

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Genètica i Microbiologia

**Colonización por *Pseudomonas aeruginosa* en los enfermos
sometidos a ventilación mecánica**



TESIS DOCTORAL
M^a Pilar Cortés Garmendia
Barcelona 2000

Pere Coll Figa, Doctor en Medicina y Profesor Titular del Departament de Genètica i Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona y **Jordi Rello Condomines**, Doctor en Medicina y Profesor Asociado del Departament de Medicina i Cirurgia de la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada "Colonización por *Pseudomonas aeruginosa* en los enfermos sometidos a ventilación mecánica" realizada por M^a Pilar Cortés Garmendia para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido elaborada bajo nuestra dirección y cumple los requisitos necesarios para su tramitación y posterior defensa ante el tribunal correspondiente.

Para que conste a efectos oportunos, firmamos la presente petición del interesado.

Barcelona, 15 de Diciembre del 2000



Dr. Pere Coll Figa

Dr. Jordi Rello Condomines

A mis aïtas y a mis hermanos

Agradecimientos

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración de numerosas personas a las que querría expresar mi agradecimiento.

A mis aitas y hermanos, a los que quiero agradecer su generosidad y comprensión, porque sin su cariño y apoyo incondicional no hubiera sido posible que llegara este momento.

Al Dr. Guillermo Prats, Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital de Sant Pau, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, así como por su colaboración e interés en el proyecto.

Al Dr. Pere Coll, director de esta Tesis, por la confianza depositada, por su estímulo y colaboración en la ejecución de este trabajo y por transmitirme, con sus reflexiones, el sentido crítico y rigor científico necesarios en todo trabajo de investigación.

Al Dr. Jordi Rello, codirector de esta Tesis, por su entusiasmo y apoyo, cuyas sugerencias y reflexiones han contribuido a enriquecer este trabajo.

Al Dr. Jordi Vallés, por su paciente disposición y asesoramiento, así como por el tiempo dedicado en la recogida de las muestras y el seguimiento de los pacientes.

A Dolors Mariscal, por su colaboración y en especial al esfuerzo dedicado en el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos.

A Ana Villagrà y a Emilià Díaz, por su participación en la recogida de las muestras.

A Marta Roqué y a Ignasi Gich, por su aportación en el análisis estadístico de los datos.

A la Dra. Carmen Muñoz, con la que inicié mi formación, por su calidad humana y científica.

A Magdalena Otegui, por su amistad y cariño, por "todo" lo que he aprendido y compartido durante estos años.

A Xavier Garriga, por su inestimable ayuda y sus enseñanzas con las que pude disfrutar durante tres años de andadura científica, así como por su amistad.

A Paquita March y Teresa Llovet, por su permanente disposición y sus sabios consejos, así como por su apoyo y amistad demostrada desde el momento en que llegué al laboratorio.

A todos los compañeros del laboratorio de Recerca (Isaí, Rosa, Neus, Isabel, Esther, Mónica, Eli, Clara, Montse S, Montse E, Roxana, Jussara), por todo lo que me han enseñado y por los buenos momentos compartidos que han hecho realmente agradable mi estancia durante estos años.

A todo el personal del Servicio de Microbiología del Hospital de Sant Pau, por su acogida y su colaboración siempre que lo he necesitado.

A todos y cada uno de mis amigos (de Barcelona y del País Vasco), por su paciencia y comprensión. Por todo el apoyo y el cariño que me han demostrado a pesar de los pocos momentos que, durante este tiempo, he podido disfrutar de su compañía.

La realización de este estudio ha sido posible gracias a la beca de Investigación 96/027 concedida por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) y a una Beca de Formación de Personal Investigador del Institut de Recerca del Hospital de Sant Pau.

Abreviaturas

AK	Amikacina
AZT	Aztreonam
CB	Cepillado bronquial
CIP	Ciprofloxacino
CP	Cepillo protegido
EAP	Edema agudo de pulmón
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
GEN	Gentamicina
IMP	Imipenem
LBA	Lavado broncoalveolar
LPS	Lipopolisacárido
NAV	Neumonía asociada a la ventilación mecánica
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
PFGE	Electroforesis en campo pulsante
PT	Pulsotipo
SAMR	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilin resistente
SAMS	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilin sensible
SDRA	Síndrome de distrés respiratorio agudo
TCE	Traumatismo craneoencefálico
TOB	tobramicina
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UFC	Unidad formadora de colonias
VM	Ventilación mecánica

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.1.1	Taxonomía	3
1.1.2	Morfología, estructura y composición	3
1.1.3	Características fisiológicas y bioquímicas	4
1.1.4	Epidemiología	5
1.1.5	Estructura antigénica	7
1.1.6	Patogenia	8
	<i>Adherencia bacteriana y colonización</i>	10
	<i>Invasión local</i>	11
	<i>Diseminación</i>	12
1.1.7	Manifestaciones clínicas	13
1.1.8	Diagnóstico	15
1.1.9	Mecanismos de resistencia	18
1.1.9.1	Resistencia a los betalactámicos	18
	<i>Resistencia natural</i>	18
	<i>Resistencia adquirida</i>	19
1.1.9.2	Resistencia a los aminoglucósidos	22
1.1.9.3	Resistencia a las quinolonas	22
1.1.10	Tratamiento	23

1.2	Neumonía en el enfermo sometido a ventilación mecánica	25
1.2.1	Etiología	25
1.2.2	Patogenia	26
1.2.3	Manifestaciones clínicas. Criterios diagnósticos	30
	<i>Diagnóstico clínico</i>	31
	<i>Diagnóstico microbiológico</i>	31
	<i>Estudio histológico</i>	35
1.2.4	Tratamiento	35
1.2.5	Prevención	37
	<i>Prevención de la colonización</i>	38
	<i>Modulación de las defensas del huésped</i>	41
1.3	<i>Neumonía en el enfermo sometido a ventilación mecánica por P. aeruginosa</i>	42
1.3.1	Incidencia	42
1.3.2	Manifestaciones clínicas	44
1.3.3	Factores de riesgo	46
1.3.4	Episodios recurrentes	47
1.3.5	Factores pronósticos	48
1.4	Marcadores en la epidemiología de las enfermedades infecciosas	50

1.4.1	Marcadores fenotípicos	52
	<i>Biotipado</i>	52
	<i>Antibiotipado</i>	53
	<i>Serotipado</i>	54
	<i>Fagotipado</i>	55
	<i>Producción de bacteriocinas</i>	55
1.4.2	Marcadores moleculares	56
1.4.2.1	Análisis de proteínas	56
	<i>Perfiles electroforéticos de proteínas totales y de membrana externa</i>	56
	<i>Análisis multienzimático</i>	57
1.4.2.2	Análisis de ácidos nucleicos	58
	<i>Análisis del DNA plasmídico</i>	58
	<i>Análisis del DNA cromosómico</i>	60
	A. Análisis del polimorfismo de restricción	61
	A.1 Análisis de los RFLPs del DNA total	63
	A.2 Análisis de los RFLPs asociados a una secuencia o a un gen	67
	B. Análisis del polimorfismo de amplificación	69
	B.1 Amplificación de diversas regiones del genoma	69
	B.2 Detección de dianas de restricción	71
	C. Análisis del polimorfismo de secuenciación	73
1.4.3	Evaluación de los marcadores epidemiológicos	74

	<i>Criterios de eficacia</i>	74
	<i>Criterios de eficiencia</i>	75
1.4.4	Cálculos estadísticos de similitud y agregación	76
2	MATERIAL Y MÉTODOS	79
2.1	Ámbito del estudio	81
2.2	Estudio ambiental	81
2.3	Sujetos de estudio	84
2.3.1	Criterios de inclusión	84
2.3.2	Criterios de exclusión	84
2.3.3	Variables clínicas	85
2.3.4	Fin del estudio	86
2.3.5	Localizaciones anatómicas estudiadas	87
2.4	Estudio microbiológico	87
2.4.1	Técnicas de aislamiento	87
	<i>Muestras de superficies y manos</i>	87
	<i>Muestras del grifo de agua</i>	88
	<i>Muestras clínicas</i>	88
2.4.2	Identificación de <i>P. aeruginosa</i>	89

2.4.3	Estudio de los cultivos de <i>P. aeruginosa</i>	90
2.4.4	Conservación de las cepas	90
2.5	Marcadores epidemiológicos	90
2.5.1	Análisis de los perfiles de macrorestricción genómica mediante la técnica de electroforesis en campo pulsante ..	90
	<i>Principio de la electroforesis en campo pulsante</i>	91
	<i>Preparación de los insertos y lisis celular</i>	91
	<i>Lavado de los insertos</i>	93
	<i>Digestión enzimática del DNA cromosómico</i>	93
	<i>Electroforesis</i>	94
	<i>Tinción y visualización del DNA</i>	96
	<i>Análisis de los patrones de bandas</i>	97
	<i>Soluciones para la electroforesis en campo pulsante (PFGE)</i>	100
2.5.2	Estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos	102
	<i>Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos</i>	102
	<i>Determinación de los patrones de resistencia</i>	103
2.6	Definiciones	105
2.6.1	Pulsotipo, subtipo y cepa	105
2.6.2	Colonización	105
2.6.3	Colonización primaria o por cepas propias del paciente ..	106
2.6.4	Colonización de origen exógeno	106

2.6.5	Neumonía asociada a ventilación mecánica	106
2.6.6	Lugar inicial de colonización y secuencia de la colonización	107
2.6.7	Cultivos policlonales	107
2.7	Análisis estadístico	108
3	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	109
3.1	Hipótesis	111
3.2	Objetivos	111
4	RESULTADOS	113
4.1	Cultivos	115
4.1.1	Estudio ambiental de la UCI	115
	<i>Cortes ambientales</i>	115
	<i>Grifos de los boxes</i>	117
4.1.2	Pacientes	118
4.2	Tipificación de <i>P. aeruginosa</i> mediante PFGE	121
4.2.1	Pulsotipos	121
	<i>Análisis con el enzima de restricción XbaI</i>	121
	<i>Análisis con el enzima de restricción DraI</i>	122

4.2.2	Frecuencia y distribución de los pulsotipos	130
	<i>Cortes ambientales</i>	130
	<i>Grifos de los boxes</i>	132
	<i>Pacientes</i>	134
4.2.3	Cronología y frecuencia de aparición de los pulsotipos	139
	<i>Cortes ambientales</i>	140
	<i>Grifos de los boxes</i>	140
	<i>Pacientes</i>	141
4.2.4	Variación de los pulsotipos	148
4.3	Colonización por <i>P. aeruginosa</i>	153
4.3.1	Colonización en el momento del ingreso	156
4.3.2	Colonización adquirida durante la estancia en la UCI	158
	<i>Frecuencia de colonización</i>	158
	<i>Origen de la colonización</i>	160
	<i>Colonización del tracto respiratorio inferior durante la ventilación mecánica</i>	167
4.3.3	Pacientes con diagnóstico de NAV	167
4.3.4	Características epidemiológicas de los pacientes incluidos en el estudio	171
4.4	Cultivos policlonales	173
	<i>Cultivos procedentes de los cortes ambientales</i>	173
	<i>Cultivos procedentes de los grifos</i>	174

	<i>Cultivos procedentes de los pacientes</i>	174
4.4.1	Relación de la morfología de las colonias con los pulsotipos	175
4.5	Estudio de sensibilidad a los antimicrobianos	180
4.5.1	Evaluación de los patrones de sensibilidad por cultivo	180
	<i>Expresión, en un cultivo, de varios fenotipos de sensibilidad por un pulsotipo</i>	180
	<i>Expresión, en un cultivo, de varios fenotipos de sensibilidad por varios pulsotipos</i>	187
	<i>Relación del patrón de sensibilidad con la morfología de las colonias y los pulsotipos</i>	191
4.5.2	Patrones de sensibilidad	197
	<i>Cortes ambientales</i>	197
	<i>Grifos de los boxes</i>	198
	<i>Pacientes</i>	198
5	DISCUSIÓN	201
5.1	Caracterización molecular de <i>P. aeruginosa</i>	203
5.2	La UCI, un importante reservorio de <i>P. aeruginosa</i>	208
5.3	El ambiente de la UCI, origen principal de la colonización	212
5.4	Colonización respiratoria por <i>P. aeruginosa</i> durante el período de ventilación mecánica	218

5.5	Implicaciones del hallazgo de cultivos policlonales	222
5.5.1	Estudios epidemiológicos	222
5.5.2	Heterogeneidad de los fenotipos de sensibilidad a los antimicrobianos	225
6	CONCLUSIONES	231
7	BIBLIOGRAFÍA	235
8	APÉNDICE	261

1 INTRODUCCIÓN

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

1.1.1 Taxonomía

Pseudomonas aeruginosa es una especie bacteriana perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae* y al género *Pseudomonas*¹⁸³. La clasificación original del género *Pseudomonas* en cinco grupos basada en la homología del DNA/rRNA¹⁸² ha sufrido una extensa revisión, lo que ha provocado que en la actualidad cuatro de los cinco grupos de homología se hayan clasificado como géneros separados. El género *Pseudomonas* sensu stricto está limitado al grupo I de homología e incluye como especie tipo a la especie *P. aeruginosa*, así como a otras especies. Los miembros de los otros grupos de homología se han clasificado como géneros separados e incluyen *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Comamonas*, *Shewanella*, *Ralstonia*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Acidovorax* y *Brevundimonas*¹¹¹. Asimismo, el género *Pseudomonas* puede diferenciarse de otros géneros relacionados en función de la composición de los ácidos grasos de la pared celular²⁴².

Existe una marcada heterogeneidad entre los distintos miembros de este género en relación con el contenido de ácidos nucleicos y proteínas. El contenido en GC% para el género *Pseudomonas* puede variar de un 58 % a un 70 %¹⁸². La especie *P. aeruginosa* presenta un contenido en GC% de un 67.2%¹⁸³.

1.1.2 Morfología, estructura y composición

P. aeruginosa es un bacilo con forma recta o ligeramente curvada y con un tamaño de 1,5 a 5µm de largo por 0,5 a 1µm de ancho.

Es un bacilo gramnegativo, no formador de esporas y móvil merced a la existencia de un flagelo polar, aunque de forma ocasional algunas células pueden

4 -Introducción-

presentar dos o más flagelos. Además, puede presentar unas proyecciones externas filiformes de estructura proteica, llamadas *pili* o fimbrias, relacionadas con su adherencia a las células del huésped.

La estructura y composición de la pared celular de *P. aeruginosa* es compleja y semejante a las de los microorganismos gramnegativos de la familia *Enterobacteriaceae*. Contiene un esqueleto de peptidoglicano y la membrana externa está compuesta por fosfolípidos, proteínas y el lipopolisacárido (LPS). Como en las bacterias gramnegativas, el LPS está compuesto por polisacáridos centrales comunes a todas las cepas y polisacáridos de cadena lateral específicos de cepa. Además, el centro del LPS contiene ácido 2-Keto-3-ácido deoxyoctónico (KDO) y lípido A. Sin embargo, el LPS de *P. aeruginosa* tiene más fósforo y contiene una L-alanina amido-unida distintiva y los aminoazúcares fucosamina, quinovosamina y de forma ocasional D-bacilosamina. El lípido A de *P. aeruginosa* carece del ácido β -hidroximirístico hallado en las enterobacterias ¹⁰⁹.

1.1.3 Características fisiológicas y bioquímicas

P. aeruginosa posee un metabolismo aerobio estricto, sin embargo, puede crecer en condiciones anaeróbicas utilizando nitrato o arginina como aceptor final de electrones. Es una bacteria versátil nutricionalmente, pudiendo utilizar como fuentes de carbono gran variedad de carbohidratos, alcoholes y aminoácidos.

En cultivo, crece sin dificultad en cualquier medio enriquecido o no, selectivo o diferencial. Las condiciones óptimas de crecimiento son una temperatura de 37°C, siendo capaz de crecer a 42°C, pero no a 4°C.

P. aeruginosa es oxidasa y catalasa-positiva. Se diferencia de otras especies por la producción de ácidos a partir de glucosa y xilosa pero no a partir de lactosa o sucrosa. Puede transformar el nitrato a nitrito o gas. Es L-arginina dehidrolasa

positiva y L-lisina descarboxilasa negativa. Algunas de las características bioquímicas y de crecimiento con valor taxonómico diferencial para *P. aeruginosa*, se ilustran en la tabla 1 ¹¹⁴.

1.1.4 Epidemiología

P. aeruginosa presenta una distribución cosmopolita. Sus mínimos requerimientos nutritivos y su tolerancia a una amplia variedad de condiciones físicas, contribuyen a su éxito ecológico y a su papel como patógeno oportunista.

Presenta una predilección por el ambiente húmedo, factor crítico en el ambiente de los hospitales pudiendo encontrarse en el equipamiento respiratorio, soluciones de lavado, desinfectantes, medicinas, fluidos de irrigación, lavamanos, etc... ¹⁶⁰.

P. aeruginosa puede encontrarse, aunque de forma infrecuente, formando parte de la flora microbiana normal de individuos sanos, colonizando el tracto intestinal y otras localizaciones húmedas como la garganta, la mucosa nasal o zonas húmedas de la piel ¹¹⁴. Sin embargo, la tasa de colonización puede aumentar en los pacientes hospitalizados, particularmente los que permanecen ingresados durante largos períodos de tiempo y/o han recibido tratamiento antimicrobiano de amplio espectro o quimioterapia. Los lugares de colonización en estos pacientes son similares a los mencionados en los individuos sanos, aunque también debe incluirse el tracto respiratorio inferior, especialmente en los pacientes sometidos a ventilación mecánica ¹⁹⁶.

Test	<i>P. aeruginosa</i> (n = 201)	<i>P. fluorescens</i> (n = 155)	<i>P. putida</i> (n = 16)	<i>P. stutzeri</i> (n = 28)	<i>P. mendocina</i> (n = 4)	<i>P. pseudoalcaligenes</i> (n = 34)	<i>P. alcaligenes</i> (n = 26)	<i>Pseudomonas</i> sp. CDC grupo I ^c (n = 31)	<i>P. luteola</i> (n = 34)	<i>P. oryzae</i> (n = 36)
Oxidasa	99	97	100	100	100	100	96	100	0	0
Crecimiento										
MacConkey	100	100	100	100	100	100	96	97	100	100
Cetrimida	94	89	81 (6)	4	75 (25)	56 (18)	15	13 (6)	0	25 (28)
6,5% NaCl	65	43	100	80 (16)	100	62 (6)	41	14	74	62
42°C	100	0	0	69	100	94	0	48	94	33
Nitrato										
Reducción	98	19	0	100	100	100	54	100	62	6
Producción de gas	93	3	0	100	100	0	0	100	0	0
Pioverdina	65	96	96	0	0	0	0	0	0	0
Arginina dihidrolasa	100	97	100	0	100	78	12	33	100	14
Lisina descarboxilasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
Ornitina descarboxilasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Indol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leche de girasol	89 pep ^b	95 pep	62 k ^b	57k	25 (75)k	28k	46k	39k	44k	57k
Hidrólisis										
Urea	48 (9)	21 (13)	13 (44)	33 (22)	50	3 (6)	0	3 (7)	26 (38)	77
Gelatina	82	100	0	0	0	0	0	4	61	17
Acetamida	100	6 (12)	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
Esculina	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
Ácido de ^c :										
Glucosa	97	100	100	96	100	9	0	0	100	100
Fructosa	ND ^d	ND	ND	ND	ND	79 (21)	0	ND	ND	ND
Almidón	ND	ND	ND	100	0	ND	ND	ND	ND	ND
Xilosa	90	100	100	93 (7)	75 (25)	18 (12)	0	0	100	100
Lactosa	<1	24	25 (13)	0	0	00	0	0	3 (24)	14 (22)
Sucrosa	0	48	0	0	0	0	0	0	12	25
Maltosa	<1	2	31	100	0	0	0	0	100	97
Manitol	70	53	25	89	0	0	0	0	76 (18)	100
Citrato Simons	95	93	94 (6)	82 (14)	100	26 (9)	57 (8)	42 (6)	100	97
n° de flagelos	1	>1	>1	1	1	1	1	1	>1	1

Tabla 1. Características de *Pseudomonas* spp. pertenecientes al género *Pseudomonas* aisladas en muestras clínicas^a (extraída de Kiska DL y cols.,¹¹⁴).

^a Porcentaje de cepas positivas; el porcentaje en paréntesis representa cepas con reacciones retardadas; ^b Tipo de reacción en leche de girasol, pep, peptonización; k, alcalina.

^c Medio basal oxidación-fermentación con un 1% de carbohidrato; ^d ND, no determinado.

Aunque la colonización por *P. aeruginosa* frecuentemente precede a la infección, la procedencia u origen del microorganismo y el modo de transmisión a menudo no está claro. Se ha llegado a postular como origen de las cepas endémicas de *P. aeruginosa* a reservorios potenciales como vegetales no cocinados, los lavamanos de los hospitales e incluso las flores en las habitaciones de los pacientes. Los posibles brotes o epidemias adquiridos en el hospital han sido relacionados con una gran variedad de reservorios específicos como el equipamiento respiratorio, endoscopios, antisépticos, escayolas, marcapasos, etc ¹⁹⁶. La transmisión de *Pseudomonas* entre los pacientes, vía las manos del personal sanitario o por otro tipo de medios o fomites, a menudo es asumida pero difícil de probar ^{65,290}.

1.1.5 Estructura antigénica

P. aeruginosa es heterogénea desde un punto de vista serológico. Se han descrito tres tipos de antígenos ^{187, 189}:

- ♦ **Antígeno O**, estable al calor y representado por el LPS, componente de la membrana externa. Los polisacáridos centrales están conservados en todas las especies y las unidades repetidas de la cadena lateral son las que confieren la especificidad antigénica.

Como sistema de clasificación se utiliza el Sistema de Tipificación Antigénico Internacional (*International Antigenic Typing Scheme; IATS*) propuesto por Liu y cols. ¹²⁸ que comprende 17 tipos. Este esquema se ha completado recientemente con tres nuevos tipos ¹²⁹.

La frecuencia de los diferentes tipos O en las muestras clínicas varía en función de la localización geográfica y la procedencia del aislamiento. No obstante, los serotipos O1, O3, O6, O11 y O12 se han descrito entre los más frecuentes ^{189, 190}. Además, algunos de ellos (p. ej. O11 y O12 se han asociado a patrones de multiresistencia ^{190, 253}.

- ♦ **Antígeno H**, sensible al calor. Se han definido dos grupos de antígenos

8 -Introducción-

flagelares: H1 y H2, que, a su vez, pueden subdividirse en ocho determinantes antigénicos ^{120, 189}. Debido a las dificultades que comporta la preparación de antígenos flagelares específicos, su utilización como método de tipificación de *P. aeruginosa* no ha sido adoptado por la mayoría de laboratorios.

- ◆ **Mucoide (M)**, responsable de la inaglutinabilidad de algunas cepas a los antígenos O y H, hecho similar a lo que ocurre en algunas enterobacterias, se trataría de ácido poliurónico secretado por algunas cepas ¹⁸⁷.

1.1.6 Patogenia

La patogenia de *P. aeruginosa* debe ser entendida en el contexto de su papel como patógeno oportunista y a su capacidad de sobrevivir en el ambiente. Raramente causa enfermedad en individuos sanos, pero es altamente patógena cuando se producen alteraciones en las defensas del huésped como la rotura de la integridad de la piel o mucosas, el uso de dispositivos médicos (catéteres intravenosos, sondas urinarias, tubos endotraqueales) o la alteración de mecanismos de defensa específicos.

La patogenia es un proceso multifactorial, dado el gran número de factores de virulencia producidos por el microorganismo y por el amplio espectro de enfermedades que causa. Se postula que puede producirse en tres estadios, adherencia y colonización, invasión local y, por último, diseminación y enfermedad sistémica. Cada estadio es un requisito previo para el siguiente, pero la enfermedad puede detenerse en cualquier estadio. Cada uno de los estadios parece estar mediado por determinados factores de virulencia, siendo responsables de síndromes característicos ¹⁹⁶.

En la siguiente tabla (tabla 2), se suman la mayor parte de los factores de patogenicidad descritos en *P. aeruginosa* ^{194, 293} y cuyo papel en las distintas manifestaciones clínicas se detallará posteriormente.

Tabla 2. Factores de patogenicidad de *P. aeruginosa*.

<i>Factor de virulencia</i>	<i>Actividad biológica</i>
Factores celulares	
- Exopolisacárido mucoide (alginato)	Adherencia al epitelio; barrera a fagocitos y antibióticos; inhibe la unión de anticuerpos y complemento.
- Lipopolisacárido	Determinante antigénico dominante de la superficie celular; pérdida de azúcares de la cadena lateral durante la infección crónica crea LPS "rugoso" y la sensibilidad a la acción bactericida del suero.
- Lipolisacárido (Lípido A)	Endotoxina (papel en síndromes clínicos asociados a sepsis)
- Pili	Adherencia a epitelio.
- Flagelo	Movilidad.
Factores extracelulares	
- Proteasas	Daño tisular; separación de la unión de las células epiteliales; degradación fibronectina; rotura de anticuerpos creando anticuerpos no funcionales; inactivan α_1 -antiproteinasa, componentes del complemento y citoquinas; escinden los receptores C3b de los neutrófilos; estimulan la secreción de moco.
- Exotoxina A	Citotóxica por inhibición de la síntesis proteica; tóxica para macrófagos; mitogénesis de los linfocitos T; inhibe la proliferación de granulocitos y de células progenitoras de los macrófagos.
- Exoenzima S	Adherencia al epitelio; citotóxico.
- Fosfolipasa C	Hemolisis; daño tisular; destruye surfactante.
- Ramnolípido (hemolisina termoestable)	Hemolisis; inhibe la función ciliar; estimula secreción de moco; afecta al transporte de iones a través del epitelio.
- Leucocidina	Citotóxico para neutrófilos y linfocitos.
- Pigmentos (p.ej. piocianina, 1-hidroxifenazina, pioverdina)	Inhiben la función ciliar; sideróforos; tóxicos para otras especies bacterianas y células humanas; aumentan el metabolismo oxidativo de los neutrófilos; inhiben la proliferación de los linfocitos.
- Lipasa	Daño tisular.
- Histamina	Deteriora la integridad epitelial.

10 -Introducción-

Los diferentes estadios que comprenden las infecciones por *P. aeruginosa* se detallan a continuación.

❖ *Adherencia bacteriana y colonización*

La adherencia a las células epiteliales del tracto respiratorio y su posterior colonización parece estar mediado por las *pili* o fimbrias^{204, 295}. Este proceso estaría facilitado por la pérdida de la fibronectina, que normalmente protege a las células epiteliales de la adherencia bacteriana, como resultado de una enfermedad u otros factores relacionados con la hospitalización, o por un incremento en la producción de la proteasa salivar²⁹⁶.

La presencia de tejidos previamente dañados podría también facilitar la adherencia de *P. aeruginosa* a las células epiteliales²⁰². Este fenómeno de "adherencia oportunista" puede jugar un papel importante en la patogénesis de ciertas infecciones (tracto urinario, queratitis o tracto respiratorio)¹⁹⁶.

El exopolisacárido mucoide de las cepas mucoides de *P. aeruginosa*²⁰⁵ y las *pili* de las cepas no mucoides representarían adhesinas para el epitelio traqueal y para la mucina traqueobronquial. Los receptores en las células del huésped parecen ser el ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) y, en el caso de la mucina traqueobronquial, N-acetilglucosamina^{203, 278}.

Bajo ciertas condiciones *P. aeruginosa* produce una cápsula de polisacárido referida como exopolisacarido mucoide. Está constituido por ácido manurónico y gularónico organizados en una estructura repetitiva, denominada alginato. Este componente mucoide parece formar una matriz alrededor de las bacterias, fijándolas al medio y protegiéndolas de la fagocitosis, anticuerpos, complemento, antibióticos, y en el tracto respiratorio, del mecanismo mucociliar¹⁹⁶.

El pigmento *piocianina*, secretado por *P. aeruginosa*, podría ayudar en el

proceso de la colonización al actuar como antibacteriano, retrasando el crecimiento de otras poblaciones bacterianas y eliminando la competencia con la flora autóctona.

❖ *Invasión local*

La capacidad de *P. aeruginosa* para invadir los tejidos depende, por una parte, de las estructuras de la superficie celular que la protegen del sistema inmune del huésped y por otra, de la producción de enzimas extracelulares o toxinas, que rompen las barreras físicas, dañando las defensas del huésped y creando un medio propicio para sus requerimientos físicos, nutricionales y reproductores.

Los leucocitos polimorfonucleares constituirían la principal defensa contra la invasión de *P. aeruginosa*¹⁹⁴. Algunas estructuras de la superficie de *P. aeruginosa* parecen facilitar el proceso invasivo. Una de ellas, como se ha mencionado anteriormente, sería el exopolisacárido mucoide debido a sus propiedades antifagocitarias y su acción como barrera ante los anticuerpos y el complemento. Los lipopolisacáridos de la membrana externa también presentarían propiedades similares⁵⁶. Por último, el flagelo al mediar en la movilidad de la bacteria podría intervenir como factor de virulencia en esta fase¹⁹⁴.

Muchos aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* producen *proteasas extracelulares*. La *elastasa* y la *proteasa alcalina* son las más claramente asociadas con la patogenicidad. Ambas producen necrosis en varios tejidos del huésped (pulmón, cornea y piel). La elastasa es capaz de solubilizar el revestimiento de elastina de los vasos sanguíneos, siendo en parte responsable de la hemorragia y necrosis observada en algunas infecciones localmente invasivas debidas a *Pseudomonas*. Más específicamente, parece contribuir a las características lesiones necróticas (“ectima gangrenoso”) asociadas a las septicemias causadas por *P. aeruginosa*. La proteasa alcalina actuaría sobre los factores de coagulación (mediante la hidrólisis de fibrina y fibrinógeno). Aunque no son altamente citotóxicas, estas enzimas pueden destruir las conexiones entre las células. Rompen el colágeno,

12 -Introducción-

degradan la laminina de las membranas basales y solubilizan la elastina de los pulmones ¹⁹⁵. Pueden alterar las defensas del huésped al escindir las inmunoglobulinas A y G e inactivar los factores del complemento ¹⁹⁶, así como el interferón gamma y el factor de necrosis tumoral ¹⁸⁵. A través de la rotura de tejidos del huésped en los lugares de infección, las proteasas proporcionarían al microorganismo los nutrientes que facilitarían la proliferación e invasión ⁵⁶.

P. aeruginosa produce otras proteínas tóxicas que contribuyen a la invasión: la *citotoxina* (leucocidina) que inhibe la función de los leucocitos polimorfonucleares y dos hemolisinas: la *fosfolipasa C* (termosensible) ²⁴ y la *hemolisina termoestable* (“ramnolípido”) ¹⁰⁸. Parecen actuar de forma sinérgica escindiendo lípidos y lecitina. Podrían contribuir con su citotoxicidad a la invasión tisular. La fosfolipasa C degrada el surfactante pulmonar y causa necrosis tisular, dando lugar a atelectasia y otras alteraciones patológicas ²⁷⁴. Además, la hemolisina termoestable podría ejercer la inhibición de las funciones ciliares y mucociliares en las infecciones agudas y crónicas del tracto respiratorio inferior ²⁰⁶.

El pigmento *piocianina* actuaría dificultando la función ciliar, lesionando el epitelio respiratorio, favoreciendo la respuesta de los neutrofilos con daño tisular y, en efecto sinérgico con la ferripioquelina (sideróforo), generaría radicales libres capaces de dañar las células del endotelio vascular ⁴⁰.

❖ *Diseminación*

La invasión del torrente circulatorio y la diseminación de *P. aeruginosa* no es un hecho bien conocido, probablemente estaría mediada por algunas de las estructuras celulares y productos extracelulares implicados en la invasión localizada. Además de las posibles propiedades antifagocitarias del exopolisacárido mucoso y del lipopolisacárido de la membrana externa, *P. aeruginosa* en la sangre es resistente a la acción bactericida del suero. Las proteasas facilitarían el paso de *P. aeruginosa* al torrente circulatorio debido a su acción sobre las inmunoglobulinas y las vías del

complemento, necesarios para la eliminación del microorganismo.

Se cree que tanto el *LPS (endotoxina)* como la *exotoxina A* intervienen en la toxicidad sistémica de *P. aeruginosa*. La endotoxina (lípidos A) puede estar implicada, de forma indirecta, en diversos síntomas clínicos asociados a la septicemia en bacterias gramnegativas, como fiebre, hipotensión, oliguria, leucopenia/leucocitosis, coagulación intravascular diseminada y síndrome del distrés respiratorio agudo (SDRA) ¹⁹⁶. En el ámbito fisiológico actuaría estimulando la liberación de péptidos vasoactivos y activando los sistemas de complemento, coagulación y fibrinólisis ¹⁹⁵. La exotoxina A es un potente inhibidor de la síntesis proteica. Parece mediar tanto en la infección local (dañando los tejidos y favoreciendo la invasión) como en la sistémica (así, se ha asociado una mayor patogenicidad a las cepas de *P. aeruginosa* productoras de la toxina) ^{60, 193}. Además, podría ejercer un papel protector, se ha observado una mejor supervivencia en los pacientes con altos niveles de anticuerpos específicos frente a la toxina al comienzo de una septicemia causada por *Pseudomonas* ¹⁹⁶.

Otra enzima extracelular es la *exoenzima S*, dado que es expuesta en la superficie celular de la bacteria se cree que podría mediar tanto en la adherencia bacteriana como ejercer funciones tóxicas y posiblemente inmunosupresoras ¹⁵.

1.1.7 Manifestaciones clínicas

Como ya se ha comentado anteriormente, *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista. Raramente causa enfermedad en el individuo sano, aunque es un saprofito común en el hombre. Esta característica unida al hecho de su ubicuidad en el ambiente hospitalario, hace difícil distinguir entre una infección y una colonización particularmente en las muestras obtenidas de ciertas localizaciones como heridas, drenajes o secreciones respiratorias. La evidencia clínica de una infección debería ir acompañada, por tanto, de la demostración del organismo en el

14 -Introducción-

lugar potencial de infección.

P. aeruginosa es el patógeno humano más importante del género *Pseudomonas* por lo que respecta tanto al número y tipo de infecciones que causa como a su morbilidad y mortalidad asociada. Tanto la naturaleza y severidad de la enfermedad subyacente del paciente como su estado inmune son factores que influyen en el hecho de que se llegue a desarrollar la infección.

P. aeruginosa es responsable de un amplio espectro de enfermedades caracterizadas por una gran variedad de cuadros clínicos que se manifiestan con diferentes niveles de severidad. En la tabla 3 se expresa de forma resumida las diferentes infecciones causadas por *P. aeruginosa* ^{23, 195, 196}.

Tabla 3. Infecciones causadas por *P. aeruginosa*.

<i>Infecciones</i>	<i>Factores de riesgo</i>
<i>Infecciones respiratorias</i>	
. Neumonía	
- No bacteriémica	Ventilación mecánica, tubo endotraqueal, sonda nasogástrica, estancia prolongada en la UCI, tratamiento con antibióticos de amplio espectro, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad neurológica.
- Bacteriémica	Neutropenia, neoplasia maligna, bronquiectasia crónica, inmunodepresión severa, quimioterapia citotóxica, quemaduras severas.
. Infección del tracto respiratorio inferior en enfermos con fibrosis	Presencia de fibrosis quística, colonización crónica por <i>P. aeruginosa</i> , deterioro progresivo del pulmón, alteración de la respuesta inmune a <i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Bacteriemia</i>	
. Primaria	Mismos factores descritos anteriormente.
. Secundaria	Leucemia, linfoma, catéter intravenoso, usuarios de drogas por vía parenteral (ADVP), traumas, prematuros, úlceras en el tracto gastrointestinal, trasplante de órganos sólidos o médula ósea, procedimiento de endoscopia.
<i>Infecciones osteo-articulares</i>	
	ADVP, insuficiencia vascular periférica en pacientes con diabetes mellitus, artritis reumatoide, infecciones urinarias, traumatismos plantares, cirugía, etc..

