red de Laboratorios de Alerta Biológica «Re-Lab». BOE 26 de diciembre de 2018. https://www.boe.es/eli/es/o/2018/12/18/pci1381

Fiebres hemorrágicas víricas

Informe elaborado por M. P. Sánchez-Seco, A. Negredo, A. Vázquez, L. Herrero, F. Molero, M. Pérez-Olmedo, E. Calonge, P. Balfagón

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

La importancia sanitaria de las fiebres hemorrágicas virales (FHVs) viene dada por ser enfermedades con una alta tasa de letalidad y que, por la capacidad de transmisión persona-persona a través de contacto con líquidos o fluidos de pacientes infectados, ponen en riesgo la salud de los contactos de los pacientes entre los familiares y personal sanitario al cuidado de los pacientes. Siempre suponen una alerta sanitaria y cada caso sospechoso ha de ser urgentemente notificado a las autoridades de salud pública de la C. A. afectada.

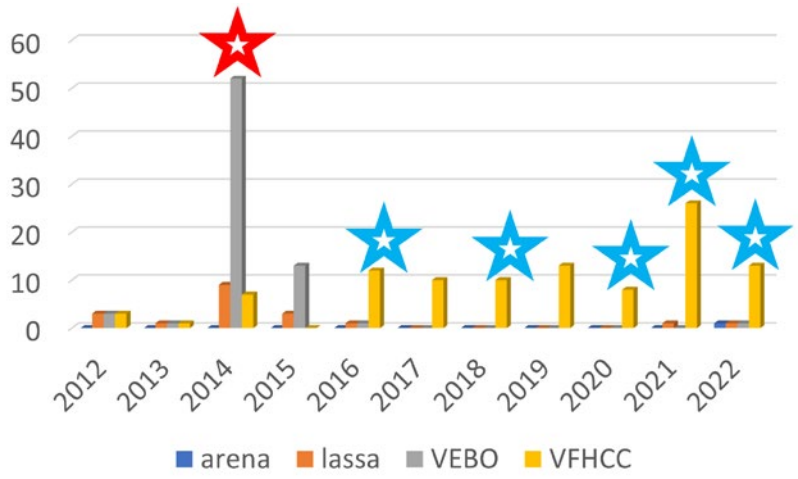
El diagnóstico de laboratorio se basa en técnicas de detección molecular, que no requieren instalaciones de clase 4 (todos los virus que producen FHVs son de nivel de bioseguridad 4), aunque el diagnóstico serológico puede ser complementario. Los expertos en este campo recomiendan la utilización de dos técnicas de PCR diseñadas en dianas no solapantes para evitar resultados falsos positivos o falsos negativos. La elección de esas técnicas es un paso decisivo ya que se trata de virus con ARN como genoma y son altamente variables. Hay aspectos de estos agentes poco estudiados ya que afectan a poblaciones pobres y su estudio requiere de instalaciones de alto nivel de seguridad biológica. Es crucial que los laboratorios que se dediquen a su diagnóstico estén sometidos periódicamente a controles de calidad (que no son accesibles de forma regular sino a través de redes internacionales o proyectos ad hoc) que permitan saber si las técnicas y procedimientos utilizados son adecuados y mantengan contacto con expertos internacionales que puedan asesorar en caso de necesidad. La preparación es de suma importancia.

El CNM lleva atendiendo sospechas de infección por estos agentes de forma regular desde 2012 aunque anteriormente ya se recibían peticiones esporádicas. En muchas ocasiones se solicita la detección de un único agente (virus Lassa -VL-, virus Ébola -VEBO- o virus de la Fiebre Hemorrágica de Crimea-Congo -VFHCC-) pero, debido a la inespecificidad de los síntomas y la distribución de estas enfermedades

que co-circulan en algunas zonas de África, ha habido ocasiones en las que se solicitan dos o tres de los virus de este grupo.

Haciendo una revisión temporal, podemos observar cómo las peticiones de diagnóstico han ido variando tras la aparición de brotes de enfermedad, habiendo marcado esta tendencia el gran brote de VEBO en África Occidental en 2014/2015 y la aparición de casos autóctonos de infección por VFHCC en España en 2016 (Figura 1).

Figura 1. Casos de sospecha de fiebres hemorrágicas virales analizados en el CNM indicados mediante barras. Las estrellas indican la detección de algún caso positivo (los números se indican en el texto).



☆ *Casos positivos para VEBO.* ☆ *Casos positivos para VFHCC.*

En 2012 se pidió el diagnóstico diferencial de VL, VEBO y VFHCC en tres pacientes y 2013 en uno.

En 2014 tiene lugar el gran brote de VEBO en África Occidental y, a pesar de producirse en una región con la que España no mantiene mucho contacto, se disparan el número de peticiones para este virus. Al inicio del brote se hacía diagnóstico diferencial de VEBO con VL y VFHCC y se estudiaron muestras de siete pacientes para los tres virus. A medida que el brote avanza y, sobre todo, tras la detección del caso autóctono español, se estudian 45 pacientes sólo para detección de VEBO. En tres de ellos se obtuvieron resultados positivos: se confirmó la infección por este virus en dos misioneros que se contagiaron en África y fueron repatriados a España y se diagnosticó el primer caso de infección por este virus fuera de región endémica (África). A partir de entonces, además de las sospechas en viajeros, se buscó el virus

en contactos del caso español. Por último, en 2014 tuvimos dos casos de pacientes en los que se sospechó únicamente VL consiguiendo descartar este virus en ambos.

En 2015 continúa la epidemia de VEBO y se envían muestras de doce pacientes para detección de este virus, además en un paciente piden diagnóstico diferencial entre VEBO y VL. Finalmente, nos solicitan descartar la presencia de arenavirus americanos en dos pacientes y de VFHCC en un paciente.

En 2016, diagnosticamos los primeros casos de infección autóctona por VFHCC. Esto marca las alertas de FHV recibidas ese año, procesando muestras de otros 9 pacientes sospechosos de infección por este virus. Además, se solicitó el diagnóstico de VEBO, VL y VFHCC en un viajero.

En 2017 se descartó la presencia de VFHCC en 10 pacientes, número estudiado también en 2018 aunque este año uno de ellos fue positivo.

En 2019 se analizaron muestras de 13 pacientes con sospecha de VFHCC y en 2020, a pesar de las restricciones de movimiento, se atendieron 8 pacientes encontrando el virus en 3 de ellos. Además, se atendió un paciente con sospecha de infección por VL y otro por arenavirus americanos.

