

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

4.3.1 Colonización al inicio de la ventilación mecánica

En 10 de los 39 pacientes colonizados por *P. aeruginosa* se demostró colonización al inicio de la ventilación mecánica. Durante el seguimiento de estos pacientes se comprobó que dos pacientes se colonizaron por aislamientos que presentaban pulsotipo(s) distinto(s) al inicial durante el período de ventilación. Con relación a las localizaciones colonizadas, el estómago, la faringe y las secreciones subglóticas se encontraban colonizadas en 6 de los 10 pacientes, el tubo endotraqueal y la tráquea en 5 pacientes y el recto en 2 pacientes. En total se obtuvieron 13 cepas que se distribuyeron en 11 PTs, ya que en dos pares de pacientes alguna de las cepas identificadas presentaban el mismo PT (tabla 21).

En relación con el *origen* de la colonización (de acuerdo con las definiciones expuestas en el apartado 2.6, del capítulo de *material y métodos*), 7 de las cepas se consideraron propias del paciente colonizado (6 pacientes). Las 6 cepas restantes mostraron un origen exógeno: en 3 pacientes los PTs identificados coincidían con los obtenidos en el grifo de los *boxes* donde permanecían ingresados, mientras que en los otros 3 pacientes eran similares a los encontrados previamente en las superficies y/o manos del personal sanitario y/o otros pacientes y/o grifos de otros *boxes* de la unidad. Dos pacientes fueron colonizados simultáneamente por cepas propias y de origen exógeno (tabla 21).

Tabla 21. Día del primer aislamiento y origen de *P. aeruginosa* en los pacientes colonizados al inicio de la VM.

Paciente	PT ^c	Grifo ^d	Localizaciones colonizadas ^e						Origen ^f	
			E	F	SG	TET	T	CB		R
8 ^{ab}	1	(1)								
	5	(1)								
	6		(1)		(1)	(1)	(1)	(2)	P	
31	1	(1)	(1)						E	
53 ^{ab}	1	(1)								
	2	(1)								
	16		(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(5)	P	
55	18							(1)	P	
57 ^a	22	(1)	(1)	(1)	(3)	(3)	(3)		(3)	E
	19								(1)	P
	21								(1)	P
75 ^a	22		(1)	(1)	(1)	(3)	(1)			E
88 ^a	2	(1)		(1)	(6)				(9)	E
	34		(3)	(3)	(1)	(1)	(1)			P
90 ^a	1	(1)								
	35		(1)	(1)	(1)	(1)	(1)			P
92 ^{ab}	1	(1)								
	2	(1)								
	7		(3)	(3)	(3)	(1)	(3)	(6)	(3)	E
94 ^{ab}	1	(1)								
	6		(3)	(1)	(1)	(3)	(3)	(5)		E

^a Pacientes con colonización del tracto respiratorio inferior.

^b Pacientes con diagnóstico de NAV.

^c PTs obtenidos en los grifos de los *boxes* y en las localizaciones anatómicas estudiadas. La nomenclatura de los PTs es temporal respecto al total de los aislamientos del estudio.

^d Día del primer aislamiento de los PTs obtenidos en el grifo del *box* (PTs 1, 2, 5 y 22).

^e Día del primer aislamiento de los PTs obtenidos en las localizaciones estudiadas: E: estómago; F: faringe; SG: secreciones subglóticas; TET: tubo endotraqueal; T: tráquea; CB: secreciones respiratorias obtenidas mediante cepillado bronquial; R: recto.

^f E: exógena (PTs coincidentes con los encontrados en los grifos y/o superficies y/o manos y/o otros pacientes (PTs 1, 2, 6, 7 y 22)); P: propia del paciente (PTs 6, 16, 18, 19, 21, 34 y 35).

En **negrita**, los dos pacientes (55 y 94) que se colonizaron con cepa(s) diferente(s) durante su estancia en la UCI.

4.3.2 Colonización adquirida durante la ventilación mecánica

Un total de 31 pacientes (79,5 %; 31/39) se colonizaron por *P. aeruginosa* durante el período de VM. Veintidós pacientes presentaban múltiples localizaciones colonizadas y en muchas ocasiones de forma simultánea. Por otra parte, 9 pacientes mostraron una única localización colonizada (8 pacientes presentaban colonización gástrica y uno de la faringe).

❖ Frecuencia de colonización

Se observaron diferencias respecto a la frecuencia de colonización de las diferentes localizaciones anatómicas estudiadas. Tal y como se refleja en la figura 16, el estómago se colonizó en 26 de los 31 pacientes (84 %). La faringe y las secreciones subglóticas se colonizaron con una frecuencia similar, en 17 (55 %) y 16 (51,6 %) pacientes, respectivamente. De la misma forma, aunque con valores algo inferiores, se comportaron la tráquea y el tubo endotraqueal. Se colonizaron en 13 (42 %) y 11 (35,5 %) pacientes, respectivamente. Solamente en 9 ocasiones (29 %) se aisló *P. aeruginosa* del recto.