Tabla 3. (continuación)

<i>Infecciones</i>	<i>Factores de riesgo</i>
<i>Infecciones del sistema nervioso central</i>	
. Meningitis	Alteración del sistema inmune (neutropenia), otros factores (neurocirugía, tumores, quemaduras, infecciones, etc).
. Abscesos cerebrales	
<i>Infecciones otorrinolaringológicas</i>	
. Otitis externa	Lesiones de la piel y mucosas, humedad, diabetes mellitus, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).
. Otitis externa maligna	
. Otitis media crónica supurada	
. Sinusitis	
<i>Endocarditis</i>	
. Infección de las válvulas sanas en ADVP	ADVP, válvulas protésicas.
. Infección de válvulas protésicas	
<i>Infecciones gastrointestinales</i>	
	Inmunosupresión (niños, cáncer, neutropenia secundaria a quimioterapia).
<i>Infecciones de la piel y tejidos blandos</i>	
. Ectima gangrenoso	Lesiones de piel y mucosas (secundarias a quemaduras, trauma, úlcera o dermatitis), humedad, neutropenia, prematuros y SIDA.
. Pioderma	
. Infección de heridas	
. Dermatitis	
. Sepsis de quemaduras	
<i>Infecciones del tracto urinario</i>	
. Agudo	Catéter en vías urinarias, cirugía (transplante renal), obstrucción, nefrolitiasis, estancia crónica en hospital.
. Crónico (frecuentemente con lugares de persistencia u obstrucción)	
<i>Infecciones oculares</i>	
. Queratitis (úlceras de la córnea)	Traumatismos, humedad, lentes de contacto, SIDA, quemaduras, estancia en UCI, esteroides tópicos.
. Endoftalmitis	

1.1.8 Diagnóstico

◆ Examen directo. Estudio microbiológico

Pseudomonas sp. puede aislarse de múltiples muestras (frotis, exudado, esputos, orina, sangre, líquido cefalorraquídeo, etc). Dada su capacidad de sobrevivir en ambientes y temperaturas adversos, las técnicas estándar de recogida, transporte y

16 -Introducción-

conservación son suficientes para asegurar su recuperación de las muestras clínicas¹⁵⁸.

Las diferentes especies de *Pseudomonas* presentan una morfología similar ante la tinción de Gram y no son fácilmente distinguibles de otros bacilos gramnegativos no fermentadores. Las cepas mucosas de *P. aeruginosa* pueden verse como microcolonias en muestras de esputo procedentes de pacientes con fibrosis quística.

Pseudomonas sp. crece bien en medios de cultivo convencionales como el agar de sangre de carnero al 5% o el agar chocolate. Estos medios pueden utilizarse para el aislamiento de microorganismos de muestras clínicas estériles donde no se espera encontrar flora mixta. Para el aislamiento de estos microorganismos de muestras clínicas con flora mixta se utilizan medios selectivos como el agar MacConkey. Agentes selectivos como la cetrila mida, acetamida o la nitrofurantoina pueden ser utilizados para el aislamiento de *P. aeruginosa* procedente de muestras clínicas o ambientales¹¹⁴.

◆ Identificación

Los aislamientos de *P. aeruginosa* son fácilmente reconocibles tras un primer aislamiento en medio de cultivo en función de la morfología característica de sus colonias, la producción de pigmentos solubles y un olor característico, debido a la síntesis de 2-aminocetofenona.

Las colonias son normalmente grandes, planas, de superficie rugosa, con bordes irregulares y pueden presentar un brillo metálico que a menudo se asocia con la autólisis de las colonias (en agar sangre). Otras variantes morfológicas incluyen formas lisas, coliformes, gelatinosas, puntiformes y mucoides¹¹⁴.

P. aeruginosa presenta la capacidad de producir ciertos pigmentos hidrosolubles incluyendo el pigmento fluorescente pioverdina (también producido por *P. fluorescens* y *P. putida*). Una característica diferencial y específica es su capacidad

de producir un pigmento fenazina soluble de color azul, denominado piocianina. Cuando este pigmento se combina con la pioverdina se produce un color verde brillante característico de *P. aeruginosa*. También puede producir otro tipo de pigmentos hidrosolubles como, piorrubina (rojo oscuro) o piomelanina (negro).

P. aeruginosa puede identificarse mediante un test de oxidasa positivo, ausencia de fermentación de la glucosa en el medio de Kligler, crecimiento a 42°C y producción de pigmentos azul o azul verdoso, rojo o marrón capaces de difundir en agar Mueller-Hinton u otro tipo de agar sin colorante ¹¹⁴.

Ocasionalmente, *P. aeruginosa* únicamente produce el pigmento pioverdina, hecho que no la diferencia de *P. fluorescens* o *P. putida*. La habilidad de crecer a 42°C permite distinguir a *P. aeruginosa* de estas dos especies. Sin embargo, para llegar a identificar a *P. aeruginosa* cuando se aísla un microorganismo no pigmentado de una muestra clínica, es necesario realizar pruebas adicionales como las detalladas anteriormente (ver tabla 1, apartado 1.1 de este capítulo).

Muchos laboratorios utilizan sistemas comerciales para la identificación de *Pseudomonas* spp. La duración de la identificación puede variar de 8 a 48 horas dependiendo de si el sistema identifica el organismo en función de enzimas ya formados (rápido) o de la utilización de sustratos. La precisión de estos sistemas para identificar cepas pigmentadas de *P. aeruginosa* varía de un 70 % a un 100% ¹¹⁴. Sin embargo, no se requiere la utilización de un sistema comercial caro cuando unas pruebas sencillas son suficientes.

En el caso de *P. aeruginosa*, no se suelen utilizar para el diagnóstico técnicas serológicas como la inmunofluorescencia directa o técnicas basadas en la hibridación de ácidos nucleicos ^{87, 114}.

Recientemente, se ha utilizado la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección directa de *P. aeruginosa* a partir de muestras clínicas, mediante la amplificación de secuencias específicas del ADN cromosómico ⁶³. Sin

embargo, debido al rápido crecimiento en cultivo, la facilidad en la identificación de *P. aeruginosa* y la necesidad de realizar estudios de sensibilidad en los aislamientos clínicos significativos, las técnicas de diagnóstico rápido para la detección de este microorganismo de una forma rutinaria tienen poco valor práctico.

1.1.9 Mecanismos de resistencia

P. aeruginosa es un microorganismo que se caracteriza por poseer una resistencia natural a numerosos antibióticos y por su capacidad de adquirir mecanismos de resistencia a los agentes habitualmente activos.

1.1.9.1 Resistencia a los betalactámicos

❖ *Resistencia natural*

P. aeruginosa presenta resistencia natural a numerosos betalactámicos, resultado de la combinación de 3 mecanismos:

- ◆ Una baja permeabilidad de la membrana, por la propia estructura de la membrana externa (de naturaleza hidrófoba) y al reducido número y pequeño diámetro de los canales proteicos o porinas ^{97, 165}.
- ◆ La existencia de un fenómeno de expulsión activa que contribuye a la resistencia natural a los betalactámicos y a otras familias de antibióticos ^{125, 126, 198}.
- ◆ La producción de una betalactamasa cromosómica e inducible ¹³². Las moléculas como las aminopenicilinas, cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, cefotaxima y ceftriaxona, son a la vez inductoras de este enzima y susceptibles a su acción y por tanto ineficaces. Los agentes naturalmente activos contra *P. aeruginosa* corresponden a inductores débiles (piperacilina, ceftazidima) o a inductores fuertes pero estables respecto a este enzima (carbapenemes) ²⁶.

❖ **Resistencia adquirida**

Los mecanismos de resistencia adquirida pueden clasificarse en mecanismos enzimáticos y no enzimáticos.

✓ **Resistencia de naturaleza enzimática**

Adquisición de penicilinasas transferibles

Se han descrito en *P. aeruginosa* numerosas betalactamasas codificadas por genes situados en plásmidos^{41, 132}. Se clasifican en tres grupos en función de su perfil de sustrato:

- ◆ El grupo PSE o CARB (carbenicilinasas), que incluyen PSE-1, PSE-3, PSE-4, CARB-3 y CARB-4.
- ◆ El grupo OXA (oxacilinasas), constituido por una serie de enzimas (OXA-1 a OXA-10)
- ◆ El grupo TEM que comporta las variantes TEM-1 y TEM-2.

Estos enzimas conferirían resistencia a ticarcilina, piperacilina y ciertas cefalosporinas pero no frente a la ceftazidima, aztreonam y los carbapenemes²⁶.

Hiperproducción de la betalactamasa cromosómica

Debido a una mutación al nivel de los genes de regulación, la producción de la betalactamasa natural puede transformarse en constitutiva, por lo que ciertas cepas de *P. aeruginosa* (denominadas "desreprimidas") serían capaces de hiperproducir este enzima afectando a la actividad de la mayoría de los betalactámicos a excepción de los carbapenemes¹³². Existen diferentes niveles de desrepresión y el nivel de resistencia observada es proporcional a la cantidad de enzima producida. No obstante, la mayoría de las cepas estarían solamente parcialmente desreprimidas¹³².

Betalactamasas de espectro extendido

Las betalactamasas de espectro extendido son enzimas plasmídicos presentes en las enterobacterias de los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* que confieren resistencia frente a las cefalosporinas de tercera generación y son sensibles a los inhibidores de las betalactamasas ¹³². En *P. aeruginosa*, la primera descrita fue la PER-1 (originaria de Turquía) ¹⁷², desde entonces se han descrito otros tipos, habiendo evolucionado mediante mutación a partir de penicilinasas, como oxacilinasas (OXA-11, OXA-14, OXA-15, etc) y otras de TEM ¹⁷³. Conferirían resistencia frente al conjunto de los betalactámicos a excepción de los carbapenemes ^{26, 173}.

Metalobetalactamasas (imipenemasas)

La resistencia al imipenem en *P. aeruginosa* por la producción de una betalactamasa se describió originariamente en Japón ²⁸⁴. Esta betalactamasa de tipo metaloenzima, denominada IMP-1, se ha descrito posteriormente en otras cepas de *P. aeruginosa* de este país ²³⁰. Estas cepas manifestarían resistencia a los carbapenemes y a la gran mayoría de beta-lactámicos a excepción del aztreonam ¹³².

✓ Resistencia de naturaleza no enzimática

Bombas de expulsión activa

Las bombas de expulsión activa consisten en un conjunto de 3 proteínas (cada una con una función específica) capaces de expulsar el antibiótico al exterior de la bacteria ¹⁹⁸. Estos sistemas están codificados por genes cromosómicos, pudiéndose expresar por mutación (es), y en ocasiones inducirse y seleccionarse en presencia de antimicrobianos como las quinolonas ⁹⁷. Tienen en común la propiedad de inducir resistencias cruzadas entre los betalactámicos y las fluoroquinolonas, así como a las otras familias de antibióticos (tetraciclinas, cloranfenicol, trimetropina) ¹⁴⁵.

En *P. aeruginosa* se han identificado tres sistemas diferentes:

- ◆ MexA-MexB-OprM, que suele expresarse de forma constitutiva contribuyendo a la resistencia natural de la especie a los betalactámicos (excepto el imipenem) y a otros antibióticos^{125, 126}.
- ◆ MexC-MexD-OprJ, que conferiría resistencia a la cefpiroma y cefepima²⁶.
- ◆ MexE-MexFB-OprN, confiere una resistencia moderada a los carbapenemes¹⁴⁵.

Modificación de la estructura del lipopolisacárido (LPS)

Ciertas modificaciones cualitativas y cuantitativas a nivel del LPS de la bacteria pueden ocasionar una disminución de la permeabilidad de la membrana dando lugar a una resistencia acusada al conjunto de los betalactámicos, a excepción del imipenem, así como a las quinolonas, al cloranfenicol y las tetraciclinas¹²³.

Modificación de la afinidad de la diana (PBP)

La diana bacteriana de los betalactámicos está constituida por unas proteínas situadas al nivel de la membrana interna y denominadas proteínas fijadoras de las penicilinas (*penicillin-binding protein; PBP*). La mayoría de los betalactámicos presentan una gran afinidad por la proteína PBP-3, salvo el imipenem que se fija preferentemente en la PBP-2. Una hiperproducción de la proteína PBP-3 se traduciría en un aumento de la resistencia moderada a los betalactámicos, excepto del imipenem¹²⁷.

Resistencia selectiva al imipenem mediante la porina D2

La porina OprD o D2 permite la difusión de los carbapenemes a través de la membrana¹³³. Una disminución o una pérdida de esta porina, asociada a una hidrólisis parcial por parte de la betalactamasa cromosómica se traduciría en una resistencia selectiva al imipenem¹³¹.

1.1.9.2 Resistencia a los aminoglucósidos

P. aeruginosa es habitualmente sensible a los aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, netilmicina, amikacina, isepamicina). Los mecanismos de resistencia son complejos y pueden ser variables en el tiempo y la localización geográfica. Además, estos mecanismos no estarían relacionados con el consumo de determinados aminoglucósidos, sino que parecerían ser respuesta al uso continuado de los aminoglucósidos en general ¹⁵⁷. La resistencia a estos antibióticos se debería a varios mecanismos que incluirían:

- ◆ Alteración del sistema de expulsión activa del antibiótico que se traduciría en una resistencia de bajo nivel al conjunto de los aminoglucósidos ²⁶.
- ◆ Resistencia de naturaleza enzimática, provocada por la adquisición de enzimas plasmídicas capaces de inactivar los aminoglucósidos por acetilación (aminoacetiltransferasas o AAC), nucleotidilación (nucleotidiltransferasa o ANT) o fosforilación (fosfotransferasa o APH) ⁹⁷. Los mecanismos de resistencia más frecuentes residen en: i) la producción de una AAC (6')-II, que confiere resistencia a la gentamicina, tobramicina y netilmicina; ii) una ANT (2'')-I, que produce resistencia a la gentamicina y la tobramicina ^{26, 157}. Otros enzimas también frecuentes serían el AAC (3')-II (resistencia a la gentamicina, tobramicina y netilmicina) y APH (3')-VI (resistencia a amikacina) ⁴⁷.
- ◆ Alteraciones de la permeabilidad sola o asociada a los dos enzimas mencionados anteriormente (resistencia a todos los aminoglucósidos) ^{26, 157}.

1.1.9.3 Resistencia a las quinolonas

La resistencia de *P. aeruginosa* a las quinolonas puede sobrevenir por tres mecanismos ^{26, 47}:

- ◆ **Modificación de la afinidad de la diana**, las quinolonas actúan inhibiendo las enzimas implicadas en la replicación del DNA, particularmente la DNA girasa y

la topoisomerasa IV. Se han descrito diversas mutaciones que afectan a los genes *gyrA* y *gyrB* (que codifican las subunidades A y B de la DNA girasa, respectivamente) ²⁹⁸ y en el gen *parC* (que codifica la subunidad A de la topoisomerasa IV), traduciéndose en una disminución de la afinidad de estas enzimas por el antibiótico ¹⁶⁶.

- ◆ **Alteraciones de la permeabilidad de la membrana externa**, dependiendo de la hidrofobicidad de las quinolonas, la resistencia puede ser consecuencia de modificaciones al nivel de las porinas o a nivel del LPS ^{123, 155}.
- ◆ **Bombas de expulsión activa**, los 3 sistemas de expulsión activa citados anteriormente para los betalactámicos contribuirían, asimismo, a la resistencia a las quinolonas ^{145, 198}.

1.1.10 Tratamiento

El tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa* constituye en ocasiones un serio problema debido a su resistencia intrínseca a múltiples antimicrobianos, como ya se ha comentado anteriormente, y a su capacidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia, hecho que ocurre con bastante frecuencia durante los tratamientos con monoterapia.

En función de la gravedad de las infecciones, la estrategia terapéutica podría comprender un tratamiento precoz (empírico) que a la espera del estudio microbiológico se evaluaría según la sensibilidad de la cepa. Además, la elección del tratamiento debería adaptarse por una parte a la ecología del hospital (incidencia de los diferentes fenotipos de resistencia, frecuencia de cepas de serotipo O12, difusión de cepas epidémicas con un perfil de resistencia característico) y por otra parte a las particularidades del paciente (localización de la infección, duración de la hospitalización, tratamiento antibiótico previo, antecedentes de portador de *P. aeruginosa*, presencia de eventuales asociaciones bacterianas) ²⁶.

Clásicamente se recomienda la utilización de una combinación de antibióticos con el fin de obtener un efecto sinérgico y bactericida más rápido además de prevenir la posible aparición de mutantes resistentes²⁹². Las combinaciones de betalactámicos y aminoglucósidos son las más comúnmente utilizadas. Otras posibles combinaciones, aunque con un menor efecto sinérgico, serían las de aminoglucósidos-fluoroquinolonas y betalactámicos-fluoroquinolonas. Otras moléculas como la fosfomicina y la rifampicina podrían emplearse eventualmente en tratamientos combinados²⁶.

En la siguiente tabla (tabla 4) se sumarian las diferentes estrategias terapéuticas para las infecciones causadas por *P. aeruginosa*.

Tabla 4. Estrategia terapéutica utilizada contra *P. aeruginosa*.

Tratamiento	Antibióticos	Indicaciones
Monoterapia	. Penicilinas anti <i>Pseudomonas</i> : ticarcilina, piperacilina, azlocilina . Cefalosporinas: ceftazidima, cefoperazona, cefpiroma . Carbapenemes: imipenem . Quinolonas: ciprofloxacina	Pacientes no granulocitopénicos, infecciones no graves, cursos clínicos cortos, seguimiento bacteriológico.
Asociaciones convencionales	. Aztreonam, ticarcilina o Ceftazidima más clavulánico . Imipenem más amikacina . Ciprofloxacina más ceftazidima . Ciprofloxacina más fosfomicina	Infecciones severas causadas por <i>Pseudomonas</i> : neumonía, bacteriemia, quemados (más tto. tópico), otitis externa maligna (más cirugía), infección del sistema nervioso central (más tto. local), fibrosis quística (más tto. tópico).
Tratamiento alternativo	. Penicilinas anti <i>Pseudomonas</i> más quinolona . Aztreonam más aminoglicósido . Aminoglicósido más quinolona	
Adyuvantes	. Acetato de mafenida (tto. local), extirpación quirúrgica del tejido necrótico. . Mucolíticos, inmunización pasiva (IL-1, acM anti-TNF) . Vacunas basadas en el polisacárido	Quemados Pacientes con fibrosis quística

* Adaptada de Bergogne-Bérézin E²³.

Abreviaturas, tto: tratamiento; IL-1: interleukina 1; acM anti-TNF: anticuerpos monoclonales contra el factor de necrosis tumoral.

1.2 Neumonía en el enfermo sometido a ventilación mecánica

1.2.1 Etiología

Los microorganismos responsables de la neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAV) varían dependiendo de varios factores como la enfermedad de base del paciente, el tratamiento antibiótico previo, la existencia de cepas epidémicas y el método de diagnóstico utilizado ^{71, 208, 263}. En un 25 % de los pacientes, aproximadamente, la NAV es causada por múltiples organismos ²¹¹.

Entre los microorganismos **grampositivos aerobios** destacan *Staphylococcus aureus* meticilin resistente (SAMR), *Staphylococcus aureus* meticilin sensible (SAMS) y *Streptococcus pneumoniae*. Este último, a pesar de considerarse la causa más frecuente de neumonía adquirida en la comunidad, es aislada en baja frecuencia en los pacientes afectados de NAV ²¹¹. Los estreptococos beta hemolíticos, corinebacterias y otros bacilos grampositivos también se han descrito como agentes causales potenciales de la NAV, y frecuentemente como una infección mixta junto con anaerobios después de una aspiración pulmonar. La presencia de estafilococos coagulasa negativos en muestras respiratorias normalmente representan una contaminación. En episodios polimicrobianos de NAV una diferencia importante entre SAMS y SAMR es que este último muestra una gran asociación con *Pseudomonas* spp., asociación inusual para SAMS ²⁰⁹. La mayoría de las muertes por NAV y cocos grampositivos se deben a SAMR.

Entre los **bacilos aerobios gramnegativos**, *P. aeruginosa* se considera el microorganismo más frecuentemente aislado. *Acinetobacter baumannii* mostraría una importancia similar, sin embargo, su incidencia es variable debido a que normalmente está presente en el ambiente húmedo de la UCI, pudiendo dar lugar a brotes nosocomiales. *Serratia marcescens*, presenta características epidemiológicas similares a *P. aeruginosa* o *A. baumannii*, estando presente de forma endémica o

26 -Introducción-

causando brotes nosocomiales. Estos 3 microorganismos se podrían considerar responsables de la mayoría de las muertes causadas por bacilos gramnegativos en pacientes con NAV ²⁰⁸.

Entre otros microorganismos gramnegativos, *Haemophilus influenzae* presenta una incidencia variable en función de la presencia de enfermedades subyacentes, duración de la intubación y el tratamiento antibiótico previo. *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Citrobacter freundii*, otras especies de *Pseudomonas*, *Xanthomonas maltophilia* o *Legionella pneumophila*, representarían un problema menor para los pacientes intubados ²¹¹.

La flora anaerobia aunque puede aislarse en los pacientes intubados, especialmente en los 2 ó 3 días inmediatos a la intubación, juega un limitado papel en la NAV. Otros patógenos oportunistas como, *Pneumocystis carinii*, virus y hongos, no suelen considerarse como causas de la NAV, excepto en pacientes con una inmunodepresión severa ²¹¹.

1.2.2 Patogenia

El modo en cómo se produce la colonización que pueda conducir al desarrollo de la NAV es un tema de continuo debate. La aspiración de secreciones orofaríngeas contaminadas o de contenidos gástricos/esofágicos representa la ruta de entrada más común ⁵⁸. A pesar de ello, se han descrito otras posibles rutas que incluyen inhalación de aerosoles que contienen bacterias; inoculación directa en los pacientes intubados a través, por ejemplo, de las manos del personal sanitario o la penetración directa de un lugar infectado (p.ej. espacio pleural); o la diseminación hematológica (p.ej. por translocación, desde el intestino o desde un lugar lejano de infección como puede ser un catéter infectado) ⁷ (figura 1).

El desarrollo de la NAV depende de la interacción entre la virulencia de la bacteria, el tamaño del inóculo y las defensas pulmonares locales (que pueden alterarse por una enfermedad subyacente, malnutrición o algunos tratamientos).

En los pacientes intubados, las defensas de las vías aéreas altas (la glotis, el reflejo de la tos y el mecanismo de lavado mucociliar) están abolidas. La colonización del tracto respiratorio inferior se produce a través de la superficie exterior del tubo traqueal, relacionado con una inadecuada función del balón de neumotaponamiento de la vía aérea en ciertas situaciones, por ejemplo, ante cambios en el calibre de las vías aéreas al toser y tragar, o cuando se cambia la posición del cuerpo, lo que permitirá las aspiraciones repetidas de las secreciones contaminadas. Si no se controla la presión del balón de forma repetida, se produce una pérdida de presión que inevitablemente conduce a la progresión de secreciones procedentes de las vías respiratorias altas.

El diseño de las medidas de prevención dependerá de una clasificación previa de las infecciones como endógenas o exógenas en función de la secuencia de colonización ²⁷². En las infecciones exógenas, los microorganismos alcanzan directamente el tracto respiratorio inferior desde un medio exterior al paciente (reservorios externos, manipulaciones y técnicas invasivas). En el caso de las infecciones endógenas existe cierta controversia acerca de la importancia de los distintos reservorios endógenos posibles (orofaringe, tráquea, estómago, senos paranasales, intestinos) ⁶.

Infecciones endógenas primarias

Estos episodios infecciosos, también denominados como neumonía de inicio precoz ²⁰¹, generalmente se producen durante la primera semana de estancia del paciente en la UCI y son causados por microorganismos presentes en el momento del ingreso. Sin embargo, la aplicación de tratamientos antibióticos de amplio espectro hace que aparezcan en los primeros dos días. Los microorganismos implicados son *Staphylococcus aureus* meticilin sensible (SAMS), *Streptococcus pneumoniae* y

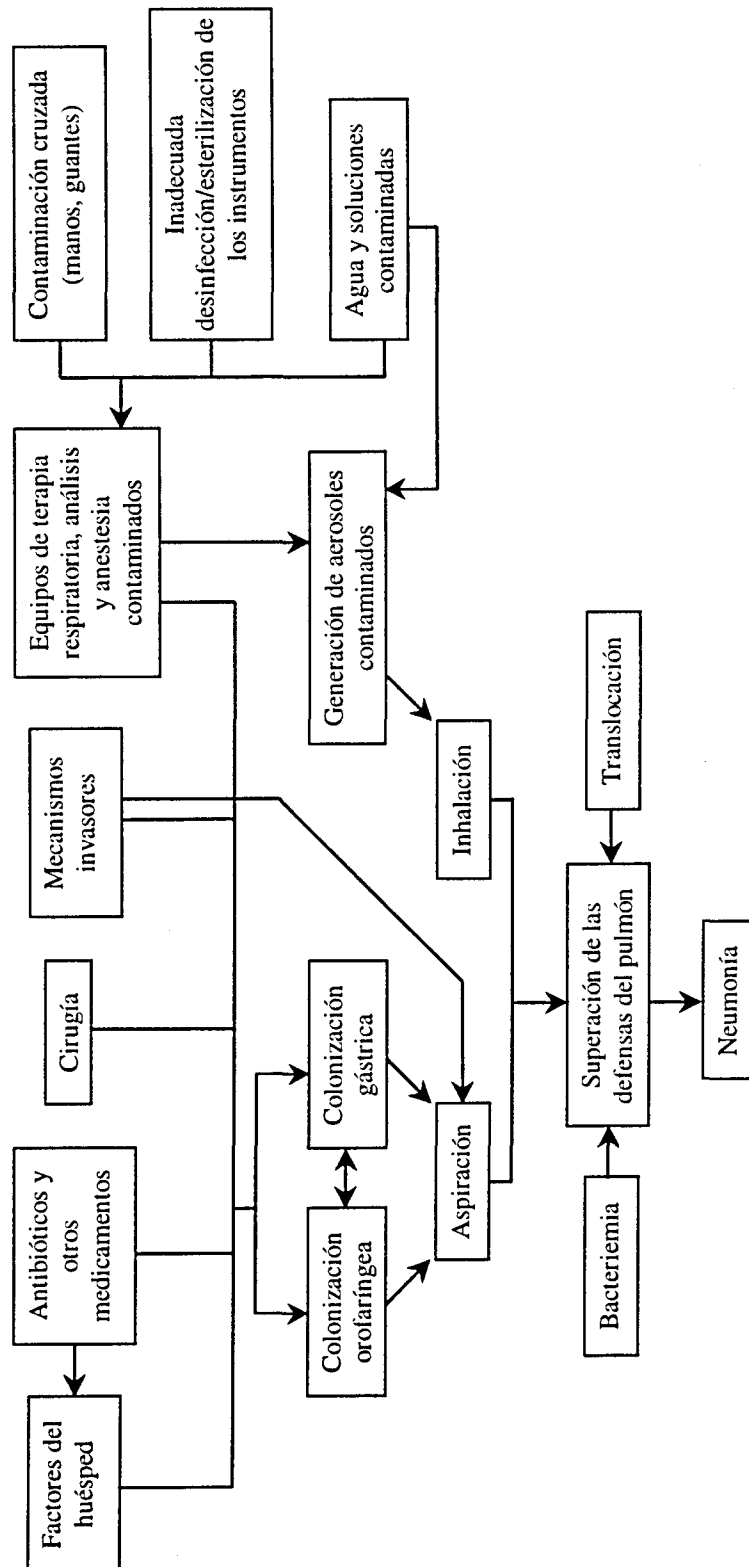


Figura 1. Posibles rutas de colonización bacteriana que pueden conducir al desarrollo de NAV ⁴⁶.

*Haemophilus influenzae*²¹⁵.

En los pacientes inmunocompetentes, con un tratamiento apropiado, el curso de la infección es benigno y no representa una mortalidad adicional significativa. Sin embargo, se asocian a tasas altas de morbilidad (mayor duración de estancia en UCI, uso de antibióticos y mayores costes). En los pacientes sometidos a ventilación mecánica, estas infecciones pueden producirse por las secreciones acumuladas por encima del balón de neumotaponamiento y que se filtrarían al tracto respiratorio inferior^{212, 268}. La aspiración continua de las secreciones subglóticas junto con el mantenimiento tanto de la permeabilidad del sistema de succión como de la presión de neumotaponamiento constituirían medidas de prevención eficaces²¹⁵.

Infecciones endógenas secundarias

Estas infecciones se producen a los 8 ó 10 días de la intubación y después de un episodio de infección primaria, aunque su aparición puede ser anterior o sin una infección primaria previa, si ha existido un tratamiento antibiótico de amplio espectro. Normalmente, los microorganismos causantes (no presentes en el momento del ingreso) proceden del ambiente del hospital, detectándose un sobrecrecimiento en el tracto digestivo previo a la colonización del tracto respiratorio inferior²¹⁵.

Suelen estar causadas por *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp. y *P. aeruginosa*. Se han asociado con un aumento de la mortalidad incluso tras un tratamiento apropiado²¹³. Las medidas de prevención deberían dirigirse hacia la reducción de la transmisión desde el ambiente, el uso restringido de tratamiento de espectro ampliado y la prevención de la colonización gástrica (p.ej. uso del sucralfato para prevenir las hemorragias digestivas)²⁰¹.

Infecciones exógenas

Aunque menos comunes que las anteriores, se considera que la flora exógena es responsable de los brotes epidémicos de neumonía nosocomial descritos¹³⁹. Los

microorganismos responsables son principalmente *S. aureus* meticilin resistente (SAMR), bacilos gramnegativos no fermentadores (particularmente *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas* spp.) y *Serratia* spp. Normalmente son patógenos multiresistentes y su influencia en la mortalidad relacionada directamente con la NAV es significativa ²¹⁵.

Se han identificado como medios de transmisión, las manos del personal sanitario, los nebulizadores o broncoscopios contaminados. La prevención de este tipo de infecciones se basaría en la observancia estricta de ciertas medidas de control, la identificación y erradicación de los reservorios, y una adecuada desinfección y esterilización de los equipos respiratorios ²¹⁵.

1.2.3 Manifestaciones clínicas. Criterios diagnósticos

La neumonía se produce cuando un microorganismo particularmente virulento o un gran inóculo llega al tracto respiratorio inferior y sobrepasa las defensas del pulmón. Se produce una respuesta inflamatoria local, con acumulación de neutrófilos y otras células en el bronquio periférico y en los espacios alveolares. Localmente, el exudado inflamatorio produce un esputo purulento y una consolidación que puede detectarse al examinar al paciente y por radiografía de torax. A escala sistémica, puede ocasionar fiebre y leucocitosis, entre otros síntomas ¹⁵³.

La neumonía nosocomial es una complicación frecuente en los enfermos sometidos a ventilación mecánica. La necesidad de administrar un tratamiento antibiótico adecuado, dificultado por el amplio y variado espectro de microorganismos responsables, hace necesario realizar un diagnóstico adecuado.

El diagnóstico de la NAV se basa en la combinación de varios métodos diagnósticos que se detallan a continuación.

❖ *Diagnóstico clínico*

El diagnóstico presuntivo de la NAV se basa en la aparición de nuevos infiltrados en la radiografía de torax o progresión de los existentes asociados a la presencia de hipertermia o hipotermia, leucocitosis o leucopenia y presencia de secreciones traqueobronquiales purulentas (en las que se pueden identificar o no, agentes patógenos) ¹⁰⁶. A estos criterios clásicos, se añadió la presencia en una muestra de aspirado traqueal de más de 25 leucocitos y menos de 10 células epiteliales escamosas por campo de bajo aumento (100 x) junto con el aislamiento de un microorganismo con potencial patógeno respiratorio ⁵⁷.

Sin embargo, en el paciente ventilado estos signos clínicos son inespecíficos y pueden llevar al sobrediagnóstico o subdiagnóstico de la NAV ^{8, 70}. La presencia de infiltrados pulmonares debida a otros procesos patológicos como edema, hemorragia o infarto pulmonar, entre otros, puede dificultar la observación de infiltrados infecciosos. En algunos pacientes no se detecta fiebre y cuando ésta se halla presente, puede tener un origen extrapulmonar o, al igual que los infiltrados pulmonares, ser debida a causas no infecciosas. La presencia de secreciones purulentas puede corresponder a traqueobronquitis, además el tracto respiratorio superior de estos enfermos suele encontrarse regularmente colonizado por bacilos gramnegativos ⁵².

❖ *Diagnóstico microbiológico*

El diagnóstico microbiológico de la NAV es difícil de establecer debido a que las infecciones pueden estar causadas por microorganismos comensales o telúricos que colonizan con frecuencia las vías respiratorias altas, sin que necesariamente sean los agentes causantes de la infección. Por ello, se han desarrollado técnicas de obtención de muestras que intentan evitar la contaminación orotraqueobronquial. Se clasifican en no invasivas e invasivas.

✓ *Técnicas de diagnóstico no invasivas*

El *aspirado traqueal* es el método más sencillo de obtención de muestras en el paciente ventilado. El *cultivo cualitativo* se considera un método inadecuado por su baja especificidad, debido a la contaminación de la muestra por microorganismos potencialmente patógenos que frecuentemente colonizan las vías respiratorias altas de los pacientes ventilados ²⁶⁶. El *cultivo cuantitativo* del aspirado endotraqueal permite un diagnóstico razonable, observándose valores de sensibilidad y especificidad con valores entre un 60 % y un 90 %, considerando un umbral de 10^5 a 10^6 unidades formadoras de colonias (ufc)/ml ^{140, 266}.

Otro método no invasivo empleado en el diagnóstico de la NAV es el *hemocultivo*, aunque su sensibilidad es baja y presenta problemas de especificidad particularmente en los pacientes críticos en los que deben considerarse otros focos de bacteriemia. Los microorganismos aislados en los hemocultivos se consideran como causa definitiva de la NAV si coinciden con los microorganismos aislados de una muestra respiratoria fiable ²⁶⁶.

✓ *Técnicas de diagnóstico invasivas*

Se han descrito dos métodos de obtención de muestras profundas cuantificadas mediante broncoscopia, el catéter telescópico con cepillo protegido (CP) ²⁹⁴ y el lavado broncoalveolar (LBA) ^{151, 220}. Este tipo de técnicas permite la obtención de las secreciones del área broncoalveolar que se sospecha asiento de la NAV, evitando la contaminación con la flora comensal del tracto respiratorio superior.

Una vez obtenida la muestra, se pueden realizar dos tipos de exámenes: uno rápido que consistiría en una búsqueda citológica y bacteriológica directa, y otro más tardío (cultivo cuantitativo o semicuantitativo) que determinaría la abundancia de microorganismos a partir del material extraído (ufc/ml). De esta forma, además de identificar, de una manera certera, el agente causal de la NAV se pretende obtener el umbral que separe la colonización de la infección ⁵⁵.

En la tabla 5 se sumarian las principales modalidades de la toma de muestras.

Tabla 5. Diferentes modalidades de toma de muestras profundas (extraido de Correa H y cols. ⁵⁵)

-
- CP bajo visión directa a través del canal del FBC ^{48, 70}
 - CP a ciegas, en particular dirigido por sonda de Metras ²⁶²
 - LBA a través del canal del FBC
 - LBA a ciegas a través de varios tipos de catéter o sonda
 - LBA protegido bajo visión directa. Se realiza pasando un catéter balón a través del canal del FBC, enclavándolo en el sector elegido ¹⁵²
-

CP: cepillo protegido; LBA: lavado broncoalveolar; FBC: fibrobroncoscopio.

En el método del *cepillo protegido* (CP), se introduce en el canal del fibrobroncoscopio un cepillo protegido por un doble catéter telescopado con un tapón que ocluye su extremo distal. Aunque en el paciente ventilado también se puede realizar directamente, a ciegas ²⁶². Este método requiere el uso de cultivos cuantitativos siendo el umbral recomendado de 10^3 ufc/ml. Los valores de sensibilidad de este método oscilan entre un 60 % y un 100 %, con una especificidad entre un 69 % y un 100 % ^{153, 266}. Esta variabilidad depende del tipo de población estudiada, del uso previo de antibióticos y de cómo se ha confirmado la neumonía (método de referencia).