En 2021 se buscó VFHCC en 25 pacientes encontrándole en dos de ellos. Además, hubo una sospecha de infección por VFHCC y/o por VL en un viajero. Y, finalmente, en 2022 se sospechó infección por VFHCC en 13 pacientes de nuevo con 2 positivos. Además, en un paciente se descartó la presencia de VL, en otro de VEBO y en uno más se descartaron arenavirus del Nuevo Mundo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Varios. Protocolo de vigilancia de la Fiebre Hemorrágica Crimea-Congo. 2016. https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/PROTOCOLOS/PROTOCOLOS%20EN%20BLOQUE/PROTOCOLOS%20VECTORES/Protocolo-vigilancia-FHCC_16_06_2017.pdf
2. Varios. Protocolo de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/PROTOCOLOS/PROTOCOLOS%20EN%20BLOQUE/PROTOCOLOS_RENAVE-ciber.pdf
3. Negredo A, de la Calle-Prieto F, Palencia-Herrejón E, Mora-Rillo M, Astray-Mochales J, Sánchez-Seco MP, Bermejo Lopez E, Menárguez J, Fernández-Cruz A, Sánchez-Artola B, Keough-Delgado E, Ramírez de Arellano E,

Lasala F, Milla J, Fraile JL, Ordobás Gavín M, Martinez de la Gándara A, López Perez L, Diaz-Diaz D, López-García MA, Delgado-Jimenez P, Martín-Quirós A, Trigo E, Figueira JC, Manzanares J, Rodriguez-Baena E, Garcia-Comas L, Rodríguez-Fraga O, García-Arenzana N, Fernández-Díaz MV, Cornejo VM, Emmerich P, Schmidt-Chanasit J, Arribas JR; Crimean Congo Hemorrhagic Fever@Madrid Working Group. Autochthonous Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Spain. N Engl J Med. 2017 Jul 13;377(2):154-161. doi: 10.1056/NEJMoa1615162. PMID: 28700843.

4. Lorenzo Juanes HM, Carbonell C, Sendra BF, López-Bernus A, Bahamonde A, Orfao A, Lista CV, Ledesma MS, Negredo AI, Rodríguez-Alonso B, Bua BR, Sánchez-Seco MP, Muñoz Bellido JL, Muro A, Belhassen-García M. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Spain, 2013-2021. Emerg Infect Dis. 2023 Feb;29(2):252-259. doi: 10.3201/eid2902.220677. PMID: 36692301; PMCID: PMC9881766.

5. Reusken C, Niedrig M, Pas S, Anda P, Baize S, Charrel R, Di Caro A, Drosten C, Fernandez-Garcia MD, Franco L, Gunther S, Leparc-Goffart I, Martina B, Pannetier D, Papa A, Sanchez-Seco MP, Vapalahti O, Koopmans M. Identification of essential outstanding questions for an adequate European laboratory response to Ebolavirus Zaire West Africa 2014. J Clin Virol. 2015 Jan;62:124-34. doi: 10.1016/j.jcv.2014.11.007. PMID: 25692204.

Enfermedades por ortopoxvirus

Informe elaborado por M. P. Sánchez-Seco, A. Negredo, A. Vázquez, L. Herrero, F. Molero

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

Los Orthopoxvirus son un género de virus que comprende diferentes especies y muchas de ellas afectan a especies animales concretas. Algunos de ellos son zoonóticos. El virus causante de la viruela humana (Variola) es, sin duda, el agente más relevante desde el punto de vista de la salud pública por su alta capacidad de transmisión y su elevada tasa de letalidad y efectos secundarios. A pesar de que es un virus erradicado gracias a las campañas de vacunación llevadas a cabo en el pasado, existe preocupación por su potencial uso como agente de bioterrorismo ya que quedan algunos pocos laboratorios en el mundo que poseen reservas de este virus. Esta preocupación fue la que, a principios de siglo, hizo que el CNM adquiriera herramientas capaces de detectar éste y cualquier otro miembro de este género. Además, el virus Monkeypox (Mpox , anteriormente conocido como Viruela del Mono) lleva causando preocupación desde que en 2003 causara el primer brote fuera de África, zona endémica donde este virus lleva circulando desde que se detecta por primera vez en 1970. Por otro lado, la incidencia del virus en zona endémica ha sufrido un constante incremento en los últimos años que algunos autores atribuyen a diferencias en el comportamiento humano (por un mayor contacto con su reservorio animal) y por pérdida de protección cruzada tras el cese de la administración de vacunas contra la viruela.

En 2023 se produce el mayor brote por Mpox registrado hasta el momento. Los primeros casos se detectan en Reino Unido en pacientes sin ningún contacto con zona endémica o con casos importados. Pasados unos pocos días, Portugal e inmediatamente después España reportamos casos sin vínculo epidemiológico. Se trataba del inicio de una epidemia global que ha producido más de 90.000 casos con 157 muertes y afectando a 117 países. España es el tercer país con mayor número de casos (más de 7.580). El 23 de julio de 2022, el Director General de la OMS declaró que el brote multinacional de Mpox constituía una Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional (ESPII).

Cuando se producen, el 16 de mayo, las primeras sospechas de infección por este virus en nuestro país, el CNM es el único centro que dispone de herramientas diagnósticas para su detección por lo que todas las muestras se envían al laboratorio de Arbovirus y Enfermedades Víricas Importadas para su diagnóstico y caracterización. El carácter urgente del diagnóstico viene dado por la necesidad de establecer medidas de aislamiento de casos y contactos además del seguimiento clínico de un brote que ha demostrado no producir una enfermedad grave pero que, en los inicios, había que investigar. De igual forma la caracterización e investigación del brote de cara a determinar si había cambiado la forma de transmisión, desarrollar métodos de detección adecuados, etc. constituía una prioridad de salud pública.

Para el diagnóstico de este grupo de virus se recomienda también la detección molecular. Al tratarse de virus que tienen como genoma ADN la variabilidad genética es mucho menos que, por ejemplo, en los productores de FH pero se necesita que las técnicas estén bien validadas y tengan parámetros de sensibilidad y especificidad adecuados. Se admite también el uso de PCRs genéricas aunque en ese caso hay que confirmar mediante secuenciación que se está amplificando un virus específicamente. Esta situación pierde importancia en el contexto de un brote como el vivido en 2022.

Al CNM sólo le han llegado sospechas de Mpox en el año 2019 y en el año 2022. En el año 2019 llegaron muestras de dos pacientes que habían sido contacto de un caso. En el año 2022 se atendieron 1.176 pacientes (1.532 muestras) siendo positivas 760 (64,6%).

