

Infección Nosocomial

Bacterias Multirresistentes



Illustration: Don Smith

Luis Sáenz Mateos
R4 Análisis Clínicos

Infeción nosocomial

- ▶ La infección nosocomial es en la actualidad uno de los principales problemas sanitarios, teniendo particular importancia las infecciones causadas por **bacterias multirresistentes**.
- ▶ Aquellas que son resistentes a dos o más grupos de antimicrobianos empleados en el tratamiento de las infecciones.
- ▶ Dicha resistencia tiene que tener relevancia clínica

Multirresistencia

- ▶ Multirresistencia



cromosoma



Elementos
móviles

Principales microorganismos nosocomiales

- ▶ 1. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM)
- ▶ 2. *Enterococcus* spp. resistente a los glucopéptidos
- ▶ 3. Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)
- ▶ 4. *Acinetobacter baumannii* multirresistente
- ▶ 5. *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenemas

Staphylococcus aureus



Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (SARM)

- ▶ Cepa cuya CMI de oxacilina es ≥ 4 mg/L o la de meticilina es ≥ 16 mg/L.
- ▶ La **resistencia** es **cromosómica** y se debe a la transcripción del gen *mecA* que genera una nueva proteína fijadora de penicilina (PBP) denominada PBP2a con muy baja afinidad por los antibióticos **beta-lactámicos** actualmente disponibles para uso clínico.
- ▶ El gen *mecA* es transportado por un elemento genético móvil denominado **cassette cromosómico *mec*** (SCC*mec*).

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (SARM)

- ▶ Los primeros aislamientos de SARM se comunicaron en 1961.
- ▶ En las últimas dos décadas su prevalencia ha aumentado de forma importante en todos los países, convirtiéndose en uno de los patógenos nosocomiales de mayor trascendencia.
- ▶ Se debe a su resistencia a múltiples antimicrobianos (no sólo a beta-lactámicos), lo que hace difícil el tratamiento de las infecciones que produce.

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (SARM)

- ▶ Causa brotes epidémicos, comportándose como un microorganismo endémico en ocasiones.
- ▶ Supone un aumento de morbilidad y coste hospitalario.
- ▶ Cada vez más frecuente, la aparición de infecciones extrahospitalarias en pacientes ingresados en centros de crónicos, residencias, etc.
- ▶ Epidemiológicamente son similares, pero existen diferencias microbiológicas y clínicas a las nosocomiales.

***Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM)**

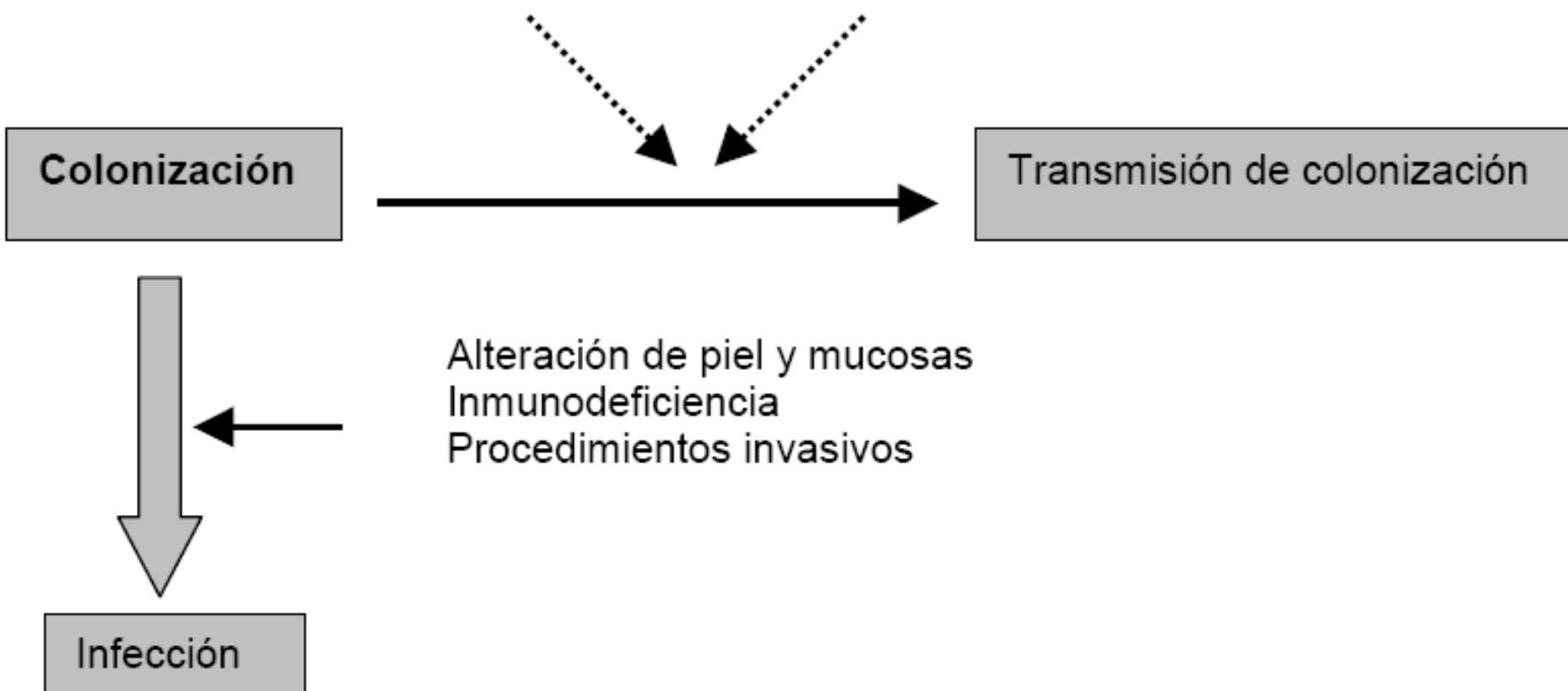
- ▶ Importancia de la colonización en la transmisión desde los reservorios.