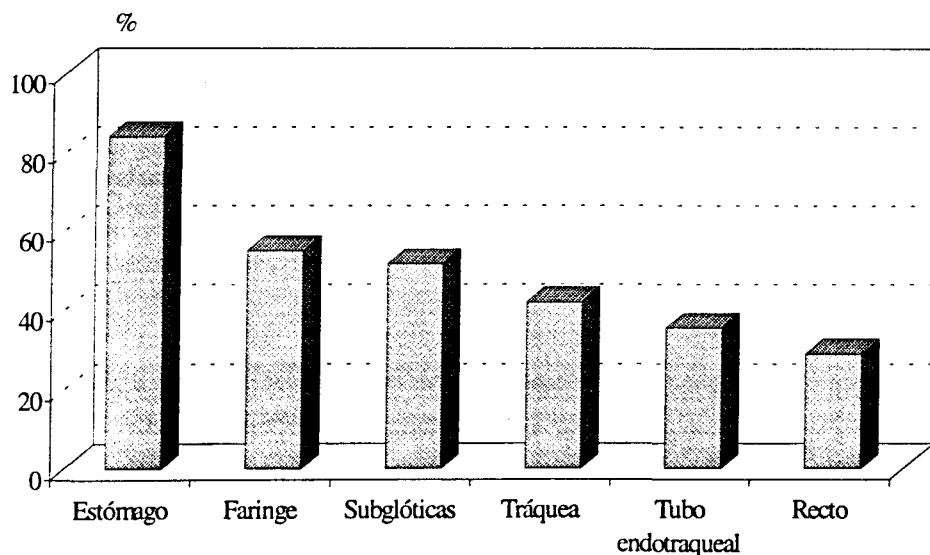


Figura 16. Frecuencia de la colonización por *P. aeruginosa*.

Otro aspecto analizado fue el *período de tiempo* que transcurría hasta la obtención del primer aislamiento de *P. aeruginosa* en cada una de las localizaciones estudiadas. Tal y como se refleja en la tabla 22, la localización que se colonizó en primer lugar fue el estómago. Posteriormente se colonizaban la faringe, las secreciones subglóticas y la tráquea (estas dos últimas casi en el mismo período). El tubo endotraqueal junto con el recto fueron las localizaciones que tardaron más tiempo en ser colonizadas.

Tabla 22. Promedio de días transcurridos hasta la colonización de las localizaciones estudiadas.

<i>Localizaciones</i>	<i>Promedio de días transcurridos</i>
Estómago	4,6 ± 3,7 (intervalo: 3 a 15 días)
Faringe	5,5 ± 4,4 (intervalo: 3 a 18 días)
Secreciones subglóticas	6,2 ± 4,5 (intervalo: 3 a 18 días)
Tráquea	6,8 ± 4,6 (intervalo: 3 a 21 días)
Tubo endotraqueal	7,7 ± 4,9 (intervalo: 3 a 21 días)
Recto	8,0 ± 5,4 (intervalo: 3 a 18 días)

Una vez realizado el análisis mediante PFGE en los 31 pacientes colonizados se observó que, 18 pacientes fueron colonizados por un único pulstipo, por consiguiente, 13 pacientes fueron colonizados por más de un pulstipo. Respecto a la variabilidad genotípica del total de cepas aisladas (n= 47), se identificaron 14 PTs diferentes como consecuencia de que varios pacientes estaban colonizados por cepas que mostraban el mismo PT. No obstante, dicha variabilidad genotípica fue distinta en las diferentes localizaciones. De tal forma, en la tabla 23 puede observarse como las 35 cepas aisladas del estómago se distribuían en 7 pulstipos diferentes, mientras que las 13 cepas aisladas de la tráquea y las 9 del recto, lo hacían en 10 y 8 pulstipos, respectivamente.

Tabla 23. Número de cepas de *P. aeruginosa* aisladas en las localizaciones anatómicas colonizadas.

<i>Localizaciones</i>	<i>Nº de cepas totales</i> ^a	<i>PTs diferentes</i>
Estómago	35	7
Faringe	20	9
Secreciones subglóticas	17	10
Tráquea	13	10
Tubo endotraqueal	12	10
Recto	9	8

^a Número total de cepas obtenidas en cada una de las localizaciones colonizadas.

❖ *Origen de la colonización*

El origen de la colonización detectada en los 31 pacientes durante el período de VM se determinó tras el análisis mediante PFGE y de acuerdo con las definiciones expuestas en el apartado 2.6 del capítulo de *material y métodos*. A continuación se detallan los resultados obtenidos para cada una de las localizaciones colonizadas.

✓ *Estómago*

De las 35 cepas de *P. aeruginosa* aisladas, en 34 (6 PTs) se determinó un origen exógeno (25 pacientes) mientras que una cepa (1 PT) se consideró como propia del enfermo (1 paciente). Respecto a las cepas de origen exógeno: alguno o todos los PTs identificados en 19 pacientes, coincidían con los obtenidos en el grifo de los *boxes* donde permanecían ingresados, mientras que en el resto de los pacientes (n= 6) eran similares a los encontrados previamente en las superficies y/o manos del personal sanitario y/o grifos de otros *boxes* de la unidad (tabla 24).

✓ *Faringe*

Respecto a las 20 cepas obtenidas, 18 (7 PTs) presentaban un origen exógeno (16 pacientes) y 2 cepas (2 PTs) se consideraron propias del paciente colonizado (2 pacientes). Un paciente estaba colonizado simultáneamente por una cepa de origen exógeno y una cepa propia. Con referencia a las cepas de origen exógeno, alguno o todos los PTs identificados en 11 pacientes, coincidían con los obtenidos en el grifo de los *boxes* donde permanecían ingresados, mientras que en los 5 pacientes restantes eran similares a los encontrados previamente en las superficies y/o manos del personal sanitario y/o grifos de otros *boxes* de la unidad (tabla 24).

✓ *Secreciones subglóticas*

De las 17 cepas aisladas, 14 (7 PTs) presentaban un origen exógeno (13 pacientes) y 3 cepas (3 PTs) se consideraron propias del paciente colonizado (3 pacientes). Con referencia a las cepas de origen exógeno, alguno o todos los PTs identificados en 9 pacientes, coincidían con los obtenidos en el grifo del *box* donde permanecían ingresados, mientras que en los 4 pacientes restantes eran similares a los encontrados previamente en las superficies y/o manos del personal sanitario y/o grifos de otros *boxes* de la unidad (tabla 24).