BIBLIOGRAFÍA

1. Varios. 2022. Evaluación de riesgo. Casos autóctonos de Viruela del Mono (Monkeypox/MPX) en España. https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/alertaMonkeypox/docs/20220809_ERR_Monkeypox.pdf
2. Orviz E, Negredo A, Ayerdi O, Vázquez A, Muñoz-Gomez A, Monzón S, Clavo P, Zaballos A, Vera M, Sánchez P, Cabello N, Jiménez P, Pérez-García JA, Varona S, Del Romero J, Cuesta I, Delgado-Iribarren A, Torres M, Sagastagoitia I, Palacios G, Estrada V, Sánchez-Seco MP; Grupo Viruela del Simio Madrid CNM/ISCIII/HCSC/Sandoval. Monkeypox outbreak in Madrid (Spain): Clinical and virological aspects. J Infect. 2022 Oct;85(4):412-417. doi: 10.1016/j.jinf.2022.07.005. Epub 2022 Jul 10. PMID: 35830908; PMCID: PMC9534097.

3. Sánchez-Seco MP, Hernández L, Eiros JM, Negredo A, Fedele G, Tenorio A. Detection and identification of orthopoxviruses using a generic nested PCR followed by sequencing. Br J Biomed Sci. 2006;63(2):79-85. doi: 10.1080/09674845.2006.11732725. PMID: 16872000.
4. Fedele CG, Negredo A, Molero F, Sánchez-Seco MP, Tenorio A. Use of internally controlled real-time genome amplification for detection of variola virus and other orthopoxviruses infecting humans. J Clin Microbiol. 2006 Dec;44(12):4464-70. doi: 10.1128/JCM.00276-06. Epub 2006 Oct 25. PMID: 17065259; PMCID: PMC1698395.

Enfermedad por coronavirus emergentes

Informe elaborado por Inmaculada Casas y Francisco Pozo

Unidad de Virus Respiratorios y Gripe, Laboratorio de Referencia e Investigación en Virus Respiratorios. Centro Nacional de Microbiología (CNM).
Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

Las acciones humanas que impactan a los animales, uso de la tierra y el cambio climático, tienen un efecto profundo en la forma en que se propagan las enfermedades por coronavirus (CoV) emergentes. A medida que nuestro clima cambia, ciertas poblaciones de animales aumentan propagándose a zonas geográficas que antes les eran inhabitables, lo que conlleva cambios en el contacto humanos-animales que afectan a la aparición y propagación de enfermedades. La explosión incontrolable del comercio mundial de vida silvestre afecta a 1 de cada 4 especies de mamíferos y aves (1).

Los CoV son una familia diversa que infectan a una amplia gama de aves y mamíferos. Murciélagos, roedores y aves son los reservorios naturales (2). Los CoV humanos incluyen aquellos que suelen asociarse con enfermedades respiratorias leves, HCoV-229E, HCoV-HKU1, HCoV-NL63 y HCoV-OC43, y con enfermedades graves, CoV del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2), y CoV del síndrome respiratorio de medio oriente (HCoV-MERS). La expansión del rango de huéspedes es parte de su historia evolutiva y probablemente todos ellos se originaron como patógenos zoonóticos que experimentaron dicha expansión mediante mecanismos de recombinación, alta variabilidad y robustez mutacional.

TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS Y DE CARACTERIZACIÓN

- Detección y Confirmación de SARSCoV-1 de 2003 mediante PCR convencional.
- Detección y Confirmación de HCoV-MERS mediante PCR en real Time (ENAC ISO 15189): dos PCR múltiples en tiempo real simultáneas empleando sondas TaqMan.

SARS-COV-1 DE 2003. SOSPECHAS ATENDIDAS

En 2002-2003, el SARS-CoV-1 perteneciente al género Betacoronavirus provocó un brote de neumonía en 8.000 casos afectados, distribuidos en 30 países y 5 continentes, y ahora se considera erradicado. Comparte más del 79% de homología con el SARS-CoV-2 de 2019 (3).

El estudio del genoma de SARS-CoV-1 demostró que no existió recombinación entre diferentes CoV humanos y que no fue un mutante de otro CoV animal o humano no patogénico.

El 23 de mayo de 2003 se publicó la detección de SARS-CoV-1 en muestras de civetas recogidas de los mercados en Hong Kong y en febrero de 2005 se demostró la susceptibilidad de diferentes especies de civetas al SARS-CoV-1 de 2003. En la Figura 1 se muestran los resultados de 26 casos estudiados en el CNM y recibidos en la Unidad de Virus Respiratorios y Gripe en 2003, 19 sospechosos de infección por SARS-CoV-1 y siete casos descartados.

Figura 1. Sospechas de infección por SARS-CoV-1 atendidas en el CNM.

CASOS ESTUDIADOS EN EL CNM 2003

Nº total de casos: 26
"casos sospechosos": 19 estudiados
"casos descartados": 7 no estudiados

SARS	Fecha	Antecedente	Resultado CNM
1	16 -Mar	viaje a China	negativo
2	18 -Mar	viaje a Tailandia	negativo
3	22 -Mar	muerte súbita	negativo
8	23 -Mar	viaje	FLUA (H3N2)
9	31 -Mar	viaje HK, Sanghai	negativo
10	2 -Abr	viaje Guangdong	FLUA (H3N2)
11	10 -Abr	viaje a Guangdong	negativo
12	11 -Abr	hija de traductora	RINOVIRUS
13	14 -Abr	procede Toronto	FLUA (H3N2)
14	16 -Abr	viaje ?	*Haemophylus influenza*
15	21 -Abr	viaje Filipinas, Singapur	Salmonella typhi
16	11 -Abr	viaje Wenzhou	negativo
17	25 -Abr	?	negativo
18	29 -Abr	viaje Zhajan	negativo
21	28 -Abr	viaje China	negativo
23	23 -May	viaje China	negativo
24	26 -May	viaje Guangdong	RINOVIRUS
25	31 -May	viaje Toronto	negativo
26	2 -Jun	Marinero inglés Singapur	EBV + HHV7

HCOV-MERS. SOSPECHAS ATENDIDAS

Fue descubierto en 2 casos de infección respiratoria aguda en septiembre de 2012 en Arabia Saudí (4). Retrospectivamente se identificaron los primeros casos de HCoV-MERS en Jordania (abril de 2012). Es un CoV zoonótico endémico en Oriente Próximo y ha sido identificado en dromedarios de Oriente Próximo, África y el sur de Asia. En total, 27 países han notificado casos desde 2012, con 858 muertes entre los casos notificados a la OMS, ya sean relacionadas con la infección o sus complicaciones. Los dromedarios son el huésped intermediario. La transmisión de persona a persona es posible cuando existe contacto estrecho y en personal sanitario. Las infecciones varían desde casos asintomáticos o síntomas respiratorios leves hasta enfermedad respiratoria aguda grave y muerte. La presentación típica es fiebre, tos y dificultad para respirar. La neumonía es un hallazgo común que presenta gravedad provocando insuficiencia respiratoria que requiere ventilación mecánica y apoyo en UCI sobretodo en personas mayores, inmunodeprimidos y personas con enfermedades crónicas (renales, pulmonares, cáncer y diabetes). La mortalidad asociada es del 35%, aunque se considera una sobreestimación, ya que los sistemas de vigilancia existentes no detectan los casos leves. Actualmente, las tasas de letalidad se cuentan únicamente entre los casos confirmados por laboratorio. Los grupos vulnerables deben evitar el contacto con dromedarios y camellos, beber su leche o comer su carne no cocinada. No existe vacuna ni tratamiento antiviral específico siendo éste un apoyo sintomático (5). Las muestras clínicas para su diagnóstico son del tracto superior, exudado nasofaríngeo, lavado nasal; y del tracto inferior, aspirado bronquial, lavado bronco-alveolar, esputo, biopsia/necropsia pulmonar.