Contacto directo

Objetos contaminados

Factores individuales

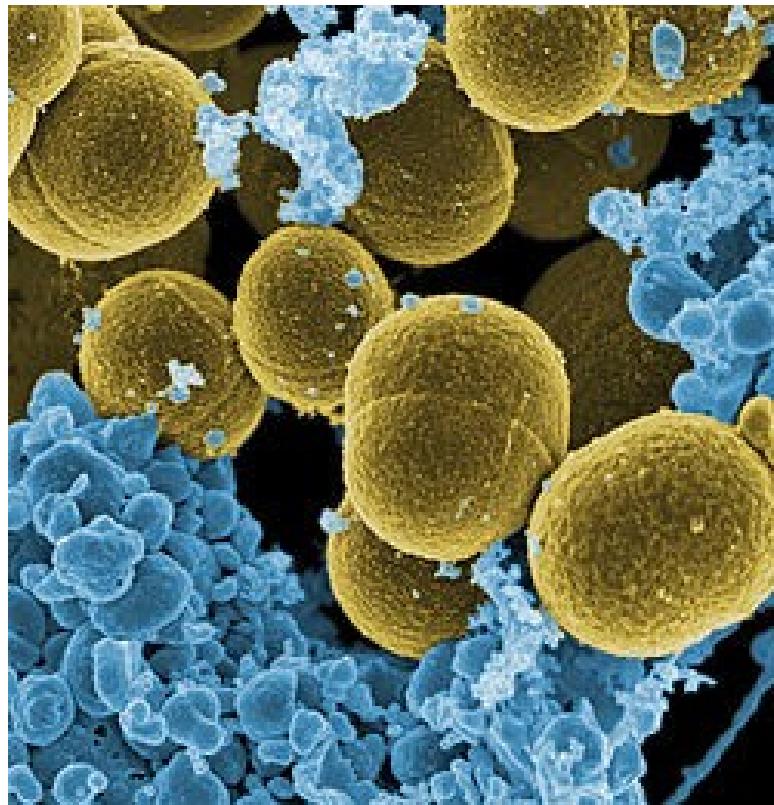
Factores microbianos



Las infecciones por SARM

- ▶ Bacteriemia primaria, la relacionada con catéter, o secundaria.
- ▶ Infección quirúrgica.
- ▶ Neumonía, especialmente la asociada a ventilación mecánica.
- ▶ Otras infecciones:
 - Infección de piel y tejidos blandos.
 - Osteomielitis.
 - Endocarditis.

Las infecciones por SARM



Mayor Gravedad
y Comorbilidad

Papel del Laboratorio Microbiología

- ▶ Identificación de SARM en las muestras clínicas.
- ▶ Detección de SARM en las muestras de vigilancia epidemiológica.

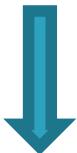


Tipo de muestras

- ▶ Exudado nasal: es la más adecuada si se elige una única muestra para los cultivos de vigilancia.
- ▶ Exudado faríngeo → toma de muestra incómoda para el paciente.
- ▶ Exudado de piel de la zona perineal-perirrectal: tiene una alta sensibilidad, pero no se aconseja como muestra única.
- ▶ Con una mayor sensibilidad está la triple muestra de exudados nasal, faríngeo y perirrectal o perineal.
- ▶ Muestras respiratorias: en pacientes con ventilación mecánica o traqueostomía.
- ▶ Exudados de úlceras o heridas: en pacientes con solución de continuidad en la piel.
- ▶ Urocultivo: en pacientes con sonda vesical.

Medios de Cultivos

- ▶ Medios selectivos y principalmente diferenciales



Oxacilina (desde 0,5 a 6 mg/L)
Cefoxitina (desde 4 a 8 mg/L)

- ▶ Agar manitol-sal (medio de Chapman)
- ▶ **Medios cromogénicos**
 - identificación presuntiva más rápida de SARM

Interpretación

- ▶ Incubación a 35–37 °C.
- ▶ Primera lectura a las 24 horas
 - No crecimiento → 48 horas
- ▶ Agar manitol
 - Organismo manitol positivo (color amarillo) → *S. aureus*.
 - Subcultivo colonia sospechosa en medio de agar sangre y en agar MRSA (24 horas).
 - Crecimiento → Gram (coco gram positivo), catalasa (positiva) y coagulasa (positiva)



SARM → Sensibilidad a antimicrobianos

Interpretación Manitol



Interpretación

► Agar cromogénico selectivo

- Microorganismo con una coloración compatible con SARM
- Subcultivo colonia SARM en medio de agar sangre.



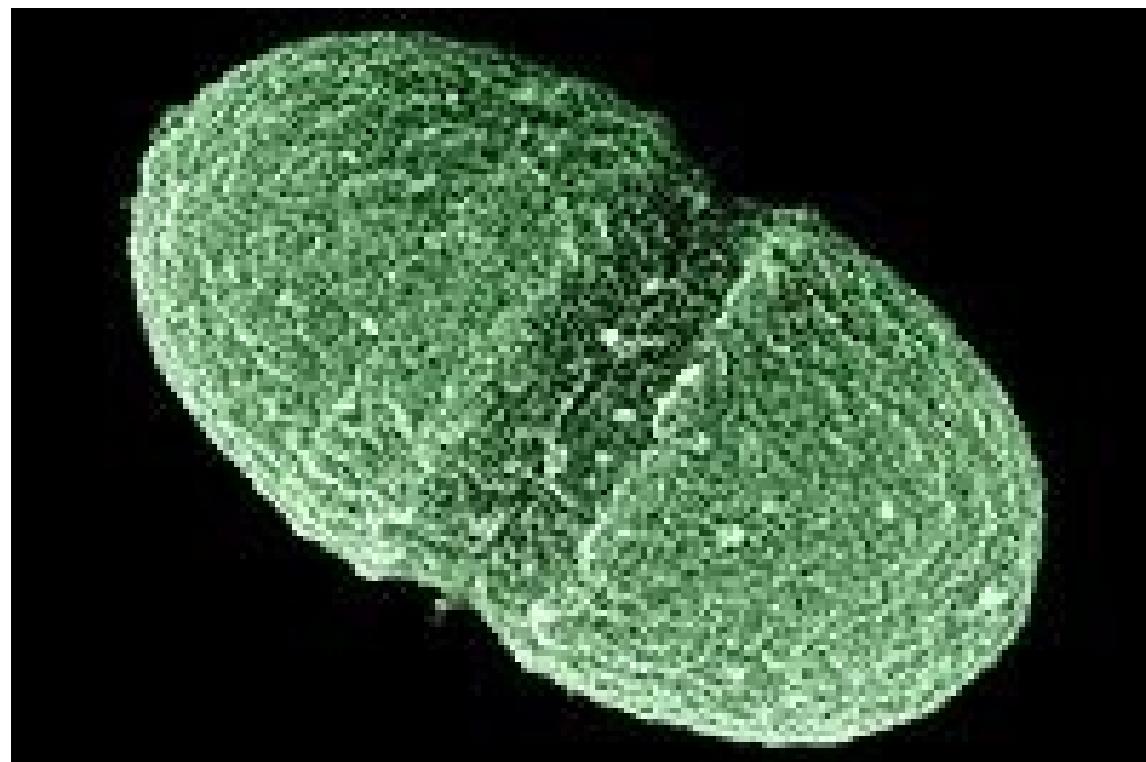
SARM → Sensibilidad a antimicrobianos

Necesidad de confirmación

- ▶ Aislamientos importantes (obtenidos de hemocultivos, líquidos estériles etc)
- ▶ Sospecha de fallo terapeútico
- ▶ Cuando se aíslan cepas con resistencias asociadas a otros grupos de antibióticos.
 - Método de disco-difusión con disco de cefoxitina (30 µg).
 - **Pruebas rápidas:**
 - Detectar gen mecA por PCR convencional o en tiempo real.
 - Aglutinación con látex para detectar la presencia de la PBP2a.

¡Ojo, se requiere identificación a nivel de especie → *S.aureus*!

Enterococcus spp.



Enterococcus spp.