✓ *Tráquea*

De las 13 cepas de *P. aeruginosa* identificadas en la tráquea, 10 (7 PTs) presentaban un origen exógeno (10 pacientes) y 3 cepas (3 PTs) se consideraron propias del paciente colonizado (3 pacientes). Con referencia a las cepas de origen exógeno, los PTs identificados en 6 pacientes, coincidían con los obtenidos en el grifo del *box* donde permanecían ingresados, mientras que en los 4 pacientes restantes eran similares a los encontrados previamente en las superficies y/o manos del personal sanitario y/o grifos de otros *boxes* de la unidad (tabla 24).

✓ *Tubo endotraqueal*

Con referencia a las 12 cepas aisladas, 9 (7 PTs) presentaban un origen exógeno (8 pacientes) y 3 cepas (3 PTs) se consideraron propias del paciente colonizado (3 pacientes). Con referencia a las cepas de origen exógeno, los PTs identificados en 6 pacientes, coincidían con los obtenidos en el grifo del *box* donde permanecían ingresados, mientras que los 2 pacientes restantes eran similares a los encontrados previamente en las superficies y/o manos del personal sanitario y/o grifos de otros *boxes* de la unidad (tabla 24).

✓ *Recto*

Respecto a las 9 cepas aisladas, 6 (7 PTs) presentaban un origen exógeno (6 pacientes) y 3 cepas (3 PTs) se consideraron propias del paciente colonizado (3 pacientes). Con referencia a las cepas de origen exógeno, los PTs identificados en 4 pacientes, coincidían con los obtenidos en el grifo del *box* donde permanecían ingresados, mientras que en los 2 pacientes restantes eran similares a los encontrados previamente en las superficies y/o manos del personal sanitario y/o grifos de otros *boxes* de la unidad (tabla 24).

Tabla 24. Secuencia, día del primer aislamiento y origen de las cepas de *P. aeruginosa* en los pacientes colonizados durante la ventilación mecánica.

Paciente	PT ^c	Grifo ^d	Localizaciones colonizadas ^e						Origen ^f
			E	F	SG	TET	T	CB	
2 ^{ab}	1	(1)	(3)	(3)		(3)	(3)		E
	2	(1)	(3)	(3)					E
4 ^b	1	(1)	(6)						E
	2	(1)	(6)						E
	3						(7)		P
5	1		(3)						E
	2	(3)		(3)	(3)				E
	4							(3)	P
6	1	(6)	(15)						E
	2	(6)	(12)						E
7	2	(3)	(3)						E
11 ^a	1			(3)	(3)		(3)		E
	2	(1)							
13	1		(3)	(3)	(3)			(3)	E
	2	(1)							
14	2	(1)	(3)						E
16	2	(1)		(6)					E
18	1	(1)							
	10			(6)	(6)			(9)	P
21 ^a	2	(1)							
	11				(9)	(9)	(9)		P
22	2	(1)	(3)	(3)	(3)				E
26 ^a	12					(9)	(9)		P
32	1		(3)						E
36	2	(3)	(6)	(6)					E
43 ^a	1		(9)						E
	14	(1)							
	15		(3)	(9)	(9)	(9)	(9)	(9)	E
55 ^a	2	(1)	(15)						E
	17	(1)	(15)	(18)	(18)	(21)	(21)	(18)	E
66	2	(3)	(3)						E
68	1	(1)	(3)						E
	2	(1)	(9)					(15)	E
	23	(1)							
69 ^a	1	(1)							
	2	(3)	(6)	(6)	(9)	(12)	(6)		E
71	1	(1)	(3)		(3)				E

Tabla 24. (continuación)

Paciente	PT ^c	Grifo ^d	Localizaciones colonizadas ^e						Origen ^f
			E	F	SG	TET	T	CB	
72 ^a	2	(1)	(3)				(12)		E
	24	(3)							
	25	(9)	(3)	(6)	(3)	(6)	(3)		E
73	1		(3)						E
	2	(1)	(6)						E
	26							(6)	P
76	1	(1)	(12)						E
	2	(1)	(9)						E
77 ^a	1		(6)	(3)	(3)		(6)		E
	2	(1)		(6)	(3)				E
	27	(1)							
78 ^a	28	(1)	(3)	(6)	(9)	(9)	(9)	(6)	E
82	2	(1)	(12)						E
83 ^{ab}	1			(3)					E
	2	(1)							
	27	(9)							
	29		(3)	(3)	(6)	(6)	(6)	(17)	P
86 ^{ab}	2	(1)							
	7			(3)	(3)	(6)	(6)	(8)	E
	17		(6)						E
89 ^a	2	(1)	(3)	(9)	(3)	(6)	(3)		E
	24	(1)							
94	1	(1)	(3)					(3)	E

^a Pacientes con colonización del tracto respiratorio inferior.

^b Pacientes con diagnóstico de NAV.

^c Pulsotipos (PTs) obtenidos en los cultivos procedentes de los grifos de los *boxes* y de las localizaciones anatómicas estudiadas. La nomenclatura de los PTs es temporal respecto al total de los aislamientos del estudio.

^d Día del primer aislamiento de los PTs obtenidos de los grifos en cada *box* (PTs 1, 2, 14, 17, 22, 23, 24, 25, 27 y 28).

^e Día del primer aislamiento de los PTs obtenidos en las diferentes localizaciones estudiadas: E: estómago; F: faringe; SG: secreciones subglóticas; TET: tubo endotraqueal; T: tráquea; CB: secreciones respiratorias obtenidas mediante cepillado bronquial; R: recto.