El *lavado broncoalveolar* (LBA) consiste en la instilación secuencial y posterior aspiración de solución fisiológica en el pulmón, a través de un fibrobroncoscopio o de un catéter, que previamente se ha enclavado en el bronquio ²²⁰. Permite tomar una muestra mucho más representativa que la del CP y por tanto, sería teóricamente más sensible. Sin embargo, puede contaminarse más fácilmente por la flora de la vía aérea superior o de los bronquios gruesos. El umbral considerado en el cultivo cuantitativo normalmente es de 10^4 ufc/ml. Se han descrito valores de sensibilidad y especificidad del cultivo cuantitativo de LBA que oscilan de un 72 % a un 100 % y de un 69 % a un 100 %, respectivamente ¹⁵³.

Para mejorar la especificidad del LBA, se ha realizado la recogida de muestras respiratorias por el método de *LBA protegido* (con el fibrobroncoscopio a través del catéter interno de un doble catéter telescopado con tapón distal) ¹⁵². Presenta mejor especificidad que el LBA y una sensibilidad igual o superior que el CP, con valores que varían de un 83 % a un 86 % y de un 82 % a un 85 %, respectivamente ¹⁵³.

Otro método de diagnóstico utilizado es el estudio microscópico de las secreciones obtenidas mediante el LBA tras tinción de la muestra con la técnica de May-Grünwald-Giemsa mediante el cual se cuantifica el porcentaje de células alveolares (macrófagos y neutrofilos) que contienen organismos intracelulares en las células alveolares. Es un método que permite identificar los pacientes con neumonía de una forma casi inmediata. Los umbrales considerados como índice indicativo de neumonía pueden variar entre un 2 % y un 5 % de células con organismos intracelulares. Los valores de especificidad varían de un 95 % a un 100 % y se ha descrito una sensibilidad superior al 75 % ¹⁵³.

Sin embargo, estas técnicas pueden presentar falsos positivos (afirmar la existencia de neumonía en ausencia real) y falsos negativos (no descubrir neumonía ante su presencia real). Varios factores pueden contribuir a la existencia de *falsos positivos* como la contaminación producida durante el muestreo, la variabilidad de la técnica (problemas de reproducibilidad) o una colonización del tracto respiratorio inferior que puede ser favorecida por un tratamiento antibiótico prolongado o una enfermedad subyacente (p.ej. la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)). Con respecto a los *falsos negativos*, la falta de estandarización del método de muestreo (área de muestreo), un tratamiento antibiótico previo, la existencia de resultados *borderline* (no realmente negativos) debido a la presencia de un estadio temprano de la infección o la propia variabilidad de la técnica son factores que podrían explicarlos ²⁶⁶.

❖ *Estudio histológico*

El estudio histológico es considerado como el método de referencia en el diagnóstico de la neumonía (siempre que se presente en fase avanzada ya que períodos iniciales o de resolución serían difíciles de distinguir de otros procesos) ²⁶⁶. Como criterio diagnóstico debe observarse densificación de la estructura del tejido pulmonar con intensa acumulación de leucocitos polimorfonucleares que ocupan el espacio alveolar. La zona afectada contiene patógenos que cultivados a partir de una muestra adecuada desarrollan $> 10^5$ ufc/gr de tejido ⁵⁵. No obstante, en la práctica clínica no suele realizarse un estudio histológico mientras el paciente vive. En los casos en los que se ha llevado a cabo ha mostrado un rendimiento diagnóstico bajo (aproximadamente un 30 %) ⁵⁵.

1.2.4 Tratamiento

El resultado final de un episodio de NAV depende fundamentalmente de la virulencia del patógeno responsable, de las defensas del huésped (así como de la presencia de enfermedades subyacentes) y de la instauración de un tratamiento antibiótico apropiado ²¹⁵. A la hora de implantar un tratamiento antibiótico deben considerarse varios aspectos, como el comienzo y finalización del tratamiento, la diferencia de coste ante aplicar una monoterapia o una terapia combinada y la aparición de microorganismos multiresistentes.

Las normas de la Sociedad Americana del Torax ⁷ recomiendan un método de tratamiento empírico que considera, la severidad en la presentación de la neumonía, la presencia de determinados factores de riesgo, el tratamiento antibiótico previo y la duración de la hospitalización previa al desarrollo de la NAV. El tratamiento recomendado contra los patógenos asociados con la neumonía endógena primaria es la monoterapia empírica. Los patógenos asociados con la neumonía endógena secundaria se deberían sospechar en aquellos pacientes que han recibido un

tratamiento antibiótico previo o que poseen otros factores de riesgo específicos y las medidas terapéuticas deberían basarse en una terapia combinada de espectro ampliado al microorganismo identificado en el cultivo (tabla 6). No obstante, a la hora de elegir un tratamiento debería considerarse la distribución de los diferentes patógenos locales así como sus patrones de sensibilidad a los antibióticos, especialmente ante condiciones que podrían favorecer una adquisición exógena (dado que la variabilidad en los patrones locales podría estar influenciada por la contaminación ambiental presente en cada institución) ²¹⁸.

El uso racional de las *terapias combinadas* además de ampliar el espectro de la terapia empírica, debe conducir a la prevención de la aparición de resistencias y a la eliminación de la bacteria, debido a un efecto sinérgico. Como primera opción se suele considerar la combinación de un aminoglucósido con un betalactámico. Sin embargo, la adición de un aminoglucósido suele asociarse a un aumento de los costes y a problemas de toxicidad. Asimismo, su efectividad es discutida debido tanto a su posible inactivación en el medio ácido de las áreas endobronquiales infectadas como a su pobre penetración en los tejidos pulmonares. Una segunda opción, aunque sin efecto sinérgico, es la combinación de dos betalactámicos; existe la posibilidad de un efecto antagónico entre ambos medicamentos así como la inducción de betalactamasas que podrían inactivar a uno o posiblemente a ambos antibióticos simultáneamente. La combinación de betalactámicos con ciprofloxacina podría producir un efecto aditivo e incluso sinérgico y además presenta la ventaja de la buena penetración en los tejidos de la fluoroquinolona junto con una menor toxicidad comparada con los aminoglucósidos ⁷. La duración del tratamiento debería ser individualizada en función de, la severidad de la enfermedad, la rapidez de la respuesta clínica y el patógeno responsable ⁷.

Tabla 6. Protocolo terapéutico recomendado para la NAV * por la Sociedad Americana del Torax en 1996 ⁷.

<i>Organismos implicados</i>	<i>Terapia</i>
<i>Organismos</i>	<i>Antibióticos esenciales</i>
. Bacilos gramnegativos entéricos (no <i>Pseudomonas</i>).	Cefalosporina de segunda generación o de tercera generación (no <i>Pseudomonas</i>)
<i>Enterobacter</i> spp.	Combinación betalactámico / inhibidor de betalactamasa
<i>E. coli</i>	Si existe alergia a la penicilina:
<i>Klebsiella</i> spp.	Fluoroquinolona o clindamicina + aztreonam
<i>Proteus</i> spp.	
<i>Serratia macescens</i>	
. <i>Haemophilus influenzae</i>	
. <i>S. aureus</i> meticilin sensible	
. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Organismos anteriores más:</i>	<i>Antibióticos esenciales más:</i>
. Anaerobios	Clindamicina o betalactámico / inhibidor de betalactamasa (solo)
. <i>S. aureus</i>	+/- Vancomicina (hasta descartar <i>S. aureus</i> meticilin resistente)
. <i>Legionella</i>	Eritromicina +/- rifampicina (con evidencia de <i>Legionella</i>)
. <i>P. aeruginosa</i>	Aminoglucósido o ciprofloxacina
. <i>Acinetobacter</i> spp.	más uno de los siguientes:
. <i>S. aureus</i> meticilin resistente	Penicilina anti- <i>Pseudomonas</i>
	Combinación betalactámico / inhibidor de betalactamasa
	Ceftazidima o cefoperazona
	Imipenem
	Aztreonam ^a
	+/- Vancomicina

* Excluidos los pacientes con inmunodepresión.

^a La eficacia del aztreonam está limitada a los bacilos gramnegativos entéricos y no debería usarse en combinación con un aminoglucósido si la infección por grampositivos o *Haemophilus influenzae* es de importancia.

1.2.5 Prevención

Las medidas para prevenir el desarrollo de la NAV son importantes y se pueden englobar en dos grupos, aquellas que previenen la colonización y aquellas que ayudan a aumentar las defensas del huésped.

❖ *Prevención de la colonización*

Como ya se ha comentado la colonización del tracto respiratorio superior es un hecho común en los pacientes ingresados en la UCI y puede preceder al desarrollo de la neumonía nosocomial. Los organismos infecciosos responsables pueden proceder de fuentes externas (exógenas) o de la propia flora de paciente (endógenas). Las estrategias recomendadas son las siguientes:

✓ *Higiene*

El lavado de las manos constituye un método efectivo de prevención de la transferencia de los microorganismos ambientales al paciente aunque frecuentemente es insuficientemente realizada ⁷. El uso de jabones con efecto antiséptico podría ser más eficaz que los jabones normales ⁶⁴. El uso de guantes desechables o de ropa de aislamiento podría ser efectivo en la reducción de ciertas infecciones nosocomiales (p. ej. las causadas por enterococos resistentes a vancomicina), aunque no se recomendaría en la prevención de la NAV ¹¹⁶.

✓ *Equipamiento de ventilación*

La utilización de agua estéril en el reservorio humidificador del sistema de ventilación ha reducido la probabilidad de colonización del equipo de ventilación. La frecuencia del cambio de los circuitos de ventilación no ha demostrado influir en las tasas de infección ⁶⁶. La utilización de intercambiadores de calor y humedad obviaría la necesidad del cambio de los circuitos y eliminaría el problema de la contaminación de las condensaciones formadas en los tubos del sistema y que pueden ser inoculados al paciente sino se manipulan con precaución ¹¹³.

✓ *Intubación*

El empleo de la intubación vía nasal puede incrementar el riesgo de sinusitis nosocomial que ha sido asociada con el desarrollo de neumonía nosocomial ¹⁰². Por

tanto es preferible la utilización de la intubación oral, siempre que sea posible. La reintubación endotraqueal también puede constituir un importante factor de riesgo para el desarrollo de NAV ²⁶⁵.

✓ *Aspiración de las secreciones subglóticas*

El riesgo de filtración de las bacterias y secreciones subglóticas alrededor del balón de neumotaponamiento del tubo endotraqueal con su consiguiente paso al pulmón puede reducirse mediante el empleo de tubos endotraqueales que permitan la aspiración continua de las secreciones subglóticas ²⁶⁸.

✓ *Posición de semiacostado*

El disponer al paciente intubado y portador de una sonda nasogástrica en una posición de semiacostado (elevación de la cabecera del paciente unos 45°) podría ser una medida de prevención de la aspiración pulmonar de los contenidos gástricos ²⁶⁴. Sin embargo, es posible que esta posición no evite completamente el reflujo gastroesofágico ni la colonización orofaríngea de origen gástrico ¹⁷⁷.

Asimismo, se ha sugerido que el uso de camas de rotación lateral en lugar de las camas estáticas podría evitar la acumulación de secreciones broncopulmonares (favorecida por una alteración del mecanismo de lavado mucociliar debido a la presencia del tubo endotraqueal) y reducir la incidencia de atelectasia y de la neumonía nosocomial. No obstante, este tipo de terapia necesitaría ser evaluado en más profundidad ²⁶⁹.

✓ *Papel de la sonda nasogástrica*

Además de la posición del paciente, otro de los factores que se cree que es responsable del reflujo gastroesofágico y de la colonización de la orofaringe es la presencia de la sonda nasogástrica, la cual podría facilitar el reflujo de los contenidos gástricos al relajar el esfínter inferior del esófago. La utilización de una sonda nasogástrica de menor tamaño (en diámetro) puede asociarse a una menor tasa de

reflujo y podría ser útil en la prevención de la aspiración traqueal y la NAV ²⁶⁹. También se ha sugerido el uso de una sonda yeyunal en vez de una sonda gástrica para prevenir el reflujo gastroesofágico, y en consecuencia reducir la incidencia de neumonía en pacientes que reciben nutrición enteral. No obstante, la aplicación de ambas medidas es todavía objeto de controversia ^{269, 277}.

Asimismo, la manipulación cuidadosa de la nutrición enteral, mediante métodos de alimentación continua y un control periódico del volumen gástrico, podría reducir el riesgo de reflujo gastroesofágico y disminuir la incidencia de NAV ²⁶⁹.

✓ *Terapia antibiótica inapropiada*

Se ha descrito que la administración previa de antibióticos contribuye al desarrollo de la neumonía nosocomial debido a la presencia de microorganismos resistentes a los antibióticos, lo que conduciría, además, a un aumento de la mortalidad ³⁹. Cada paciente debería analizarse individualmente con respecto a su necesidad de recibir tratamiento y a su vez, éste debería seleccionarse en función de los posibles patógenos y de los patrones de resistencia locales ²⁷⁷.

✓ *Descontaminación digestiva selectiva*

Se ha descrito que el empleo sistemático de una combinación de antibióticos tópicos (normalmente polimixina, tobramicina y anfotericina B) aplicados a la orofaringe y al estómago, junto con la administración por vía intravenosa de cefotaxima, puede reducir la incidencia de neumonía nosocomial ¹. Aunque no suele utilizarse de forma rutinaria debido a que no se ha demostrado su efecto en la mortalidad, a la aparición de bacterias resistentes y a una toxicidad adicional. Sí que se ha considerado que su aplicación podría ser apropiada en ciertas condiciones clínicas como en pacientes inmunodeprimidos o en coma ^{116, 277}.

✓ *Mantenimiento de un pH gástrico bajo*

Otro método para disminuir la colonización consiste en la utilización de fármacos

para la profilaxis de la hemorragia digestiva que no modifican el pH gástrico. Con esta medida se pretende mantener una acidez gástrica adecuada con el fin de evitar el sobrecrecimiento de los bacilos gramnegativos en el estómago, origen de la mayor parte de los microorganismos que colonizan la orofaringe. El sucralfato es uno de los fármacos más utilizados y a pesar de que existen estudios donde se describe una menor incidencia de la neumonía nosocomial empleando este fármaco frente a los antiácidos o los bloqueadores de los receptores H₂ de la histamina⁵³, no se ha llegado a evidenciar la influencia de estos fármacos en el desarrollo de la infección pulmonar^{33,276}. La elección de un determinado agente profiláctico debería basarse en factores relacionados con el paciente (p. ej. la presencia o ausencia de la sonda nasogástrica), la probabilidad de interacciones entre los fármacos y los costes derivados de la aplicación de los diferentes tipos de terapia¹¹⁶.

❖ *Modulación de las defensas del huésped*

Los mecanismos de defensa se encuentran frecuentemente deteriorados en los pacientes críticos, haciéndoles susceptibles al desarrollo de infecciones nosocomiales. Las defensas sistémicas se ven reducidas debido a enfermedades crónicas, malnutrición, cirugía prolongada y varias dolencias como el fallo respiratorio. Entre las posibles medidas a tomar destacarían:

✓ *Agentes inmunopresores*

El uso de agentes inmunosupresores como, corticoesteroides y agentes citotóxicos, debería ser limitado debido a que podrían deteriorar diversos mecanismos de defensa del huésped²⁷⁷.

✓ *Soporte nutricional*

El estado nutricional del paciente intubado es un factor de riesgo que puede contribuir al desarrollo de la neumonía⁷. No obstante, existen discrepancias acerca de la ruta de administración preferible, la nutrición enteral o la dieta parenteral. Sin

embargo, se ha sugerido que la dieta enteral, administrada de una forma temprana o precoz, estimularía la mucosa intestinal (evitando la traslocación de las bacterias), así como la síntesis de determinados mediadores inflamatorios que conllevarían a una mejora del estado inmune del paciente ⁷.

✓ *Administración de citoquinas*

La restauración de una adecuada respuesta inmune, a menudo debilitada en los pacientes críticos, puede representar una estrategia importante a la hora de prevenir las infecciones pulmonares nosocomiales. En la actualidad, se está valorando la capacidad de ciertas sustancias para prevenir el desarrollo de la neumonía o acelerar su resolución como, el factor de estimulación de colonias granulocito/macrofágicas (GM-CSF) (citoquina capaz de incrementar el número y la función de los neutrófilos circulantes); el interferón-gamma (IFN- γ) o la interleuquina-12 (que estimula la respuesta la respuesta inmune tipo Th-1). Sin embargo, la mayoría de los estudios son aún experimentales y no existen recomendaciones acerca de su uso en los pacientes de la UCI ^{7,277}.

1.3 Neumonía en el enfermo sometido a ventilación mecánica por *P. aeruginosa*

1.3.1 Incidencia

La neumonia asociada a ventilación mecánica (NAV) representa la principal causa de infección nosocomial en los enfermos sometidos a ventilación mecánica en la UCI. La incidencia de la NAV presenta valores variables debido a diferencias tanto en los criterios diagnósticos como en la población estudiada (la incidencia es variable en los diferentes tipos de UCI). El número de días de ventilación mecánica, la gravedad de la enfermedad subyacente, los factores de riesgo para la neumonía nosocomial y las condiciones subyacentes de los pacientes son, asimismo, variables que podrían explicar las diferencias en las incidencias descritas ²⁰⁷.

La incidencia de la neumonía nosocomial durante la ventilación mecánica recogida en la literatura muestra valores variables, oscilando entre un 18 % y un 60 %^{33, 49, 263, 267}. No obstante, en los últimos años se ha considerado más apropiado expresar los valores de la incidencia teniendo en cuenta la duración de la ventilación mecánica. Basándose en este hecho, las tasas de incidencia descritas oscilan entre los 5 casos por cada 1.000 días en niños y los 35 casos por 1.000 días en pacientes quemados⁵⁹. Las tasas globales descritas para los pacientes ingresados en la UCI muestran valores que oscilan entre los 10 y los 20 episodios por cada 1.000 días de ventilación mecánica, en función de la población estudiada^{54, 59, 85}.

En España, los datos procedentes de un estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en UCI (ENVIN-UCI) realizado desde el año 1994, ha demostrado una tasa de incidencia entre 18,5 y 23,6 episodios por cada 1,000 días de VM⁵. Los valores recogidos en la UCI del Hospital de Sabadell desde el año 1995 hasta el año 1999, mostraron valores ligeramente inferiores, oscilando entre los 16 y 18 episodios de NAV por cada 1,000 días de ventilación mecánica, utilizando rutinariamente un sistema de aspiración de secreciones subglóticas (figura 2).

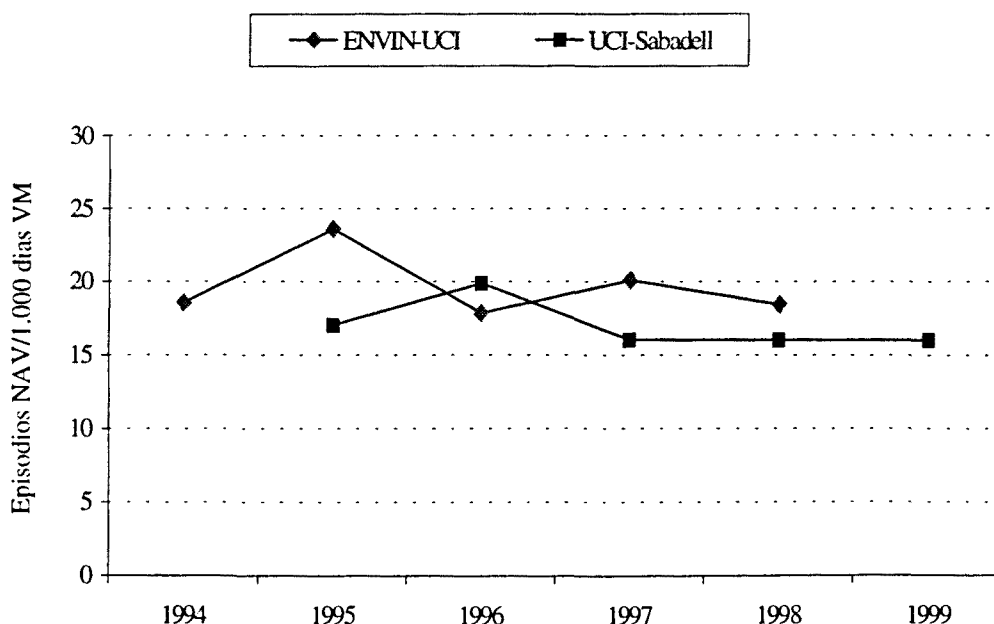


Figura 2. Comparación de la incidencia de NAV entre los años 1994-1999.

Desde el punto de vista etiológico, se considera que más de un 60 % de los episodios de NAV son causados por bacilos gramnegativos y *P. aeruginosa* figura como uno de los principales agentes causales^{71, 207, 263}. Las frecuencias de aislamiento de este microorganismo varían en función de los diferentes estudios, con valores que oscilan entre el 24 % y el 31 %^{71, 210, 241}. En España, los resultados obtenidos en un estudio nacional efectuado entre los años 1994 y 1998 (ENVIN) mostraron que, a pesar del predominio de *P. aeruginosa* se observó una progresiva disminución de la neumonía causada por este microorganismo con valores que evolucionaban desde un 36,9 % a un 18,1 % final⁶.

1.3.2 Manifestaciones clínicas

La neumonía causada por *P. aeruginosa* no presenta especiales diferencias con la producida por la mayoría de bacilos gramnegativos. Se ha descrito la alteración del patrón diurno de la temperatura con un pico en la mañana^{188, 261}. El valor promedio de leucocitosis es de alrededor de 15.000 leucocitos/ml, con aproximadamente un 10% de formas inmaduras. En general, la neumonía por *P. aeruginosa* es de aparición tardía en pacientes con elevado grado de disfunción orgánica previa al diagnóstico. La presencia de bacteriemia es poco frecuente (inferior al 15%)³⁹. No obstante, alrededor de una tercera parte pueden desarrollar una lesión alveolar aguda que evolucione a un síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA)²¹⁷. Una proporción similar de pacientes puede desarrollar shock séptico o requerirán un aumento de la dosis en la perfusión de fármacos vasoactivos, si los estaban precisando; la presencia de esta complicación puede acompañarse de un pronóstico fatal a corto plazo³⁹.

La identificación de *P. aeruginosa* solamente en el cultivo de aspirado traqueal procedente de pacientes sometidos a ventilación mecánica no se puede considerar diagnóstico de la presencia de neumonía. La colonización traqueal sin neumonía suele producirse en los pacientes ventilados y en los portadores de traqueostomía¹⁶⁹.

Por el contrario, si *P. aeruginosa* está presente en el cultivo de aspirado traqueal de un paciente con neumonía, es bastante probable que sea el organismo causante de la infección. Aunque esta relación no se ha confirmado en los pacientes sometidos a ventilación mecánica, si se halla *P. aeruginosa* en el cultivo debería considerarse un tratamiento adecuado para combatir este microorganismo ²¹⁷.

La radiografía de torax también es inespecífica y la neumonía nosocomial causada por *P. aeruginosa* no se distingue radiológicamente, de una forma rutinaria, de otras neumonías bacterianas. La neumonía por *P. aeruginosa* en el paciente intubado tiende a no ser unilobular; habitualmente es multilobular y frecuentemente afecta a los lóbulos inferiores ¹⁸⁸. Las propiedades necrotizantes y vasocéntricas del organismo traducidas en infrecuentes características radiográficas incrementan la sospecha que se trate de una neumonía producida por *P. aeruginosa*. Debido a que los anaerobios desempeñan un papel poco importante en la NAV, *P. aeruginosa* es la causa principal de las neumonías necrotizantes. Los pacientes con neumonía por *Pseudomonas* spp. suelen presentar derrame pleural aunque de pequeño tamaño y, por tanto, son difíciles de detectar en radiografías portátiles. La presencia de empiema también se ha asociado a la neumonía por *Pseudomonas* spp., aunque no es frecuente en los pacientes ventilados ⁶⁷.

Se ha descrito que los episodios polimicrobianos pueden producirse en una tercera parte de los casos, siendo la mayoría de los microorganismos acompañantes pertenecientes a la familia de las enterobacterias ³⁹. Asimismo, se produce con frecuencia la asociación a *S. aureus* resistentes a meticilina (SAMR) ²⁰⁹. Por el contrario, es excepcional el aislamiento concomitante de otros cocos grampositivos o de *H. Influenzae* ²¹¹, así como el aislamiento conjunto de *A. baumannii*.

El mejor indicador de *P. aeruginosa* como la causa de la neumonía es, probablemente, el marco clínico. El uso previo de antibióticos parece constituir uno de los factores más importantes ^{71, 208}. Dada la habilidad de este microorganismo para desarrollar resistencia a los antibióticos, la probabilidad de identificarlo será mayor cuanto más prolongado haya sido el tratamiento y más amplio sea su espectro de

acción.

1.3.3 Factores de riesgo

Los factores de riesgo para desarrollar neumonía se han considerado como aquellas situaciones clínicas que facilitan la aspiración de secreciones en la vía aérea, aumentan la cantidad y patogenicidad de los microorganismos inoculados y disminuyen las defensas locales del tracto respiratorio y la inmunidad sistémica ⁶. Se han desarrollado varios estudios con el propósito de determinar los factores de riesgo que se asocian al desarrollo de la NAV causada por *P. aeruginosa* en los pacientes sometidos a ventilación mecánica. Los factores de riesgo pueden variar de un estudio a otro en función de los diferentes factores que se valoren y que están relacionados con las características epidemiológicas del paciente (como la duración de la ventilación mecánica, el nivel de consciencia, las enfermedades subyacentes), las diferentes vías de adquisición del microorganismo, la instauración de un tratamiento antibiótico previo, la duración de la estancia en la UCI, la existencia de infecciones previas, etc.

Los estudios multivariados realizados han determinado que los factores, con valor independiente, que pueden influir en la presentación de la NAV causada por *P. aeruginosa* son mayormente, la presencia de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) ^{210, 232, 252, 263}, la duración de la ventilación mecánica ^{210, 218, 252, 267} y el uso previo de antibióticos ^{71, 210, 218, 267}.

La colonización por *P. aeruginosa* en el paciente intubado también es un factor de riesgo a considerar en el desarrollo de la infección. No obstante, existe cierta controversia acerca del origen inicial de dicha colonización. Por un lado, se ha considerado la colonización del tracto respiratorio como un importante factor de riesgo para el desarrollo de la NAV causada por *P. aeruginosa*, sugiriéndose la implicación tanto de la colonización faríngea como de la colonización traqueal ²².

32-34, 43, 62, 170, 252. Algunos de estos estudios han destacado la existencia de una colonización primaria de la tráquea (sin una colonización previa de otras localizaciones) ^{62, 170, 252}, sugiriendo, en ocasiones, un origen exógeno de *P. aeruginosa* como posible explicación ^{62, 252}. Asimismo, el mayor tropismo de este microorganismo a favor de la tráquea frente a la orofaringe podría estar relacionado con la observación de que, *P. aeruginosa* presenta un mayor grado de adherencia a las células traqueales que a las células bucales ^{168, 169}.

Del mismo modo, se ha observado que existe relación entre el deterioro del estado nutricional del paciente y una menor resistencia de la mucosa traqueobronquial a la infección ¹⁶⁹. Asimismo, el pobre estado nutricional podría favorecer el paso previo desde la orofaringe a la tráquea de bacterias gramnegativas entéricas, que podrían crear condiciones favorables para la posterior colonización por *P. aeruginosa* ¹⁷⁰.

Asimismo, se ha sugerido una estrecha relación entre la colonización del tracto respiratorio inferior y el desarrollo posterior de una neumonía en pacientes que recibían tratamiento antimicrobiano y con enfermedades subyacentes graves ³.

Existen discrepancias acerca del impacto de la colonización del estómago en la patogénesis de la neumonía nosocomial ^{35, 171} a pesar de que se le ha considerado un importante reservorio ^{99, 105}. Es posible que las diferentes medidas de prevención que se llevan a cabo en los pacientes intubados tales como, el control de la posición del paciente, la administración de profilaxis para la hemorragia digestiva, la disminución del volumen gástrico, el control del pH gástrico, entre otras, hayan podido influir en su menor papel en la colonización y posterior infección pulmonar ¹⁷¹.

1.3.4 Episodios recurrentes

P. aeruginosa es el principal microorganismo aislado en los pacientes ventilados

que presentan una neumonía previa, siendo ésta tanto de origen comunitario como de origen nosocomial. Además, muestra una particular facilidad para desarrollar episodios de recurrencia con una frecuencia variable: desde un 3%³⁹, a un 18,1%²¹⁶ e incluso un 50 %²³². Estos valores dependen, en gran parte, de los criterios diagnósticos empleados y de la especificidad de la técnica de diagnóstico seleccionada.

Mediante la técnica de electroforesis en campo pulsante (PFGE) se ha podido demostrar que la mayoría de los episodios de recurrencia clínica en pacientes ventilados se deben a una recaída producida por la misma cepa de *P. aeruginosa* que fue causante del episodio inicial de neumonía²¹⁶. Estos resultados podrían justificar un cambio en las medidas tradicionales de control de la transmisión, sugiriendo una estrategia basada en la identificación de los portadores y la intervención sobre los mecanismos de defensa.

Finalmente, se ha observado que los pacientes que presentan enfermedades pulmonares tales como EPOC²³² o SDRA²¹⁶ son más susceptibles a desarrollar episodios de recurrencia.

1.3.5 Factores pronósticos

La resolución de una NAV es el resultado de una compleja interacción entre un adecuado mecanismo de defensa del huésped, la virulencia del agente patógeno y una adecuada terapia antibiótica. Permitiendo la modificación de una terapia antibiótica inapropiada, un diagnóstico adecuado es el primer paso en un intento de actuar sobre la mortalidad. Incluso, a pesar de un diagnóstico adecuado, la mortalidad puede no verse afectada si la terapia antibiótica posterior no es efectiva o si el paciente está demasiado enfermo como para responder con una adecuada respuesta inmune²⁹⁷.

La presencia de NAV causada por *P. aeruginosa* en los pacientes ingresados en

la UCI se asocia con una elevada tasa de mortalidad. Existen estudios donde se ha registrado una mortalidad global con valores que oscilan entre un 69 % y un 71 %, revelando una mortalidad atribuible al mencionado microorganismo entre un 38 % y un 42,8 % (valores que en ocasiones pueden doblar a los observados en la neumonía causada por otros microorganismos) ^{39, 72}. En uno de estos estudios ⁷² se concluyó que las neumonías causadas por bacilos gramnegativos no fermentadores se asociaban con una mortalidad superior a la resultante de la patología de base sola y prolongaban significativamente los días de estancia en la UCI. Sin embargo, en un estudio de cohortes realizado en la UCI del Hospital de Sabadell se registraron valores menores, con una mortalidad global del 42,3 % y una mortalidad atribuible del 13,5 %, habiendo recibido todos los casos analizados un tratamiento empírico en combinación a la que los aislamientos eran susceptibles ²¹³.

Por otra parte, en otro estudio realizado en la UCI del Hospital de Sant Pau (Barcelona) se identificó como único factor independiente de la mortalidad el uso previo de antibióticos. Sin embargo, al repetir el análisis en el grupo de pacientes con un agente etiológico determinado, solamente los microorganismos de alto riesgo se mantuvieron como factor de riesgo significativo ²⁰⁸. Estos resultados sugerirían que el resultado de la terapia antibiótica previa podría ser la selección de determinados microorganismos como, por ejemplo, *P. aeruginosa*, la cual se asociaría con una elevada mortalidad ^{71, 208}. También se ha observado (en la UCI del Hospital de Sabadell) que el nivel de disfunción fisiológica en el momento de desarrollar una neumonía es el factor que más impacto tiene en la mortalidad de los pacientes afectados por NAV. Sin embargo, tanto en los grupos de pacientes con un elevado (> 50 %) o reducido (<50%) riesgo de fallecer, la implicación de *P. aeruginosa* como agente causal se acompañaría de un exceso de mortalidad ²¹⁴.

A pesar de que las relaciones entre la mortalidad, las enfermedades de base y el desarrollo de neumonía son complejas en el paciente ventilado; la presencia de neumonía causada por *P. aeruginosa* es frecuente entre aquellos que fallecen, siendo la principal causa de mortalidad por neumonía en aquellos pacientes que desarrollan NAV.

1.4 Marcadores en la epidemiología de las enfermedades infecciosas

La epidemiología molecular en el campo de las enfermedades infecciosas va dirigida a la detección de polimorfismos genéticos entre cepas de microorganismos con importancia clínica. Se pueden establecer relaciones entre las diferentes cepas basándose en el cálculo de la heterogeneidad genética. La hipótesis en la que se basa la aplicación de los métodos de tipificación es que los aislamientos obtenidos durante, por ejemplo, una epidemia o en el curso de la infección de un paciente presentan una “relación clonal”, es decir, derivan de la expansión clonal de un único precursor. Sin embargo, al nivel de especie existe la suficiente diversidad genética como para que se pueda diferenciar los aislamientos procedentes de diferentes localizaciones u obtenidos en momentos diferentes ²⁴⁹.

En el contexto de la epidemiología, cuando se utilizan métodos de tipificación es necesario tener en cuenta ciertos términos.

- **Aislamiento**, un cultivo bacteriano puro derivado de una única colonia a partir de un cultivo original, presumiblemente derivado de un único organismo, y caracterizado por la identificación al nivel de especie ^{246, 257}.
- **Cepa**, un aislamiento o conjunto de aislamientos que exhiben rasgos fenotípicos y/o genotípicos que los diferencian de otros aislamientos de la misma especie ²⁴⁶.
- **Tipo**, un patrón o un perfil específico o un conjunto de características o resultados de marcadores epidemiológicos, exhibidos por una cepa tras la aplicación de uno o varios métodos de tipificación ²⁴⁶.
- **Clon**, un conjunto de aislamientos descendientes de un precursor común formando parte de una cadena directa de replicación y transmisión de huésped a huésped o del ambiente al huésped. La relación clonal de estos aislamientos se pone de manifiesto porque poseen un nivel de similitud entre sus genotipos y/o fenotipos significativamente superior al que se podría encontrar entre los aislamientos no relacionados de la misma especie escogidas al azar ¹⁷⁹.

El grado de identidad entre los componentes de una clona se complica en la práctica como consecuencia de la inestabilidad del genoma de los microorganismos, que puede acumular modificaciones de su material genético en cada generación. Estas modificaciones pueden ser debidas a mutaciones al azar, a reordenaciones o cambios en la propia secuencia (deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones) o a fenómenos de recombinación⁶⁸. Así pues, la clonalidad no es absoluta sino que está modulada por el tiempo, es decir, la similitud absoluta (identidad) que existía inicialmente entre los componentes de una clona va disminuyendo con el tiempo. Igualmente, la clonalidad se verá influenciada por la estabilidad genética del microorganismo, la diversidad existente dentro de una especie y por la presión selectiva del ambiente⁶⁸.

Al realizar estudios epidemiológicos de las enfermedades infecciosas es importante disponer de métodos de tipificación al nivel de cepa o de subespecie que permitan abordar los siguientes objetivos: a) determinar la existencia y el alcance o extensión de una epidemia o brote epidémico; b) delinear los patrones de colonización e identificar las fuentes de contaminación y los modos de transmisión; c) identificar y controlar los reservorios en la población y/o en el ambiente; d) evaluar la eficacia de las medidas preventivas y e) realizar un seguimiento de la difusión de las cepas en una población. La información obtenida permitirá un mejor análisis epidemiológico, siendo necesario que dicha información sea un soporte o reflejo de la hipótesis clínica sin reemplazar los métodos epidemiológicos convencionales²⁴⁶.

En resumen, será necesario que el método de tipificación empleado reconozca la similitud entre las cepas con una procedencia común, pero que a su vez muestre una diferencia clara entre las cepas de la misma especie no relacionadas epidemiológicamente²⁷⁰. Por tanto, la utilidad de un marcador determinado dependerá de su propia estabilidad y de la diversidad existente en la especie (definiendo una especie bacteriana como el conjunto de cepas que presentan una homología de DNA/DNA superior o igual al 70%)²⁸⁵.

1.4.1 Marcadores fenotípicos

Los métodos fenotípicos son todavía de uso muy difundido y se siguen valorando para la caracterización. Sin embargo, suelen presentar importantes deficiencias. Normalmente son específicos del microorganismo, es decir, sólo se pueden aplicar en aquellos organismos a partir de los cuales se han diseñado. Además, la estabilidad de la mayoría de estos métodos está influenciada por una presión ambiental selectiva y por ello, presentan una capacidad relativamente baja a la hora de determinar relaciones genéticas entre las cepas. Por último, no todas las cepas son susceptibles de ser tipificadas por el método utilizado.