- ▶ Más de 20 especies.
- ▶ Los enterococos forman parte de la microbiota intestinal normal del ser humano.
- ▶ Posee la capacidad de sobrevivir largos periodos de tiempo en condiciones desfavorables (suelo, alimentos y agua).
- ▶ Ambiente Hospitalario
 - Equipamiento médico
 - Ambiente que rodea a colonizados
 - Infectados

Reservorio

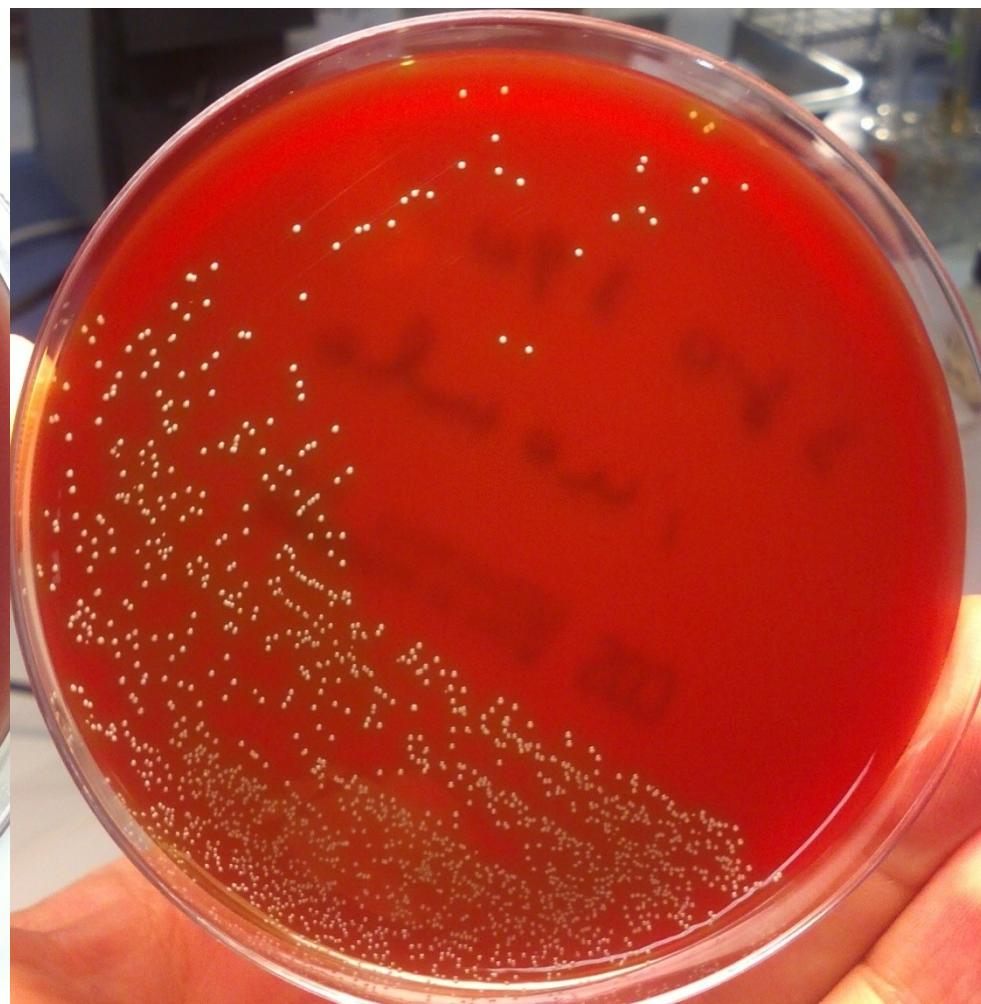
Enterococcus spp.

- ▶ *E. faecalis* es aislado con mayor frecuencia en muestras clínicas (80–90%).
 - Tracto gastrointestinal
 - Cavidad oral
 - Vagina
 - Área perineal
 - Tracto hepatobiliar
 - Tracto respiratorio superior
 - Piel, heridas abiertas y úlceras de decúbito
- ▶ *E. faecium* (5–20%).

E. faecalis



E. faecium



Enterococcus spp. Resistencias

- ▶ Resistencia intrínseca a
 - Betalactámicos
 - Lincosamidas
 - Aminoglucósidos
 - Quinolonas
 - Cotrimoxazol
- ▶ También adquieren resistencia por intercambio genético
 - Plásmidos
 - Transposones



Resistencia a Glucopeptidos

- ▶ Vancomicina y teicoplanina → Fenotipos:
- ▶ VanA → 

The diagram illustrates the genetic pathways for vancomycin resistance. On the left, arrows point from VanA and VanB genes to two ovals. The top oval contains 'Van y Tei' and the bottom oval contains 'Van'. To the right of the ovals are four blue arrows pointing upwards, representing the resulting resistance phenotype.
- ▶ VanB →
- ▶ VanC
- ▶ VanD
- ▶ VanE
- ▶ VanG
- ▶ En España en general los ERG son poco habituales

Infección Nosocomial *Enterococcus*

- ▶ Importancia creciente en la infección nosocomial:
- ▶ Pacientes críticos
- ▶ Quirúrgicos
- ▶ Áreas especiales de quemados
- ▶ Hematooncológicos
- ▶ Trasplantados



Contacto directo o indirecto:

Manos contaminadas
Equipamiento médico
Superficies rodean paciente
Diarrea en colonizados

Infecciones urinarias, bacteriemias, infecciones de herida quirúrgica y de quemaduras, úlceras de pie diabético y úlceras de decúbito.



Papel del Laboratorio Microbiología

- ▶ Identificación de las cepas de ERG en las muestras clínicas diarias.
- ▶ Detección de cepas ERG en las muestras de vigilancia epidemiológica.

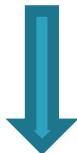


Tipo de muestras

- ▶ Frotis rectal o perianal
- ▶ Muestras de heces
- ▶ Orina
- ▶ Exudados de herida
- ▶ Superficies próximas al paciente
- ▶ Instrumental médico

Medios de Cultivos

▶ Medios selectivos y diferenciales



Vancomicina de 6 a 8 mg/L

Esculina → esculetina+ citrato férrico → marrón

Sales biliares y azida sódica

▶ Medios cromogénicos

- No se dispone de información suficiente sobre su empleo para el reconocimiento específico de ERG.

Interpretación

- ▶ Incubación a 35–37 °C durante 48 horas
- ▶ Primera lectura a las 24 horas
- ▶ La aparición de pequeñas colonias translúcidas acompañadas de una pigmentación negra o marrón a su alrededor hará sospechar de la presencia de ERG.
- ▶ Caldo de cultivo → oscurecimiento del medio.

Interpretación

- ▶ Colonias sospechosas translúcidas con pigmentación negra o marrón a su alrededor.
 - Gram y catalasa → cocos gram positivos catalasa negativos



Agar Sangre y medio cribado de resistencia a vancomicina



Agar BHI suplementado con 6 mg/L vancomicina

ERG → Sensibilidad a antimicrobianos

Pruebas rápidas

- ▶ PCR a tiempo real
 - Genes *vanA* y *vanB* *directamente de muestras clínicas.*
 - Mayor sensibilidad que con medios selectivos.
 - Mayor rapidez.
 - Detecta ERG de muestra directa y cultivo.