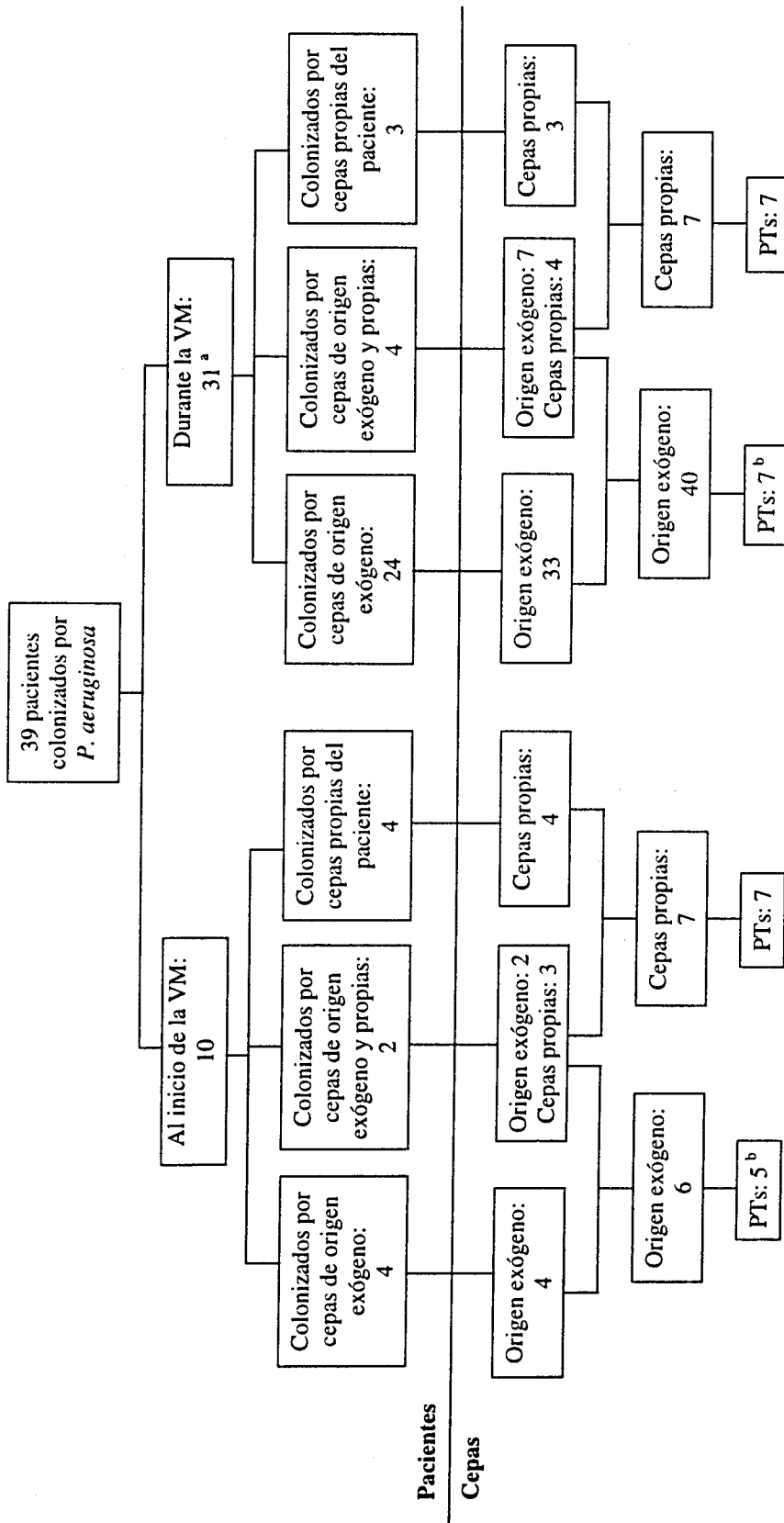
^f Origen de la cepa de *P. aeruginosa* aislada en los pacientes, E: exógena (PTs coincidentes con los encontrados en los grifos y/o superficies y/o manos (PTs 1, 2, 7, 15, 17, 25 y 28); P: propia del paciente (PTs 3, 4, 10, 11, 12, 26 y 29).

En resumen, en todas las localizaciones estudiadas la mayoría de las cepas aisladas mostraban un origen exógeno (tabla 25). No obstante, fue en el estómago donde se observó de forma más patente la influencia del ambiente en su colonización, ya que el 97 % de las cepas aisladas eran de origen exógeno. En el resto de las localizaciones se observó el mismo comportamiento aunque los porcentajes fueron algo menores.

Tabla 25. Resumen del origen de las cepas de *P. aeruginosa*

Localizaciones	Nº total de cepas	Origen	
		Exógeno (%)	Propia del paciente (%)
Estómago	35	34 (97)	1 (3)
Faringe	20	18 (90)	2 (10)
Subglóticas	17	14 (82,4)	3 (17,6)
Tráquea	13	10 (77)	3 (23)
Tubo endotraqueal	12	9 (75)	3 (25)
Recto	9	6 (67)	3 (33)

Finalmente, los **resultados globales** referidos al origen de la colonización en los 39 pacientes colonizados por *P. aeruginosa*, se reflejarían en la figura 17. En los 10 pacientes colonizados al inicio de la VM, el 54 % de las cepas aisladas fueron consideradas como propias de los enfermos y el 46 % procederían del ambiente de la UCI. Respecto a los pacientes cuya colonización se detectó durante la ventilación mecánica, el 85 % de las cepas obtenidas poseían un origen exógeno y el resto de las cepas (15 %) fue considerado como propias de los pacientes colonizados.



^a Dos de los 31 pacientes estaban colonizados al inicio de la VM pero se colonizaron con cepa(s) diferente(s) durante el desarrollo de la misma.