❖ *Biotipado*

El biotipado se fundamenta en la variabilidad intraespecífica del metabolismo bacteriano, pudiendo comprender reacciones bioquímicas específicas, la morfología de las colonias y la tolerancia ambiental (p.ej. la capacidad de crecimiento en ciertos medios o a diferentes temperaturas o pH). Aunque en algunas especies existen biotipos bien definidos asociados a alguna reacción bioquímica o carácter morfológico característico ⁷³, es necesario analizar una gran cantidad de caracteres bioquímicos. Para ello se han utilizado microgalerías comerciales con medios liofilizados que permiten estudiar fácilmente una gran cantidad de caracteres metabólicos. Sin embargo, estas galerías han estado diseñadas para estudios taxonómicos, es decir, de identificación de género y especie, y no para la diferenciación de cepas con fines epidemiológicos. Generalmente muestra un bajo poder discriminativo y una baja reproducibilidad (su variabilidad puede deberse a factores técnicos y ambientales, además de la incorporación o la pérdida de plásmidos) ¹⁸⁶. No obstante, se ha aplicado con éxito para estudios epidemiológicos de algunos microorganismos, como *Candida albicans* ¹⁷⁴, *Serratia marcescens* ²³¹ y *Staphylococcus epidermidis* ¹⁸⁴.

❖ **Antibiotipado**

El antibiotipado se basa en la determinación del patrón de sensibilidad o resistencia de una bacteria frente a un panel de agentes antimicrobianos. En los estudios epidemiológicos, en lugar de clasificar las cepas como "sensible", "intermedia" o "resistente" a determinado antibiótico (antibiograma cualitativo), es preferible expresar los resultados en valores continuos, es decir, valores de CIM (concentración inhibitoria mínima) o diámetro del halo de inhibición ⁷⁶, así como realizar una lectura interpretativa del antibiograma de forma que valore los resultados en función del mecanismo de resistencia (constitutiva, inducible, de bajo nivel, de alto nivel, etc).

Una ventaja de este método radica en se realiza de forma rutinaria y estandarizada en la mayoría de laboratorios de microbiología ¹¹⁰. El principal inconveniente reside en que existe cierta homogeneidad de patrones influida por la política antibiótica local, que en las infecciones nosocomiales puede dificultar la diferenciación de la cepa epidémica de las no relacionadas. En estos casos se pueden utilizar antibiogramas "ampliados" en los que se incluyen antibióticos no utilizados en clínica y, por tanto, no influenciados por la presión selectiva ambiental. Asimismo, el poder discriminativo depende del nivel de resistencia natural de una especie concreta, viéndose disminuido en algunas especies altamente resistentes (como p.ej. *Xantomonas maltophilia*) o sensibles (p. ej. estreptococos), así como por la variación fenotípica (inestable ante determinados factores ambientales). La resistencia a determinados antibióticos puede producirse por múltiples mecanismos genéticos como, mutaciones puntuales espontáneas ⁸⁸ y la adquisición de genes de resistencia específicos asociada a elementos móviles (p.ej. transposones, plásmidos) ⁶¹. Por otra parte, ante la ausencia de una presión selectiva específica, estos elementos podrían perderse ^{68, 156}. Como consecuencia de estos mecanismos genéticos, cepas diferentes pueden presentar patrones de resistencia similares o, a la inversa, los patrones de susceptibilidad de aislamientos secuenciales que representan la misma cepa podrían diferir en uno o más antibióticos ^{156, 256}.

A pesar de las limitaciones mencionadas, con respecto a su aplicación en *P. aeruginosa*, el antibiotipado se ha aplicado en estudios de brotes ²⁵³ o como marcador de vigilancia epidemiológica previa a la aplicación de marcadores moleculares ⁷⁸.

❖ *Serotipado*

Este método está basado en la detección de determinantes antigénicos (somáticos, flagelares, capsulares o de superficie) mediante una colección de anticuerpos poli o monoclonales específicos. Muchos componentes de la superficie celular exhiben variación antigénica, incluyendo lipopolisacáridos, polisacáridos capsulares, proteínas de membrana externa y organelas extracelulares (p.ej flagelos y *pili*). Las técnicas aplicadas para la detección de antígenos incluyen: aglutinación, coaglutinación, inmunofluorescencia y enzimoanálisis (ELISA) ¹⁸⁶. Es un método muy utilizado para la identificación taxonómica de algunas especies, así como de reconocido valor en la tipificación de un gran número de especies. Continua siendo una técnica clave en la tipificación de *Salmonella*, *Shigella* y neumococos ²⁵⁹. En el caso concreto de *P. aeruginosa* se utiliza como antígeno el lipopolisacárido termoestable de la membrana externa (antígeno-O) ¹⁸⁹. Aunque puede presentar una buena reproducibilidad y poder discriminativo ^{20, 239}, se han descrito ciertas limitaciones como son, la alta frecuencia de cepas poliaglutinables ⁹⁶, el hecho de que la mayoría de los aislamientos clínicos pertenece a un número limitado de serotipos ^{20, 221} y que una importante proporción de las cepas no es tipable (p.ej. en pacientes con fibrosis quística) ⁹⁰.

En general, se considera una técnica de un valor epidemiológico limitado, dado que en muchas especies bacterianas no se encuentra desarrollado un sistema de serotipado o, si existe, presenta una baja reproducibilidad, una baja tipabilidad y un bajo poder discriminativo. Otro problema adicional es la disponibilidad limitada de anticuerpos de alta calidad, posible únicamente en los centros de referencia.

❖ **Fagotipado**

Los bacteriófagos (o fagos) son virus que infectan a las bacterias. En algunos casos pueden producir la lisis celular y liberar nuevas partículas víricas, mientras que en otros casos puede permanecer en estado de lisogenia, es decir, el DNA del fago (profago) se encuentra integrado en el genoma bacteriano sin producir la lisis celular. El fagotipado evalúa la sensibilidad o la resistencia de una cepa frente a una colección de bacteriófagos de infectividad restringida. Se ha aplicado en el estudio de las bacterias asociadas a infecciones nosocomiales y se ha documentado su utilidad epidemiológica en el estudio de cepas de *Staphylococcus aureus*¹², *Salmonella enteritidis*¹⁰⁰. En *P. aeruginosa* ha sido posible tipificar hasta un 85 % de aislamientos clínicos con este método¹⁸⁹. Sin embargo, aunque se ha aplicado en varios estudios^{19, 20, 90} ha demostrado una baja reproducibilidad^{189, 239}.

En general, es una técnica de limitada tipabilidad, así como de una baja reproducibilidad y de difícil estandarización (p. ej. por cambios en las condiciones ambientales o por la introducción de plásmidos)¹⁸⁶. Además, su interpretación resulta complicada precisa de grandes colecciones de fagos, por lo que sólo se desarrolla en centros de referencia.

❖ **Producción de bacteriocinas**

Las bacteriocinas son sustancias producidas por algunas bacterias que pueden tener un efecto letal sobre otros microorganismos de la misma especie, género o familia. El análisis de la producción de bacteriocinas consiste en la detección de su producción por la cepa problema mediante la inhibición del crecimiento de cepas indicadoras estándares¹⁸⁶. Este método ha sido muy utilizado en la tipificación de ciertos patógenos como, *P. aeruginosa*^{79, 189, 239}. Se ha observado que, utilizado en combinación con el serotipado a menudo permite diferenciar entre cepas pertenecientes a un mismo serotipo de *P. aeruginosa*^{186, 189}. Sin embargo, puede presentar una baja reproducibilidad¹⁸⁰.

En general, no se considera una técnica con valor epidemiológico debido a la falta de estandarización y su baja reproducibilidad. Un inconveniente adicional es la baja tipabilidad de algunas especies, requiriéndose grandes colecciones de cepas indicadoras y controles, lo que hace que sea una técnica limitada a centros de referencia.

1.4.2 Marcadores moleculares

En los últimos años, la introducción de un número importante de técnicas moleculares que analizan tanto las proteínas como los ácidos nucleicos ha revolucionado los estudios epidemiológicos de los microorganismos, por ser métodos que no precisan de reactivos específicos de microorganismo, por presentar una gran tipabilidad, reproducibilidad y gran poder discriminativo y ser capaces, a su vez, de determinar las relaciones clonales entre las cepas patógenas. No obstante, como cualquier método de tipificación convencional es necesario estandarizarlos, validarlos cuidadosamente y saber interpretar los resultados obtenidos.

Los métodos moleculares de tipificación se dividen en dos grandes grupos, en función de las macromoléculas sometidas a estudio: proteínas y ácidos nucleicos.

1.4.2.1 Análisis de proteínas

❖ *Perfiles electroforéticos de proteínas totales y de membrana externa*

Esta técnica permite evaluar el grado de variabilidad al nivel de las proteínas totales entre las diferentes cepas estudiadas. Para ello, se realiza una lisis celular y posterior estudio del perfil proteico mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). Dado el gran número de proteínas presentes en una célula bacteriana, es posible que los perfiles electroforéticos

muestran un gran número de bandas, lo que dificulta su interpretación. Para simplificar la interpretación se han propuesto métodos como, por ejemplo, el inmunoblot que consiste en la transferencia de los geles a membranas de nitrocelulosa por la técnica de *Western-blot* y su revelado con antisueros específicos para la especie estudiada o con una mezcla de antisueros humanos ¹⁶¹.

Una técnica alternativa, en la cual se purifican las proteínas de la membrana externa y se analiza su heterogeneidad aplicando también SDS-PAGE, se ha utilizado para la caracterización de varias bacterias gramnegativas como son *H. influenzae* ¹⁶, *Neisseria meningitidis* ¹⁵⁹ y *P. aeruginosa* ^{20, 138}.

❖ *Análisis multienzimático*

En el análisis multienzimático (*multilocus enzyme electrophoresis*; MEE), los aislamientos son analizados basándose en las diferentes movilidades de un conjunto de enzimas metabólicos. Los extractos celulares que contienen los enzimas metabólicos solubles son sometidos a una electroforesis en gel de almidón o de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes y, posteriormente, se revelan los enzimas con sustratos colorimétricos específicos ²²⁹. Esta técnica aporta datos indirectos de la variabilidad del genoma bacteriano, en concreto, de la existencia de mutaciones puntuales neutras que afectan a la secuencia de los loci que codifican para enzimas citoplasmáticos de actividad metabólica ⁶⁸. Este tipo de mutaciones produciría cambios en la secuencia de los nucleótidos sin alterar la función del enzima y afectando sólo a la secuencia de aminoácidos, pudiendo provocar cambios en la carga eléctrica y la conformación del enzima que afectarían a su movilidad electroforética ¹⁶².

Las variantes electroforéticas o electromorfos de un enzima se consideran alelos del locus enzimático correspondiente. Se debe considerar la posible existencia de mutaciones silenciosas a nivel del DNA que no llegan a afectar la movilidad electroforética y, por tanto, cepas con el mismo electromorfo pueden presentar

distintos perfiles alélicos y ser indistinguibles por MEE. A pesar de estas limitaciones, existe la suficiente diversidad como para permitir la diferenciación de una determinada especie microbiana en una serie de combinaciones de electromorfos o electroferotipos (ETs).

MEE ha sido utilizada de manera efectiva para determinar la estructura genética de las poblaciones bacterianas. Se ha aplicado para caracterizar poblaciones clonales de una gran variedad de organismos patógenos bacterianos ⁶⁸. Sin embargo, es un método no estandarizado entre laboratorios, que implica una labor intensa e interpretación dificultosa. Por esta razón y debido a su moderado poder discriminativo ¹¹, posee una limitada aplicación en estudios epidemiológicos, como se ha descrito en el caso de *P. aeruginosa* ^{88, 192}.

1.4.2.2 Análisis de ácidos nucleicos

Las técnicas que analizan el DNA pueden ser utilizadas, con mínimas variaciones, en cualquier microorganismo. En este sentido los marcadores genotípicos poseen una flexibilidad y tipabilidad muy superior a la de los marcadores fenotípicos. El desarrollo de ciertas técnicas como el aislamiento de los ácidos nucleicos, su purificación, restricción, separación y amplificación, ha permitido el desarrollo de métodos de tipificación que permiten estudiar de una forma directa el material genético. Los marcadores genotípicos se pueden dividir en dos grandes grupos, según se estudie el DNA extracromosómico (plásmidos) o el DNA cromosómico.

❖ Análisis del DNA plasmídico

Los plásmidos son moléculas circulares extracromosómicas de doble cadena de DNA, independientes del cromosoma y dotados de replicación autónoma. Codifican para una serie de funciones tales como los factores de patogenicidad, la resistencia a

los antimicrobianos y el metabolismo de los hidratos de carbono, que otorgan al huésped ventajas selectivas en determinadas condiciones ambientales ²⁵⁸. Sin embargo, no son estructuras esenciales para el crecimiento normal de la bacteria.

El número de copias no es uniforme, los plásmidos de gran tamaño presentan 1 ó 2 copias por célula mientras que el número de copias en los de pequeño tamaño tiende a ser elevado, siendo éstos más fáciles de detectar. La utilización de plásmidos en la tipificación bacteriana se basa en el tamaño y número de copias presentes por célula considerando que, cepas relacionadas presentan plásmidos idénticos en número y tamaño ¹⁴⁸. Para su caracterización, tras el proceso de extracción del DNA plasmídico, se procede a la separación electroforética en gel de agarosa, considerando que la distancia recorrida por cada plásmido en el gel es inversamente proporcional a su peso molecular ¹⁵⁴.

El perfil plasmídico es un método rápido, fácil de realizar y ha demostrado ser de gran utilidad en gran número de estudios ^{107, 148, 226} y puede ser efectivo en la evaluación de brotes epidémicos, especialmente intrahospitalarios ¹¹. Si bien es una técnica aplicable a la mayoría de especies, la presencia de plásmidos no se da con la misma frecuencia. En el caso de *P. aeruginosa*, consiste en una técnica con una baja tipabilidad dado que solo de un 10 % a un 15 % de las cepas poseen plásmidos ¹⁹¹. Puede presentar además otros inconvenientes ^{11, 186, 249}:

- ◆ La morfología del plásmido puede verse alterada durante el proceso de extracción y adoptar diferentes conformaciones, presentando movilidades electroforéticas distintas. Por tanto, se podrían interpretar como plásmidos diferentes cuando, en realidad, se trata de conformaciones distintas del mismo plásmido ²⁵⁵.
- ◆ Los plásmidos son elementos genéticos prescindibles, por lo que su adquisición o pérdida se da con relativa frecuencia, especialmente en aquellas bacterias conjugables. Todo ello conlleva a cierta inestabilidad del perfil plasmídico, tanto más acentuada cuanto mayor es el período de tiempo que separa a las cepas que se comparan ¹⁴⁸.

- ◆ Pueden aislarse plásmidos del mismo tamaño entre distintas cepas, aunque su secuencia de pares de nucleótidos pueda ser diferente.

Tanto el poder discriminativo como la reproducibilidad de esta técnica pueden mejorar utilizando enzimas de restricción y analizando el número y tamaño de los fragmentos obtenidos ^{11, 148}.

❖ *Análisis del DNA cromosómico*

El análisis del DNA cromosómico se puede realizar desde tres tipos de enfoques generales. Un grupo de técnicas estudia el polimorfismo de restricción, otro grupo de técnicas se basa en el polimorfismo de la amplificación y finalmente el tercer grupo se basa en el polimorfismo de secuenciación. A continuación, se detallarán los diferentes métodos siguiendo la siguiente clasificación:

. Polimorfismo de restricción

- a) Del *DNA total*,
 - mediante electroforesis convencional
 - mediante electroforesis en campo pulsante
- b) de *un gen*,
 - mediante *Southern blot* e hibridación, tras electroforesis convencional
 - mediante restricción del producto amplificado por PCR

. Polimorfismo de amplificación

- a) De diversas regiones del genoma (a partir de secuencias conocidas o desconocidas)
- b) Detección de dianas de restricción

. Polimorfismo de secuenciación

a) de un gen mediante la amplificación por PCR y secuenciación

A. Análisis del polimorfismo de restricción

Mediante este método se compara el número y tamaño de los fragmentos producidos por la digestión del DNA cromosómico con enzimas de restricción. Estas enzimas son producidas por las propias bacterias como un sistema de protección frente a la contaminación de su genoma por DNA exógeno (p. ej. DNA de bacteriófagos) y se caracterizan por reconocer secuencias de nucleótidos específicas, generalmente de unos 4 a 6 pares de bases (pb), cortando el DNA a ese nivel. Para evitar que sea digerido por su propio enzima de restricción, este sistema de protección se complementa con una metilación del DNA en la diana de restricción de la propia bacteria.

A lo largo del tiempo, determinadas regiones del cromosoma bacteriano están sujetas a mutaciones, reordenaciones (deleciones, inserciones, inversiones o translocaciones) y recombinaciones interespecíficas²⁵⁸, que comportan cambios en la secuencia y en el número de nucleótidos, que pueden llegar a afectar a las secuencias diana de restricción y secuencias adyacentes. Por tanto, el número y la localización de dichas dianas serán únicos para cada genoma, reflejándose en los perfiles de restricción del DNA cromosómico. Las variaciones en el número y tamaño de los fragmentos de restricción se denominan polimorfismos del tamaño de los fragmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphisms*; RFLPs).

Cuando se digiere una molécula de DNA con un enzima de restricción se obtiene un número de fragmentos equivalentes a las veces que se encuentra repetido el lugar de restricción a lo largo del genoma. La frecuencia de corte de un enzima para un microorganismo en concreto vendrá determinada tanto por el tamaño de la secuencia de la diana de restricción (cuanto más corta sea la secuencia de restricción, mayor

será el número de fragmentos obtenidos), como por el contenido en guanina y citosina (G+C) de dicha secuencia y del genoma de la especie bacteriana en estudio ²⁸².

La capacidad de variabilidad del genoma de un microorganismo y la duración del estudio, son dos variables que pueden influir en la diversidad de los RFLPs. Una representación esquemática conceptual de estas dos variables se muestra en la siguiente figura (Figura 2).

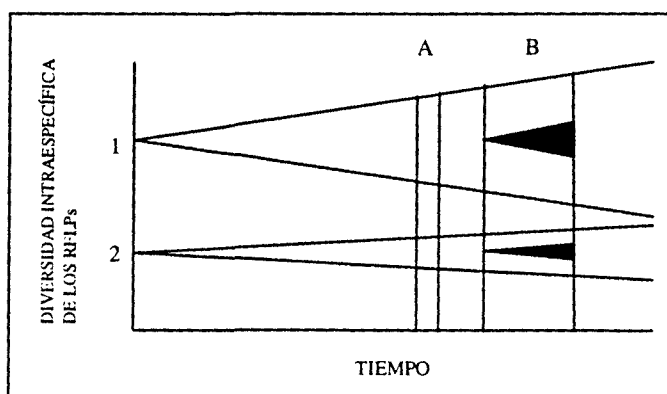


Figura 2. Representación gráfica de las variables que influyen en la diversidad de los RFLPs (esquema extraído de Stull TL y cols. ²⁴⁸). La especie 1, representa una especie con una alta capacidad de variación; la especie 2, representa una especie con una baja capacidad de variación. Las áreas A y B, representan la duración de los estudios epidemiológicos (corto y largo, respectivamente). Las zonas sombreadas representan el desarrollo de polimorfismo de una cepa durante un período epidemiológico determinado.

Un marcador epidemiológico óptimo ha de detectar un alto grado de polimorfismo de los RFLPs, siendo estable durante el período de estudio. En función de las dos variables descritas y representadas en la figura 2, se pueden crear 4 posibles situaciones a las que se podría dar la siguiente interpretación:

- **A.1.** Los resultados pueden interpretarse fácilmente. Existe una gran variabilidad de los RFLPs y el período de estudio es corto.
- **A.2.** La interpretación puede ser difícil. Las cepas se caracterizarían en unos pocos tipos (poca variabilidad). Este problema puede solventarse

parcialmente utilizando varias enzimas de restricción, para detectar el máximo de heterogeneidad posible.

- **B.1.** El período de tiempo es lo suficientemente largo como para permitir que una sola cepa pueda desarrollar una gran variabilidad, lo que dificultaría la interpretación de los RFLPs.
- **B.2.** El bajo polimorfismo obtenido se podría solventar mediante la utilización de varias enzimas de restricción.

El análisis de los RFLPs del DNA cromosómico puede realizarse del genoma en su conjunto o asociado a una secuencia o gen específico.

A.1 Análisis de los RFLPs del DNA total

♦ Análisis de los RFLPs del DNA total mediante una electroforesis en campo constante (REA)

Esta técnica se basa en la digestión del DNA con enzimas de restricción de alta frecuencia de corte (generándose cientos de fragmentos con tamaños que oscilan entre las 0,5 y las 50 kilobases (kb)) y la separación de los fragmentos obtenidos mediante una electroforesis convencional de campo constante en gel de agarosa. Las diferentes cepas de una misma especie bacteriana podrán diferenciarse debido a que variaciones al nivel de la secuencia del DNA pueden alterar el número y la distribución de las dianas de restricción e incluso de las secuencias adyacentes.

Dada la posibilidad de estudiar el genoma entero se considera que es un método muy discriminativo, de aplicación universal y, además, relativamente sencillo de realizar. Sin embargo, un factor limitante es la dificultad para interpretar y comparar los perfiles de restricción debido al gran número de fragmentos generados que no pueden resolverse convenientemente y que tienden a solaparse¹⁴². Este método ha sido utilizado para caracterizar cepas de *P. aeruginosa*^{80, 134, 136} y aunque en

ocasiones la interpretación de los perfiles generados resulta compleja, ésta puede mejorarse gracias a la utilización de métodos computerizados ⁸⁰.

◆ **Análisis de los RFLPs del DNA total mediante una electroforesis en campo pulsante**

Este método constituye una variante del anteriormente expuesto. En este caso, el genoma bacteriano es digerido con enzimas de baja frecuencia de corte por lo que se generarán un menor número de fragmentos, aunque de un tamaño superior. Los fragmentos generados se separan mediante una electroforesis en campo pulsante (*pulsed-field gel electrophoresis*; PFGE), variación de la electroforesis convencional desarrollada por Schwartz y Cantor ²²⁷ y basada en la alternancia de los de campos eléctricos.

Dado que para el PFGE se requiere un DNA lo más intacto posible, el aislamiento del DNA implica la inmovilización del cultivo bacteriano en bloques de agarosa ("insertos"), realizándose *in situ* la lisis celular y posteriormente la digestión enzimática ¹¹. La selección de los enzimas de restricción adecuados vendrá determinada por los dos factores anteriormente descritos (el tamaño de la secuencia de la diana de restricción y el contenido en guanina y citosina (G+C) de dicha secuencia y del genoma de la especie bacteriana) y por un tercer factor consistente en la presencia en las dianas de restricción de secuencias extremadamente raras del genoma bacteriano, tales como el tetranucleótido CTAG (en genomas con un contenido G+C ~ 45%) y los trinucleótidos CCG y CGG (en genomas con un contenido G+C < 45%) ¹⁵⁰. En función del enzima utilizado, el análisis mediante PFGE permitirá obtener perfiles de restricción con un número limitado de fragmentos de DNA (de 5 a 20), bien resueltos y con un tamaño que puede variar entre 10 kb y 800 kb ¹⁴³.

En la electroforesis convencional, la separación de los distintos fragmentos dependerá de la propiedad tamizadora de la matriz del gel, bajo la influencia de un

campo eléctrico constante y unidireccional. Sin embargo, los fragmentos de DNA mayores de 50 kb muestran la misma movilidad y migran como una única banda ¹¹⁹. Este problema se resuelve con el PFGE, dado que se expone al DNA a campos eléctricos que cambian de una forma periódica a lo largo del gel. El principio de la técnica consiste en que, cuando se aplica un campo eléctrico en el gel, las moléculas de DNA se alargan, se extienden y migran en dirección a la corriente moviéndose a través de los sucesivos poros, al estilo de una serpiente (reptación). Cuando la dirección del campo eléctrico cambia, las moléculas de DNA deben cambiar su conformación y reorientarse hacia el nuevo campo eléctrico aplicado, antes de empezar a migrar. Por tanto, la migración es claramente dependiente del tamaño del fragmento de DNA. Así, a un pulso dado (denominando pulso a la duración de cada campo eléctrico) las moléculas de mayor tamaño necesitarán más tiempo para reorientarse por lo que tendrán menos tiempo para migrar a través del gel en la nueva dirección ⁸². Además de la duración del campo eléctrico (pulso), existen una serie de variables o parámetros electroforéticos, relacionados entre sí, que pueden influir en la movilidad de una molécula de DNA como son el voltaje aplicado, la temperatura, la concentración del gel de agarosa y el ángulo que existe entre los campos eléctricos ⁴².

Se han descrito y desarrollado distintas técnicas de electroforesis en campo pulsante, diferenciándose entre ellas fundamentalmente por la disposición de los campos eléctricos. Entre ellos, los más utilizados son:

- OFAGE (*orthogonal-field alternating gel electrophoresis*) ⁴⁴, en el cual se generan campos eléctricos no homogéneos (debido a que la longitud de los electrodos en el cátodo es mayor que en el ánodo) que se alternan a pulsos de tiempo iguales. La orientación entre los electrodos puede ser de 90° ó 120°. Aunque este sistema permite una buena resolución, debido a la no-homogeneidad del campo se pueden observar distorsiones en las bandas de bajo peso molecular, dificultando, en algunos casos, su interpretación.
- CHEF (*contour-clamped homogeneous electric field*) ⁵⁰, el campo eléctrico se genera por electrodos puntuales (n= 24) equidistantes entre sí y dispuestos de forma hexagonal. Los electrodos que determinen el ángulo seleccionado, que

puede variar entre 60° y 120°, presentarán mayor potencial que el resto de electrodos, que funcionarán con potenciales intermedios. Este hecho provocará un campo eléctrico homogéneo a lo largo de todo el gel.

Este modelo permite incrementar gradualmente los pulsos a lo largo de la carrera (*ramping*) con el efecto de asegurar que cada rango de tamaños de las moléculas de DNA esté sometido a las condiciones óptimas de separación al menos parte del tiempo de la carrera. De esta forma, se adquiere la separación de un amplio rango de tamaños y una mejor resolución de las bandas lo que facilita su interpretación

- FIGE (*field-inversion gel electrophoresis*)⁴⁵, se generan campos eléctricos homogéneos que se invierten periódicamente en una sola dirección (en función de dos electrodos dispuestos con un ángulo de 180°). Este modelo de electroforesis, al igual que el CHEF, permite utilizar *ramping* de pulsos a lo largo de la carrera. Este modelo básicamente está indicado para separar fragmentos pequeños ya que la resolución para fragmentos superiores a 600 Kb es menor.

El método de PFGE ha sido aplicado a una gran variedad de organismos¹⁴³ y ha demostrado ser altamente discriminativo y reproducible. Es por ello, que constituye el método de tipificación de elección para la mayoría de patógenos bacterianos, incluyendo *P. aeruginosa*^{93, 251} aplicándose en una gran variedad de estudios como, por ejemplo, brotes epidémicos^{250, 253, 254}, colonización persistente en pacientes con enfermedades pulmonares graves^{101, 244} o caracterización de la colonización de pacientes ingresados en la UCI^{21, 22, 37, 240}.

Sin embargo, el PFGE presenta dos limitaciones notables como son: la duración del proceso (de 2 a 4 días) para completar el proceso, aunque en los últimos años se han descrito protocolos más cortos^{83, 147}, y el requerimiento de equipos específicos y relativamente caros.

A.2 Análisis de los RFLPs asociados a una secuencia o a un gen

♦ Patrones de restricción - hibridación.

Un método para simplificar el número de bandas a comparar en el análisis de los RFLPs del DNA cromosómico, consiste en estudiar zonas concretas del genoma. Con este fin, los fragmentos de restricción del DNA total, obtenidos mediante enzimas de restricción de alta frecuencia de corte y separados mediante una electroforesis convencional en gel de agarosa, se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o de *nylon* por el método de *Southern blot*²³⁷ y posteriormente se detectan mediante una sonda marcada complementaria a la secuencia específica a estudiar. Bajo determinadas condiciones, la sonda se unirá ("hibridará") por complementariedad de bases sólo a aquellos fragmentos que contengan la totalidad o parte de la secuencia escogida. Las variaciones en el número y tamaño de los fragmentos detectados reflejarán variaciones tanto en el número y distribución de las copias de la secuencia diana en el genoma, como en la localización y número de las dianas de restricción dentro de dicha secuencia y en las regiones adyacentes. El poder discriminativo dependerá de forma directa de la frecuencia con la que los fragmentos detectados varían en número y/o tamaño. La elección de la sonda constituye un punto crítico de este método.

Existe una gran variedad de sondas que pueden utilizarse en la tipificación, normalmente se diferencian en dos grupos:

Sondas específicas

Este tipo de sondas suelen desarrollarse específicamente para una determinada especie bacteriana. Suelen derivar de genes que codifican para funciones metabólicas o para factores de virulencia, como es el caso de *P. aeruginosa*. Para su tipificación se han propuesto una serie de sondas que incluyen genes de virulencia como el *toxA*^{65, 93, 239}, *algD* y *lasA*¹³⁴ o genes que codifican para las *pili*²³⁸.

También se han utilizado como sondas específicas transposones y secuencias de inserción (*insertion sequence*; IS) demostrando ser un método de tipificación reproducible y altamente discriminativo (p.ej. la IS6110 perteneciente a *Mycobacterium tuberculosis*²⁷¹).

Sondas universales: Ribotipado

En el ribotipado los patrones de restricción-hibridación obtenidos están asociados a sondas derivadas de los operones ribosomales 16S y 23S de *E.coli*¹⁹⁹.

Este método de tipificación presenta dos ventajas fundamentales respecto a los métodos asociados a sondas derivadas de una secuencia específica²⁴⁹: (i) la sonda puede ser utilizada de forma universal, debido a la elevada conservación de los genes rRNA y a que se encuentran presentes en todas las especies bacterianas; (ii) la mayoría de las bacterias contienen múltiples operones ribosomales por lo que el número de fragmentos obtenidos puede permitir una discriminación al nivel de subespecie²⁴⁷.

El ribotipado se ha aplicado a una variedad importante de cepas clínicas, demostrando una amplia utilidad²⁴⁷. Diversos autores han aplicado el ribotipado en la caracterización de cepas de *P.aeruginosa*^{28, 30, 93, 141, 181}. Sin embargo, en algunos casos el ribotipado no suele ser la técnica de elección debido a que es un método muy laborioso, de larga duración y a que en ocasiones su poder discriminativo es limitado (en función del enzima de restricción empleado y del número de operones ribosomales presentes en una determinada especie)^{11, 259}

◆ Patrones de restricción de una secuencia de DNA amplificada por PCR

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) presenta una serie de ventajas respecto a los métodos descritos hasta ahora como son, la rapidez, la sensibilidad y un protocolo relativamente simple²⁴⁹. Una característica esencial de esta técnica reside en la habilidad de amplificar de una forma exponencial los ácidos

nucleicos. Por este procedimiento el DNA diana (que puede estar a muy baja concentración) es amplificado, mediante una DNA-polimerasa, en un proceso que no dura más que unas horas y compuesto de 20 a 30 ciclos. Cada ciclo consiste en tres fases alternas: i) desnaturalización de la doble hebra de DNA, ii) unión de los iniciadores a sus secuencias complementarias y iii) elongación de las cadenas de DNA a partir de los iniciadores por adición de nucleótidos por la DNA-polimerasa²⁵⁹.

Su aplicación más simple en los estudios epidemiológicos reside en la **PCR-RFLP**, que consiste en la amplificación de una secuencia variable conocida enmarcada por secuencias constantes. Estas secuencias constantes se utilizan para el diseño de los iniciadores de la reacción de PCR. Las secuencias de DNA amplificadas pueden ser cortadas por enzimas de restricción, lo que permite comparar los perfiles obtenidos tras la resolución de los fragmentos mediante electroforesis. Los genes que codifican para factores de virulencia, así como los operones ribosomales (especialmente el espacio intergénico 16S-23S) o los espacios intergénicos entre tRNA, han sido sujeto de estudio para la tipificación de las bacterias mediante esta técnica²⁴⁹.

La capacidad discriminativa de esta técnica depende exclusivamente de la heterogeneidad de la región amplificada dentro de las cepas de una misma especie.

B Análisis del polimorfismo de amplificación

B.1 Amplificación de diversas regiones del genoma

♦ Rep-PCR

Este método está basado en la existencia de secuencias cromosómicas repetidas utilizando, para generar los productos amplificados, iniciadores complementarios a dichas secuencias. Estas secuencias se encuentran distribuidas a lo largo del genoma

de todos los organismos. Cuando dos secuencias se encuentran lo suficientemente cerca (p.ej. a unas pocas kb) el fragmento de DNA existente entre ambas es amplificado. Debido a que el número y la localización de estas secuencias es variable, el número y tamaño de los fragmentos generados variará entre las diferentes cepas ²⁷⁵.

En los procariotas estas secuencias repetidas se caracterizan por ser cortas (< 200 pb), no codificantes, intergénicas y, aparentemente, ampliamente distribuidas en el genoma ¹³⁵. Los ejemplos mejor definidos son las secuencias REP y las secuencias ERIC. Las secuencias REP (*repetitive extragenic palindrome*) se identificaron inicialmente en *Salmonella typhimurium* y *E. coli* ²⁴³. Secuencias parecidas a las REP existen en todas las eubacterias ¹³⁵. Otras secuencias repetidas adicionales han sido identificadas en *E. coli*, *S. typhimurium* y en otras enterobacterias, llamadas ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) ¹⁰³.

La rep-PCR está teniendo una difusión importante en la tipificación de diversos microorganismos entre ellos *P. aeruginosa* ¹²¹, mostrando una buena reproducibilidad y capacidad discriminativa.

◆ AP-PCR

Este método se fundamenta en la observación de que, una secuencia de nucleótidos arbitraria puede ser utilizada como iniciador (no dirigido hacia una secuencia diana) y unirse a diferentes zonas del DNA al azar con la suficiente afinidad, como para que se produzca la amplificación de fragmentos de DNA anónimos. El número y la localización de las zonas donde se unirán los iniciadores varía entre las diferentes cepas de una especie, permitiendo su tipificación en función del número y tamaño de los fragmentos obtenidos.

En la literatura se han descrito tres variantes de esta aplicación, el término AP-PCR (*Arbitrarily Primer PCR*), donde se emplean iniciadores de 20 bases ²⁸⁸; RAPD

(*Random Amplified Polymorphic DNA*) donde se utilizan iniciadores de 10-12 bases²⁹¹ y DAF (*DNA-amplified fingerprinting*), donde se utilizan iniciadores de 4 ó 5 bases¹⁷. Sin embargo, las tres denominaciones se realizan indistintamente, utilizándose en literatura tanto el término AP-PCR como RAPD.

La técnica AP-PCR ha sido aplicada en la tipificación de numerosos microorganismos¹¹, incluido *P. aeruginosa*^{27, 98, 112, 219, 240}. Una variante de la AP-PCR, la RAPD-ALFA (*automated laser fluorescence analysis of randomly amplified polymorphic DNA*), que permite la generación de los datos en formato digital y con mayor precisión, se ha evaluado como método de tipificación de *P. aeruginosa*^{92, 94}.

Aunque es un método sencillo, que no requiere un conocimiento previo de las secuencias a amplificar y estudia el genoma completo, en ocasiones han surgido ciertos problemas para adquirir resultados reproducibles y discriminativos¹¹.

B.2 Detección de dianas de restricción

Con esta técnica se combina el potencial discriminativo de los enzimas de restricción con la facilidad y rapidez de la técnica de PCR. Consiste básicamente en cuatro pasos: i) digestión del DNA total con dos enzimas de restricción, ii) ligación de unas secuencias de oligonucleótidos (adaptadores) a los fragmentos obtenidos, iii) amplificación selectiva por PCR de los fragmentos de restricción, iv) visualización de los productos de PCR mediante electroforesis. Utilizando iniciadores que reconozcan la secuencia formada por el adaptador y el lugar de restricción, se amplificarán las secuencias existentes entre las dianas de restricción.