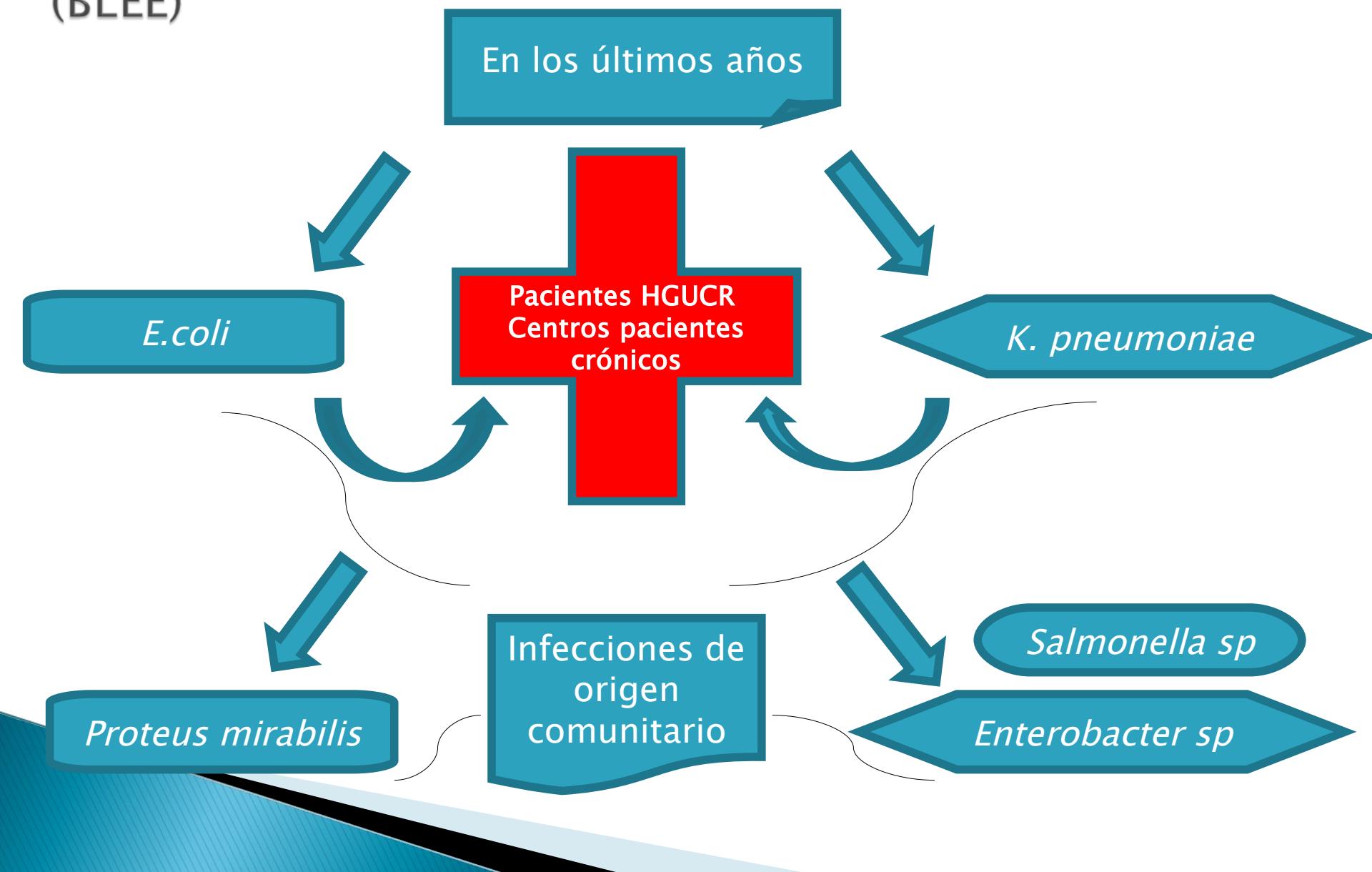
ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)



ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)

- ▶ Mecanismo de resistencia más frecuente a beta-lactámicos en enterobacterias es la producción de beta-lactamasas.
- ▶ Uno de los que más trascendencia clínica tienen es el de las BLEE → codificada por plásmidos.
- ▶ La primera BLEE se describió en Alemania en los primeros años de la década de 1980.
- ▶ Familias de las que provienen las BLEEs según secuencia aminoacídica → SHV, TEM, CTX-M, OXA, PER, VEB, BES, GES, SFO, IBC, etc.
- ▶ <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>

ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)



ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)

- ▶ Causas del las BLEE en la comunidad:
 - Co-selección y el **amplio uso** de antimicrobianos (incluyendo su uso en animales).
 - La **mayor eficacia** de los elementos genéticos que albergan los genes que codifican las BLEE para su **transmisión** entre diferentes microorganismos.
 - La **mayor utilización** de los **servicios sanitarios** hospitalarios por parte de la población general.
 - Aumento de portadores fecales BLEE → **incremento colonización** de otros individuos.

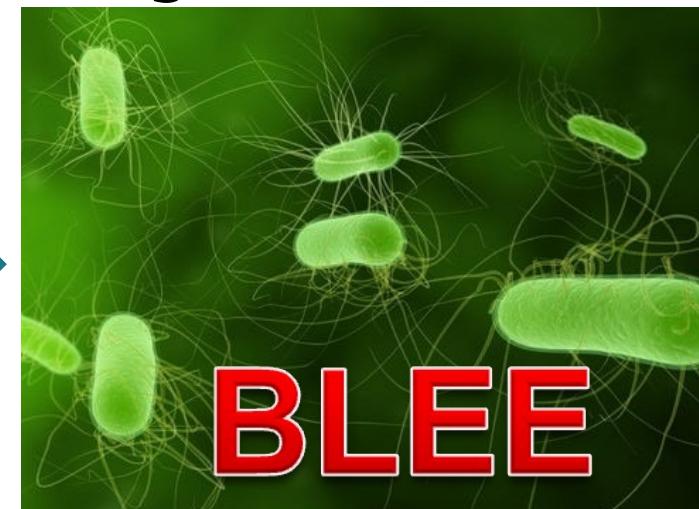
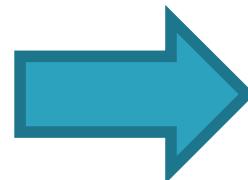
ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)

- ▶ Mecanismo de transmisión:
- ▶ Las manos del personal sanitario.
 - Principal reservorio → aparato digestivo
- ▶ Objetos que rodean a los pacientes.
- ▶ Productos utilizados en la higiene.

ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)

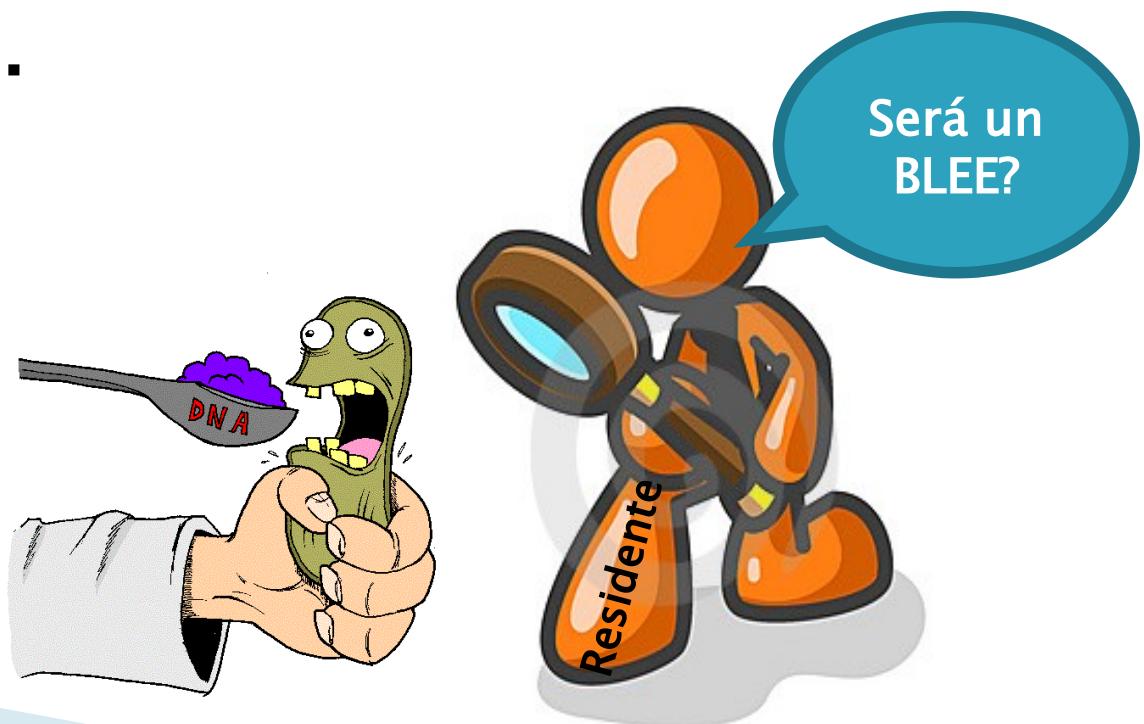
- ▶ Pacientes de riesgo:
- ▶ Enfermedad de base grave.
- ▶ Estancias prolongadas en el hospital.
- ▶ Objetos médicos de soporte vital (sonda urinaria, catéteres intravasculares, tubos endotraqueales).
- ▶ Tratamiento antimicrobiano prolongado.

Cefalosporinas de amplio espectro
Fluoroquinolonas
Cotrimoxazol
Aminoglucósidos



Papel del Laboratorio Microbiología

- ▶ Identificación de los microorganismos productores de estas enzimas en muestras diagnósticas y en las de portadores asintomáticos.
- ▶ Investigar fuentes ambientales de infección en brotes epidémicos.



Tipo de muestras

- ▶ Frotis rectal.
- ▶ Muestras de heces.
- ▶ Muestras ambientales.

Medios de Cultivos

- ▶ Medios selectivos



MacConkey

Agar de Driglasky

Agar nutritivo con vancomicina y anfotericina B

Base



Suplementados

cefotaxima o ceftazidima (0,5–4 mg/L)

Medios de Cultivos

▶ Medios cromogénicos



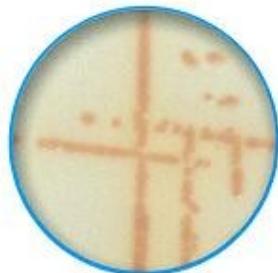
18-24 h.



**ESBL-Bx
Cefpodoxima**

Identificación directa de:

<i>E. coli</i>	rosa a burdeos
KESC	verde/azul a pardo/verdosa
<i>Proteaceae</i>	parda a marrón



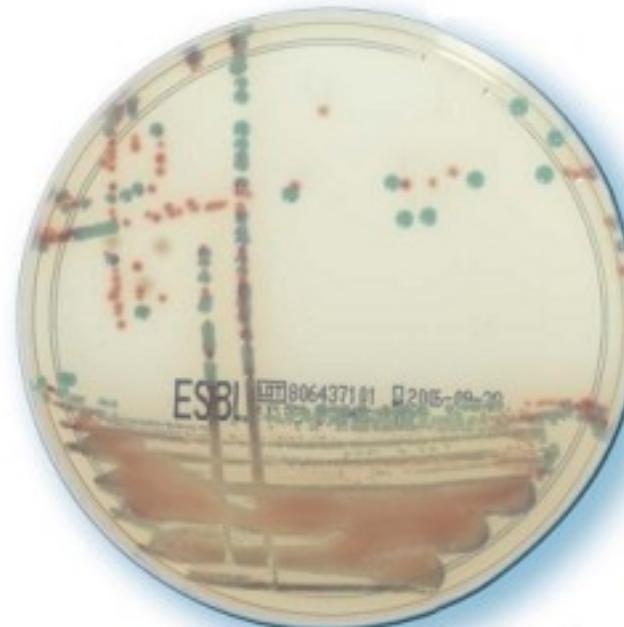
E. coli CIP 103982
Incubación 24 horas



K. pneumoniae ATCC® 700603
Incubación 24 horas



E. coli CIP 103582 - *K. pneumoniae* ATCC 700603
P. mirabilis ATCC BAA-896
Incubación 24 horas



Confirmación BLEE

Interpretación

- ▶ Incubación a 35°C aerobiosis durante 24–48 horas
- ▶ Primera lectura a las 24 horas.
- ▶ Medios selectivos → morfología de enterobacteria.
- ▶ ESBL-Bx

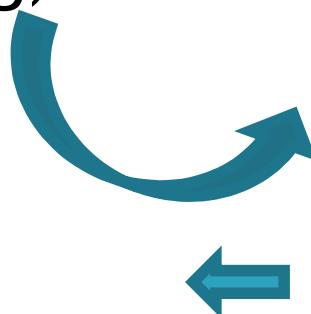


Identificación a nivel de especie y ATB
(pruebas bioquímicas convencionales, galerías comerciales o paneles de sistemas semiautomatizados)

Interpretación

- ▶ Antibiograma → buscamos confirmar BLEE.
- ▶ 1. Disco difusión
- ▶ Agar Mueller-Hinton con discos de **cefotaxima** (30 µg) o **ceftazidima** (30 µg) con y sin ácido clavulánico (10 µg).

BLEE



Interpretación

► 2. Microdilución en caldo:

- Ceftazidima (0,25–128mg/L) y cefotaxima (0,25–64mg/L) con y sin ácido clavulánico a un concentración fija de 4 mg/L.



CMI de una de las dos cefalosporinas disminuye 3 o más diluciones en presencia de clavulánico.