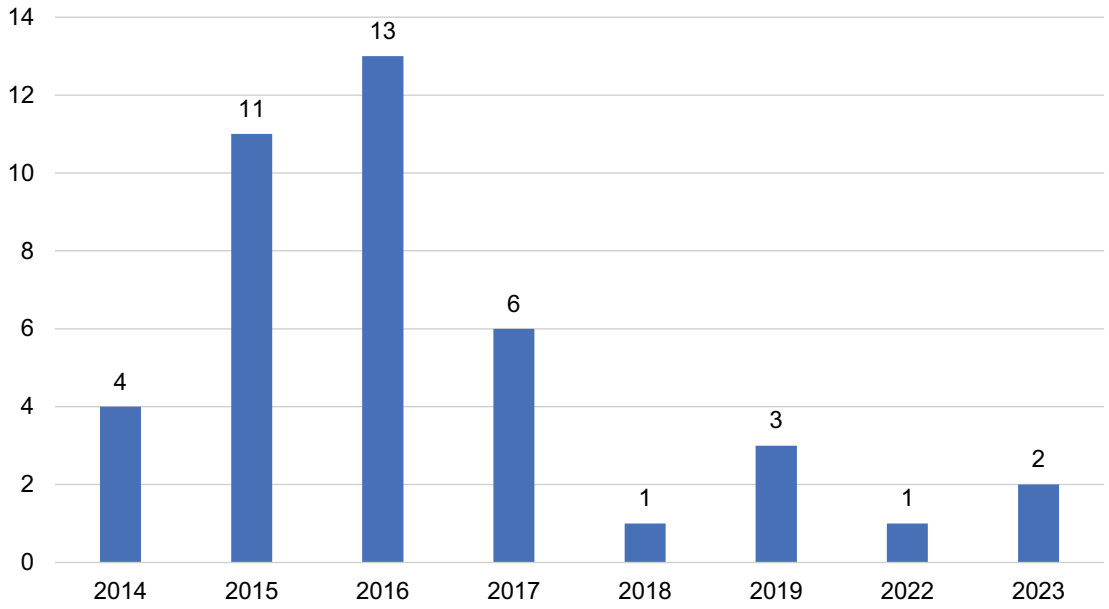
Desde septiembre 2012 se reciben muestras respiratorias procedentes de pacientes con sospecha de HCoV-MERS que cumplen los criterios establecidos por OMS.

Episodio noviembre 2013: se detectaron dos sospechas de casos importados a España en dos personas que resultaron positivas y que estaban relacionadas en el mismo viaje a La Meca aunque los resultados no se pudieron confirmar. En total, se identificaron 113 contactos, de los cuales se obtuvieron muestras de 103 (91%), y tras completarse el periodo de seguimiento, no se identificó ningún contacto positivo. Los resultados obtenidos clasifican ambos casos como probables no confirmados.

Desde 2014 a agosto 2023: se han recibido un total de 41 alertas, 22 procedentes de Arabia Saudí La Meca, cuatro de Dubái, tres de Qatar, dos de Omán, y una del Golfo Pérsico, una de Iraq, una de Jordania, una de Kuwait entre otros países. Ninguna de estas 41 alertas ha resultado positiva a HCoV-MERS. La distribución del número de alertas por año se presenta en la Figura 2. La mayor parte de las sos-

pechas se concentran en los días posteriores a la peregrinación a La Meca, en Arabia Saudí, conocido como Hajj.

Figura 2. Número de sospechas de infección por CoV-MERS atendidas en el CNM desde 2014.



BIBLIOGRAFIA

1. An Overview of seizures of cites-listed wildlife in the European Union. January to December 2018. https://www.traffic.org/site/assets/files/12745/eu-seizures-report-2020-final-web.pdf
2. Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, *et al.* 2005. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. Science 310:676–79.
3. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications virus origins and receptor binding. Lancet. 2020; 395:565–574.
4. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM., Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. N Engl J Med. 2012;367:1814–1820
5. August 2022 https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-(mers-cov)

Antrax

Informe elaborado por M. T. Llorente Rodriguez, R. Escudero Nieto e I. Jado García

Laboratorio de Referencia e Investigación en Patógenos Especiales (LRIPE).
Centro Nacional de Microbiología (CNM). Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

IMPORTANCIA SANITARIA

Bacillus anthracis (*B. anthracis*), es una bacteria Gram positiva, formadora de esporas, y el agente etiológico productor de la enfermedad zoonótica conocida como ántrax o carbunco.

En la mayoría de los países industrializados el carbunco es una infección poco frecuente asociada a la persistencia del agente en terrenos de regiones tradicionalmente agrícolas y ganaderas. La enfermedad es propia de herbívoros, rumiantes principalmente, aunque el ser humano y otros carnívoros pueden convertirse en hospedadores accidentales e infectarse. En España, el carbunco es una enfermedad de declaración obligatoria (EDO) y está considerada enfermedad de carácter profesional. Su prevención está muy vinculada al control de casos en animales y en este sentido, desde la introducción hace años de la vacuna en herbívoros, el número de notificaciones de casos anuales en humanos se ha reducido drásticamente en nuestro país.

Las esporas producidas por *B. anthracis* pueden permanecer viables durante varias décadas en el medio ambiente e introducirse en el organismo humano a través de lesiones en la piel (ántrax cutáneo), de los pulmones (ántrax pulmonar) o de la ruta gastrointestinal (ántrax gastrointestinal) generando formas vegetativas. La extremada virulencia de *B. anthracis* se debe a la producción de toxinas en el organismo del hospedador que pueden causar la muerte en pocos días.