^b El número de PTs distintos de origen exógeno es 9. La suma del total de PTs es superior a los 22 descritos debido a que un PT se consideró propio y de origen exógeno.

Abreviaturas: VM, ventilación mecánica; PT: pulso tipo.

Figura 17. Origen de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de los 39 pacientes colonizados.

❖ *Colonización del tracto respiratorio inferior durante la ventilación mecánica*

En nuestro estudio, de los 31 pacientes en los que se detectó colonización durante la VM, 13 presentaron colonización del tracto respiratorio inferior (tráquea) por *P. aeruginosa* (tabla 24, pág. 163). La ruta de colonización de la tráquea se determinó basándose en la cronología de la obtención de los diferentes pulsotipos en las muestras clínicas estudiadas. En tres pacientes se demostró una colonización gástrica previa. En 2 pacientes se produjo colonización previa de las vías respiratorias altas (faringe y/o secreciones subglóticas). En ningún caso se demostró colonización rectal previa a la colonización respiratoria.

En el resto de los pacientes no se pudo establecer de forma clara el lugar inicial de la colonización dado que:

- En 5 pacientes se produjo colonización gástrica simultáneamente a la colonización de las vías respiratorias altas.
- En dos pacientes se encontró colonización simultánea de las vías respiratorias altas y la tráquea.
- En un paciente se produjo colonización simultánea del tubo endotraqueal y de la tráquea.

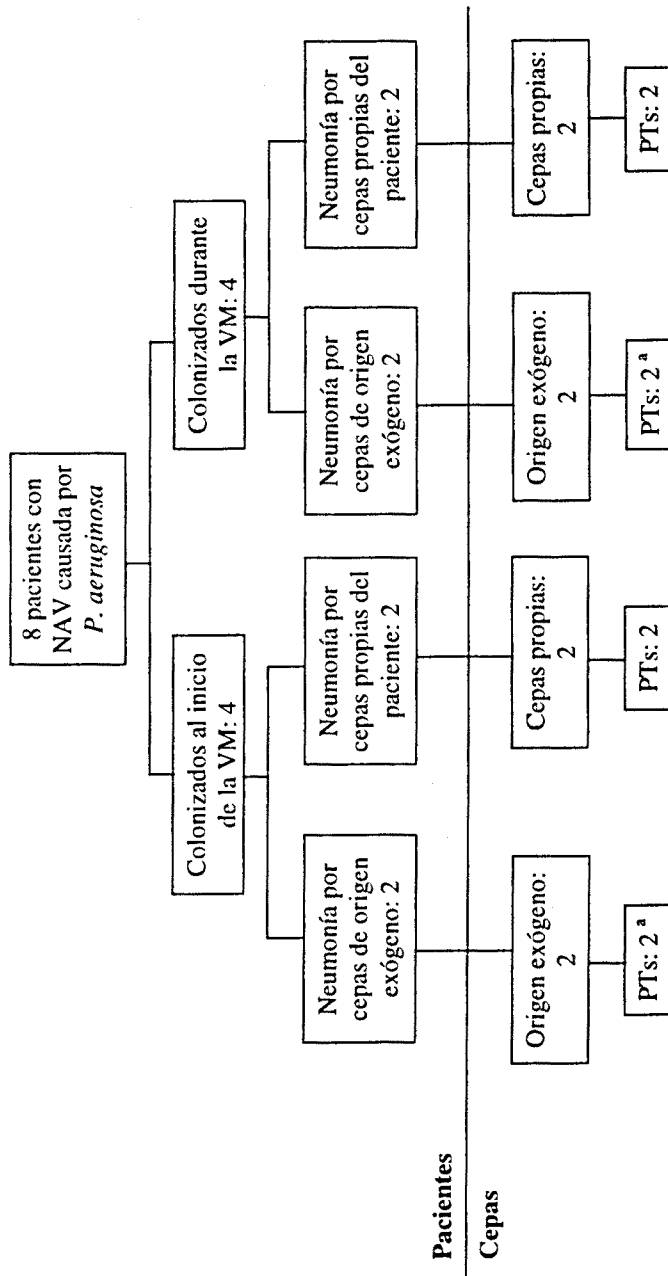
4.3.3 Pacientes con diagnóstico de NAV

Ocho (11,1 %) de los 72 pacientes incluidos en el estudio desarrollaron neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV) por *P. aeruginosa*. El diagnóstico de la neumonía se efectuó como media a los $6,9 \pm 4,45$ días (mediana: 5,5; intervalo: 2 a 17 días) desde el momento de la instauración de la ventilación mecánica. Sólo un paciente presentó neumonía antes de los 5 días de VM.

En todos los pacientes se identificó una única cepa como causante de la NAV. No obstante, se identificaron un total de 6 PTs dado que, en dos pares de pacientes la cepa causante de la infección pertenecía al mismo PT (figura 19). Cinco pacientes presentaban, además, una o más localizaciones colonizadas por uno o más pulsotipos diferentes al causante de la infección (tabla 21, pág. 157; tabla 24, pág. 163).

Con respecto al *origen* de las cepas de *P. aeruginosa* causantes de neumonía (según las definiciones del apartado 2.6, del capítulo de *material y métodos*), en 4 ocasiones la cepa se consideró como propia del enfermo. En el resto de los casos las cepas mostraban un origen exógeno: en un paciente el PT identificado coincidía con el encontrado en el grifo de su propio *box* mientras que en los otros 3 pacientes eran similares a los encontrados previamente en las superficies (n= 2) y en otro paciente (n= 1) (tabla 21, pág. 157; tabla 24, pág. 163; figura 19).