BLEE



Interpretación

- ▶ 3. Otras
 - Difusión Mueller con ácido
 - Tiras de cefalosporina

Disminución cefalosporina

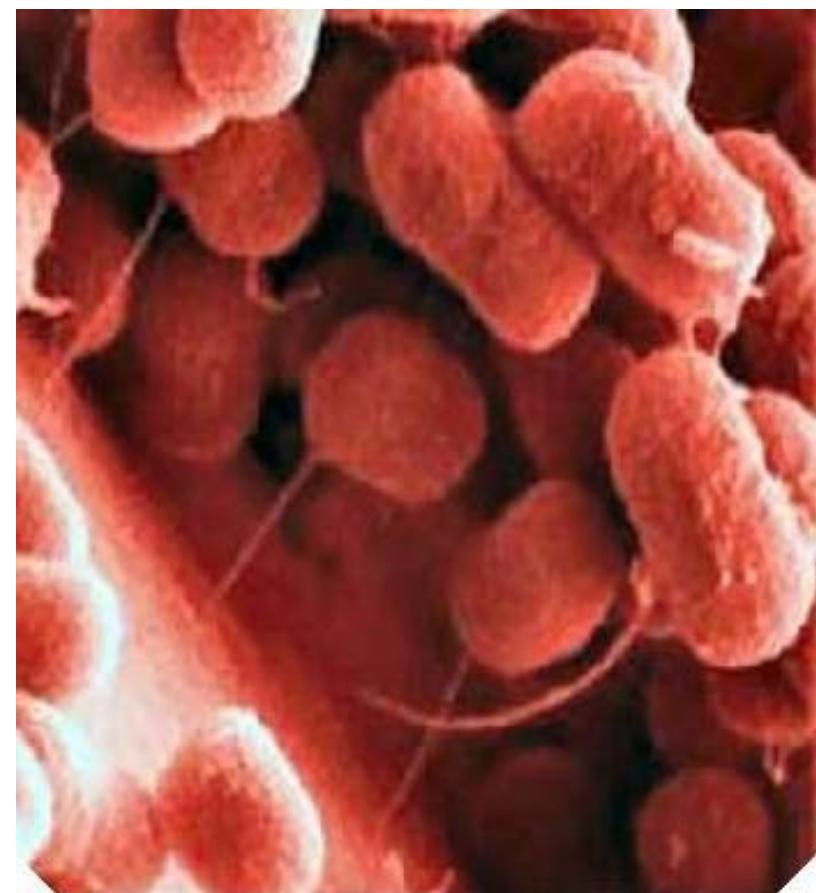
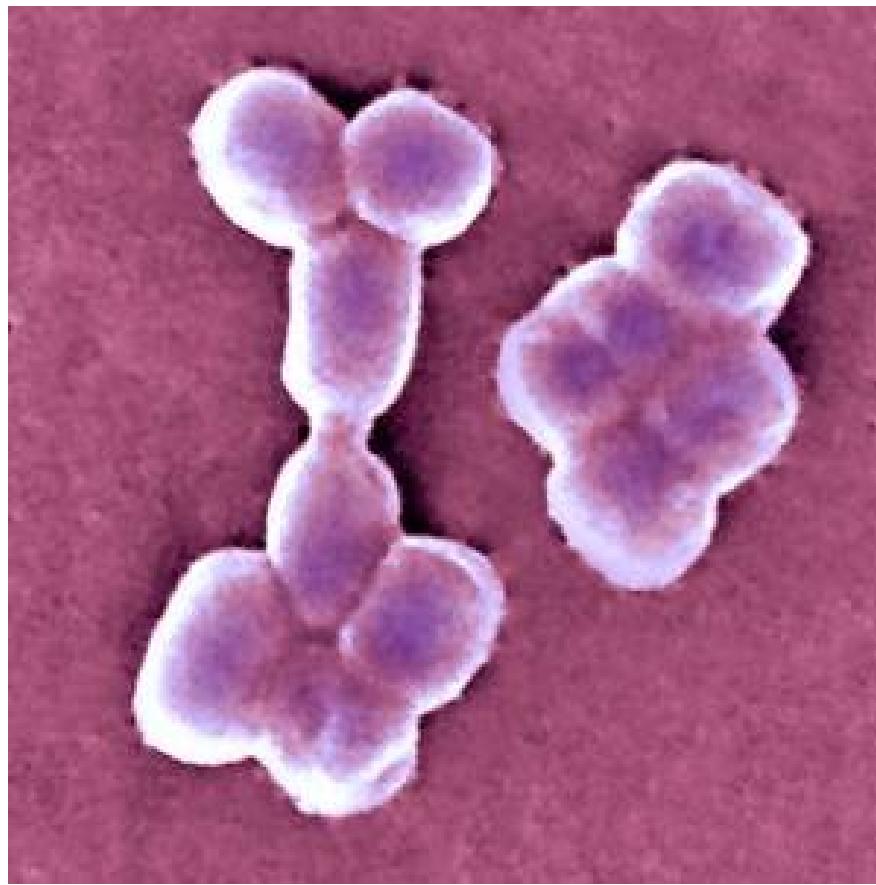


DLLC

adidos en agar implementado
vs la misma



Acinetobacter baumannii



Acinetobacter baumannii

- ▶ Hace unas décadas se aislaban con poca frecuencia de muestras clínicas.
- ▶ Bajo poder patógeno, actuan como oportunistas (UCI).
- ▶ Ha sido capaz de desarrollar resistencia a los antimicrobianos.
- ▶ Persistir en el medio ambiente largos períodos y extenderse a la gran mayoría de los hospitales.
- ▶ Ocasionando graves epidemias y situaciones de endemia.

Acinetobacter baumannii

- ▶ *A. baumannii nosocomiales* son resistentes a:
 - Beta-lactámicos (incluyendo las carbapenemas en bastantes ocasiones).
 - Fluoroquinolonas.
 - Aminoglucósidos.
 - Tetraciclinas.
 - Cotrimoxazol.
- En general sensibles a Polimixinas (colistina) → se han descrito aislados resistentes.

Acinetobacter baumannii multirresistente

- ▶ Capacidad de resistencia a numerosos antimicrobianos.
- ▶ Propagación clonal.
- ▶ Alteración genética.
- ▶ Explosión de resistencia.
- ▶ Multiresistente.
- ▶ Mecanismos de resistencia.
- ▶ Síntesis de enzimas.



Infección Nosocomial *A. baumannii*

- ▶ Sobrevive en medio ambiente largos periodos → importante la **contaminación ambiental**.
- ▶ Transmisión a través de las **manos del personal sanitario**.
- ▶ Pacientes infectados o **colonizados**.
 - Bacteriemia
 - Neumonía nosocomial (en particular en el paciente con ventilación mecánica)
 - Meningitis
 - Infecciones urinarias
 - Infecciones de heridas quirúrgicas y tejidos blandos.

Infección Nosocomial *A. baumannii*

- ▶ Los factores de riesgo relacionados con su adquisición incluyen:
 - Una estancia hospitalaria prolongada
 - Empleo de maniobras invasoras
 - Inmunosupresión
 - Enfermedad de base grave
 - Uso previo de antimicrobianos

Papel del Laboratorio Microbiología

- ▶ Identificación de la bacteria multirresistente en muestras diagnósticas y en las de pacientes colonizados.
- ▶ Investigar fuentes ambientales de infección en brotes epidémicos.