En el caso de humanos, además de ser un patógeno relevante en Salud Pública, *B. anthracis* tiene gran relevancia a nivel de biodefensa al estar considerado como uno de los agentes bioterroristas más potente debido a: la extremada resistencia y viabilidad de sus esporas en el ambiente, sus diferentes modos o vías de infección, su capacidad de aerosolizarse y la elevada tasa de mortalidad que puede provocar. Un ataque con esporas de ántrax podría llevarse a cabo de diferentes formas: vehiculizadas en cartas, alimentos, agua; liberadas al aire desde vehículos, edificios o aviones. Esto

implica que las esporas de ántrax se pueden dispersar fácilmente a través del viento, de prendas, calzado u otros objetos y las personas pueden aspirarlas y contraer la enfermedad. Se ha estimado que una dosis de entre 8.000-50.000 esporas de ántrax aerosolizadas serían letales para el 50% de la población diana. La inhalación de esporas de ántrax da lugar a la presentación respiratoria, o manifestación neumónica, que constituye la forma más grave de la enfermedad y que puede producir la muerte de forma rápida sin un tratamiento adecuado.

Su utilización, como potencial arma en ataques de bioterrorismo, representa desde hace años y aún en la actualidad una preocupante amenaza en todo el mundo. Aunque el ántrax se ha utilizado como arma biológica durante casi un siglo, el episodio más mediático ocurrió en 2001 cuando se difundieron algunas cartas con esporas de *B. anthracis* en Estados Unidos seguido de múltiples falsos envíos en distintos países, incluido España. A pesar del elevado impacto mediático y social, sólo 22 personas contrajeron la enfermedad si bien, el temor y la concienciación sobre el potencial uso de armas biológicas y químicas de destrucción masiva se extendieron por todo el mundo.

Este potencial uso en bioterrorismo ha hecho necesario el desarrollo de medidas preventivas para responder a un potencial ataque y para ello el Laboratorio de Referencia e Investigación en Patógenos Especiales (LRIPE) cuenta con métodos rápidos y fiables para la detección, identificación y diagnóstico de *Bacillus anthracis* así como con infraestructura de laboratorios de bioseguridad BSL2 y BSL3 requerida para trabajar con este patógeno clasificado como categoría A (CDC) y/o grupo 3 (Directiva 90/679/CEE; Real Decreto (RD) 664/1997).

El LRIPE es uno de los laboratorios especializados del CNM, incluido en la estructura operativa de la Red de Laboratorios de Alerta Biológica (RE-LAB), para responder ante amenazas en el Área de la Salud Pública y tiene experiencia en trabajar con este patógeno altamente infeccioso capaz de originar situaciones de alerta o emergencia sanitaria.

TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN/DETECCIÓN

En el LRIPE/CNM para la identificación de *B. anthracis* se utilizan herramientas moleculares y microbiológicas.

La metodología utilizada para la identificación rápida y específica de ADN de *B. anthracis*, consiste en una PCR en tiempo real (PCR-TR) empleando sondas TaqMan que se basa en la detección de la diana cromosómica BA534 presente en todas las cepas de *B. anthracis* (1). Este procedimiento está acreditado según la norma

ISO/IEC 17025 (2) y se aplica a los ADNs extraídos de muestras sospechosas de contener esporas de *B. anthracis*: suspensiones en tampón AVL de muestras recogidas con hisopo, polvos suspendidos en AVL y material textil sumergido en AVL.

La identificación y confirmación microbiológica se realiza mediante el cultivo las muestras sospechosas para evidenciar la presencia o ausencia de *B. anthracis* y confirmar el resultado de la detección molecular (PCR-TR). Se utilizan medios de cultivo en placa en los que *B. anthracis* crece formando colonias de fenotipo característico (colonias blancas de aspecto algodonoso y ausencia de β-hemólisis). Con las colonias obtenidas se realiza una identificación utilizando la PCR-TR descrita anteriormente y la secuenciación del fragmento que codifica el RNAr16S.

ORGANIZACIÓN DE UNA ALERTA DE ÁNTRAX. RE-LAB

En la figura 1, se representa el procedimiento a seguir con una muestra sospechosa en una alerta de ántrax. Ante la presencia de muestras de polvo sospechosas de contener esporas de *B. anthracis*, las Fuerzas y Cuerpos de seguridad del Estado, Policía Nacional y Guardia Civil de los grupos especiales NRBQ (de respuesta a amenazas nucleares, radiactivas, biológicas y químicas), antes de su envío al CNM llevarán a cabo la detección rápida del agente utilizando dos métodos de cribado:

- **Tetracore BioThreat Alert Test Strips**, para detección de antígeno de *B. anthracis*: http://tetracore.com/bio-warfare/index.html. La sensibilidad del método de Tetracore es de 10^6 esporas/mL, con una sensibilidad estimada en un 99,3% y una especificidad del 98,6% (3).
- **Biocheck**, para la detección de proteínas: http://biocheckinfo.com/faq/. El test tiene un límite de detección de $8x10^7$ CFUs y una sensibilidad de 10 µg para la presencia de cualquier proteína, según el fabricante.

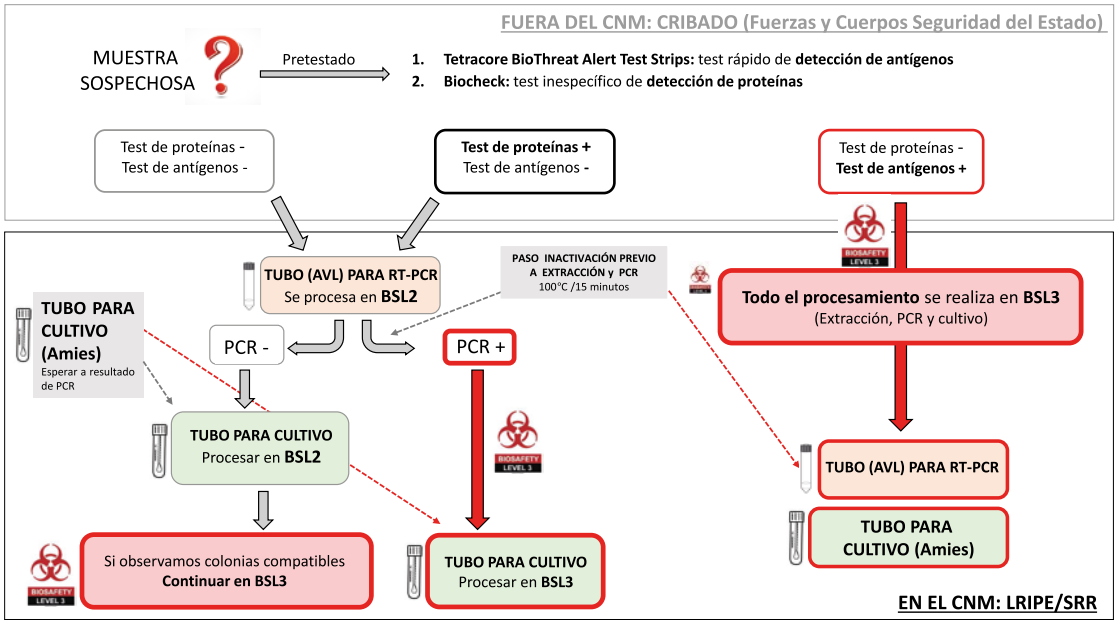
Independientemente de los resultados del cribado, todas las muestras sospechosas se envían al CNM donde se registran y se procesan de manera urgente. Cada muestra se envía al CNM en dos tubos independientes, uno de ellos en buffer AVL para realizar la RT-PCR y el segundo en medio AMIES para el cultivo de la muestra.