Siete de los 8 pacientes con NAV presentaban colonización del tracto respiratorio superior e inferior (tráquea) por la cepa causante de la infección con anterioridad al diagnóstico de neumonía. El promedio de días que transcurrieron desde el primer aislamiento de *P. aeruginosa* en la tráquea hasta el diagnóstico de la NAV fue de $3,6 \pm 3,4$ días (intervalo: 1 a 11 días) (figura 20). Asimismo, se demostró colonización del estómago previa al diagnóstico en 6 pacientes y del recto en un paciente. Uno de los 8 pacientes únicamente mostraba colonización gástrica previa al diagnóstico de NAV, pero por una cepa distinta a la causante de la infección (tabla 21, pág. 157; tabla 24, pág. 163). Con referencia a la ruta de adquisición de la cepa causante de la infección, las vías respiratorias altas (faringe y/o secreciones subglóticas) fueron el lugar inicial de colonización en 2 de los 8 pacientes con NAV. En otros 4 pacientes se detectó también colonización gástrica simultánea y, además, 3 de estos 4 pacientes presentaban colonización compartida de la tráquea. En un paciente el tubo endotraqueal fue el primer lugar colonizado y el resto de las localizaciones se colonizaron posteriormente. En el paciente restante, la cepa causante de la infección se detectó únicamente en las secreciones respiratorias obtenidas mediante cepillado bronquial (tabla 21, pág. 157; tabla 24, pág. 163). Por tanto, en ningún caso el estómago y el recto fueron el primer lugar colonizado.



^a El número de PTs distintos de origen exógeno es 3. La suma del total de PTs es superior a 6 dado que 2 pacientes (al inicio y durante la VM) mostraban el mismo PT. Además un mismo PT se consideró como propio y de origen exógeno.

Abreviaturas: NAV, neumonía asociada a ventilación mecánica; VM, ventilación mecánica; PT: pulso tipo.

Figura 19. Origen de las cepas de *P. aeruginosa* causantes de NAV.

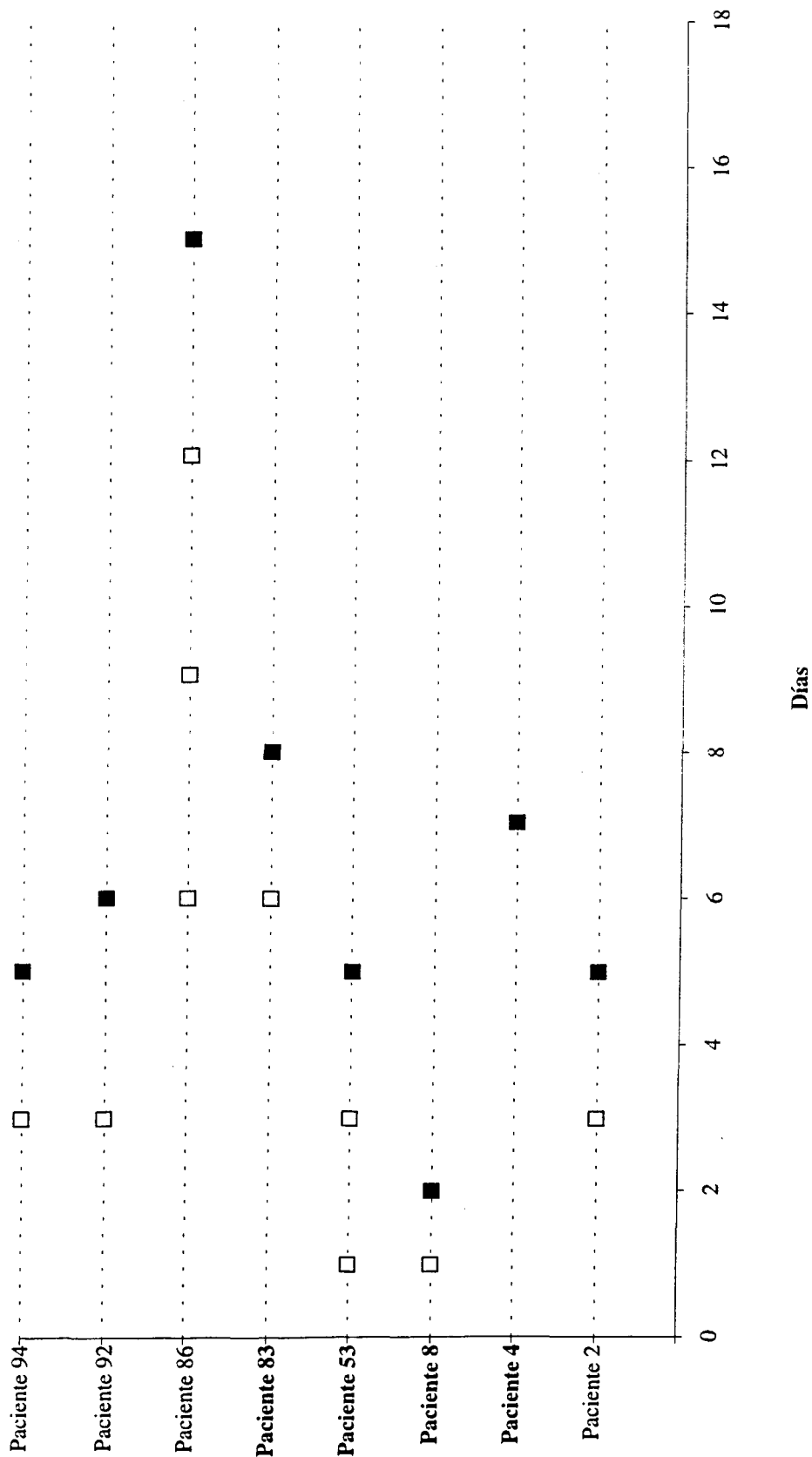


Figura 20. Secuencia de aislamiento de *P. aeruginosa* de la traquea previo al diagnóstico de la NAV. El momento del diagnóstico de la NAV se indica con un cuadro negro. Los pacientes colonizados con cepas propias se indican en **negrita**.