Existen dos variaciones de este método:

- ♦ AFLP (*amplified restriction fragment length polymorphisms*), se utilizan dos enzimas de restricción, uno de alta frecuencia de corte y otro de baja frecuencia

de corte. Los adaptadores utilizados tienen el mismo tamaño (con una longitud de 18 a 22 nucleótidos). La amplificación por PCR de los fragmentos de restricción se lleva a cabo con iniciadores que, además de reconocer la secuencia de los adaptadores y la secuencia de la diana de restricción, contienen una o dos bases selectivas en sus extremos 3'. De esta forma es posible amplificar, de una forma selectiva, un grupo de fragmentos sin un conocimiento previo de las secuencias diana ²⁸¹.

Existen diversos estudios que demuestran que la AFLP es una técnica reproducible y con capacidad para diferenciar cepas que poseen relación clonal ^{175, 225}. Así, por ejemplo, se ha utilizado en la caracterización de *P. aeruginosa* ²⁴⁰.

- ◆ IRS-PCR (*infrequent-restriction-site PCR*), es una técnica con el mismo concepto que la AFLP, pero en este caso uno de los 2 enzimas utilizados es de baja frecuencia de corte. Además, los adaptadores están constituidos por una cadena larga oligonucleótidos (18 a 22) y por una cadena corta (7 nucleótidos). Los adaptadores se ligarán a los extremos cohesivos de los fragmentos de restricción. El oligonucleótido corto no está fosforilado por lo que no se ligará al DNA. Esto permitirá una amplificación selectiva de los fragmentos de restricción mixtos, no produciéndose amplificación de los fragmentos con extremos generados por el enzima de alta frecuencia de corte ¹⁴⁹.

Es una técnica rápida, reproducible y puede aplicarse a una gran variedad de microorganismos. Hasta el momento, se ha valorado para la caracterización de *P. aeruginosa*, junto con otros microorganismos de importancia clínica ¹⁴⁹ y se ha aplicado en la tipificación de *Legionella pneumophila* ²²².

C Análisis del polimorfismo de secuenciación

Todos los métodos de tipificación genotípicos se basan en variaciones en la secuencia de DNA. Sería lógico pensar, por tanto, que la secuenciación del DNA podría ser un buen método de tipificación. Sin embargo, hay varias consideraciones a tener en cuenta: la secuenciación debe dirigirse a una pequeña región del cromosoma del microorganismo, esta región debería consistir en una región variable flanqueada por regiones altamente conservadas y, además, no debería ser susceptible de transmisión horizontal a otras cepas de la misma especie ¹⁷⁵.

Recientemente, se ha diseñado un método de tipificación basado en la secuenciación llamado *multilocus sequence typing* (MLST) ¹³⁷. Es un método que adapta los mismos conceptos y métodos del MLEE, permite la asignación directa de los alelos por medio de la determinación de la secuencia de nucleótidos de los fragmentos internos de los genes necesarios para el funcionamiento celular (*housekeeping genes*), los cuales poseen los niveles adecuados de diversidad genética. Es un método técnicamente sencillo, que requiere la amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR y su secuenciación, manualmente o mediante un secuenciador automático. Para cada cepa analizada se obtiene un patrón o combinación de alelos de cada uno de los loci estudiados (*multilocus sequence type*, ST).

Una de las ventajas de este método respecto al MLEE y cualquier marcador basado en la comparación del tamaño de los fragmentos de DNA, es que permite obtener datos inequívocos y transferibles de las secuencias. De esta forma se facilita la posibilidad de la comparación de los resultados y el intercambio de información entre los distintos laboratorios a escala mundial.

El MLST puede aplicarse a casi todas las especies bacterianas y otros organismos haploides, de tal forma se ha aplicado con éxito en la tipificación de *N. meningitidis* ^{74, 137}, *Streptococcus pneumoniae* ²⁹⁹ o *S. aureus* ⁶⁹.

1.4.3 Evaluación de los marcadores epidemiológicos

Se han descrito una serie de criterios que permiten la evaluación de los métodos de tipificación epidemiológica, se pueden dividir en dos categorías de eficacia y de eficiencia ²⁴⁶.

❖ *Criterios de eficacia*

La eficacia de un marcador epidemiológico se mide fundamentalmente en función de los siguientes parámetros ^{142, 246}:

- ◆ **Tipabilidad**, se expresa como la proporción de cepas que el marcador puede clasificar como pertenecientes a un tipo determinado.
- ◆ **Reproducibilidad**, la capacidad de un marcador para asignar el mismo tipo a una cepa cuando se realizan varios ensayos separados e independientes de la misma.
- ◆ **Poder discriminativo**, la probabilidad promedio de que el marcador utilizado asigne tipos diferentes a dos cepas no relacionadas obtenidas al azar en la población microbiana de un determinado taxón. Matemáticamente se puede calcular mediante el índice de diversidad de Simpson (ID) ¹⁰⁴:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s nj(nj - 1)$$

N = número total de cepas; S = número total de tipos;
nj = número de cepas pertenecientes al tipo j.

En general, se acepta que el poder discriminativo de un método es adecuado para que sea utilizado por sí solo, cuando la probabilidad de que dos aislamientos no relacionados sean atribuidos a un mismo tipo es <5% ($D > 0,95$) ²⁹. Un poder discriminativo menor hace necesario la aplicación de ese método en combinación con otros.

- ◆ **Estabilidad**, mide la capacidad de un marcador para reconocer la relación clonal existente entre aquellas cepas que han derivado *in vitro* o *in vivo* de un precursor común; a pesar de la variación fenotípica o genotípica ocurrida durante el almacenamiento y replicación en el laboratorio o durante la diseminación clonal en la naturaleza, especialmente en períodos prolongados o en epidemias a gran escala.

❖ **Criterios de eficiencia**

La eficiencia de un marcador depende de unos factores generales (el volumen o el tamaño de la investigación epidemiológica, el marco temporal en el que se necesita la información y los recursos técnicos y financieros disponibles) y de unos parámetros específicos del propio marcador destacando:

- ◆ **Flexibilidad**, refleja el rango de especies tipables con el mínimo de modificaciones en su aplicación.
- ◆ **Rapidez**, varía en función del marcador de unas horas a varias semanas.
- ◆ **Accesibilidad**, viene condicionada por la disponibilidad y el coste tanto de los reactivos como del instrumental necesario, además de la cualificación técnica requerida para un método determinado.
- ◆ **Facilidad de uso**, incluye la simplicidad técnica, la posibilidad de analizar un número elevado de cepas y la facilidad en la obtención e interpretación de los resultados.

Es importante destacar que, debido a que diferentes investigaciones requieren diferentes niveles de eficacia y eficiencia, no existe un método de tipificación ideal de uso universal y, además, la aplicación de los diferentes métodos de tipificación tiene que estar unida siempre a una sólida investigación epidemiológica y a unos planteamientos claros.

1.4.4 Cálculos estadísticos de similitud y agregación

El análisis de los diferentes perfiles de bandas o fragmentos de DNA obtenidos con los marcadores genéticos, comporta determinar el grado de homología o similitud entre las cepas estudiadas. Cuando se compara un número limitado de cepas es suficiente una valoración cualitativa subjetiva de los caracteres comunes y distintos mediante un análisis visual. Sin embargo, si el número de cepas aumenta es preferible y necesario realizar una valoración cuantitativa.

Se han desarrollado diversos métodos basados en el análisis computerizado de los perfiles de bandas que permiten la comparación de un gran número de perfiles generados en diferentes geles, en distintos tiempos e incluso en distintos laboratorios. Así, por ejemplo, el BioImage System (Genomic Solutions Inc., Ann Arbor, MI, USA), dotado de un sistema de análisis de imágenes (*Whole Band Analyzer*), incluye un sofisticado algoritmo de normalización del tamaño de los fragmentos, obtenidos en los diferentes geles, a partir de un estándar de tamaño conocido y un programa que permite comparar un perfil con cualquiera de los perfiles archivados.

El análisis cuantitativo de los perfiles obtenidos se realiza asignando un valor de 1 ó 0 a cada carácter o banda, en función de su presencia o ausencia, respectivamente, por lo que se genera un código binario que permitirá determinar la similitud de cada par de individuos. La comparación cuantitativa se realizará mediante el cálculo del coeficiente de similitud, obtenido de la determinación cualitativa del grado de divergencia existente entre cada dos perfiles. Las ecuaciones que normalmente se emplean para el cálculo de los coeficientes de similitud son ²³⁵.

- *Dice* $2a / 2a + b + c$
- *Jaccard* $a / a + b + c$
- *Hamann* $(a + d) - (b + c) / a + b + c + d$
- *Rogers-Tanimoto* $a + d / a + d + 2(b + c)$

en donde:

- a, el número de caracteres o bandas comunes en las dos cepas.
- b, el número de caracteres o bandas presentes en la cepa 1 y ausentes en la cepa 2.
- c, el número de caracteres o bandas presentes en la cepa 2 y ausentes en la cepa 1.
- d, el número de caracteres o bandas ausentes en las dos cepas.

Los coeficientes de Dice y de Jaccard no valoran los caracteres negativos, es decir, los caracteres ausentes, al contrario de los coeficientes de Hamann y Rogers-Tanimoto, que estiman tanto los caracteres positivos como los negativos. Habitualmente, los coeficientes de Dice y de Jaccard son los más utilizados en estudios tanto en estudios de taxonomía como de epidemiología.

Cuando se compara el conjunto de aislamientos estudiados se consigue una representación gráfica de todos los coeficientes de similitud mediante una matriz de similitud. Asimismo, es posible construir dendrogramas (representación gráfica de la agrupación jerárquica de los coeficientes en orden decreciente de similitud) mediante la utilización de diversos sistemas de agregación. El método de agregación más utilizado en epidemiología bacteriana es el UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*)¹²⁴. El método UPGMA emplea un algoritmo de agrupación que trabaja con la premisa de que cualquier cepa analizada tiene el mismo número de eventos mutacionales, por tanto, la evolución es aproximadamente constante entre las distintas líneas^{124, 223}. En primer lugar identifica los dos individuos que muestran mayor similitud entre sí (*a* y *b*), y los agrupa como un sólo individuo (*ab*). A continuación, respecto a este último, identifica otro individuo (*c*) con el que presente la mayor similitud y los agrupa de nuevo (*abc*) y así sucesivamente. La distancia media entre dos grupos consiste en el cálculo de la media aritmética de todas las distancias posibles entre cualquier par de individuos de los dos grupos.

2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Ámbito del estudio

Se realizó un estudio prospectivo en el Servicio de Medicina Intensiva del Hospital de Sabadell (Corporació Sanitaria del Parc Taulí, Barcelona) durante un período de 35 meses, comprendido entre marzo de 1996 y febrero de 1999. El Hospital de Sabadell es un hospital docente con una Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) de tipo polivalente (médico-quirúrgica). La UCI consta de 16 *boxes* individuales, cada uno con un lavamanos y una puerta para poder aislarlos. Ocho de los 16 *boxes* (habitaciones 1 a 4 y 7 a 10) fueron hábiles desde el comienzo del estudio. A partir de octubre de 1996 se abrió el resto de los *boxes* (figura 3). Por otra parte, en una planta inferior había una habitación (sala A) que solo fue utilizada durante los primeros meses del año 1996 y posteriormente fue cerrada.

2.2 Estudio ambiental

Se realizó un estudio del ambiente de la UCI con el propósito de conocer la frecuencia y la distribución de *P. aeruginosa*. Los resultados se correlacionaron con los obtenidos en los enfermos para determinar el origen y las vías de transmisión de las cepas aisladas en los pacientes. Para ello, durante el período de estudio se realizaron cinco cortes en las siguientes fechas: 13/09/96; 17/04/97; 18/11/97; 23/02/98 y 24/11/98. El período de tiempo transcurrido entre cada corte ambiental fue de un mínimo de 3 meses hasta un máximo de 8 meses.

En cada corte ambiental se recogieron muestras, sin previo aviso, de las siguientes localizaciones:

- ◆ Manos del personal sanitario
- ◆ Superficies húmedas (adyacentes a los grifos): de los 16 *boxes*, de la sala A (mientras permaneció abierta) y de la cocina.

- ◆ La superficie del control de enfermería.
- ◆ El grifo de la cocina y de la sala A (solo durante el primer corte ambiental)
- ◆ Teléfonos y estetoscopios.

Asimismo, paralelamente a la estancia de los pacientes en la UCI se estudiaron los grifos de los *boxes* donde permanecían ingresados. La toma de las muestras se realizaba desde el momento en que el paciente era intubado y posteriormente cada 72 horas hasta que el paciente finalizaba el estudio. El agua se utilizaba para comprobar la permeabilidad de la sonda nasogástrica y para administrar medicación. También era empleada para lavar al paciente y para el lavado de las manos del personal sanitario.

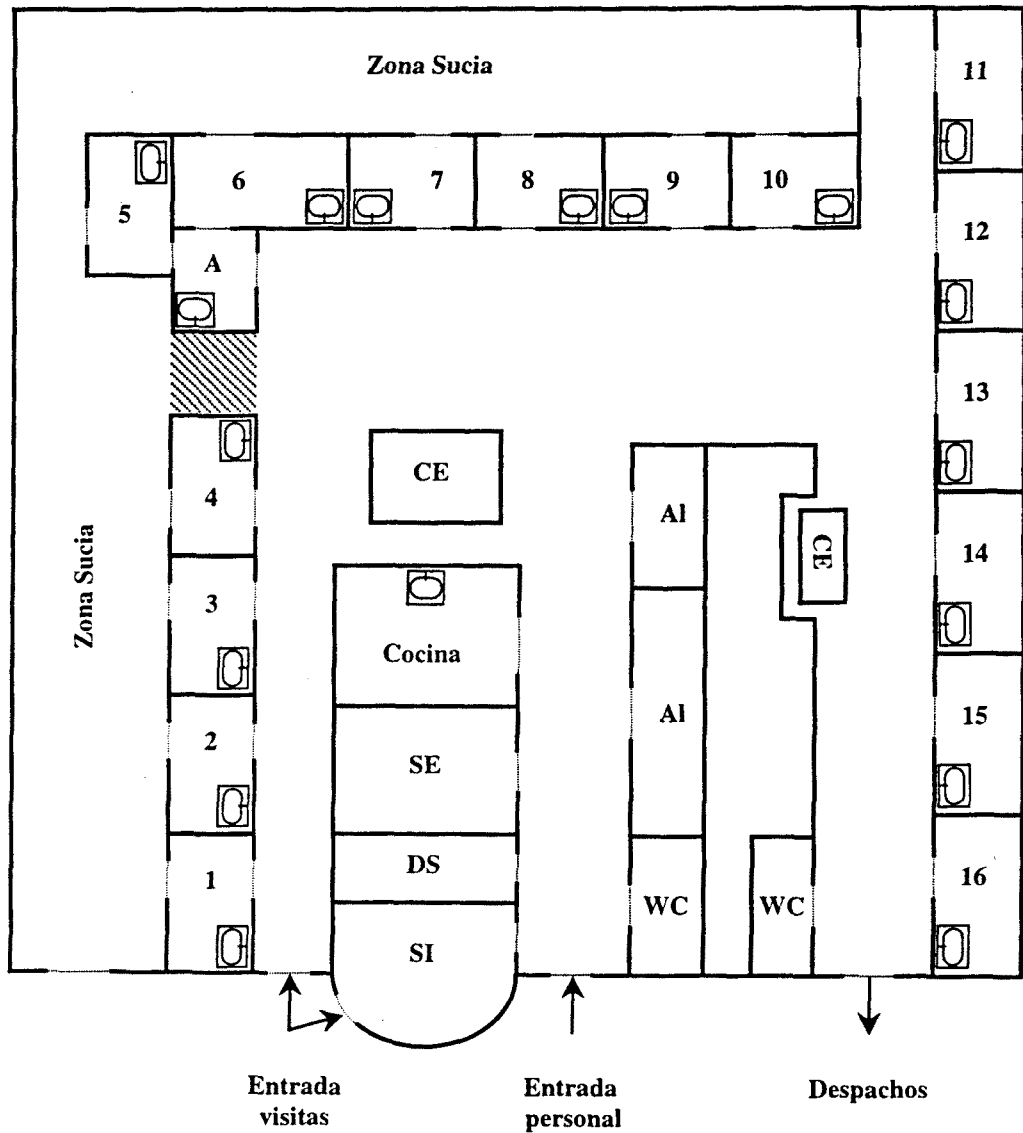


Figura 3. Mapa de la UCI del Hospital de Sabadell.

Cada número corresponde a los 16 *boxes* de la UCI. A: antesala (habitación con lavamanos que sirve de acceso a las habitaciones 5 y 6 utilizadas para el aislamiento de los pacientes); AI: almacén; CE: control de enfermería; DS: despacho supervisora; SE: sala de estar; SI: sala de información; WC: lavabo.

La *zona sucia*, es la zona destinada a la limpieza del instrumental utilizado antes de ser esterilizado y por donde también se traslada todo aquello que ha estado en contacto con el paciente.

2.3 Sujetos de estudio

2.3.1 Criterios de inclusión

Se incluyeron en el estudio aquellos pacientes ingresados durante el período de estudio en la UCI del Hospital de Sabadell, que hubieran sido intubados y precisaran ventilación mecánica. La duración de la ventilación mecánica debía producirse durante un período igual o superior a 72 horas. Una limitación que se planteó en el estudio fue el hecho de no poder estudiar los pacientes de forma consecutiva debido a la imposibilidad de asumir, por parte del Laboratorio de Microbiología del Hospital, el gran número de muestras que se debían evaluar. Por tanto, sólo se pudieron estudiar tres pacientes de forma simultánea. El resto de los candidatos era excluido hasta que uno de los tres pacientes finalizaba el estudio.

Todos los pacientes fueron intubados mediante un tubo endotraqueal de baja presión (Hi-lo-evac; Mallinckrodt Laboratories, Athlone, Ireland), que permite aspirar las secreciones subglóticas acumuladas por encima del balón de neumotaponamiento. También permite recoger muestras de secreciones subglóticas para cultivo.

2.3.2 Criterios de exclusión

No fueron incluidos en el estudio todos aquellos pacientes que precisaban ventilación mecánica y en los que el período de duración de la misma era inferior a 72 horas. La interrupción de la ventilación mecánica puede producirse por una extubación planificada, por autoextubación o por fallecimiento. Asimismo, no se incluyeron aquellos pacientes receptores de tubos convencionales referidos de otros centros hospitalarios.

2.3.3 Variables clínicas

En el momento en que un paciente entraba en el estudio se recogían de un modo prospectivo las siguientes variables clínicas:

- Nombre y apellidos.
- Edad.
- Sexo.
- Fecha de ingreso en la UCI.
- Fecha de alta de la UCI.
- Fecha de alta del Hospital.
- Índice de gravedad al ingreso en la UCI mediante el sistema APACHE II.
- Categoría de diagnóstico primario al ingreso.
- Condiciones del paciente consideradas *factores de riesgo* potenciales para una colonización o infección causada por *P. aeruginosa*:
 - Coma (definido como nivel de Glasgow < 9).
 - Estado de *shock*.
 - Politraumatismo sin traumatismo craneoencefálico (TCE).
 - TCE.
 - Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).
 - Síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA).
 - Edema agudo de pulmón (EAP) cardiogénico.
 - Cirugía.
 - Hepatitis crónica.
 - Inmunosupresión.
 - Nutrición parenteral total.
 - Neoplasia.
 - Diabetes.

Para definir las enfermedades crónicas subyacentes del paciente se utilizaron las definiciones descritas por Knaus y cols.¹¹⁵. El *síndrome de distrés respiratorio agudo* se definió como un distrés respiratorio con presencia de infiltrados bilaterales

difusos, hipoxemia ($\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 < 250$) y una presión de oclusión de la arteria pulmonar inferior a 18 mmHg. Se consideró que los pacientes padecían *diabetes mellitus* si requerían terapia con insulina previa al ingreso. Se consideró la presencia de una *neoplasia hematológica* cuando los resultados del examen de sangre periférica o de biopsia de médula ósea o nódulos linfáticos eran consistentes con este diagnóstico, y la *neoplasia no hematológica* únicamente cuando se disponía de diagnóstico histológico. Se consideró que un paciente presentaba *inmunosupresión* si había recibido terapia con corticoides (30 mg. de Prednisona diaria o una dosis equivalente por lo menos durante una semana antes de la intubación traqueal) o terapia citotóxica durante al menos cuatro semanas previas a la inclusión en el estudio.

Además, se recogió de modo prospectivo si el paciente había recibido sucralfato o ranitidina, como profilaxis de la hemorragia digestiva aguda, y nutrición enteral. Asimismo, se anotaron las prescripciones de antibióticos durante el período de estudio y se efectuó un control diario del pH gástrico mediante tiras reactivas colorimétricas, durante todo el tiempo en que el paciente permaneció en ventilación mecánica y, por consiguiente, con sonda nasogástrica. Ninguno de los pacientes fue sometido a tratamiento para la descontaminación digestiva.

2.3.4 Fin del estudio

El estudio de seguimiento de cada paciente se consideró finalizado cuando el período de ventilación mecánica llegaba a los 21 días, cuando el paciente era extubado, cuando se le practicaba una traqueotomía, cuando el paciente fallecía o cuando se diagnosticaba un episodio de neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV) causada por *P. aeruginosa*.

2.3.5 Localizaciones anatómicas estudiadas

En todos los pacientes incluidos en el estudio se realizó la toma de muestras de las siguientes localizaciones anatómicas: estómago, faringe, secreciones subglóticas, superficie interna del tubo endotraqueal, tráquea y recto. La toma de las muestras se efectuó tras el procedimiento de intubación y posteriormente cada 72 horas mientras el paciente permanecía intubado hasta la conclusión del estudio. En aquellos pacientes con sospecha clínica de neumonía se realizaba el cultivo de las secreciones respiratorias.

2.4 Estudio microbiológico

2.4.1 Técnicas de aislamiento

La toma de las diferentes muestras se llevó a cabo en el Servicio de Medicina Intensiva. El aislamiento de las cepas de *P. aeruginosa* se realizó en el Laboratorio de Microbiología (UDIAT, Corporació Sanitaria Parc Taulí, Sabadell).

❖ *Muestras de superficies y manos*

Las *muestras de las manos* se recogieron mediante la inmersión de la mano en una bolsa estéril de polietileno (500 ml, Vertex Technics S.L.) que contenía 200ml de medio BHI (*Brain Heart Infusion*), durante al menos un minuto ⁸⁶.

Para recoger las *muestras de todas las superficies* estudiadas, se humedecía una gasa estéril (Texpol) con el medio BHI. Las superficies se frotaban de forma vigorosa. La gasa se colocaba en el interior de una botella con tapón hermético (Nirco), que contenía 50 ml de medio. La botella se agitaba durante al menos un minuto, a fin de recuperar los microorganismos ⁸⁶.

❖ *Muestras del grifo de agua*

La recogida de las muestras de los grifos se realizaba humedeciendo un escobillón estéril en medio BHI. Tras retirar el exceso de líquido, se pasaba el escobillón de forma rotatoria por la superficie interna del grifo. Después de separar la cabeza del escobillón mediante un corte con tijeras estériles, se sumergía en un tubo que contenía 10 ml de medio. El tubo se agitaba mecánicamente durante 30 segundos⁸⁶.

Todas las muestras recogidas en el medio BHI (grifos, manos y superficies) se procesaron de manera similar. Quinientos microlitros del medio se cultivaron en agar cetrimida (medio selectivo para facilitar el aislamiento de *P. aeruginosa* de poblaciones mixtas) y agar chocolate (MAIM, Barcelona) distribuyendo el inóculo sobre la superficie de las placas. Las placas se dejaron secar en una cabina de seguridad biológica y se incubaron a 37°C.

❖ *Muestras clínicas*

Para la obtención de las muestras procedentes de las diferentes localizaciones estudiadas en cada paciente se utilizaron diferentes métodos detallados brevemente a continuación¹⁵⁸:

- ◆ *Aspirado gástrico*, se realizaba por aspiración con una jeringa a través de la sonda nasogástrica. En los pacientes con dieta enteral, ésta se suspendía dos horas con anterioridad a la toma de las muestras.
- ◆ *Frotis faríngeo*, se realizaba frotando bilateralmente la mucosa bucal mediante un escobillón estéril.
- ◆ *Aspirado de secreciones subglóticas*, las muestras se recogían a través del canal adicional del tubo endotraqueal siguiendo un método descrito previamente²⁶⁸.

- ◆ *Superficie interna del tubo endotraqueal*, se llevó a cabo frotando la superficie interna del tubo endotraqueal con un escobillón estéril humedecido con suero fisiológico.
- ◆ *Aspirado endotraqueal*, se realizaba mediante una sonda convencional estéril de aspiración de secreciones, intercalando entre ésta y el sistema de aspiración un recolector de secreciones estéril.
- ◆ *Frotis rectal*, se recogía la muestra con un escobillón estéril.
- ◆ *Secreciones respiratorias*, en aquellos pacientes con sospecha clínica de neumonía nosocomial se practicaban cultivos cuantitativos de las secreciones respiratorias obtenidas mediante broncoscopia utilizando el catéter telescópico con cepillo protegido según la técnica estándar ya descrita ¹⁵¹.

Todas las muestras se cultivaron en agar cetrimida y agar chocolate (MAIM, Barcelona). Se incubaron a 37°C y la lectura de los cultivos se realizó a las 24 y 48 horas.

2.4.2 Identificación de *P. aeruginosa*

La identificación de las cepas de *P. aeruginosa* se realizó en el Laboratorio de Microbiología (UDIAT, Corporació Sanitaria Parc Taulí, Sabadell). Se efectuó según métodos convencionales ¹⁶³ que incluían la prueba de la oxidasa, el estudio de la morfología de la colonia y como método de confirmación se utilizó un sistema comercial de identificación, el API 20NE (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

2.4.3 Estudio de los cultivos de *P. aeruginosa*

De cada cultivo positivo de *P. aeruginosa* se seleccionaron, siempre que fue posible, 4 colonias representativas de los diferentes tipos morfológicos presentes en la placa de cultivo. Cuando no se observaban diferencias en la morfología, la elección se realizaba al azar. Cada colonia fue subcultivada y conservada por separado, para ser posteriormente caracterizada con los diferentes marcadores epidemiológicos.

2.4.4 Conservación de las cepas

Cada colonia aislada se conservó siguiendo el siguiente protocolo:

1. Cultivo de cada colonia en agar chocolate (MAIM, Barcelona) a 37°C.
2. Recogida mediante un escobillón estéril del contenido de la placa.
3. Resuspender y repartir el contenido del escobillón en dos criotubos con medio TSB (*Tryptone Soya Broth* + 10% glicerol).
4. Conservar los tubos a - 20°C.

2.5 Marcadores epidemiológicos

2.5.1 Análisis de los perfiles de macrorestricción genómica mediante la técnica de electroforesis en campo pulsante

En una primera parte del estudio, se analizaron todos los aislamientos de *P. aeruginosa* con un primer enzima de restricción *Xba*I. Posteriormente, se realizó un segundo análisis con el enzima de restricción *Dra*I tomando un representante de aquellos aislamientos que, tras el primer estudio, fueron considerados como indistinguibles y todas las cepas con patrones relacionados o diferentes.

❖ *Principio de la electroforesis en campo pulsante*

La electroforesis en campo pulsante (*pulsed-field gel electrophoresis*; PFGE) permite separar fragmentos de restricción de alto peso molecular del DNA cromosómico total (fragmentos que no pueden separarse con la electroforesis convencional, que presenta un campo eléctrico uniforme y constante y con un límite de resolución máximo de 50 Kb)¹¹⁹. La técnica de PFGE expone al DNA a campos eléctricos que regularmente cambian de dirección. Esta alternancia de campos eléctricos provoca que las moléculas de DNA cambien de conformación y se orienten en función del campo eléctrico, permitiendo de esta manera su migración en una trayectoria de zigzag a lo largo del gel⁸².

Para este tipo de análisis electroforético es necesario:

- ◆ Obtener el DNA lo más intacto posible, es decir, evitando al máximo las roturas mecánicas. Para ello, se han desarrollado métodos de extracción de DNA, en los cuales el proceso de lisis celular se realiza en bloques de agarosa (insertos), cuya matriz protege las moléculas de alto peso molecular y al mismo tiempo permite la difusión de detergentes y proteasas¹⁴.
- ◆ Digerir el DNA con enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, que produzcan un número relativamente pequeño de fragmentos de restricción de alto peso molecular (no inferior a 10)^{150,257}.

❖ *Preparación de los insertos y lisis celular*

La obtención de los insertos y la lisis celular se realizó según una modificación del método descrito por Smith y cols²³⁴.

Procedimiento

- Inocular 1 ó 2 colonias crecidas en una placa de agar sangre (bioMèrieux, Marcy l'Etoile, Francia) durante 18 h a 37°C a una botella que contenga 20 ml de medio enriquecido de Luria-Bertani (LB).
- Incubar a 37°C en un baño con agitación durante 18 horas.
- Medir su absorbancia a 450 nm y ajustar a una densidad óptica de 0,6-0,7.
- Tomar 7 u 8 ml del medio crecido y centrifugar a temperatura ambiente durante 10 minutos a 3.000 r.p.m.
- Resuspender el sedimento con 3 ó 4 ml de tampón PET IV (10 mMTris-HCl [pH7,6] - 1M NaCl). Centrifugar durante 10 minutos a 3.000 r.p.m.
- Repetir el paso anterior una o dos veces más.
- Resuspender el sedimento y ajustar a 1 ml de volumen final con PET IV.
- Limpiar los moldes para la formación de los insertos (Pharmacia Biotech Europe, Uppsala, Suecia) con agua destilada y etanol. Dejar secar y sellar la parte inferior con cinta adhesiva transparente.
- Preparar la cantidad necesaria de agarosa de bajo punto de fusión (Incert agarosa, FMC BioProducts, Rockland, ME, USA) para obtener una concentración final de 0,8%. Dado que la relación agarosa-muestra es de 1:1 (v:v), al diluirse a la mitad se necesita preparar la agarosa al 1,6%. Normalmente, se preparan 5 insertos por muestra y cada inserto tiene un volumen total de 100 µl. Por tanto, se necesitan 600 µl de volumen total por muestra a realizar, de los cuales 300 µl serán de agarosa al 1,6 %.
- Disolver la agarosa en agua destilada estéril por calor y mantenerla a una temperatura entre 45 y 50 °C.
- Transferir 300 µl de la muestra, resuspendida en el tampón PET IV, a un tubo de microcentrífuga y añadir 300 µl de agarosa de bajo punto de fusión.
- Homogeneizar la mezcla y sin dejar que se enfríe, dispensar 100 µl en cada bloque del molde.
- Dejar solidificar a 4°C durante aproximadamente una hora.
- Sacar los insertos del molde, para ello retirar la cinta adhesiva y con la ayuda de una pera de goma ejercer presión en la parte superior para que el inserto salga. Transferirlo directamente a un tubo con 2 ml de tampón de lisis ESP [0,5 M EDTA [pH 9-9,5] - 1% sarcosilato (SLS)-1 mg/ml pronasa (Sigma, St. Louis MO, USA).
- Incubar durante 24 horas a 50°C en un baño sin agitación.

- Guardar a 4°C. Los insertos pueden guardarse en esta solución, durante 1 año aproximadamente.

❖ *Lavado de los insertos*

Antes de proceder a la digestión enzimática del DNA es necesario eliminar los restos de detergentes utilizados para la lisis celular, así como los restos que puedan quedar de pronasa (debido a su acción sobre los enzimas de digestión).

Procedimiento

- Transferir un inserto a un tubo con 1 ml de TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA; [pH8]). Incubar a temperatura ambiente durante 4 h.
- Cambiar el TE e incubar durante 18 h.
- Repetir el proceso de lavado con TE tres o cuatro veces más, con una duración de 1 ó 2 h cada uno.
- Una vez finalizados los lavados, cambiar el TE y guardar a 4°C. Los insertos pueden guardarse en esta solución durante 1 mes aproximadamente.

❖ *Digestión enzimática del DNA cromosómico*

La digestión enzimática del DNA, al igual que en el proceso de lisis celular, tiene lugar en el mismo inserto merced a la difusión del enzima a través de la matriz de agarosa. Los enzimas que se utilizan para el análisis de restricción del DNA cromosómico en PFGE son endonucleasas de baja frecuencia de corte, obteniendo de esta forma un número limitado de fragmentos de alto peso molecular. La elección del enzima dependerá tanto del contenido en G+C del genoma de la especie bacteriana a estudiar y de la secuencia diana de restricción como del tamaño de dicha secuencia¹⁵⁰.

La digestión del DNA cromosómico se realizó según el método descrito por Smith y cols.²³⁴. Para la digestión de un fragmento del inserto de aproximadamente

1mm de grosor, se utilizaron 30 unidades (U) de cada uno de los enzimas *XbaI* (T↓CTAGA) y *DraI* (TTT↓AAA) (Boehringer Mannheim, GmbH, Mannheim, Germany), en un volumen total de 200 µl, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Procedimiento

- En un tubo *ependorf* añadir:
 - 143 µl de agua destilada estéril
 - 20 µl de tampón de restricción 10X
 - 2 µl de albúmina bovina sérica (*BSA*; *bovine serum albumin*; 10 mg/ml)
 - un fragmento del inserto
 - 30 U del enzima de restricción
- Incubar durante 18 h a 37°C.
- Guardar a 4°C durante un mínimo de 30 minutos antes de proceder al análisis electroforético.

❖ *Electroforesis*

Para la separación de los fragmentos de DNA de alto peso molecular, se han descrito y desarrollado distintas variaciones de electroforesis en campo pulsante, diferenciándose entre ellas fundamentalmente por la disposición de los electrodos.

En nuestro caso se utilizó el sistema:

- ◆ *Contour-clamped homogeneous electric field* (CHEF; CHEF DRIII System apparatus, Bio Rad, Richmond, CA). En este sistema, el campo eléctrico se genera por 24 electrodos puntuales equidistantes entre sí y dispuestos en un contorno hexagonal. Los electrodos que determinen el ángulo seleccionado, que puede variar entre 60° y 120°, presentarán mayor potencial que el resto de los electrodos, que funcionarán con potenciales intermedios. Este hecho provocará un campo eléctrico homogéneo a lo largo de todo el gel ⁵⁰.

✓ *Preparación del gel*

Procedimiento

- Preparar 100 ml de agarosa al 1% (Sea Kem ME Agarose, FMC Bioproducts, ME, USA) en TBE 0,5X (50 mM Tris-borato-0.1mM EDTA; pH7,5-8).
- Calentar la mezcla en el microondas hasta su completa homogeneización. Ajustar el volumen final y dejar enfriar.
- Limpiar el soporte, los moldes formadores del gel y el peine con etanol y agua destilada abundante. Montar el sistema de formación del gel en la orientación correcta y verter los 100 ml de agarosa.
- Eliminar las burbujas y dejar solidificar.
- Retirar los moldes formadores del gel y el peine.

✓ *Electroforesis*

Procedimiento

- Conectar la cubeta de electroforesis al sistema de refrigeración (Cooling module, Bio Rad, Richmond, USA) a 14°C. Añadir a la cubeta 2 litros de TBE 0,5X y conectar el sistema de recirculación del tampón (Variable Speed Pump, Bio Rad).
- Cargar el DNA digerido en el gel. Para ello, con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril colocar el fragmento del inserto digerido sobre la superficie interior de un *parafilm* y con ayuda de un cubreobjetos transferirlo al pocillo del gel con una manipulación cuidadosa.
- Cargar el **marcador de peso molecular**, DNA de concatámeros de fago lambda (PFGE Marker I, Boehringer Mannheim, GmbH, Mannheim, Germany) colocándolo en los extremos y en el medio del gel.
- Sellar los pocillos con agarosa al 0,5% (Sea Kem ME Agarose, FMC Bioproducts, ME, USA).
- Deslizar la placa formadora del gel por encima del soporte y retirar con cuidado con un papel de celulosa los restos de agarosa solidificada adherida en la base. Disponer el gel en la cubeta de electroforesis y comprobar que el gel quede cubierto por el tampón. Tapar la cubeta y conectarla a la fuente de alimentación (Power module, Bio Rad,

Richmond, USA).