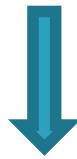


Tipo de muestras

- ▶ **Esputo**
- ▶ **Exudado de traqueostomía**
- ▶ **Heridas axila/ingle**
- ▶ **Frotis rectal**
- ▶ **Muestras ambientales.**
 - **Equipos de respiración asistida**
 - **Líquidos diversos**
 - **Medicaciones multidosis**
 - **Ropa de cama**
 - **Transductores de presión no desechables**
 - **Superficies de mobiliario (carros de curas o de medicación) que rodea a los pacientes**

Medios de cultivo

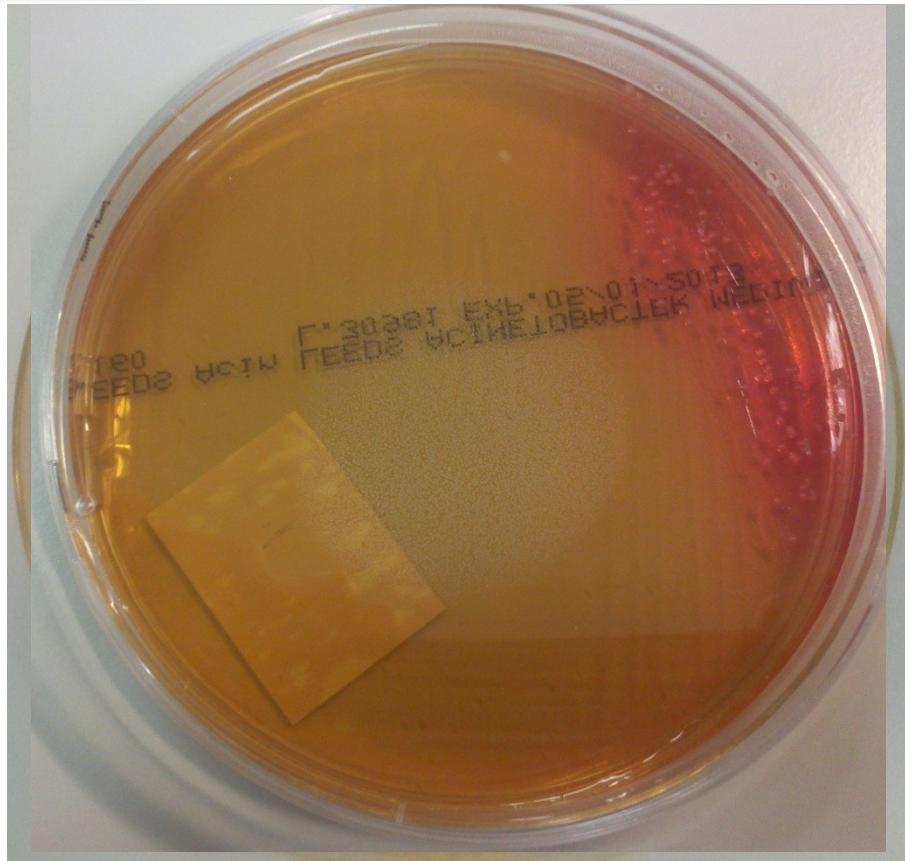
- ▶ Cualquiera de los medios selectivos habituales para bacterias gramnegativas → MacConkey
- ▶ Medios de cultivo diferenciales → LAM



Suplementado

Vancomicina (10 mg/L)
Cefsulodina (15 mg/L)
Cefradina (50 mg/L)

Medios de cultivo



Interpretación

- ▶ Aerobiosis a 35°C durante 24 y 48 horas.
- ▶ Se pueden realizar las pruebas de la catalasa (positivo) y de la oxidasa (negativo).



Identificación a nivel de especie y ATB
(pruebas bioquímicas convencionales, galerías comerciales o paneles de sistemas semiautomatizados)

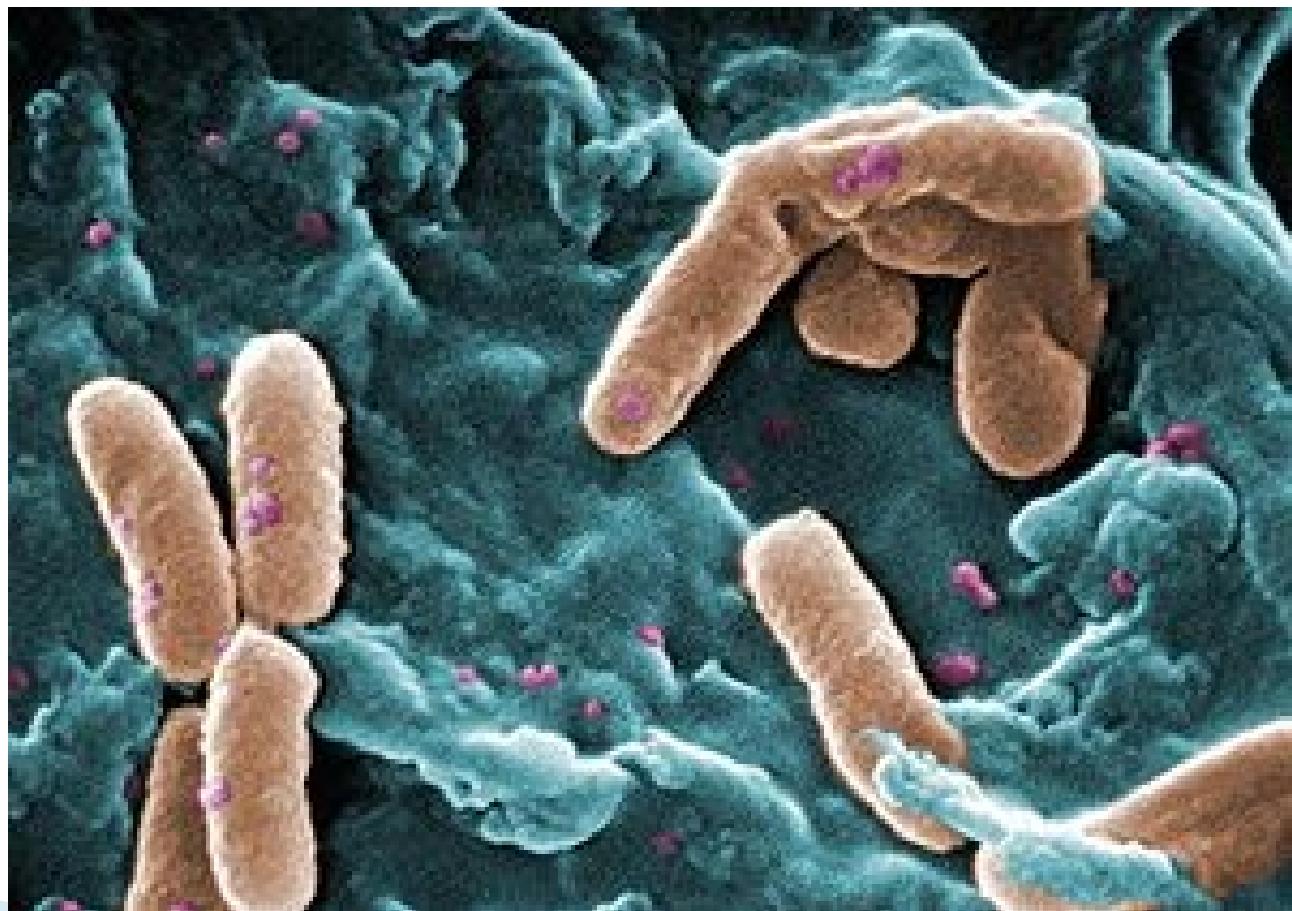


Difusión disco
Paneles comerciales



Acineto
Multirresistente

Pseudomonas aeruginosa



Pseudomonas aeruginosa

- ▶ Sobrevive fácilmente en el ambiente hospitalario.
- ▶ Constituye uno de los principales patógenos nosocomiales oportunistas.
- ▶ Presenta resistencia natural a muchos antimicrobianos:
 - Penicilinas
 - Cefalosporinas 1^a, 2^a y muchas de 3^a generación
 - Tetraciclinas
 - Cloranfenicol
 - Cotrimoxazol
 - Rifampicina