En el caso de que el test de antígenos haya dado positivo todos los procesos se deben realizar en el laboratorio de bioseguridad de nivel 3 (BSL3). En el caso de que los test de antígenos resulten negativos los procesos se realizan en condiciones de bioseguridad 2 (BSL2).

La muestra en AVL para PCR, previa a su manipulación, se somete a un paso adicional de inactivación que consiste en una incubación a 100°C durante 15 minutos.

- Si el resultado de la PCR es negativo, se lleva a cabo el cultivo de la muestra en condiciones de bioseguridad BSL2 utilizando el segundo tubo en AMIES. A las 24 y 48h se observa el crecimiento bacteriano. Si crecen colonias compatibles con *B. anthracis*, el cultivo se procesará en el BSL3.
- Si el resultado de la RT-PCR resulta positivo, el tubo en medio AMIES se sembrará en condiciones de bioseguridad BSL3 realizándose la observación del cultivo en las siguientes 24/48 h para observar el crecimiento de colonias compatibles.
- A partir de las colonias compatibles se realizará la identificación de *B. anthracis* mediante PCR-TR y secuenciación del 16S RNAr.

Figura 1. Alerta de ántrax: Esquema del procedimiento a seguir con la muestra sospechosa.

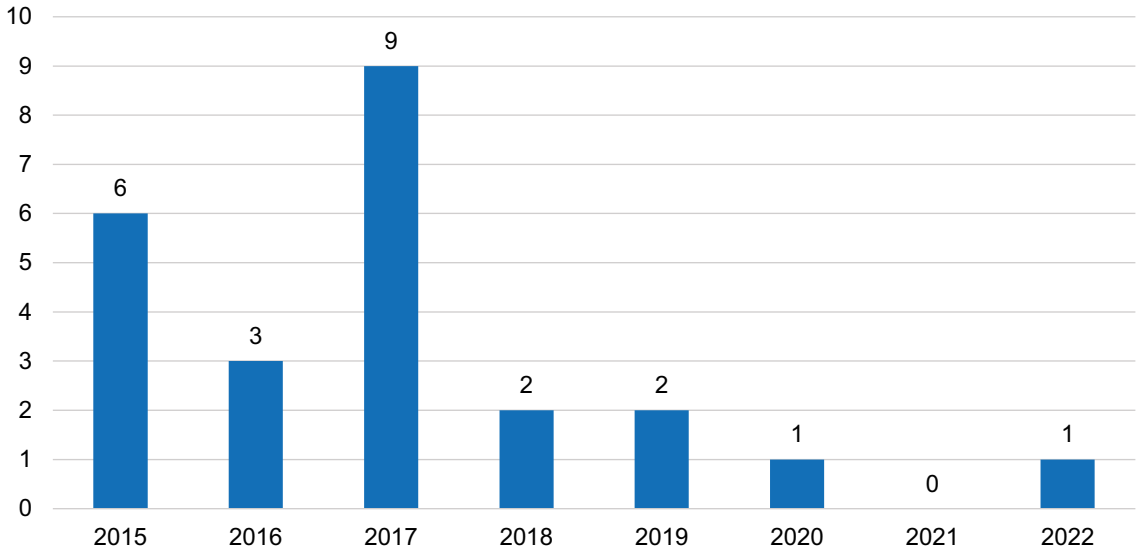


SOSPECHAS ATENDIDAS POR EL SISTEMA DE RESPUESTA RÁPIDA. PERÍODO 2012-2022

La distribución del número de alertas por año se representa en la Figura 2. Desde la creación en el Centro Nacional de Microbiología del ISCIII del Sistema de Respuesta Rápida en junio de 2014 se han procesado un total de 24 alertas de ántrax, siendo 2017 el año en el que más número de alertas se recibieron, un total de 9. En los 24 casos, tanto las PCRs como los cultivos resultaron negativos. Las

muestras correspondientes a las 24 alertas fueron recogidas de: sobres sospechosos conteniendo sustancia pulverulenta (16), sustancias pulverulentas (6), sustancia roja en film transparente húmedo (1) y ojo de animal (1) que fueron enviadas a distintas dependencias públicas o privadas.

Figura 2. Alertas anuales de Carbunco/ántrax. Período 2015-2022.



BIBLIOGRAFÍA

1. Antwerpen M, Zimmermann P, Bewley K, Frangoulidis D, Meyer H. Real-time PCR system targeting a chromosomal marker specific for Bacillus anthracis. Mol. Cell. Prob. 2008, 22 (5-6): 313-315.
2. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. (ISO/IEC 17025:2017).
3. Ramage JG *et al.* Comprehensive Laboratory Evaluation of a Highly Specific Lateral Flow Assay for the Presumptive Identification of *Bacillus anthracis* Spores in Suspicious White Powders and Environmental Samples**.** Health Security 2016, 14: 351-365.

Peste

Informe elaborado por M.T. Llorente Rodriguez, R. Escudero Nieto e I. Jado García

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

BREVE ENCUADRE SOBRE IMPORTANCIA SANITARIA

La peste es una zoonosis producida por la bacteria *Yersinia pestis,* Gram negativa, no formadora de esporas, que afecta fundamentalmente a animales pequeños, principalmente roedores, y sus pulgas, pero puede también afectar a mamíferos y al ser humano. *Yersinia pestis* es una bacteria ubicua en la naturaleza que aparece en muchas regiones del mundo y puede causar enfermedades graves en personas de zonas rurales y determinadas localizaciones geográficas en los que existen focos naturales. La transmisión entre animales y ser humanos tiene lugar a través de picaduras de pulgas infectadas o por contacto directo, inhalación o ingestión de materiales infecciosos.