4.3.4 Características epidemiológicas de los pacientes incluidos en el estudio

En la tabla 26 se refleja los resultados obtenidos al comparar los 72 pacientes en función de si mostraban colonización exógena por cepas de *P. aeruginosa* o no. Los 2 grupos comparados constaban de 33 pacientes colonizados por cepas de *P. aeruginosa* exógenas y 39 pacientes colonizados por cepas propias o no colonizados por *P. aeruginosa*. No se observaron diferencias entre ambos grupos de pacientes con relación a las características: edad, el valor del pH gástrico, coma, shock, politraumatismo, EPOC, EAP, cirugía, hepatopatía, inmunodepresión, nutrición parenteral, neoplasia, diabetes, profilaxis con ranitidina y profilaxis con sucralfato. Se apreciaron diferencias de distribución en los dos grupos para las variables Apache II al ingreso, SDRA y dieta enteral, aunque sin llegar a ser significativas desde un punto de vista estadístico (tabla 26).

Se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes considerados respecto a las variables: duración de la estancia en la UCI y el tratamiento con cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima y ceftriaxona) (tabla 26). Se entiende por estancia en la UCI, la duración total del ingreso del paciente hasta el *exitus* o el traslado y no el tiempo previo a la colonización. En la figura 21 se muestra una curva de supervivencia en la que se relaciona la colonización exógena con el tiempo de exposición a riesgo.

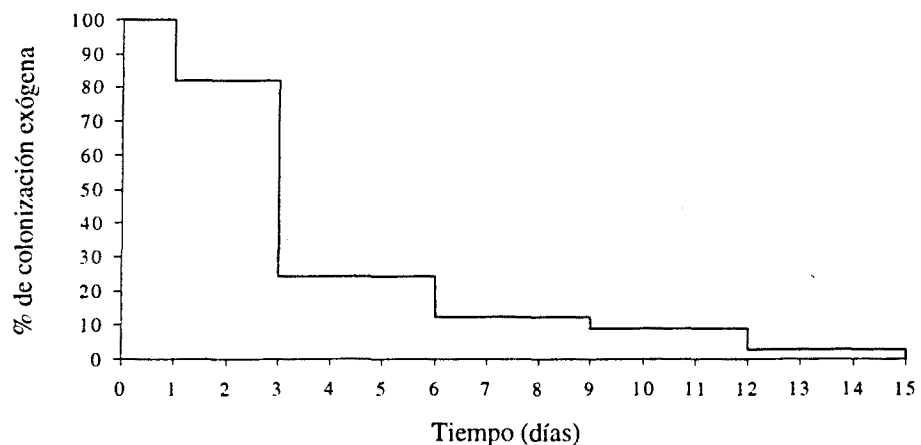


Figura 21. Relación entre la colonización exógena y el tiempo de exposición a riesgo.

Tabla 26. Características epidemiológicas de los 72 pacientes incluidos en el estudio.

Variables	<i>P. aeruginosa</i> propia o no-colonización (n= 39)	<i>P. aeruginosa</i> exógena (n= 33)	Valor P ^c
Edad ^a	65,74 (18,33)	65,73 (15,87)	0,99
Apache II ^a	18,74 (7,47)	22,03 (7,73)	0,07
Duración estancia en UCI ^a	14,92 (16,07)	22,56 (17,67)	0,006
pH gástrico ^a	5,72 (1,08)	5,95 (0,92)	0,34
Coma ^b	17 (43,6)	14 (42,4)	0,92
Shock ^b	17 (43,6)	10 (30,3)	0,25
Politraumatismo ^b	2 (5,1)	1 (3,0)	1,00
EPOC ^b	14 (35,9)	12 (36,4)	0,97
SDRA ^b	2 (5,1)	7 (21,2)	0,07
EAP ^b	4 (10,3)	3 (9,1)	1,00
Cirugía ^b	7 (17,9)	6 (18,2)	0,98
Hepatopatía ^b	2 (5,1)	3 (9,1)	0,66
Inmunodepresión ^b	5 (12,8)	5 (15,2)	0,78
Nutrición parenteral ^b	5 (12,8)	4 (12,1)	0,93
Neoplasia ^b	3 (7,7)	3 (9,1)	1,00
Diabetes ^b	7 (17,9)	3 (9,1)	0,28
Tratamiento con cefalosporinas de 3 ^a generación ^b	5 (12,8)	11 (33,3)	0,04
Dieta enteral ^b	32 (82,1)	32 (97)	0,06
Ranitidina ^b	12 (30,8)	11 (33,3)	0,82
Sucralfato ^b	33 (84,6)	29 (87,9)	0,69

^a Los valores reflejados corresponden a la media y entre paréntesis se indica la desviación estándar.

^b Los valores reflejados corresponden al número de individuos que presentan la característica indicada y entre paréntesis se indica el porcentaje.

^c El valor de P se obtuvo mediante las pruebas: t-Student, U-Mann Whitney, Chi-cuadrado de Pearson y la prueba exacta de Fisher en los casos en los que se consideró adecuado, de acuerdo a las características de los datos a analizar.

En el modelo multivariable se incluyeron todas las variables de las que se obtuvieron un valor de $P \leq 0,1$ en el estudio univariable y que se consideraron clínicamente relevantes. Dos de ellas constituyeron factores de riesgo independientes para la colonización por *P. aeruginosa* adquirida en la UCI: el Apache II en el ingreso y el padecer SDRA. No obstante, dada la inestabilidad del estudio multivariable, estas asociaciones deben considerarse con precaución.