Facilidad para desarrollar mutaciones cromosómicas y adquirir material genético

Pseudomonas aeruginosa

- ▶ Su resistencia intrínseca depende
 - Baja permeabilidad de su membrana externa
 - Varios sistemas de expulsión activa
- ▶ Resistencia *AmpC* → expresión de Beta-Lactamasa “regulada” → nivel variable de resistencias a penicilinas y cefalosporinas.
- ▶ Betalactamasas adquiridas (integrones y trasposones) → METALO-BETA-LACTAMASA **MBL** → carbapenemasas que no se inhiben con ac. Clavulánico.

Pseudomonas aeruginosa



Pseudomonas aeruginosa

- ▶ Ejemplo:
- ▶ Resistencia a carbapenemas



Pseudomonas aeruginosa

- ▶ Infecciones relacionadas con la situación del huésped:
 - Rotura de la barra cutáneo-mucosa
 - Trastornos de la inmunidad humoral
 - Neutropenia.
- ▶ Factores de riesgo para aparición Multirresistencia
 - Gravedad de la infección
 - Uso de dispositivos invasores
 - Hospitalización prolongada
 - Exposición previa a antimicrobianos

Inmunodeprimidos
y quemados

Pseudomonas aeruginosa

▶ Variedad de infecciones

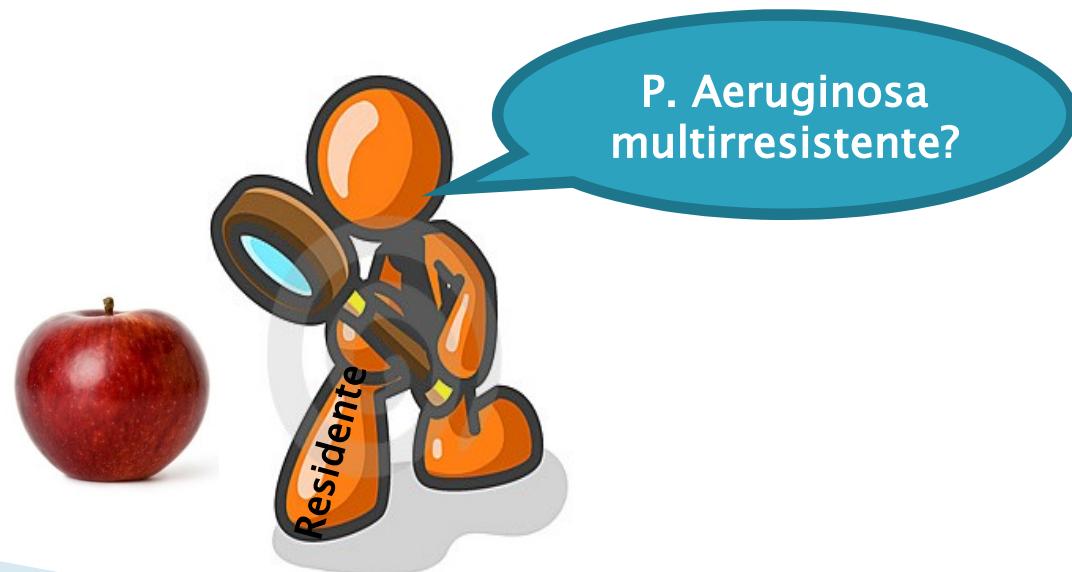
- Bacteriemia
- Neumonía asociada a ventilación mecánica
- Infecciones respiratorias en pacientes con fibrosis quística
- Neumonía de la comunidad
- Infecciones urinarias
- Endocarditis
- Meningitis
- Diversas formas de otitis
- Queratitis y endoftalmitis, osteomielitis, enterocolitis, infecciones perianales

Pseudomonas aeruginosa

- ▶ Es importante estudiar a pacientes colonizados:
 - Colonización del tracto gastrointestinal.
 - Faringe, axila y periné.
 - Productos y equipos hospitalarios (humedad).
 - Superficie de frutas y verduras.

Papel del Laboratorio Microbiología

- Identificación de cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* en muestras clínicas.
- Contribuir al diseño e implementación de programas de vigilancia y control.
- Aplicación de métodos de epidemiología molecular que ayuden a establecer la relación clonal de los aislamientos, y la caracterización de los mecanismos de resistencia implicados y de los elementos genéticos que los codifican.



Tipos de muestra

- ▶ Toma de muestras de pacientes
 - ▶ Muestras del medio ambiente
 - ▶ Equipos de atención sanitaria
-
- ▶ En definitiva similares a las que se toman para *Acinetobacter baumannii*.

Medios de cultivo

- ▶ Diferenciales para bacterias gramnegativas → agar MacConkey.
- ▶ Medios selectivos con cetrimida

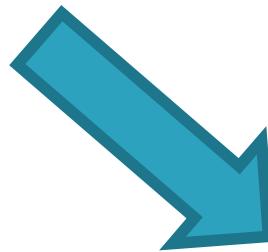


Flora mixta

Muestras
ambientales

Medios de cultivo

- ▶ Agar MacConkey
 - Ceftazidima
 - Aminoglucósidos
 - Carbapenemas



Favorecerá específicamente la selección de cepas con mayor nivel de resistencia

Interpretación

- ▶ Aerobiosis a 35°C durante 24 y 48 horas.
- ▶ Se identifica fácilmente por:
 - Aspecto de la colonia, la pigmentación, prueba de la oxidasa (positiva), oxidación de la glucosa pero no fermentación de la misma, presencia de arginina dehidrolasa y crecimiento a 42°C.



Identificación a nivel de especie y ATB
(pruebas bioquímicas convencionales, galerías comerciales o paneles de sistemas semiautomatizados)



Difusión disco
Paneles comerciales



P.aeruginosa Multirresistente

Interpretación

- ▶ Antibiograma → buscamos **confirmar MBL**.
- ▶ 1. Disco difusión
- ▶ Agar con y sin EDTA e imipenem o ceftazidima



EDTA es capaz de aumentar el diámetro del halo del beta-lactámico



MBL

Interpretación

▶ 2. Microdilución en caldo:

- Comparación de la CMI de imipenem solo y en combinación con dos inhibidores, EDTA (0,4 mM) y 1,10 fenantrolina (0,04mM)



Disminución de la CMI de imipenem en combinación con los quelantes de al menos 8 veces

↓
MBL



Tiras de Etest que contienen imipenem e imipenem+EDTA

Interpretación

▶ Estos métodos:

- No son completamente sensibles ni específicos.
- Tienen difícil interpretación, con frecuencia subjetiva.



PCR



MBL

Muchas gracias por vuestra atención