✓ *Condiciones de electroforesis*

• **Enzima XbaI**

1^{er} Bloque

Pulso inicial 4 seg. *Pulso final* 8 seg. *Tiempo* 8h

2^o Bloque

Pulso inicial 10 seg. *Pulso final* 15 seg. *Tiempo* 20h

• **Enzima DraI**

1^{er} Bloque

Pulso inicial 4 seg. *Pulso final* 8 seg. *Tiempo* 9h

2^o Bloque

Pulso inicial 10 seg. *Pulso final* 15 seg. *Tiempo* 23h

En ambos casos se emplearon las siguientes condiciones:

- . *Voltaje* 200 V
- . *Ángulo* 120°
- . *Temperatura* 14°C

❖ *Tinción y visualización del DNA*

Una vez finalizada la electroforesis, la visualización de los fragmentos de DNA se realiza mediante la tinción del gel con bromuro de etidio, el cual se intercala entre las hebras de DNA, y genera fluorescencia al ser expuesto a la luz ultravioleta.

Procedimiento

- Trasladar el gel a una bandeja donde se han dispuesto con anterioridad 500 ml de TBE 0,5X y 50 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml).
- Incubar con agitación suave durante 20 min.
- Lavar el gel con TBE 0,5X durante 30 min. En estas condiciones el gel puede guardarse a 4°C durante varias semanas.
- Visualizar el gel mediante un transiluminador con luz ultravioleta (UVP, Cambridge, Reino Unido) y fotografiar.

❖ *Análisis de los patrones de bandas*

✓ *Análisis*

Los patrones de bandas obtenidos tras macrorestricción genómica del DNA cromosómico y generados mediante PFGE (pulsotipos; PTs), se analizaron con ayuda del *software Bio Image Whole Band Analyzer* (Genomic Solutions Inc., Ann Arbor, MI, USA), que permite calcular los pesos moleculares de las bandas de cada canal del gel a partir de los marcadores de peso molecular colocados en los extremos y en el medio del gel. Para la caracterización de las bandas, se utilizó una desviación tolerable de un 2% y un 5% para las zonas de alto y bajo peso molecular, respectivamente. Asimismo, este *software* también permite comparar los patrones de bandas en función de estos pesos moleculares. Para ello, se establece el grado de divergencia existente entre cada dos PTs mediante el coeficiente de similitud de Dice (S_D)²²³.

$$S_D = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Cálculo del coeficiente de similitud de Dice, donde **a** es el número de bandas comunes entre la cepa 1 y 2; **b** es el número de bandas presentes en la cepa 1 y ausentes en la cepa 2; **c** es el número de bandas presentes en la cepa 2 y ausentes en la cepa 1.

Cuando se comparan más de dos patrones (especialmente un número importante) se consigue una representación gráfica de todos los coeficientes de similitud mediante una matriz de similitud. Asimismo, es posible obtener una estimación del grado de divergencia existente entre todos los patrones aplicando el algoritmo matemático UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*)^{235, 236} que permite la construcción de un dendrograma.

✓ Interpretación

La interpretación de los diferentes PTs obtenidos se realizó según las recomendaciones propuestas por Tenover y cols.²⁵⁷. Estos criterios están enfocados al análisis de un número discreto de aislamientos, obtenidos a partir de estudios epidemiológicos de posibles brotes durante un período relativamente corto de tiempo (1 a 3 meses). Es posible que, tal y como describen los autores, estos criterios tuvieran que modificarse en aquellos estudios que comportaran un gran número de aislamientos y se produjeran en períodos de tiempo superiores o iguales a un año. No obstante, se han considerado adecuados para el estudio de la epidemiología de *P. aeruginosa* procedente de diferentes nichos ecológicos y obtenida en largos períodos de tiempo^{90, 244}. De tal forma, se aplicaron las siguientes pautas de interpretación:

- Los aislamientos que presentaban PTs con igual número de fragmentos y del mismo peso molecular, se han considerado indistinguibles.
- Los aislamientos con PTs que diferían en menos de 3 bandas, debido a 1 evento genético, se han considerado relacionados.
- Los aislamientos con PTs que diferían entre 4 y 6 bandas, debido a 2 eventos genéticos independientes, se consideraron posiblemente relacionados.
- Los aislamientos con PTs que diferían ≥ 7 bandas, debido a 3 o más eventos genéticos independientes, se han considerado aislamientos diferentes.

En un principio y dado que no se trataba de un estudio de brotes, al comparar el conjunto de los PTs obtenidos no se designó un patrón epidémico o principal y todos

los PTs obtenidos se compararon entre sí. La nomenclatura de los diferentes PTs obtenidos se realizó siguiendo un orden temporal en función de la fecha de obtención de los diferentes aislamientos de *P. aeruginosa*. Los aislamientos con PTs que no presentaban ninguna relación con el resto de los PTs observados se designaron con un número (p. ej. 1, 2, etc). Todos aquellos aislamientos con PTs relacionados se consideraron subtipos de un mismo PT y se denominaron con letras (p. ej. 1a, 1b, 1c,...del PT 1, etc). Para intentar dar cierta coherencia a la clasificación de los subtipos obtenidos en un determinado PT, se creyó conveniente escoger de entre todos los perfiles el más común, que, además, en la mayoría de las ocasiones era el primer perfil obtenido. Posteriormente, se denominaban el resto de los subtipos siguiendo, igualmente, un orden temporal en función de la obtención de los aislamientos de *P. aeruginosa*. Así, por ejemplo, al designar los subtipos obtenidos para el PT1, al perfil más común y obtenido en primer lugar se le nombraba como 1a. Al nuevo subtipo aparecido se le designaba con la siguiente letra (1b) y así sucesivamente. En este caso, por ejemplo, se consideraría que el PT 1 tendría 2 subtipos: 1a y 1b.

✓ *Controles*

Como ya se ha mencionado anteriormente, se utilizó como marcador de peso molecular el DNA de concatámeros de fago lambda (PFGE Marker I, Boehringer Mannheim, GmbH, Mannheim, Germany) situándolo en los extremos y en el medio del gel. Los marcadores de pesos proporcionan una orientación acerca del tamaño de los fragmentos obtenidos y son necesarios para evaluar pequeñas diferencias que se observan en los perfiles debidas a un único evento genético²⁵⁷.

También se utilizó, en todos los geles, una cepa de *P. aeruginosa* (escogida del total de aislamientos estudiados) como cepa de control interno y, de esta forma, valorar las pequeñas diferencias observadas en los diferentes perfiles, al comparar los distintos geles entre sí. Asimismo, se pretendía comprobar la reproducibilidad de todo el proceso (lisis celular, lavados, digestión enzimática y condiciones

100 -Material y métodos-

electroforéticas).

❖ *Soluciones para la electroforesis en campo pulsante (PFGE)*

Todas las soluciones y reactivos utilizados para el PFGE serán de uso exclusivo para dicha técnica y se manipularán de la forma más estéril posible.

◆ **Tris-HCl 1M (pH 8)**

Tris base [Sigma]	121,1 g
Agua destilada	hasta 1000 ml

. Disolver y ajustar a pH 8 con HCl. Autoclavar. Conservar a temperatura ambiente.

◆ **PET IV (10 mM Tris-HCl [pH7,6] - 1M NaCl).**

Tris base 1M	10 ml
NaCl [Sigma]	58.4 gr
Agua destilada	hasta 1000 ml

. Disolver y ajustar a pH 7,6 con HCl. Autoclavar. Conservar a temperatura ambiente.

◆ **Sar cosilato al 20% (SLS)**

SLS [Sigma]	20 g
Agua destilada estéril	hasta 100 ml

. Disolver. No autoclavar. Conservar a temperatura ambiente.

◆ **Pronasa (Protease E) 50 mg/ml**

Pronasa [Sigma]	500 mg
Agua destilada estéril	10 ml

. Disolver y alicuotar. Conservar a -20°C menos de un año.



◆ **Tampón de lisis ESP (0,5 M EDTA [pH9-9.5] - 1% SLS- 1 mg/ml Pronasa)**

EDTA [Sigma]	186 g
Agua destilada	hasta 950 ml

. Disolver y ajustar a pH9-9,5 con NaOH 10 N. Autoclavar.

. Una vez atemperado el tampón, añadir 50 ml de la solución SLS al 20%. Conservar a temperatura ambiente.

. En el momento de su uso añadir, por cada 2 ml del tampón: 40 µl de Pronasa (50 mg/ml).

◆ **EDTA 0,1 M (pH 8)**

EDTA [Sigma]	3,72 g
Agua destilada	hasta 100 ml

. Disolver y ajustar a pH 8 con NaOH 10 N. Autoclavar. Conservar a temperatura ambiente.

◆ **Tampón TE (10 mM Tris-HCl – 0,1 mM EDTA; [pH 8])**

Tris base 1M	10 ml
EDTA 0.1 M	1 ml
Agua destilada	899 ml

. Mezclar y autoclavar. Conservar a temperatura ambiente.

◆ **Albúmina bovina sérica 20 mg/ml (BSA; bovine serum albumine)**

BSA [Sigma]	200 mg
Agua destilada estéril	10 ml

. Disolver y alicuotar. Conservar a -20 °C menos de un año.

◆ **TBE 5X (1M Tris-HCl - 1 M Ácido bórico - 2 mM EDTA, [pH7,5-8])**

Tris base [Sigma]	121,1 g
Ácido bórico [Sigma]	61,83
EDTA [Sigma]	0,745 g
Agua destilada	hasta 2000 ml

. Disolver y ajustar a pH 7,5-8 con HCl. Autoclavar. Conservar a temperatura ambiente.

. La solución TBE 0,5X se consigue diluyendo 100 ml TBE 5X en 1.000 ml de agua destilada.

2.5.2 Estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos

❖ *Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos*

Los mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa* a los antimicrobianos son complejos y, en general, la resistencia a las diferentes familias de antimicrobianos puede deberse a la relación o a la acción conjunta de varios mecanismos. De forma resumida se podrían describir los siguientes mecanismos de resistencia:

Resistencia a los betalactámicos

1. Hiperproducción de betalactamasas cromosómicas del grupo I ^{130, 132}, que motivaría un elevado nivel de resistencia a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y al aztreonam.
2. Alteraciones de la permeabilidad de la membrana externa por disminución o pérdida de porinas específicas ^{133, 145}, afectarían esencialmente al imipenem y en menor medida al meropenem. La resistencia al imipenem, sin embargo, podría producirse como consecuencia de la relación entre la pérdida de la porina OprD (D2) y la producción de betalactamasas cromosómicas del grupo I ¹³¹.
3. Resistencia intrínseca por activación de las bombas de expulsión activa ^{125, 198}, produciría cierto nivel de resistencia cruzada a todos los betalactámicos con excepción del imipenem.
4. Betalactamasas plasmídicas, que afectarían principalmente a las carboxi y ureidopenicilinas ^{41, 132}.
5. Producción de carbapenemasas ^{132, 133}.

Resistencia a los aminoglucósidos

1. Resistencia de naturaleza enzimática, provocada por la adquisición de enzimas plasmídicas capaces de inactivar los aminoglucósidos por acetilación (aminoacetiltransferasas o AAC), nucleotidilación (nucleotidiltransferasa o ANT) o fosforilación (fosfotransferasa o APH) ⁹⁷.

2. Alteraciones de la permeabilidad de la membrana sola o asociada a algún mecanismo enzimático, que podrían ocasionar la resistencia a todos los aminoglucósidos ^{26, 157}.

Resistencia a las quinolonas

1. Modificación de la afinidad de la diana, especialmente asociada a mutaciones en la DNA girasa y la topoisomerasa IV ²⁹⁸.
2. Aumento en la expresión de los sistemas de expulsión activa ^{145, 198}.
3. Alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa ⁴⁷.

Para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos se seleccionaron, entre los diferentes antibióticos disponibles en la rutina del laboratorio, diferentes antibióticos como “indicadores” de algunos de los mecanismos de resistencia mencionados anteriormente. De tal forma, se utilizó el aztreonam, como “indicador” del mecanismo de resistencia debido a la betalactamasa cromosómica; el imipenem, como “indicador” de la resistencia debida a alteraciones de la permeabilidad de la membrana; entre los aminoglucósidos se estudiaron la gentamicina, la tobramicina y la amikacina y finalmente, ciprofloxacina entre las quinolonas.

❖ *Determinación de los patrones de sensibilidad*

El estudio de sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología (UDIAT, Corporació Sanitaria Parc Taulí, Sabadell).

La determinación de los patrones de sensibilidad se llevó a cabo en la totalidad de los aislamientos de *P. aeruginosa*. El estudio de sensibilidad se realizó por el método de difusión en agar con disco ¹⁸ en agar Mueller-Hinton (14 cm; MAIM, Barcelona) a partir de un inóculo inicial con una turbidez comparable a un estándar Mc Farland 0,5 ($\approx 1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (ufc)/ml), siguiendo los criterios descritos por el NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) ¹⁶⁷. Tras la incubación de las placas a 37°C se procedió a su lectura a las

104 -Material y métodos-

18 horas, midiendo y anotando los halos de inhibición. Como cepa control se utilizó la cepa de *P. aeruginosa* ATCC27853.

Los diferentes antimicrobianos estudiados con su correspondiente carga (Difco Laboratories, Detroit MI, USA), así como los valores propuestos por el NCCLS para determinar la categoría de la sensibilidad ¹⁶⁷, se detallan en la Tabla. 7.

Tabla 7. Antibióticos estudiados y medidas interpretativas estándar del diámetro de inhibición de acuerdo con el NCCLS ¹⁶⁷.

Agente antimicrobiano	Resistente (≤ mm)	Intermedio (rango mm)	Susceptible (≥ mm)
<i>Carbapenem</i>			
- Imipenem (10 µg)	13	14-15	16
<i>Monobactámicos</i>			
- Aztreonam (30 µg)	15	16-21	22
<i>Aminoglucósidos</i>			
- Amikacina (30 µg)	14	15-16	17
- Gentamicina (10 µg)	12	13-14	15
- Tobramicina (10 µg)	12	13-14	15
<i>Quinolonas</i>			
- Ciprofloxacina (5 µg)	15	16-20	21

En la definición de los patrones de sensibilidad, las cepas de la categoría intermedia se consideraron como resistentes.

En la comparación de los patrones de sensibilidad de un cultivo, se tuvieron en cuenta los problemas de reproducibilidad de la técnica de disco-difusión en *P. aeruginosa*. Por ello, para considerar que dos aislamientos tenían un patrón de sensibilidad diferente se exigía una variación "mayor", esto es, de una categoría sensible a una resistente o viceversa. Las variaciones "menores" de intermedia a sensible o resistente o viceversa no se tuvieron en consideración.

2.6 Definiciones

2.6.1 Pulsotipo, subtipo y cepa

❖ *Pulsotipo*

Conjunto de aislamientos de *P. aeruginosa* que presentan un perfil de bandas mediante PFGE que difiere de los demás en un mínimo de 7 bandas.

❖ *Subtipo*

Conjunto de aislamientos de *P. aeruginosa* que comparten un perfil de bandas mediante PFGE con una diferencia máxima de 6 bandas.

❖ *Cepa*

Determinado pulsotipo en un enfermo concreto.

2.6.2 Colonización

Se ha definido como *colonización*, el aislamiento de *P. aeruginosa* a partir de las muestras obtenidas de cualquier localización anatómica del paciente, siempre que no exista infección. Dentro de este término se ha diferenciado entre:

- ◆ *Colonización al inicio de la ventilación mecánica (VM)*, la colonización detectada dentro de las primeras 24 horas del ingreso y la intubación del paciente.
- ◆ *Colonización adquirida durante el período de VM*, la colonización detectada transcurridas 24 horas de la intubación del paciente y siempre que no se haya detectado una colonización en el momento del ingreso e intubación.

- ◆ **Presión de colonización**, proporción de pacientes colonizados o infectados ³⁶.

2.6.3 Colonización primaria o por cepas propias del paciente

La colonización primaria o por cepas propias del paciente colonizado, se ha definido como la colonización causada por aislamientos de *P. aeruginosa* que mostraban PTs que no habían sido obtenidos previamente en otro paciente, en las manos del personal sanitario o en otra localización ambiental estudiada en la UCI.

2.6.4 Colonización de origen exógeno

Se ha definido la colonización de origen exógeno, como la causada por aislamientos de *P. aeruginosa* que mostraban PTs previamente identificados en otro paciente, en las manos del personal sanitario o en otra localización ambiental estudiada en la UCI.

2.6.5 Neumonía asociada a ventilación mecánica

La neumonía asociada a ventilación mecánica se sospechó en todos aquellos pacientes sometidos a ventilación mecánica (que no presentaban neumonía en el momento de la intubación) y de los que se conocían los siguientes criterios: fiebre ($T^a >38,3^{\circ}\text{C}$), leucocitosis (>12.000 leucocitos/ mm^3) o leucopenia (<4.000 leucocitos/ mm^3), secreciones traqueales purulentas y la presencia de infiltrados pulmonares nuevos y persistentes.

El diagnóstico de neumonía se confirmó por medio de un cultivo positivo para *P. aeruginosa* obtenido mediante broncoscopia utilizando un catéter telescópado con cepillo protegido con valores $>10^3$ ufc/ml, un cultivo positivo de lavado

broncoalveolar con valores $>10^4$ ufc/ml, o mediante un cultivo cuantitativo de aspirado endotraqueal con valores $>10^6$ ufc/ml.

2.6.6 Lugar inicial de colonización y secuencia de la colonización

❖ *Lugar inicial de colonización*

Se ha definido como la primera localización anatómica en la que el PT implicado en la colonización del tracto respiratorio inferior o en la neumonía se identificaba por primera vez. La colonización simultánea de varias localizaciones era posible.

❖ *Secuencia de la colonización*

La secuencia de la colonización por *P. aeruginosa* que causaba la colonización del tracto respiratorio inferior (tráquea) o el desarrollo de neumonía se ha determinado mediante la comparación cronológica de los PTs obtenidos en el estómago, la faringe, las secreciones subglóticas, el tubo endotraqueal, la tráquea y el recto.

2.6.7 Cultivos policlonales

Para determinar la existencia de posibles cultivos policlonales se estudiaron hasta 4 aislamientos (con la misma o diferente morfología colonial) por cultivo. Por tanto, se ha considerado un cultivo como policlonal cuando tras el análisis de dichos aislamientos mediante la técnica de PFGE se demostraba la existencia de más de un PT diferente.

2.7 Análisis estadístico

Para comparar las características epidemiológicas de los 72 pacientes incluidos en el estudio asociadas a la colonización por cepas de *P. aeruginosa* adquiridas en la UCI, se utilizó la prueba Chi-cuadrado de Pearson. En aquellos casos en los que no se consideraba adecuado aplicar esta prueba (en función de los datos a analizar) se ha utilizado la prueba exacta de Fisher. Cuando las variables eran continuas, se aplicó la prueba paramétrica t-Student, y en el caso de considerarse necesario debido a la asimetría de las variables, la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. De esta forma se intentaba determinar si las distribuciones de estas variables diferían significativamente entre los pacientes colonizados con cepas adquiridas en la UCI y el grupo de pacientes no colonizados por *P. aeruginosa* o colonizados por cepas propias. Se han considerado significativos valores de $P < 0,05$.

Las variables que en el estudio univariable mostraron un valor de $P < 0,1$ se incluyeron en un modelo de regresión logística con el fin de determinar los factores de riesgo independientes asociados a la posibilidad de colonizarse por cepas de *P. aeruginosa* adquiridas en la UCI. El modelo de regresión se construyó eliminando variables paso a paso según el valor de la prueba de razón de verosimilitud.

Para determinar la existencia de una posible relación entre la aparición de variantes en los diferentes PTs obtenidos con el tiempo de persistencia y la frecuencia de aislamiento se aplicó el coeficiente de correlación de Spearman. Se han considerado significativos valores de $P < 0,05$.

Todos los análisis se realizaron mediante el paquete estadístico SPSS 9 (SSPS for Windows, release 9.0, SPSS Inc, Chicago, Ill).

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

P. aeruginosa presenta una heterogeneidad genética importante tanto en el reservorio ambiental de la UCI como en los pacientes colonizados, que se traslada a los cultivos y que implica un replanteamiento de las técnicas tradicionales de estudio o de tipificación para poder establecer el origen y las rutas de transmisión de este microorganismo.

3.2 Objetivos

Para abordar la hipótesis expuesta anteriormente, los objetivos planteados fueron los siguientes:

1. Análisis de la colonización ambiental causada por *P. aeruginosa* durante el período de estudio mediante la realización de cultivos de los grifos de la Unidad, las superficies adyacentes a los mismos, las manos del personal sanitario y otras posibles fuentes de transmisión.
2. Análisis del origen de la colonización y/o la infección causada por *P. aeruginosa* en los enfermos sometidos a ventilación mecánica, valorando:
 - El origen endógeno o exógeno de la colonización y/o la infección por *P. aeruginosa* mediante cultivos periódicos del estómago, la faringe, las secreciones subglóticas, la luz del tubo endotraqueal, la tráquea y el recto, que se correlacionarán con los resultados del estudio ambiental.
 - La secuencia de colonización de las distintas localizaciones anatómicas estudiadas.

112 -Hipótesis y objetivos-

3. Determinar la existencia de cultivos policlonales de *P. aeruginosa* analizando su implicación en los estudios epidemiológicos de la colonización y/o la infección así como en la heterogeneidad de los fenotipos de sensibilidad a los antimicrobianos en los cultivos de *P. aeruginosa*.

4 RESULTADOS

4.1 Cultivos

4.1.1 Estudio ambiental de la UCI

❖ *Cortes ambientales*

Durante el período de estudio, comprendido entre los años 1996 y 1999, se llevó a cabo un estudio del ambiente de la UCI mediante cinco cortes realizados en las siguientes fechas: 13/09/96; 17/04/97; 18/11/97; 23/02/98 y 24/11/98. Se obtuvieron un total de 279 cultivos procedentes de las siguientes localizaciones:

- Manos del personal sanitario (n= 170).
- Superficies húmedas (adyacentes a los grifos) de los *boxes* (n= 73) y de la cocina (n= 4).
- Superficie del control de enfermería (n= 6).
- Grifo de la cocina (n= 5) y de uno de los *boxes* (sala A) (n= 1, solo durante el primer corte ambiental).
- Teléfonos (n= 5) y estetoscopios (n=15).

En la tabla 8 se detallan los diferentes microorganismos aislados. De los 279 cultivos realizados destacan entre los más frecuentes: 225 cultivos positivos (80,7 %) para estafilococos coagulasa negativa, 96 (34,4 %) fueron positivos para *Staphylococcus aureus*, 60 (21,5 %) para *Enterobacteriaceae*, 58 (20,8 %) para *Corynebacterium* spp, 49 (17,6 %) para *Bacillus* spp y 41 (14,7 %) para *P. aeruginosa*. Entre las diferentes localizaciones estudiadas se observó que en los cultivos obtenidos de las manos destacaban los estafilococos coagulasa negativa (91,4 %) y *S. aureus* (41,2 %). Ambos microorganismos fueron asimismo aislados con frecuencia en los estetoscopios y los teléfonos. En las superficies húmedas los microorganismos más frecuentes fueron estafilococos coagulasa negativa (60 %), *Enterobacteriaceae* (46,8 %) y *P. aeruginosa* (33,8 %). En 5 de los 6 cultivos realizados en los grifos de la cocina y la sala A se obtuvo *P. aeruginosa*.

Tabla 8. Organismos aislados en los cultivos ambientales realizados en los cinco cortes de prevalencia.

	Manos 170 ^a /170	Boxes		Cocina		Sala A		Estetoscopio		Superficie control de		Teléfonos	Total
		superficie	grifo	superficie	grifo	1 ^a /1	15 ^a /15	6 ^a /6	enfermería	5 ^a /5	278 ^a /279		
Cultivos positivos / Cultivos totales	157 (91,4) ^b	73 ^a /73	4 ^a /5	4 ^a /4	1 ^a /1	15 ^a /15	6 ^a /6	5 ^a /5	278 ^a /279				
Estafilococos coagulasa negativa	45 (61,7)		-	1	-	12 (80)	5	5	225 (80,7)				
Staphylococcus aureus	70 (41,2)	10 (13,7)	-	-	-	9 (60)	4	3	96 (34,4)				
Enterobacteriaceae	18 (10,6)	34 (46,6)	-	2	-	4 (26,7)	1	1	60 (21,5)				
Corynebacterium spp.	36 (21,2)	10 (13,7)	1	3	-	6 (40)	1	1	58 (20,8)				
Bacillus spp.	39 (23)	8 (11)	-	1	-	-	1	-	49 (17,6)				
Pseudomonas aeruginosa	10 (6)	25 (34,3)	4	1	1	-	-	-	41 (14,7)				
Streptococcus spp.	13 (7,7)	6 (8,2)	-	1	-	1 (6,7)	1	1	23 (8,2)				
Enterococcus spp.	5 (3)	3 (4,1)	-	-	-	3 (20)	1	-	10 (3,6)				
Stenotrophomonas maltophilia	2 (1,2)	1 (1,4)	-	-	-	-	-	-	3 (1,1)				
Aspergillus terreus	2 (1,2)	-	-	-	-	-	-	-	2 (0,7)				
Aspergillus fumigatus	1 (0,6)	-	-	-	-	-	-	-	1 (0,4)				
No-crecimiento	-	-	1	-	-	-	-	-	1 (0,4)				

^a Varios cultivos muestran más de un microorganismo.

^b Entre paréntesis se expresa el porcentaje.

Como ya se ha comentado anteriormente, 41 (14,7 %) de los 279 cultivos realizados fueron positivos para *P. aeruginosa*. Las localizaciones colonizadas fueron: las superficies húmedas de los *boxes*, las manos del personal sanitario, el grifo de la sala A (solamente estudiado en el primer corte ambiental) y el grifo y la superficie de la cocina (tabla 9). Estudiando un máximo de 4 colonias por cada cultivo positivo, el número total de aislamientos de *P. aeruginosa* que se sometieron a análisis con los diferentes marcadores fue 160.

Tabla 9. Cultivos positivos para *P. aeruginosa* en los cortes ambientales.

Localizaciones estudiadas	Cultivos realizados	Cultivos positivos para <i>P. aeruginosa</i> (%)
Manos	170	10 (6)
Superficie habitación	73	25 (34,3)
Estetoscopios	15	-
Superficie control enfermería	6	-
Grifo cocina	5	4
Teléfonos	5	-
Superficie cocina	4	1
Grifo sala A	1	1
Total	279	41 (14,7)

❖ *Grifos de los boxes*

Desde el momento en que un paciente ingresaba en la UCI y era intubado se recogían cultivos del grifo de su *box* con una periodicidad de tres días, hasta que finalizaba su seguimiento. De los 149 cultivos realizados, un total de 96 (64,4 %) fueron positivos. Entre los diferentes microorganismos aislados *P. aeruginosa* fue el más frecuente, obteniéndose en 93 de los 96 cultivos positivos. También colonizaron esta localización, aunque con una frecuencia menor, *Stenotrophomonas maltophilia* (24 cultivos) y *Pseudomonas fluorescens* (22 cultivos) (tabla 10).

Tomando, siempre que fue posible, 4 colonias por cultivo, el número total de

aislamientos de *P. aeruginosa* disponibles para un posterior análisis con los distintos marcadores fue 348.

Tabla 10. Microorganismos aislados en los grifos de los *boxes*.

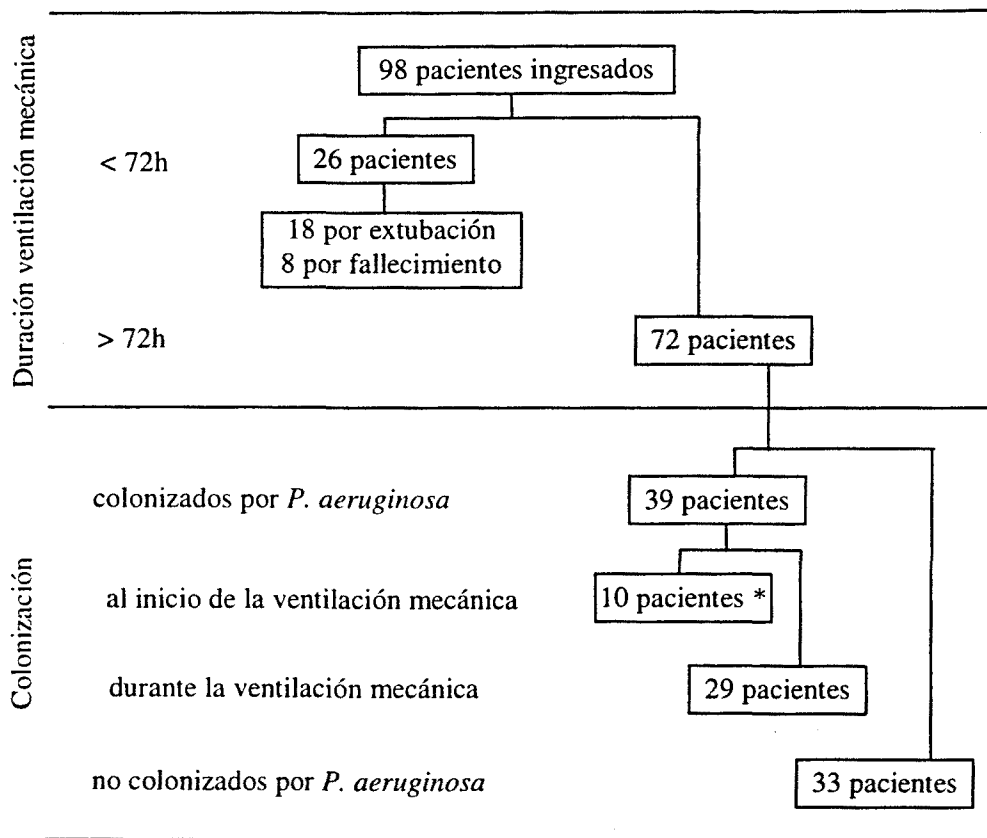
<i>Microorganismos</i>	<i>Nº cultivos positivos (%)^a</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	93 (62,4)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	24 (16,1)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	22 (14,8)
<i>Escherichia coli</i>	1 (0,7)
<i>Corynebacterium</i> sp.	1 (0,7)
Estafilococos coagulasa negativa	1 (0,7)
<i>Mycobacterium gordonae</i>	1 (0,7)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1 (0,7)

^a El número total de cultivos es superior a 96 debido a que en 26 cultivos se aisló más de un microorganismo.

4.1.2 Pacientes

Durante el período de estudio, 98 pacientes ingresados en la UCI del Hospital de Sabadell fueron incluidos en el estudio. Veintiséis pacientes (26,5 %) fueron excluidos posteriormente debido a que estuvieron sometidos a ventilación mecánica durante un período inferior a 72 horas (ver apartado criterios de inclusión, capítulo *material y métodos*). Las causas de la menor duración de la ventilación mecánica fueron: la extubación en 18 pacientes y el fallecimiento en 8 pacientes. De los 72 pacientes que permanecieron más de 72 horas en ventilación mecánica, en 33 (45,8 %) no se documentaron cultivos positivos para *P. aeruginosa*. Por tanto, 39 pacientes (54,2 %) fueron colonizados por *P. aeruginosa*: 10 pacientes estaban colonizados al inicio de la ventilación mecánica (VM) y 29 pacientes se colonizaron mientras estaban sometidos a VM (figura 4). Sin embargo, durante el seguimiento efectuado a los pacientes se observó que, dos de los 10 pacientes colonizados al inicio de la VM se colonizaron durante la misma por cepa(s) distinta(s). Por tanto, 31 pacientes mostraron colonización adquirida durante la VM.

Se diagnosticó neumonía causada por *P. aeruginosa* en 8 (11,1 %) de los 72 pacientes incluidos en el estudio. En 7 pacientes el diagnóstico se realizó mediante broncoscopia utilizando el catéter telescopado. Solamente en un caso, el diagnóstico se realizó a partir del cultivo cuantitativo del aspirado endotraqueal.



* Dos de los 10 pacientes se colonizaron, además, durante el período de VM por cepa(s) distinta(s).

Figura 4. Pacientes colonizados por *P. aeruginosa*.

En el estudio de seguimiento realizado en los 39 pacientes colonizados por *P. aeruginosa*, se obtuvieron un total de 288 cultivos positivos. La frecuencia de los cultivos positivos varió en función de las localizaciones estudiadas (figura 5). El estómago fue la localización con mayor número de cultivos positivos (n= 71). La faringe y las secreciones subglóticas presentaron valores algo menores pero similares

(53 y 52 cultivos, respectivamente). Algo semejante se observó en el tubo endotraqueal y la tráquea (39 y 44 cultivos, respectivamente). Del recto se obtuvieron 22 cultivos positivos. Los 7 cultivos positivos obtenidos mediante el cepillado bronquial pertenecen a los casos diagnosticados de NAV.

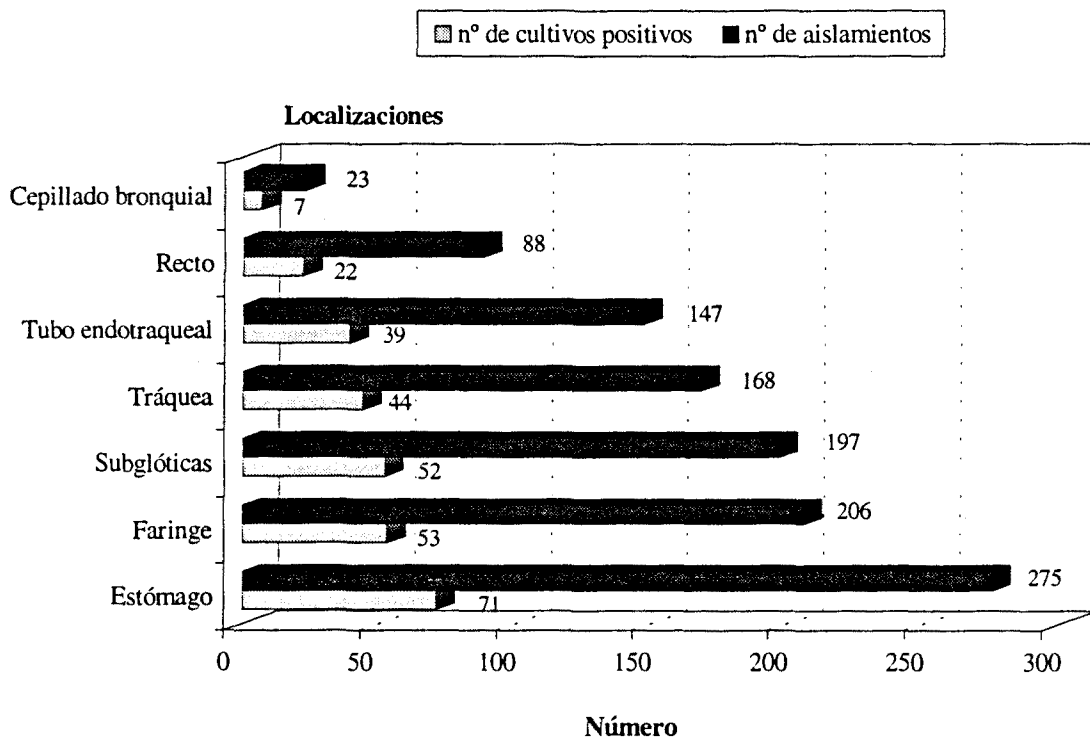


Figura 5. Cultivos y aislamientos de *P. aeruginosa* en las localizaciones anatómicas estudiadas.

El número de aislamientos de *P. aeruginosa* procedentes de las distintas localizaciones anatómicas estudiadas y que posteriormente se sometieron a tipificación fue 1.104.

4.2 Tipificación de *P. aeruginosa* mediante PFGE

4.2.1 Pulsotipos

❖ *Análisis con el enzima de restricción XbaI*

El DNA cromosómico de cada uno de los 1.612 aislamientos de *P. aeruginosa* (160 obtenidos en el estudio ambiental, 1104 en el estudio de seguimiento de los 39 pacientes y 348 de las muestras obtenidas de los grifos de los *boxes* de estos pacientes) fue digerido con el enzima de restricción de baja frecuencia de corte *XbaI*. Este enzima de restricción se consideró adecuado para la caracterización de *P. aeruginosa*, al generar un número relativamente pequeño de fragmentos (menos de 50) ⁴. Dicho valor estaría relacionado con el contenido en G+C de esta especie (67,2 %) ¹⁸³ y la presencia del tetranucleótido CTAG en su secuencia diana de corte, que es rara en el DNA de *Pseudomonas* así como en la mayor parte de los genomas bacterianos ¹⁵⁰. Este enzima ha sido utilizado en diversos estudios de tipificación de *P. aeruginosa* junto con otros enzimas de restricción, como *SpeI* o *DraI*, mostrando todos ellos una capacidad discriminativa similar ^{101, 244, 251}. Cinco de los aislamientos (0,3 %) no pudieron ser analizados debido a repetidas lisis del DNA cromosómico.