Los síntomas clínicos que presenta la peste son muy parecidos a los de una gripe: fiebre, escalofríos, cefalea, mialgia, debilidad, náuseas y vómitos. En función de la vía de infección se pueden desarrollar tres formas clínicas: bubónica, septicémica y neumónica. La presentación clínica más común es bubónica y la más grave es la forma neumónica, que puede transmitirse de persona a persona, lo que tiene gran importancia a nivel de Salud Pública. Las tasas de letalidad de la peste humana sin tratamiento pueden llegar a ser del 50% en el caso de la forma bubónica. La peste septicémica y la neumónica casi siempre resultan de alta mortalidad.

A lo largo de la historia se han descrito varias pandemias de peste, 3 de ellas en los dos últimos milenios originando más de 200 millones de muertes y un gran caos económico y social. La peste actualmente es endémica en muchos países de África y en la Antigua Unión Soviética, las Américas y Asia. Los recientes brotes en Uganda, China, República Democrática del Congo y Madagascar demuestran que la peste sigue siendo un grave problema de Salud Pública.

El patógeno *Y. pestis* ha sido empleado en guerras en la antigüedad y, actualmente se considera uno de los posibles candidatos para llevar a cabo un ataque biológico ya que se puede dispersar en forma de aerosol originando brotes de peste neumó-

nica en la población expuesta. Al igual que *B. anthracis,* es un patógeno clasificado como categoría A (CDC) y/o grupo 3 (Directiva 90/679/CEE; Real Decreto (RD) 664/1997) por su facilidad de transmisión de persona a persona, su elevada tasa de mortalidad y su importante repercusión en Salud Pública.

Contar con herramientas para un diagnóstico rápido y aplicar un tratamiento precoz puede paliar las consecuencias de la infección por *Y. pestis*. En ausencia de tratamiento antibiótico la peste bubónica puede producir la muerte de la persona afectada en menos de una semana y en menos de 48 h en el caso de la forma neumónica. Al igual que para *B. anthracis*, y debido al potencial bioterrorista de *Y. pestis* se han desarrollado en el LRIPE/CNM procedimientos rápidos y fiables para su detección, identificación y diagnóstico. En el caso de que se produjera una alerta por este patógeno el LRIPE y/o el grupo de Respuesta Rápida del CNM son los responsables de proporcionar una respuesta en 24h.

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico/detección de *Y. pestis* se realiza en el LRIPE/CNM mediante herramientas moleculares y microbiológicas.

La metodología utilizada para la identificación rápida y específica de ADN de *Y. pestis*, consiste en una PCR en tiempo real (PCR-TR) empleando sondas TaqMan que se basa en la detección de dos dianas plasmídicas: *pla y caf 1* que codifican determinantes de virulencia que desempeñan un papel fundamental para la replicación del patógeno (1).

Se trata de una técnica acreditada bajo la norma UNE-EN ISO/IEC 18159 (2) que se aplica a ADNs extraídos a partir de muestras de sangre (en EDTA o citrato), biopsias de ganglios, aspirados y/o lavados bronquiales y esputos tomadas de pacientes con sospecha de infección por *Y. pestis.*

La PCR nos permite obtener un diagnóstico presuntivo, pero para la confirmación del diagnóstico se requiere el aislamiento del patógeno en cultivo microbiológico utilizando medios de cultivo como agar MacConkey o el medio agar selectivo CIN (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocina). El patógeno aislado en cultivo se identifica utilizando la PCR y la secuenciación del 16S RNAr.

SOSPECHAS ATENDIDAS POR EL SISTEMA DE RESPUESTA RÁPIDA. PERÍODO 2012-2022

Desde la creación del SRR en junio de 2014, no se ha atendido ninguna alerta de peste en el CNM/ISCIII.

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS E INICIATIVAS EUROPEAS

El LRIPE participa desde 2011 en varias iniciativas financiadas desde la UE enfocadas al estudio y diseño de planes de preparación y respuesta ante amenazas para la Salud Pública producidas por *B. anthracis* y *Y. pestis*:

1. QUANDHIP: «Quality Assurance Exercises and Networking on the Detection of Highly Infectious Pathogens». 2011-2013.
2. EMERGE: «Efficient response to highly dangerous pathogens at EU level». 2015-2018.
3. SHARP: «Sthreghthened international HeAlth Regulations and Preparedness in the EU»-Joint Action-848096. 2019-2023.

Estos proyectos, en los que colaboran distintos laboratorios de diferentes países europeos, tienen como objetivos principales la mejora en la capacidad y eficacia de la metodología de detección y diagnóstico de bacterias de riesgo biológico 3 y la organización de ejercicios intercomparativos en los que la respuesta se realiza en el menor tiempo posible, simulando una situación de emergencia sanitaria. La participación en estos proyectos ha permitido mejorar la metodología del procesamiento de muestras, detección rápida, caracterización de aislados, así como la de obtener una visión global de gran interés sobre los genomas bacterianos de estos agentes de alto poder patógeno.

BIBLIOGRAFÍA

1. Riehm JM, Rahalison L, Scholz HC, Thoma B, Pfeffer M, Razanakoto LM, *et al.* Molecular and cellular probes. Mol Cell Probes. 2011; 25:8-12.
2. Laboratorios clínicos. Requisitos para la calidad y la competencia. UNE-EN ISO 15189: 2022.

Ricina

Informe elaborado por I. Moreno Iruela y M. Domínguez Rodríguez
Laboratorio de Referencia e Investigación de Inmunología Microbiana.
Centro Nacional de Microbiología (CNM). Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

CONSIDERACIONES GENERALES

La ricina es una de las toxinas más potentes conocidas. Debido a su elevado poder tóxico, a la relativa facilidad de obtención y a la gran extensión geográfica donde puede encontrarse, es considerada un agente con potencial uso en bioterrorismo. Es una proteína constituida por dos cadenas, la cadena A de 32 kDa y la cadena B de 34 kDa, unidas ambas por un puente disulfuro. La cadena B es la que facilita la entrada de ricina en la célula, mientras que la cadena A inactiva el ribosoma, inhibiendo así la síntesis de proteínas. La toxicidad se manifiesta tras la exposición por ingestión, inhalación o inoculación.

Esta toxina se encuentra en la semilla del ricino (*Ricinus communis*), y está asociada a una lectina, la aglutinina de *Ricinus communis*, llamada RCA 120. La identidad entre las cadenas polipeptídicas de ambas proteínas es muy elevada, un 94%. Es por ello que, frecuentemente, en la detección de la ricina tiene lugar una reacción de reconocimiento cruzado entre ambas proteínas, dando lugar a falsos positivos.

El CDC (Centers for Disease Control and Prevention) clasifica a los agentes biológicos potencialmente peligrosos para la salud pública en tres categorías: A, B o C, atendiendo a su capacidad de diseminación, a la gravedad de los síntomas que producen y al índice de mortalidad asociado. La ricina está incluida en la categoría B, en la que están incluidos aquellos agentes que tienen una diseminación moderada y presentan bajos índices de mortalidad.

TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN/DETECCIÓN

Para la detección de la ricina en muestras de distinta naturaleza existen muy pocas ofertas comerciales. Al tratarse de un agente que puede ser utilizado en bioterrorismo es necesario contar con métodos rápidos, sensibles y con capacidad de discriminar entre la ricina y la RCA120. La baja oferta de equipos comerciales y,

además, la generalmente inadecuada sensibilidad y especificidad de los mismos, nos llevó a desarrollar un ELISA tipo sándwich que cumpliera dichos requisitos. Los puntos clave en la consecución de este inmunoensayo fueron:

- Obtención de una colección de anticuerpos monoclonales generados utilizando como inmunógeno- la cadena A o la cadena B.
- Selección y caracterización de la reactividad de los anticuerpos frente a la cadena A y frente a la cadena B mediante ELISA y western blot.
- Análisis de la reactividad cruzada con RCA 120.
- Determinación de los parámetros cinéticos del ELISA sándwich, como son límite de detección (LD), límite de cuantificación (LQ) y la concentración efectiva media máxima (EC50).

Este proceso nos ha proporcionado un inmunoensayo cuantitativo, rápido, sensible y específico que permite detectar la ricina en muestras de distinta naturaleza.

En la ejecución del ELISA se utiliza, un anticuerpo monoclonal de captura que reconoce un epítopo en la cadena A de la ricina y un anticuerpo monoclonal de detección que reconoce un epítopo en la cadena B. Como estándar utilizamos ricina purificada suministrada por la Dra. Brigitte G. Dorner, del laboratorio de Toxinas biológicas del Centre for Biological Threats and Special Pathogens, del Robert Koch-Institute Berlín Alemania. El inmunoensayo tiene un LD de 0,47 ng/ml, una de LQ 1,32 ng/ml y una EC50 de 38 ng/ml. La bondad del ELISA ha sido demostrada en ensayos interlaboratorio dentro del proyecto europeo EuroBioTox (https://eurobiotox.org/index.html#). Además del ensayo de ELISA, simultáneamente, y utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce tanto la ricina como RCA 120, desarrollamos un western blot para determinar en la muestra la presencia de ricina, en cuyo caso observaremos una banda correspondiente a unos 60 kDa, y la de RCA 120, que se observará en una banda a unos 120 kDa.

Estas técnicas se incorporaron a nuestra cartera de servicios en 2016, y desde entonces y hasta el 2022 se han resuelto 13 alertas. Tanto la tecnología como los reactivos se han transferido a otros grupos de alertas, como es el caso del Dr. Jacob Lorenzo Morales, del Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias.

ORGANIZACIÓN DE UNA ALERTA DE RICINA. RELAB

Ante la presencia de muestras de polvo sospechosas de contener posibles agentes empleados en bioterrorismo, las fuerzas y cuerpos de seguridad (FCS), Policía Na-

cional/Guardia Civil, aplicarán dos métodos rápidos de cribado antes de su envío al CNM para la detección de esporas de *B. anthracis*, tal y como se describe en el capítulo correspondiente.

Independientemente de los resultados del cribado, todas las muestras sospechosas se enviarán al CNM donde se registrarán y se procesarán de manera urgente. De cada muestra se enviarán al menos tres alícuotas, una para realizar la RT-PCR de ántrax, otra para el cultivo microbiológico de la muestra y una última para la detección de ricina.

Una vez realizada la RT-PCR para ántrax y constatado un resultado negativo, El Laboratorio de Referencia e Investigación en Patógenos Especiales comunicará el mismo a Laboratorio de Referencia e Investigación de Inmunología Microbiana para que en este inicie el análisis de detección de la ricina. Todas las muestras recibidas se procesarán en cabina de seguridad biológica BSL2 y se realizará un análisis de la muestra mediante electroforesis por SDS-PAGE (para determinar si es de naturaleza proteica o no) y los dos inmunoensayos indicados anteriormente: el ELISA tipo sándwich específico para la cuantificación de ricina y el western-blot.

Para el procesamiento de la muestra, se pesará una alícuota que se disolverá en tampón fosfato estéril a una concentración final de 25 mg/ml, se mezclará vigorosamente durante cinco minutos y a continuación se centrifugará en microfuga a 13.000 rpm durante 2 minutos, separando, si el polvo fuera insoluble, un sedimento y un solubilizado. La fracción soluble se analizará mediante ELISA y western blot y la fase insoluble, tras solubilización en SDS se analizará por western blot.

BIBLIOGRAFÍA

1. Worbs S, Skiba M, Soderstrom M, Rapinoja ML, Zeleny R, Russmann H, Schimmel H, Vanninen P, Fredriksson SA, Dorner BG: Characterization of Ricin and R. communis Agglutinin Reference Materials. Toxins (Basel) 2015, 7:4906-4934.
2. https://emergency.cdc.gov/agent/ricin/
3. Hans-Christian Slotved, Nadja Sparding, Julia Tanas Tanassi, Nina R Steenhard, Niels H H Heegaard; Evaluating 6 ricin field detection assays. Biosecur. Bioterror. 2014 Jul-Aug;12(4):186-9. doi: 10.1089/bsp.2014.0015. Epub 2014 Jun 30.
4. https://eurobiotox.org/index.html#

Agradecimientos

Los programas y actividades de vigilancia microbiológica del CNM solo pueden entenderse en estrecha asociación con la vigilancia epidemiológica, formando así una unidad inseparable. En este sentido, llevamos a cabo nuestro trabajo en colaboración directa con el Centro Nacional de Epidemiología (CNE). Por lo tanto, deseamos iniciar esta sección expresando nuestro agradecimiento y reconocimiento hacia nuestras compañeras y compañeros del CNE.

Por otra parte, estos programas y actividades de vigilancia solo pueden concebirse en el contexto de la colaboración con la red pública de laboratorios de Microbiología, muchos de los cuales han sido designados específicamente como integrantes de las Redes de Laboratorios de algunos de los Programas. Asimismo, no podrían existir sin la activa participación de hospitales y centros de atención primaria, así como la participación de los servicios territoriales de Salud Pública. Extendemos nuestro agradecimiento y reconocimiento a los profesionales de todos estos niveles.

Muchos de estos programas de vigilancia se desarrollan en el marco 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 por su labor.

Finalmente, expresamos nuestro agradecimiento a la Dirección del Instituto de Salud Carlos III por respaldar estos programas y por apoyar la realización de esta obra.