Tras la macrorestricción del DNA cromosómico de *P. aeruginosa* y posterior separación electroforética en geles de agarosa mediante el sistema CHEF, los perfiles generados presentaban de 12 a 19 fragmentos (la mayoría presentaban entre 15 y 18 fragmentos). Este número de fragmentos se correspondía con el rango de pesos moleculares considerado para el estudio y comprendido entre 48,5 y 291 kilobases (kb) (zona abarcada por los marcadores de peso molecular conocido). La comparación de los diferentes perfiles se realizó tolerando una desviación del 2% en los fragmentos de alto peso molecular (entre 485 y 145 kb) y una desviación del 5% en los de bajo peso molecular (entre 145 y 48 kb).

Después de la comparación dos a dos de los diferentes perfiles obtenidos del estudio de la totalidad de los aislamientos, se calculó el grado de divergencia entre todos los pares de pulsotipos (PTs) utilizando el coeficiente de similitud de Dice (S_D). La agrupación jerárquica decreciente de los índices obtenidos se realizó mediante la aplicación del método de agregación UPGMA. La representación gráfica de la similitud de los diferentes PTs se realizó mediante la construcción de un dendrograma (dado el gran número de aislamientos analizados, únicamente se reflejan en el dendrograma los representantes de los diferentes perfiles obtenidos) (figura 6).

Aplicando los criterios de interpretación expuestos en el apartado 2.5.1 del capítulo *material y métodos*, se incluyeron en el mismo pulsotipo todos aquellos aislamientos cuyos perfiles presentaban igual número de fragmentos y del mismo tamaño (indistinguibles). De la misma forma, se denominaron como subtipos de un pulsotipo aquellos aislamientos cuyos perfiles mostraban diferencias atribuibles a un evento genético (de 1 a 3 bandas) o a dos eventos genéticos independientes (de 4 a 6 bandas). Por último, los aislamientos que presentaban perfiles con más de 7 bandas de diferencia (3 o más eventos genéticos independientes), se consideraron diferentes. De tal forma, se obtuvieron un total de 34 perfiles o pulsotipos diferentes (figura 6). A su vez, se detectaron 49 subtipos que se agruparon en 12 PTs (PTs 1, 6, 7, 11, 13, 17, 18, 22, 27, 29, 34 y 35).

❖ *Análisis con el enzima de restricción DraI*

Con el propósito de confirmar o refutar las relaciones establecidas con el enzima de restricción *XbaI*, se procedió a un posterior análisis con el enzima de restricción *DraI*. Se estudió un representante de aquellos aislamientos que mostraban perfiles considerados como pulsotipos diferentes, indistinguibles o subtipos de un determinado pulsotipo.

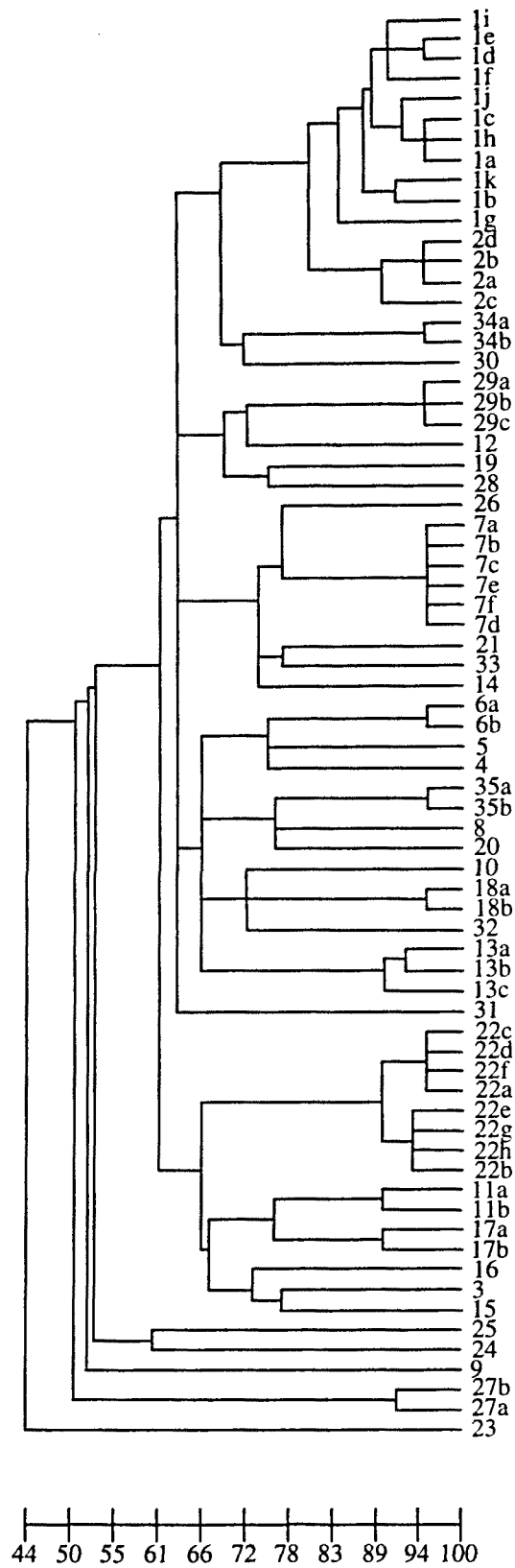


Figura 6. Dendrograma basado en la comparación de los perfiles de macrorestricción obtenidos con el enzima *Xba*I. La escala representa los coeficientes de similitud.

Los perfiles generados presentaban de 11 a 21 fragmentos, aunque la mayoría mostraban entre 18 y 20 fragmentos. Dicho valor se correspondía con el rango de pesos moleculares considerado para el estudio y comprendido entre 48,5 y 339,5 kb (zona abarcada por los marcadores de peso molecular conocido). La comparación de los diferentes perfiles se realizó tolerando los mismos porcentajes de desviación a los utilizados con el enzima *XbaI*. Asimismo, el cálculo del grado de divergencia entre todos los pares de pulsotipos y la metodología que se empleó para la agrupación jerárquica de los índices obtenidos así como para la construcción del dendrograma, fue la misma que la empleada con el enzima *XbaI*.

Después de la aplicación de los criterios de interpretación mencionados anteriormente, se observaron algunas diferencias respecto a los resultados obtenidos con el enzima *XbaI*: i) se identificaron 35 PTs diferentes (figura 7). El PT1 que agrupaba doce subtipos tras el análisis con el enzima *XbaI* (con diferencias entre 1 y 6 bandas), se diferenciaba en dos PTs diferentes (diferencias entre 8 y 9 bandas) con este segundo enzima. ii) El número de subtipos detectados fue algo menor (36 subtipos agrupados en 10 PTs). En algunos pulsotipos (PTs 1, 7, 22, 27, 34 y 35), algunos de los subtipos que aparecían tras el análisis con *XbaI* (con diferencias de 1 a 2 bandas) no llegaron a diferenciarse con el enzima *DraI* (presentaban perfiles con el mismo número y tamaño de bandas).

Por tanto, los resultados expuestos a lo largo de este capítulo se referirán al análisis combinado realizado con ambas enzimas de restricción, tal y como queda reflejado en la tabla 11. El número total de PTs obtenidos fue de 35. Asimismo, se caracterizaron 49 subtipos que se agruparon en 13 PTs (tabla 12). Se utilizará el pulsotipo (PT) como unidad de comparación y solo se hará referencia a las diferentes variantes (subtipos) aparecidas en los apartados 4.2.3 y 4.2.4 del presente capítulo.

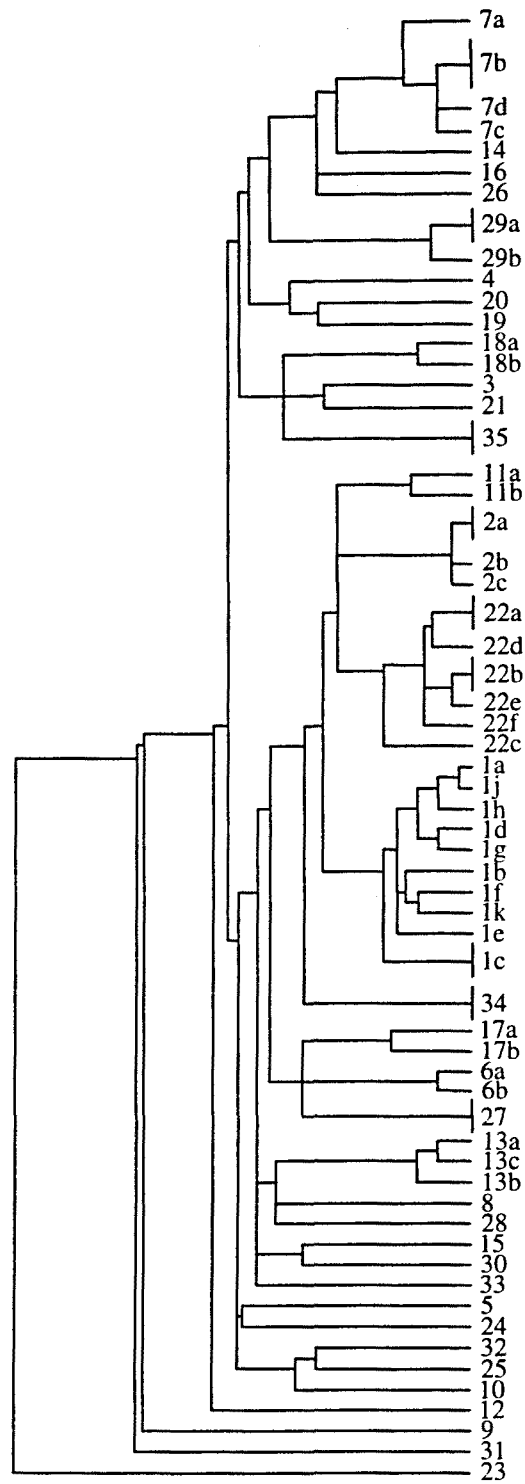


Figura 7. Dendrograma basado en la comparación de los perfiles de macrorestricción obtenidos con el enzima *DraI*. La escala representa los coeficientes de similitud.

Tabla 11. Resultados del análisis combinado realizado con los enzimas *XbaI* y *DraI* ^a.

<i>XbaI</i>	<i>DraI</i>	<i>Pulsotipo final</i>	<i>XbaI</i>	<i>DraI</i>	<i>Pulsotipo final</i>
1a	2a	2a	14	15	15
1b	1a	1a	15	16	16
1c	1b	1b	16a	17a	17a
1d	1c	1c	16b	17b	17b
1e	1d	1d	17a	18a	18a
1f	1e	1e	17b	18b	18b
1g	1f	1f	18	19	19
1h	1g	1g	19	20	20
1i	2a	2b	20	21	21
1j	2b	2c	21a	22a	22a
1k	1h	1h	21b	22b	22b
1l	2c	2d	21c	22b	22c
1m	1i	1i	21d	22a	22d
1n	1c	1j	21e	22c	22e
1o	1j	1k	21f	22d	22f
2	3	3	21g	22e	22g
3	4	4	21h	22f	22h
4	5	5	22	23	23
5a	6a	6a	23	24	24
5b	6b	6b	24	25	25
6a	7a	7a	25	26	26
6b	7b	7b	26a	27	27a
6c	7b	7c	26b	27	27b
6d	7c	7d	27	28	28
6e	7b	7e	28a	29a	29a
6f	7d	7f	28b	29a	29b
7	8	8	28c	29b	29c
8	9	9	29	30	30
9	10	10	30	31	31
10a	11a	11a	31	32	32
10b	11b	11b	32	33	33
11	12	12	33a	34	34a
12a	13a	13a	33b	34	34b
12b	13b	13b	34a	35	35a
12c	13c	13c	34b	35	35b
13	14	14			

^a El orden establecido en la tabla se corresponde con la fecha de obtención de los distintos aislamientos.

Tabla 12. Subtipos caracterizados tras el análisis con los enzimas *XbaI* y *DraI*.

<i>Pulsotipos</i>	<i>Nº subtipos</i>
1	11
2	4
6	2
7	6
11	2
13	3
17	2
18	2
22	8
27	2
29	3
34	2
35	2

En las figuras 8 y 9, se pueden observar dos ejemplos de los perfiles obtenidos con los enzimas *XbaI* y *DraI*. En la figura 8 se reflejan los diferentes subtipos obtenidos para el PT 22. En la figura 9 se puede observar un ejemplo de algunos de los diferentes PTs obtenidos del estudio de la totalidad de los aislamientos.

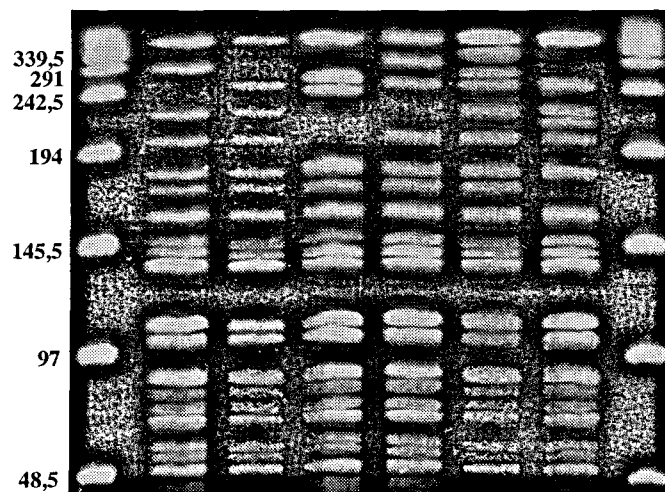
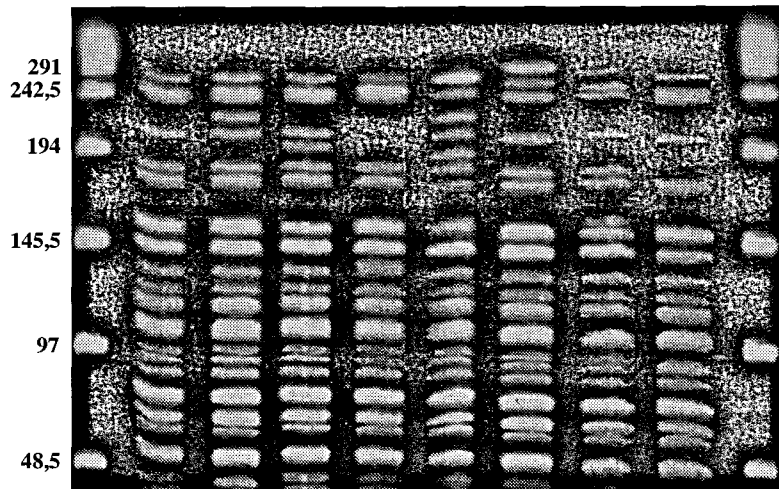


Figura 8. Perfiles de macrorestricción utilizando los enzimas *Xba*I (parte superior) y *Dra*I (parte inferior) que reflejan los diferentes subtipos englobados en el PT 22. Los números a la izquierda indican los valores de los marcadores de peso molecular en kb.

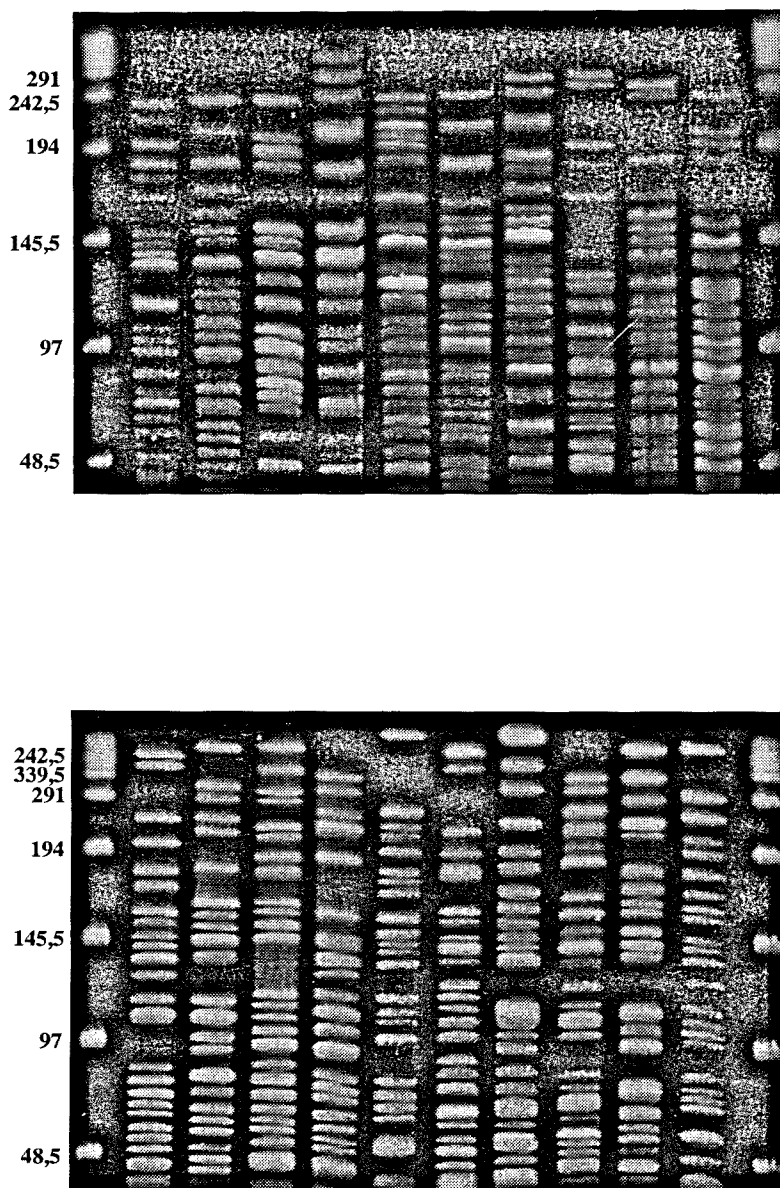


Figura 9. Perfiles de macrorestricción utilizando los enzimas *Xba*I (parte superior) y *Dra*I (parte inferior) que reflejan diferentes PTs obtenidos tras el estudio de los aislamientos de *P. aeruginosa*. Los números a la izquierda indican los valores de los marcadores de peso molecular en kb.

4.2.2 Frecuencia y distribución de los pulsotipos

❖ Cortes ambientales

Tras la tipificación de los 160 aislamientos correspondientes a los 41 cultivos positivos para *P. aeruginosa*, se identificaron un total de 15 pulsotipos diferentes. En la tabla 13, se detallan los resultados obtenidos para cada uno de los cultivos realizados en los diferentes cortes ambientales. El pulsotipo más frecuente fue el PT 1, presente en 13 cultivos (31,7 %) (tabla 14). Otros pulsotipos aislados de forma repetida fueron el PT 7 (7 cultivos), el PT 8 (6 cultivos), el PT 33 (4 cultivos) y los PTs 12 y 13 (en 3 cultivos cada uno).

Tabla 13. Tipificación mediante PFGE de los aislamientos de *P. aeruginosa* obtenidos en los cortes ambientales.

Cortes ambientales	Localización	Origen ^a	PT ^b	
13/09/96	Box 4	S	7	
			8	
	Sala A	G	1	
	Cocina	G	1	
	Personal	M	9	
17/04/97	Box 1	S	8	
	Box 3	S	1	
	Box 6	S	1	
	Box 9	S	7	
	Box 11	S	2	
	Box 14	S	13	
	Box 15	S	12	
	Box 16	S	1	
			8	
	Cocina	G	1	
	Cocina	S	1	
	Personal	M	1	
	Personal	M	1	
Personal	M	12		
18/11/97	Box 2	S	13	
			7	
			8	
	Box 5	S	11	
	Box 6	S	8	
18/11/97	Box 7	S	8	
			15	
			7	
	Box 15	S	12	
	Cocina	G	1	
	Personal	M	15	
	Personal	M	1	
	23/02/98	Box 2	S	20
		Box 5	S	7
				13
		Box 7	S	7
		Box 10	S	7
		Box 14	S	22
Cocina		G	1	
24/11/98	Box 4	S	30	
	Box 7	S	31	
	Box 11	S	32	
	Box 13	S	2	
	Box 16	S	1	
	Personal	M	33	
	Personal	M	33	
Personal	M	33		
Personal	M	33		

^a G: grifo; S: superficies; M: manos.

^b La nomenclatura de los pulsotipos (PTs) es temporal respecto al total de los aislamientos del estudio.

Tabla 14. Frecuencia de los pulsotipos obtenidos en los cinco cortes de prevalencia.

<i>Pulsotipo</i>	<i>n° cultivos (%)^a</i>	<i>Pulsotipo</i>	<i>n° cultivos (%)^a</i>
1	13 (31,7)	15	2 (4,9)
2	2 (4,9)	20	1 (2,4)
7	7 (17,1)	22	1 (2,4)
8	6 (14,6)	30	1 (2,4)
9	1 (2,4)	31	1 (2,4)
11	1 (2,4)	32	1 (2,4)
12	3 (7,3)	33	4 (9,8)
13	3 (7,3)		

^a El número de cultivos es superior a 41 debido a que en 5 cultivos se identificó más de un pulsotipo.

Respecto a la *distribución* de los diferentes pulsotipos, observamos que el PT1 aparecía en todas las localizaciones estudiadas (figura 10). Las superficies de las habitaciones fueron colonizadas por una gran variedad de pulsotipos (n= 13), siendo los más frecuentes los PTs 7 y 8. En las manos del personal sanitario de los cinco pulsotipos obtenidos, los PTs 1 y 33 fueron los más frecuentes. En dos ocasiones se aisló el mismo pulsotipo en los cultivos procedentes de las manos y de las superficies de las habitaciones (PTs 12 y 15). En la cocina, tanto en el grifo como en la superficie adyacente, únicamente se obtuvo el PT 1. Asimismo, en el otro grifo estudiado (correspondiente a la sala A) también el único pulsotipo encontrado fue el PT 1.

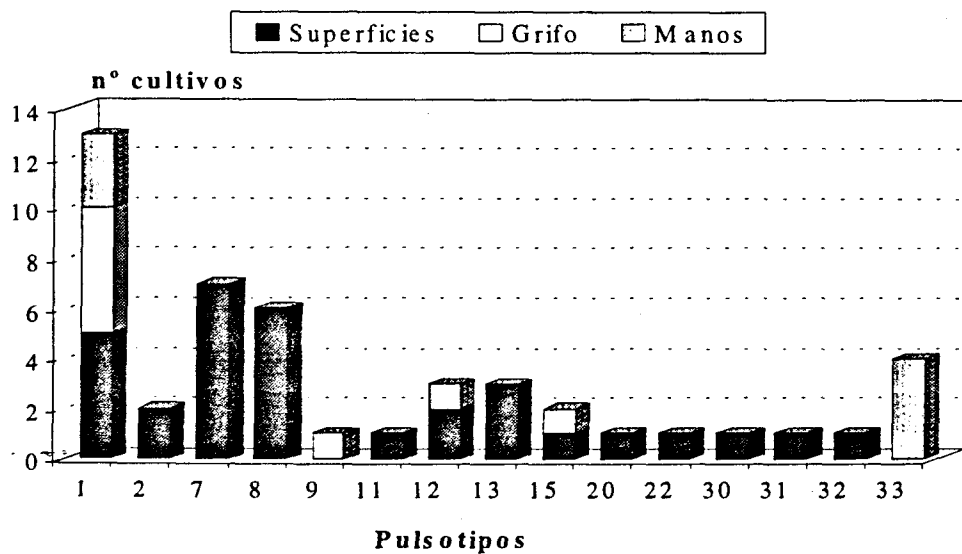


Figura 10. Distribución de los PTs en función de las localizaciones colonizadas.

❖ *Grifos de los boxes*

Tras el análisis de los 348 aislamientos procedentes de los 93 cultivos positivos de *P. aeruginosa*, se identificaron 11 pulsotipos diferentes. Sólo un aislamiento no pudo analizarse debido a repetidas lisis del DNA.

El perfil con mayor representación fue el PT 2, colonizando el grifo de 10 de los 14 *boxes* con cultivos positivos de *P. aeruginosa*, lo que representaba el 74,2 % de los cultivos (tabla 15). El siguiente pulsotipo en frecuencia fue el PT1, obtenido en un 32,3 % de los cultivos (30/93) y presente en el grifo de 8 *boxes* de la UCI. El resto de los pulsotipos aparecieron de una forma puntual.

Tabla 15. Frecuencia de la colonización de *P. aeruginosa* en los grifos de los *boxes*.

PT	Boxes ^a														Cultivos totales (%) ^b
	1	2	3	4	5	7	8	10	11	12	13	14	16	A	
1	2		1	7	7	5			5				2	1	30 (32,3)
2	1	2	12	15		1	11	3	5	12	7				69 (74,2)
5														1	1 (1,1)
14					1										1 (1,1)
17							2								2 (2,2)
22												1			1 (1,1)
23				1											1 (1,1)
24			4												4 (4,3)
25			1												1 (1,1)
27										5					5 (5,4)
28								4							4 (4,3)

^a El valor indicado en cada *box* representa el número de cultivos en donde se obtuvieron los diferentes pulsotipos.

^b El número total de cultivos es superior a 93 debido a que en 26 cultivos se obtuvieron dos PTs diferentes.

En la tabla 16 se detalla la distribución de los PTs obtenidos en los diferentes cultivos de seguimiento realizados en los grifos.

Tabla 16. Tipificación mediante PFGE de los aislamientos de *P. aeruginosa* obtenidos de los grifos de los *boxes*.

Box	Fecha ^a	PT ^b	Box	Fecha ^a	PT ^b	Box	Fecha ^a	PT ^b	
1	22/03/96	1	4	23/04/98	2	10	12/09/98	28	
		2		26/04/98	2		11	18/04/97	2
	2/05/96	1		30/04/98	1			15/06/98	1
		2			2				2
2	25/06/96	2		29/01/99	1		18/06/98	1	
	18/07/96	2			2			2	
3	12/04/96	1		2/02/99	1		21/06/98	1	
		2	5	4/02/97	1			2	
	29/08/96	2		6/02/97	1		24/06/98	1	
	11/10/96	2		27/10/97	14		27/06/98	1	
	18/05/98	2		9/05/98	1			2	
	21/05/98	2	12/05/98	1	12	2/07/98	2		
		24	15/05/98	1				27	
	24/05/98	2	18/05/98	1			5/07/98	2	
		24	5/01/99	1				27	
		27/05/98	2	7	26/09/96	1		6/11/98	2
			25		24/04/98	1		9/11/98	2
	30/05/98	2	27/04/98		1		12/11/98	2	
	5/01/99	2			2		16/11/98	27	
			24	30/04/98	1		20/11/98	2	
	8/01/99	2		3/05/98	1			27	
	11/01/99	2	8	30/01/98	2		23/11/98	2	
	24				17			27	
14/01/99	2	2/02/98		2		5/01/99	2		
		5/02/98		2		8/01/99	2		
4	22/04/96	2			17		11/01/99	2	
	10/05/96	2		8/02/98	2		14/01/99	2	
	26/07/96	2		14/02/98	2		20/01/99	2	
	4/10/96	2		17/02/98	2	13	6/04/98	2	
	9/01/98	1		20/02/98	2			15/04/98	2
		2		29/02/98	2			3/11/98	2
	13/01/98	1		8/12/98	2			6/11/98	2
		2		11/12/98	2		9/11/98	2	
	8/04/98	2		14/12/98	2		12/11/98	2	
		23	10	28/05/98	2		16/11/98	2	
	11/04/98	1			31/05/98	2	14	23/02/98	22
		2			3/06/98	2		16	6/02/99
14/04/98	1			3/09/98	28		9/02/99		1
	2		6/09/98	28	A	30/05/96	1		
17/04/98	2		9/09/98	28				5	
20/04/98	2								

^a Fecha de obtención de los cultivos de *P. aeruginosa* desde el momento de la intubación del paciente hasta que finalizaba el seguimiento. En cada *box*, la *línea de puntos* separa los cultivos obtenidos durante el ingreso de un determinado paciente y la *línea -----* separa los diferentes ingresos.

^b La nomenclatura de los PTs es temporal respecto al total de los aislamientos del estudio

❖ *Pacientes*

El estudio mediante PFGE de los 1.104 aislamientos obtenidos de las distintas localizaciones anatómicas reveló un total de 22 pulsotipos diferentes. Sólo 4 aislamientos no se pudieron analizar debido a repetidas lisis del DNA cromosómico.

De los 22 pulsotipos obtenidos, los perfiles con mayor representación fueron los PTs 1 y 2 encontrándose en 16 (41 %) y 20 (51,3 %) de los 39 pacientes estudiados, respectivamente (tabla 17). En 5 de estos pacientes se produjo la presencia simultánea de ambos PTs, asimismo en otros 9 pacientes se identificaron uno o ambos PTs junto con otros PTs diferentes (tabla 18). Los PTs 6, 7, 17 y 22 se hallaron en dos pacientes cada uno. El resto de los pulsotipos (n= 16) se identificaron en pacientes individuales (tabla 17).

Tabla 17. Frecuencia de los PTs de *P. aeruginosa* aislados en los 39 pacientes colonizados.

<i>PTs</i>	<i>nº pacientes (%)</i> ^a	<i>PTs</i>	<i>nº pacientes (%)</i> ^a
1	16 (41)	17	2 (5,1)
2	20 (51,3)	18	1 (2,6)
3	1 (2,6)	19	1 (2,6)
4	1 (2,6)	21	1 (2,6)
6	2 (5,1)	22	2 (5,1)
7	2 (5,1)	25	1 (2,6)
10	1 (2,6)	26	1 (2,6)
11	1 (2,6)	8	1 (2,6)
12	1 (2,6)	29	1 (2,6)
15	1 (2,6)	34	1 (2,6)
16	1 (2,6)	35	1 (2,6)

^a El n° total de pacientes es superior a 39 debido a que en 16 pacientes se identificó más de un PT.

En la tabla 18 se refleja la distribución de los diferentes pulsotipos en cada uno de los pacientes estudiados, detallando los resultados hallados en las distintas localizaciones colonizadas.

Tabla 18. Tipificación mediante PFGE de los aislamientos de *P. aeruginosa* obtenidos en los 39 pacientes colonizados.

Paciente	Box	Muestra ^a	Día ^b	PT ^c
2	1	E	3	1
				2
		F	3	1
				2
		TET	3	1
		T	3	1
4	3	E	6	1
				2
		CB	7	3
5	4	E	3	1
		F	3	2
		SG	3	2
		R	3	4
6	1	E	12	2
			15	1
			18	1
				2
			21	2
7	4	E	3	2
8	A	E	1	6
		SG	1	6
		TET	1	6
		T	1	6
		CB	2	6
11	2	F	3	1
		SG	3	1
		T	3	1
13	2	E	3	1
		F	3	1
		SG	3	1
		R	3	1
14	4	E	3	2
16	3	F	6	2
18	7	F	6	10
			9	10
		SG	6	10
			9	10
		R	9	10
21	4	SG	9	11
		TET	9	11
		T	9	11
22	3	E	3	2
		F	3	2
		SG	3	2
26	11	TET	9	12
		T	9	12
31	5	E	1	1
			3	1
32	5	E	3	1
36	11	E	6	2
		F	6	2
43	5	E	3	15
			6	15
			9	15
			12	1
			15	15
		F	9	15
			12	15
			15	15
			18	15
		SG	9	15
			12	15
			15	15
			18	15
		TET	9	15
			12	15
			15	15
			18	15
		T	9	15
			12	15
			15	15
			18	15
		R	9	15
53	4	E	1	16
			3	16
		F	1	16
			3	16
		SG	1	16
		TET	1	16
			3	16
		T	1	16
			3	16
		CB	3	16

Tabla 18. (continuación)

Paciente	Box	Muestra ^a	Día ^b	PT ^c	
55	8	E	15	17	
				2	
			18	17	
					2
				21	17
		F	18	17	
			21	17	
		SG	18	17	
			21	17	
		TET	21	17	
		T	21	17	
		R	1	18	
			3	18	
			6	18	
			9	18	
			12	18	
			15	18	
			18	17	
21	17				
		18			
57	14	E	1	22	
			3	22	
	14	F	1	22	
			3	22	
	8		6	22	
			14	SG	3
	8		6	22	
			14	TET	3
	8		6	22	
			14	T	3
	8		6	22	
			14	R	1
				21	
				3	21
				22	
	66	13	E	3	2
				12	2
	68	4	E	3	1
6				1	
				2	
9				1	
				2	
15				2	
		18	1		

Paciente	Box	Muestra ^a	Día ^b	PT ^c			
68	4	R	15	2			
			18	2			
69	7	E	6	2			
			9	2			
			12	2			
			15	2			
			F	6	2		
				9	2		
		12	2				
			15	2			
		SG	9	2			
			12	2			
			15	2			
			9	2			
12	2						
15	2						
TET	12	2					
	15	2					
	T	6	2				
		12	2				
	15	2					
	71	5	E	3	1		
6				1			
9				1			
		SG	3	1			
72	3	E	3	25			
				2			
			6	25			
			9	25			
			12	25			
			F	6	25		
				9	25		
				12	25		
			SG	3	25		
				6	25		
				9	25		
				12	25		
				TET	6	25	
					9	25	
			12		25		
			73	10	E	3	1
						6	2
						R	6

Tabla 18. (continuación)

Paciente	Box	Muestra ^a	Día ^b	PT ^c
75	15	E	1	22
			6	22
			9	22
		F	1	22
			3	22
			6	22
			9	22
			12	22
		SG	1	22
			3	22
			6	22
			9	22
			12	22
		TET	3	22
			6	22
			9	22
			12	22
		T	1	22
			3	22
			6	22
9	22			
12	22			
76	11	E	9	2
			12	1
77	12	E	6	1
			3	1
		F	6	2
			3	2
		SG	3	2
			6	2
		T	6	1
			3	2
78	10	E	3	28
			6	28
			9	28
		F	6	28
			9	28
		SG	9	28
			9	28
		TET	9	28
			9	28
		R	6	28
9	28			

Paciente	Box	Muestra ^a	Día ^b	PT ^c
82	13	E	12	2
83	12	E	3	29
			F	3
		F	3	29
			6	29
			9	29
			12	29
			15	29
		SG	6	29
			9	29
			12	29
			15	29
			TET	6
		TET	9	29
			12	29
			15	29
T	6	29		
	9	29		
	12	29		
	15	29		
	CB	15	29	
86	8	E	6	17
			F	3
		F	6	7
			3	7
		SG	6	7
			3	7
		TET	6	7
			6	7
		T	6	7
			8	7
88	12	E	3	34
			9	34
		F	1	2
			3	34
			6	34
		SG	9	34
			1	34
			3	34
		TET	6	2
			9	34
			1	34
			3	34
6	34			
TET	9	34		
	3	34		
	6	34		
TET	9	34		
	9	34		

Tabla 18. (continuación)

Paciente	Box	Muestra ^a	Día ^b	PT ^c			
88	12	T	1	34			
			3	34			
			6	34			
			9	2			
			12	34			
89	3	E	3	2			
			6	2			
			9	2			
			F	9	2		
			SG	3	2		
		TET	6	2			
			9	2			
			T	3	2		
		90	5	E	1	35	
					3	35	
					F	1	35
3	35						
SG	1				35		
			3	35			
90	5	TET	1	35			
			3	35			
			SG	3	7		
			TET	1	7		
				3	7		
		92	4	E	3	7	
					F	3	7
					SG	3	7
					TET	1	7
						3	7
		94	16	E	3	6	
	1						
F	1				6		
	3				6		
SG	1				6		
			3	6			
			TET	3	6		
			T	3	6		
			CB	3	6		
			R	3	1		

^a E: estómago; F: faringe; SG: secreciones subglóticas; TET: tubo endotraqueal; T: tráquea; CB: secreciones respiratorias obtenidas mediante cepillado bronquial; R: recto.

^b Día de aislamiento de los cultivos de *P. aeruginosa* desde el momento de la intubación del paciente hasta que finalizaba el estudio. 1: cultivo obtenido en las primeras 24 horas tras el ingreso, el resto de los cultivos se realizaron cada 3 días (3, 6,..).

^c La nomenclatura de los PTs es temporal respecto al total de los aislamientos del estudio.

Cuando se analizaron las diferentes localizaciones anatómicas por separado se observó que la distribución de los diferentes pulsotipos no era uniforme. Se apreciaron diferencias al comparar, especialmente, la frecuencia de obtención del PT 1 y el PT 2 con el resto de los PTs obtenidos. De tal forma, en el estómago a pesar de que el número de cultivos donde se obtuvieron el PT 1, el PT 2, y el resto de los PTs fue similar (figura 11), cuando se contabilizaban todos los cultivos que mostraban el PT 1 y/o el PT 2 frente al resto de PTs, se observaron diferencias. De este modo, de los 71 cultivos obtenidos del estómago, más de la mitad (n= 46) presentaban el PT 1 y/o el PT 2 mientras que el resto de los cultivos (n= 32) mostraban otros PTs diferentes (7 de estos cultivos mostraban el PT 1 o el PT 2 junto con un PT

diferente). En el resto de las localizaciones se observó una tendencia inversa, siendo más numerosos los cultivos que mostraban PTs diferentes a los PTs 1 y 2. La probabilidad de obtener cultivos con alguno de estos 2 PTs fue disminuyendo desde el tracto respiratorio superior al inferior. Un comportamiento similar se observó en los cultivos provenientes del tubo endotraqueal y el recto. En ninguno de los cultivos procedentes de las secreciones respiratorias obtenidas mediante cepillado bronquial se identificaron dichos PTs (figura 11).

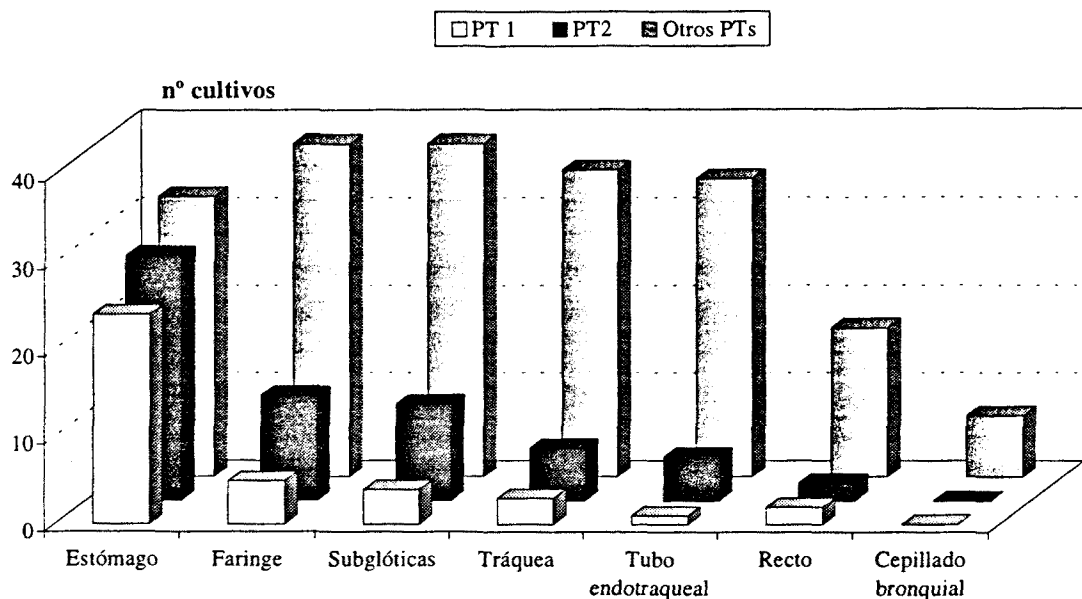


Figura 11. Distribución de los PTs 1 y 2 respecto al resto de PTs en las diferentes localizaciones anatómicas estudiadas.

4.2.3 Cronología y frecuencia de aparición de los pulsotipos

Durante el período de estudio se observaron diferencias respecto a la frecuencia de aparición o persistencia de los diferentes pulsotipos. Asimismo, se advirtió la aparición de pequeñas variaciones en los perfiles pertenecientes a determinados pulsotipos. Dichas variantes manifestaban diferencias entre 1 y 6 bandas respecto al perfil inicial.

En la figura 12 se muestra la cronología de la aparición de los diferentes pulsotipos y subtipos que caracterizan a los aislamientos de *P. aeruginosa* obtenidos durante el período de estudio. A continuación se detallan estos datos en cada uno de los estudios realizados.

❖ *Cortes ambientales*

De los 15 pulsotipos identificados, el PT 1 fue el único pulsotipo obtenido en todos los cortes ambientales realizados. Otros pulsotipos (PTs 7, 8 y 13) se aislaron de una forma repetida y secuencial en diferentes cortes ambientales. El PT 7 en 4 de los 5 cortes ambientales realizados y los PTs 8 y 13 en tres cortes. El PT 2 se detectó en dos de los cortes realizados aunque separados por un período de 19 meses. El resto de los pulsotipos aparecieron de una forma puntual (figura 12).

Se observó la aparición de variaciones en los perfiles de 4 de los 15 pulsotipos obtenidos (PTs 1, 2, 7 y 13). Durante los 26 meses que englobaban los cinco cortes realizados, el PT 1 mostró 7 variantes (o subtipos). La mayor parte de las variaciones se detectaron a los 7 meses del inicio del estudio ambiental. Tres subtipos (1a, 1c y 1g) se aislaron de forma persistente. El PT 7 mostró 5 subtipos que aparecieron de forma secuencial en un período de 17 meses. En el PT 13 se detectaron 3 subtipos (cada uno en un corte ambiental diferente) en un período de 10 meses. Por último, en los 19 meses que separaron los dos aislamientos del PT2 se apreció la aparición de dos subtipos (figura 12).

❖ *Grifos de los boxes*

De los 11 pulsotipos obtenidos, los PTs 1 y 2 colonizaron de forma persistente los grifos durante todo el período de estudio. Dos pulsotipos (PTs 24 y 27) se obtuvieron en dos ocasiones aunque separados por un período de 7 y 4 meses, respectivamente. El resto de los pulsotipos (n= 7) aparecieron de forma puntual (figura 12).

En esta ocasión, los perfiles de 4 de los 11 PTs (PTs 1, 2, 17 y 27) obtenidos mostraron variaciones. Con respecto al PT 1, aparecieron dos variantes (subtipos 1a y 1c). La persistencia de los diferentes subtipos varió durante el período de estudio. El subtipo 1a sólo se aisló durante el año 1996 y posteriormente de una forma puntual al final del estudio. El subtipo 1c se obtuvo a partir del año 1997. El PT 2 exhibió 4 subtipos (2a - 2d). Con respecto al subtipo 2a, se aisló durante todo el estudio, apareciendo a partir del año 1998 el subtipo 2b y coexistiendo ambos hasta el final del estudio. Los dos subtipos restantes del PT 2 (2c y 2d) aparecieron esporádicamente. El PT 17 mostró dos subtipos que aparecieron casi simultáneamente (en un período de 3 días). No obstante, uno de los subtipos (17b) se volvió a aislar 10 meses después. Por último, el PT 27 presentó también dos variantes en un período de 4 meses (figura 12).

❖ *Pacientes*

De los 22 pulsotipos identificados, los PTs 1 y 2 persistieron durante todo el período de estudio (35 meses) aislándose en 16 y 20 pacientes, respectivamente. Otros tres pulsotipos (PTs 6, 7 y 22) se obtuvieron en 2 pacientes, cada uno. El PT 6 se identificó en un paciente a mediados del año 1996 y posteriormente se detectó en otro paciente al final del estudio. El período de tiempo transcurrido entre los dos aislamientos de los PTs 7 y 22 fue de dos y cuatro meses, respectivamente. El resto de los pulsotipos se obtuvieron puntualmente (figura 13). El momento de aparición y la persistencia de los PTs 1 y 2 coincidía con lo observado en el estudio de los grifos de los *boxes* (figura 12).

Se detectó la aparición de pequeñas diferencias en los perfiles de 9 pulsotipos (PTs 1, 2, 6, 7, 18, 22, 29, 34 y 35). El período de tiempo transcurrido entre la aparición de los diferentes subtipos fue diferente para cada uno de los PTs mencionados. El PT 1 mostró 7 variantes. El subtipo 1a se aisló durante el año 1996 y después a partir del año 1998 hasta el final del estudio. El subtipo 1c se obtuvo a partir del año 1997. El resto de los subtipos aparecieron de forma esporádica a lo

largo del estudio. El PT 2 mostró 3 subtipos, el subtipo 2a se aisló durante todo el estudio, el subtipo 2b durante el año 1998 y el subtipo 2d apareció de forma ocasional. El PT 22 presentó 8 subtipos, dos de ellos (22a y 22b) se obtuvieron en dos ocasiones en un período de 4 meses. Los otros 6 subtipos (22c - 22h) aparecieron puntualmente (durante el estudio de uno de los 2 pacientes). Las 3 variantes detectadas en el PT 29 aparecieron en un período de 15 días, durante el estudio de un paciente. Cinco pulsotipos (PTs 6, 7, 18, 34 y 35) mostraron dos subtipos, cada uno. Los subtipos de los PTs 18, 34 y 35 (aislados cada uno en un paciente) aparecieron en períodos que oscilaban entre 3 (PT 35), 9 (PT 34) y 21 días (PT 18). Respecto a los PTs 7 y 6 (obtenidos en 2 pacientes, cada uno), el período de tiempo transcurrido entre la obtención de los 2 subtipos fue de 2 y 32 meses, respectivamente (figura 12 y 13).

La aparición y persistencia de los subtipos 1a y 1c del PT 1 y de los subtipos 2a y 2b del PT2 coincidió prácticamente con lo observado anteriormente en los grifos de los *boxes*, con la excepción del subtipo 1a. En los aislamientos de los pacientes apareció durante casi todo el período de estudio (con excepción del año 1997) y, sin embargo, en los grifos solo se aisló durante el año 1996 y puntualmente al final del estudio (figura 12).

Figura 12. Diagrama en una escala no-temporal de la aparición de los diferentes pulsotipos y subtipos que caracterizan a la totalidad de los aislamientos de *P. aeruginosa*.

- El *eje x* corresponde al período de estudio, comprendido entre los años 1996-1999. En el *eje y* se señalan los diferentes pulsotipos (nombrados con un número) y sus correspondientes subtipos (nombrados con una letra minúscula).
- Cada *cuadro* se corresponde con un cultivo. El *color gris* representa los cultivos obtenidos en los cortes ambientales, el *color blanco* los procedentes de los grifos de los *boxes* y el *color negro* los pertenecientes a los pacientes colonizados. La *amplitud* de las barras está relacionada con el número de cultivos positivos obtenidos en las distintas localizaciones (grifos y pacientes).
- Las *flechas* (*eje x*), indican los cinco cortes ambientales efectuados durante el período de estudio.
- Un cuadro negro a continuación de uno blanco indica que el cultivo procedente del paciente se ha obtenido con posterioridad al del grifo de su *box*. La coincidencia de ambos cuadros en el *eje vertical* señala que ambos cultivos se han obtenido simultáneamente. Cuando los cuadros que coinciden son del mismo color (blanco o negro) representa la identificación de pulsotipos o subtipos diferentes en un mismo grifo o paciente.

Figura 13. Diagrama en una escala no-temporal de los diferentes pulsotipos y subtipos identificados en los cultivos de *P. aeruginosa* obtenidos en los 39 pacientes colonizados.

- El *eje x* corresponde al período de estudio, comprendido entre los años 1996-1999. En el *eje y* se señalan los diferentes pulsotipos (denominados con un número) y sus correspondientes subtipos (denominados con una letra minúscula).
- Cada *línea* corresponde a un paciente (identificados mediante un número). Su *longitud* indica el número de cultivos obtenidos.
- La coincidencia en el *eje vertical* de líneas con el mismo número significa la identificación de pulsotipos o subtipos diferentes en un mismo paciente.

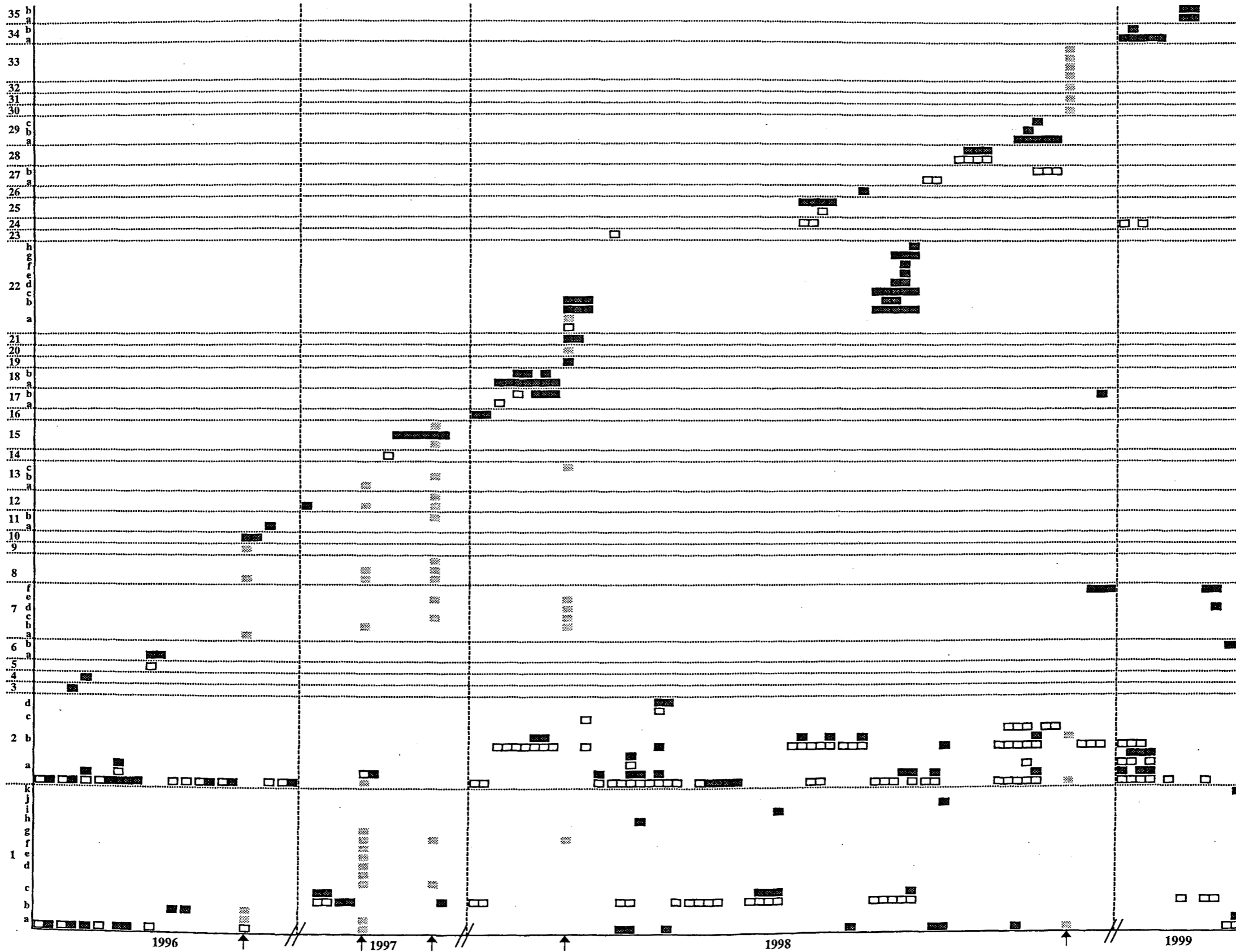


Figura 12

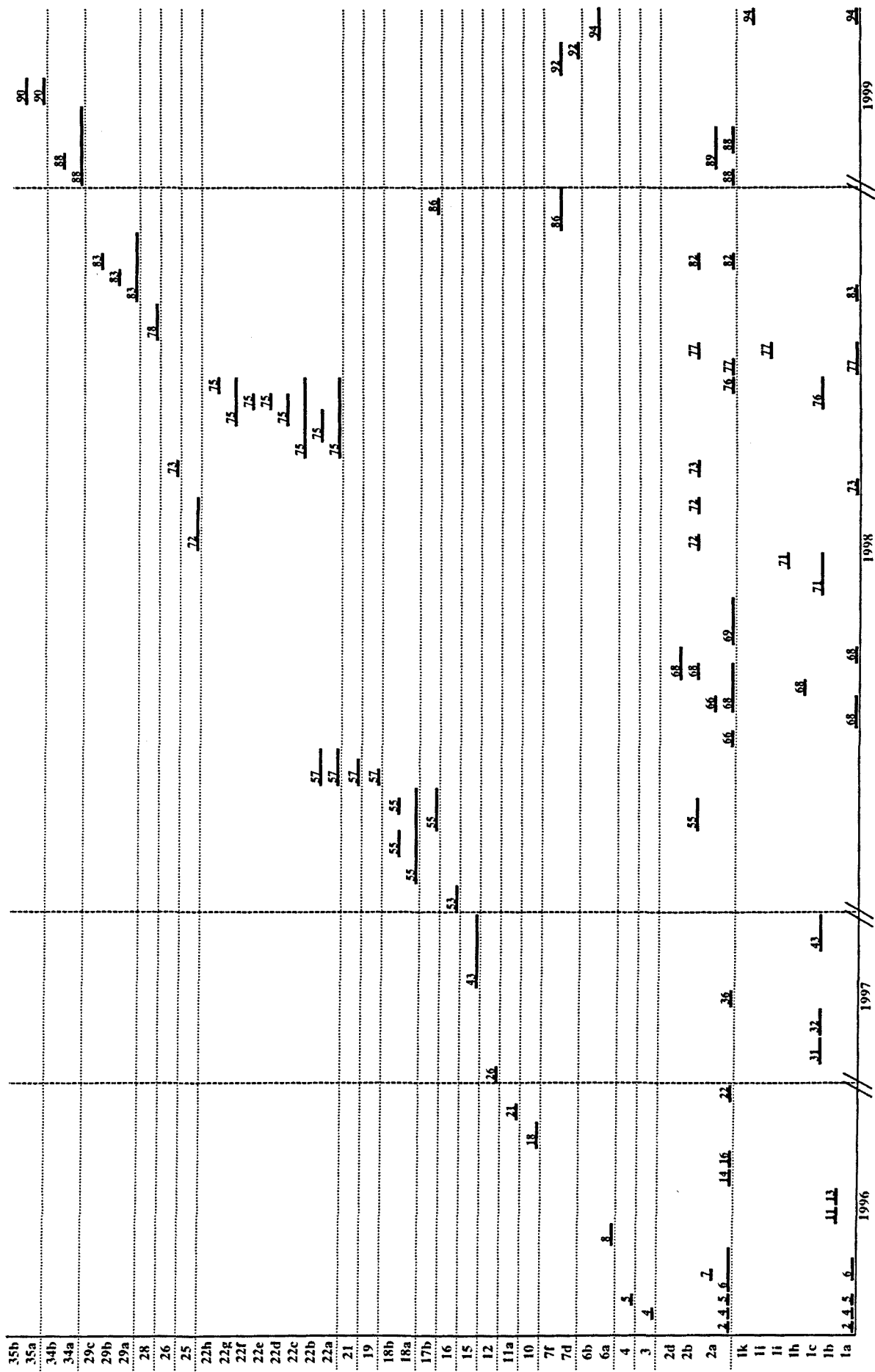


Figura 13

4.2.4 Variación de los pulsotipos

En nuestro estudio, como se ha comentado anteriormente, se observó la aparición de pequeñas variaciones (subtipos) en varios de los PTs obtenidos (tabla 19).

Tabla 19. Variantes observadas en los PTs obtenidos en el estudio.

<i>Pulsotipos</i>	<i>Nº subtipos</i> ^a	<i>Pulsotipos</i>	<i>Nº subtipos</i> ^a
1	11	19	0
2	4	20	0
3	0	21	0
4	0	22	8
5	0	23	0
6	2	24	0
7	6	25	0
8	0	26	0
9	0	27	2
10	0	28	0
11	2	29	3
12	0	30	0
13	3	31	0
14	0	32	0
15	0	33	0
16	0	34	2
17	2	35	2
18	2		

^a El número de subtipos igual a 0 corresponde a aquellos PTs con un único perfil, sin variación. El número de subtipos igual a 2 corresponde a aquellos PTs con dos variantes (p. ej. 1a y 1b). etc.

El hecho de que algunos pulsotipos presentaran mayor variación que otros podría deberse a varios factores. En primer lugar, el genoma de las bacterias es inestable pudiéndose acumular variaciones con el tiempo. De acuerdo con ello, los pulsotipos que persistían durante mayor período de tiempo tendrían mayor oportunidad para divergir. Por otra parte, el número de veces en los que se aislaba un determinado pulsotipo podría influir en la capacidad para detectar variaciones en el mismo. Finalmente, determinados autores han sugerido que en una población pueden existir clones o linajes con una mayor o menor capacidad para divergir²⁹.

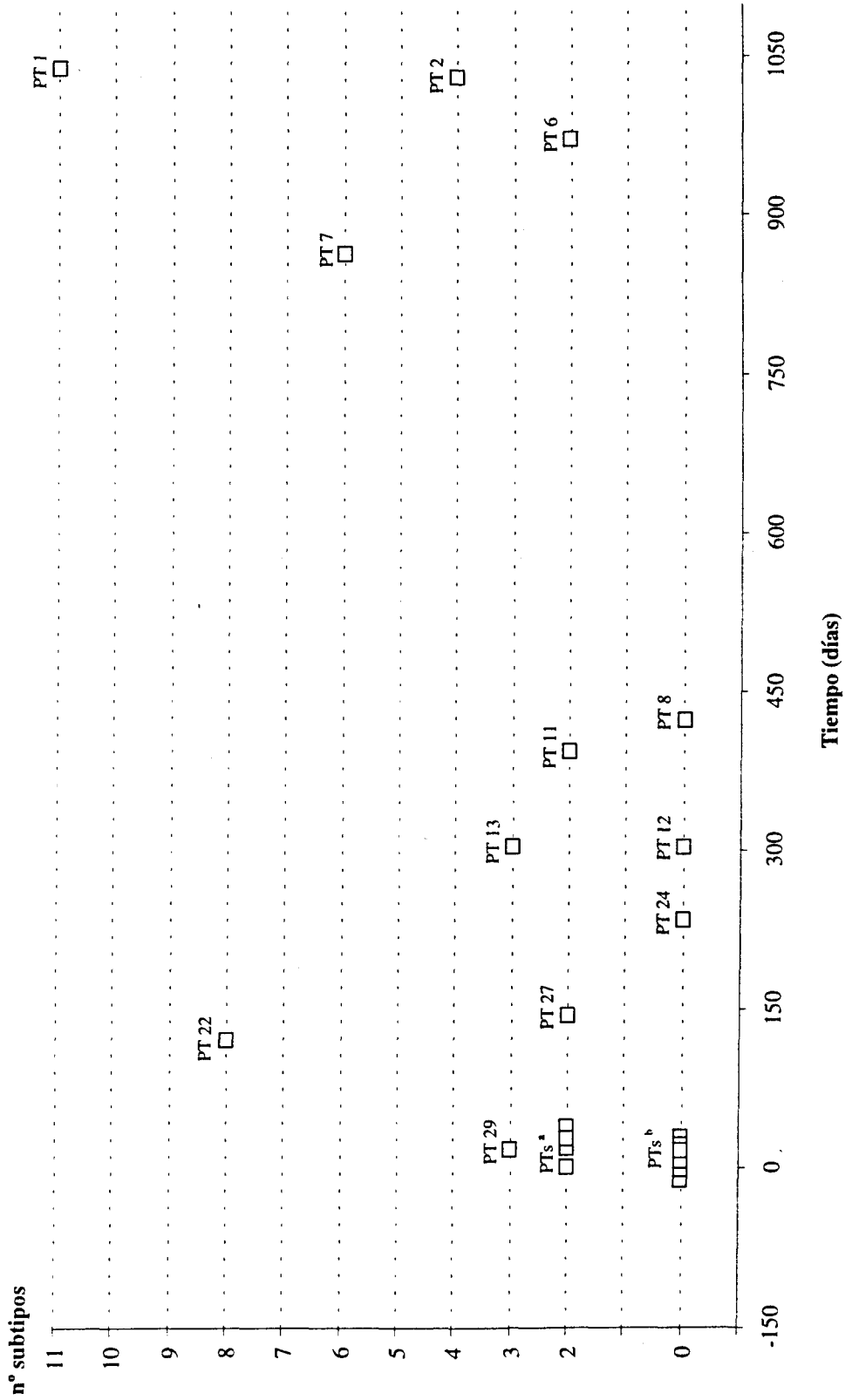
Los resultados obtenidos se analizaron con relación a estas hipótesis de la siguiente forma:

- a. El grado de relación que podía existir entre la variación detectada en los distintos PTs y el tiempo de persistencia de los mismos se analizó mediante el coeficiente de correlación de Spearman. En la figura 14 se representa el número de subtipos (o variantes) aparecido en cada uno de los PTs obtenidos en el estudio en función de su tiempo de persistencia. Los PTs que caracterizaban las cepas de *P. aeruginosa* obtenidos de una forma puntual (PTs 3, 4, 5, 9, 14, 20, 23, 26, 30, 31, 32 y 33) no se consideraron en el análisis. Respecto al resto de los PTs se calculó el período de tiempo existente entre la primera y la última fecha de su obtención. Como número de subtipos igual a 0 se consideró a todos aquellos PTs que mostraban un único perfil sin variación (PTs 8, 10, 12, 15, 16, 21, 24, 25 y 28).

El valor obtenido para dicho coeficiente (r_s : 0,508; P: 0,016) estimó que la relación entre ambas variables era significativa (se consideró una correlación significativa al nivel 0,05). Ello podría indicar que el número de subtipos o variantes detectado estaría relacionada de forma directa y creciente con el tiempo.

- b. El análisis de la influencia de la frecuencia de aislamiento de los distintos PTs con la detección de una mayor variación, se refleja en la figura 15. Se contabilizaron el número de cultivos donde se aislaron los distintos PTs. Los pulsotipos considerados fueron los mismos que los citados en el análisis anterior. De tal forma, no se incluyeron aquellos PTs obtenidos de forma puntual. Igualmente, todos aquellos PTs que mostraban perfiles sin variación se englobaron en la categoría número de subtipos igual a 0. Nueve PTs mostraron tal característica y se obtuvieron en un número de cultivos que oscilaba entre 2 y 25. Siete PTs mostraron dos subtipos, aislándose con una frecuencia similar a los anteriores (entre 4 y 16 cultivos). Dos PTs, que mostraban 3 subtipos, fueron obtenidos en 3 y 19 cultivos, respectivamente. Los 4 PTs restantes mostraron 4, 6, 8 y 11 variantes de sus perfiles, siendo obtenidos en 136, 22, 36 y 82 cultivos, en cada caso. En esta ocasión, la aplicación del coeficiente de correlación de

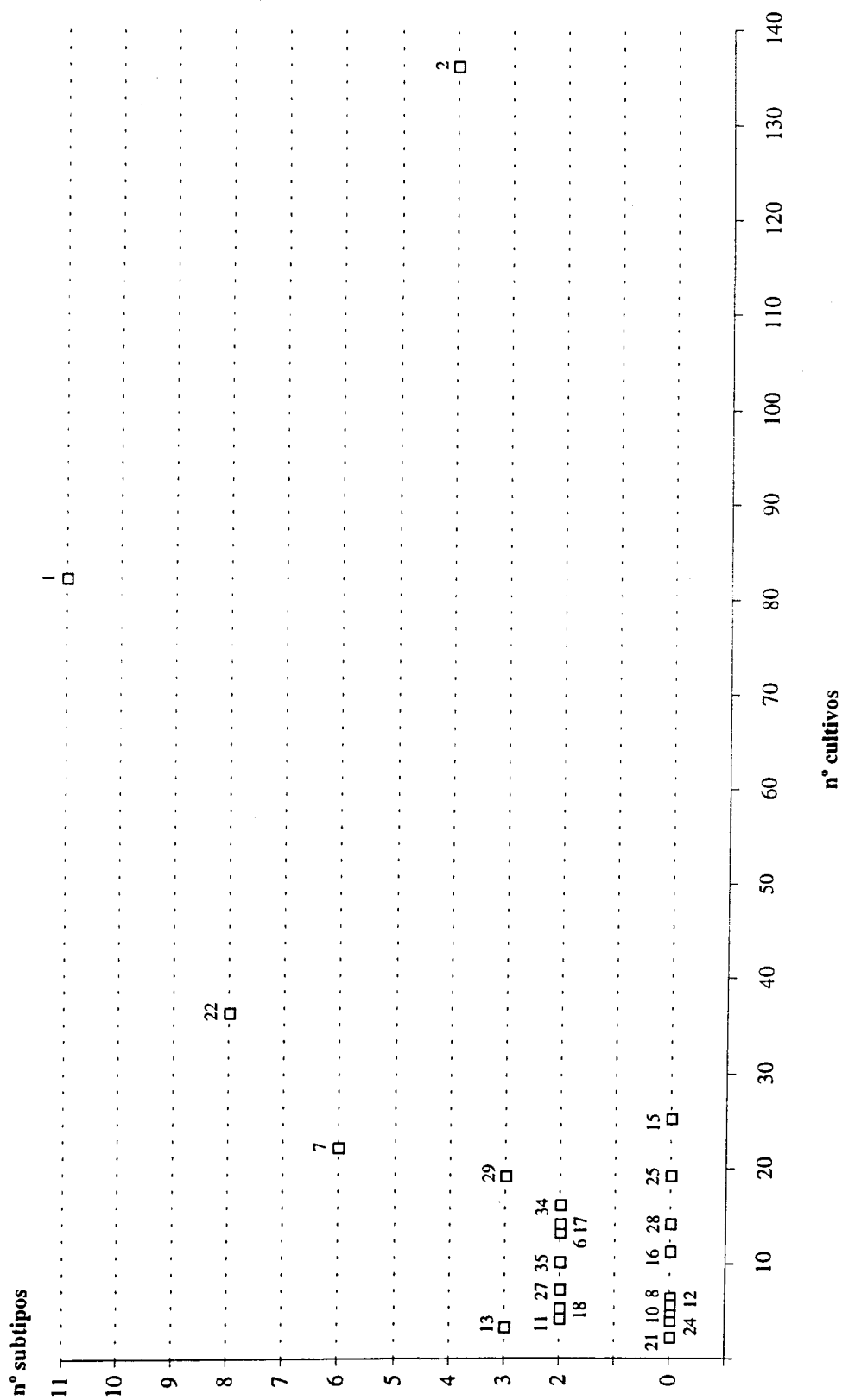
Spearman también estimó que la relación entre las variables consideradas era significativa (r_s : 0,470; P: 0,027). Por lo tanto, la capacidad para detectar variación también podría estar relacionada de forma directa y creciente con la mayor frecuencia de aislamiento de los pulsotipos.



^a PTs 17, 18, 34 y 35.

^b PTs 10, 15, 16, 21, 25 y 28.

Figura 14. Variación manifestada por los diferentes pulsotipos durante el período de estudio.



El número situado encima o debajo de cada cuadro indica el número del PT correspondiente.

Figura 15. Variación detectada en los diferentes pulstipos en función de la frecuencia de aislamiento.

4.3 Colonización por *P. aeruginosa*

De los 72 pacientes incluidos en el estudio, 39 (54,2 %) fueron colonizados por *P. aeruginosa*. En el mes de enero de 1999, la prevalencia de la colonización fue de 34,8 % de los pacientes con una densidad de colonización de 37,8 por 100 días de ventilación mecánica. En estos pacientes se pudieron reconocer dos patrones diferentes: (i) 23 pacientes (59 %) fueron colonizados por un único pulsotipo. En 10 de estos pacientes la colonización se produjo de forma puntual, observándose en uno de estos 10 pacientes la aparición de dos subtipos del PT identificado. En los otros 13 pacientes la colonización persistió de 2 a 12 días. En 9 de estos pacientes se conservó el pulsotipo, mientras que en 4 pacientes aparecieron varios subtipos en el PT determinado. En uno de estos 4 pacientes los diferentes subtipos aparecieron simultáneamente y en 3 a lo largo del tiempo. (ii) 16 pacientes (41 %) se colonizaron por dos o más pulsotipos diferentes. Ocho pacientes fueron colonizados por dos o tres PTs de forma puntual o con una persistencia máxima (de alguno de los PTs) de 9 días. En los 8 pacientes restantes, la colonización se produjo por un PT persistente (entre 6 y 21 días) y uno o dos PTs transitorios diferentes. En 5 de estos 8 pacientes se apreció la aparición de variantes de uno o varios de los pulsotipos conforme transcurría la colonización (tabla 20).

Tabla 20. Distribución de los PTs tras el análisis mediante PFGE de los aislamientos de *P. aeruginosa* procedentes de los pacientes colonizados.

<i>Paciente</i>	<i>Nº total de aislamientos</i> ^a	<i>Período de seguimiento (días)</i> ^b	<i>PT</i> ^c	<i>Nº de aislamientos</i> ^d	<i>Persistencia del PT (días)</i> ^e
2	16	5	1a	14	1
			2a	2	1
4	8	9	1a	1	1
			2a	3	1
			3	4	1
5	16	6	1a	4	1
			2a	8	1
			4	4	1
6	10	21	1a	3	3
			2a	7	9
7	4	3	2a	4	1
8	17	3	6a	17	2
11	9	3	1b	9	1
13	16	4	1b	16	1
14	4	6	2a	4	1
16	4	11	2a	4	1
18	14	12	10	14	3
21	12	11	11a	12	1
22	12	7	2a	12	1
26	8	15	12	8	1
31	12	5	1c	8*	3
32	8	9	1c	8	3
36	8	7	2a	8	1
43	92	19	1c	6	6
			15	86	15
53	39	4	16	39	3
55	68	21	2b	3	3
			17b	38	6
			18a	18	21
			18b	9	9
57	52	8	22a	9	6
			22b	36	6
			19	2	1
			21	5	3
66	8	15	2a	8	9
68	28	19	1a	10	15
			1h	1	1
			2a	6	9
			2b	3	1
			2d	8	3
69	64	17	2a	64	9
71	16	11	1c	13	6
			1i	3	1
72	61	14	2b	2	9
			25	59	9

Tabla 20. (continuación)

<i>Paciente</i>	<i>Nº total de aislamientos^a</i>	<i>Período de seguimiento (días)^b</i>	<i>PT^c</i>	<i>Nº de aislamientos^d</i>	<i>Persistencia del PT (días)^e</i>
73	12	9	1a	4	1
			2b	4	1
			26	4	1
75	85	16	22a	62	12
			22b	2	3
			22c	7	12
			22d	3	3
			22e	1	1
			22f	1	1
			22g	8	6
			22h	1	1
76	8	16	1c	2	1
			2a	6	3
77	21	9	1a	6	3
			1j	4	1
			2a	3	1
			2b	8	1
78	37	15	28	37	6
82	4	16	2a	3	1
			2b	1	1
83	74	21	1a	2	1
			29a	67	12
			29b	4	1
			29c	1	1
86	32	9	7f	28	6
			17b	4	1
88	73	21	2a	12	9
			34a	60	12
			34b	1	1
89	44	9	2a	44	6
90	40	6	35a	34	3
			35b	6	3
92	32	8	7d	1	1
			7f	31	3
94	36	5	1a	1	1
			1k	4	1
			6b	31	3

^a n° total de aislamientos teniendo en cuenta que se estudian un máximo 4 colonias por cada cultivo positivo de las diferentes localizaciones estudiadas.

^b Período comprendido desde el ingreso y la intubación del paciente hasta el fin del estudio.

^c Los PTs tipo se han designado con un número y sus variantes (subtipos) se han designado con letras.

^d N° de aislamientos caracterizados por un determinado PT o subtipo.

^e Intervalo de tiempo entre la primera y la última fecha de aislamiento del PT determinado.

* En el paciente 31, 4 de los aislamientos no pudieron analizarse debido a repetidas lisis del DNA.