4.4 Cultivos policlonales

Con el propósito de determinar la posible existencia de cultivos policlonales (ver definición en el apartado 2.6, capítulo *material y métodos*), se estudiaron varias colonias (hasta un máximo de 4 por cultivo) de cada cultivo positivo de *P. aeruginosa*. En principio se escogieron colonias que exhibían diferente morfología en el medio de aislamiento. En caso de que no presentaran diferente apariencia morfológica, la elección se realizaba al azar.

En los 403 cultivos considerados (con más de dos colonias analizadas) se detectó un total de 52 cultivos policlonales (13 %) y 351 cultivos (87 %), por tanto, mostraban un único PT (tabla 27). De los 52 cultivos policlonales, el 61,5 % (32/52) procedían del ambiente, encontrándose especialmente en los grifos de los *boxes*. Respecto a los 20 cultivos policlonales restantes, procedentes de los pacientes colonizados, el 80% (16/20) de los mismos correspondía a los cultivos obtenidos del tracto gastrointestinal (estómago y recto). En los siguientes puntos de este apartado, se detallan los resultados obtenidos en función de la procedencia de los cultivos realizados.

❖ *Cultivos procedentes de los cortes ambientales*

Cinco de los 41 cultivos positivos para *P. aeruginosa* (12,2 %) fueron considerados como policlonales (tabla 27). Cuatro de los cinco cultivos mostraban dos pulsotipos diferentes de *P. aeruginosa* y un cultivo presentó tres pulsotipos distintos. Todos los cultivos procedían de las superficies adyacentes a los grifos de los *boxes*. Los 36 cultivos restantes se consideraron monoclonales (mostraban un sólo pulsotipo).

❖ *Cultivos procedentes de los grifos*

De los 88 cultivos de *P. aeruginosa* obtenidos de los grifos de los *boxes*, 27 (30,7 %) fueron considerados policlonales (tabla 27). Todos los cultivos mostraban dos pulsotipos diferentes. En concreto, 14 de los 27 cultivos mostraban cepas caracterizadas por los PTs 1 y 2. Además, en los 13 cultivos restantes una de las dos cepas mostraban uno de los 2 PTs. En los 61 cultivos restantes (69,3 %) únicamente se obtuvo un pulsotipo.

❖ *Cultivos procedentes de los pacientes*

A la hora de reflejar los resultados obtenidos en los cultivos pertenecientes a los pacientes colonizados, se decidió analizar las diferentes localizaciones estudiadas englobándolas de la siguiente forma: tracto gastrointestinal (cultivos obtenidos del estómago y recto), tracto respiratorio superior (cultivos procedentes de la faringe y secreciones subglóticas), tracto respiratorio inferior (cultivos obtenidos de la tráquea y las secreciones respiratorias obtenidas mediante cepillado bronquial). El tubo endotraqueal se consideró de forma separada. El estudio, por tanto, demostró la existencia de cultivos policlonales en todas las localizaciones excepto en las procedentes del tracto respiratorio inferior (tabla 27). Entre el resto de las localizaciones, en el tracto gastrointestinal se obtuvo el mayor número de cultivos policlonales (n= 16). De los 16 cultivos policlonales, 13 procedían del estómago lo que suponía el 19,1 % del total de cultivos obtenidos de esta localización (13/68). Los otros 3 cultivos provenían del recto, correspondiendo a un 14,3 % (3/21) del total de cultivos considerados. Respecto a los 3 cultivos policlonales obtenidos en el tracto respiratorio superior, 2 procedían de la faringe y 1 de las secreciones subglóticas. De los 37 cultivos obtenidos del tubo endotraqueal, uno fue policlonal (tabla 27).

Todos los cultivos policlonales mostraban dos pulsotipos diferentes. En 8 de los 20 cultivos policlonales se demostró la presencia de los PTs 1 y 2 (6 de los 8 cultivos

procedían del estómago). Además, en la mayoría de los 12 cultivos restantes alguno de estos 2 PTs caracterizaba a una de las dos cepas existentes.

Tabla 27. Frecuencia de cultivos policlonales en la totalidad de los cultivos de *P. aeruginosa*.

	Cultivos totales ^a	Cultivos monoclonales (%)	Cultivos policlonales (%)
Ambiente			
• Grifos de los <i>boxes</i>	88	61 (69,3)	27 (30,7)
• Otros cultivos del ambiente	41	36 (87,8)	5 (12,2)
Total	129	97 (75,2)	32 (24,8)
Pacientes			
• Tracto gastrointestinal	89	73 (82)	16 (18)
- Estómago	68	55 (80,9)	13 (19,1)
- Recto	21	18 (85,7)	3 (14,3)
• Tracto respiratorio superior	100	97 (97)	3 (3)
- Faringe	51	49 (96,1)	2 (3,9)
- Secreciones subglóticas	49	48 (98)	1 (2)
• Tracto respiratorio inferior	48	48 (100)	0
- Tráquea	42	42 (100)	0
- Cepillado bronquial	6	6 (100)	0
• Tubo endotraqueal	37	36 (97,3)	1 (2,7)
Total	274	254 (92,7)	20 (7,3)

^a Cultivos con más de dos colonias estudiadas por cultivo.

4.4.1 Relación de la morfología de las colonias con los pulsotipos

Se intentó determinar si, en los distintos cultivos estudiados, existía correspondencia entre la variación de la morfología colonial y la variación genotípica detectada mediante PFGE.

En relación con la *totalidad de los cultivos* considerados, en 341 cultivos (84,6 %) los aislamientos presentaban igual apariencia morfológica, mientras que 62 cultivos (15,4 %) mostraron colonias con diferente morfología (tabla 28). En 12 (3,5 %) de los 341 cultivos con una única morfología se identificó más de pulsotipo

de *P. aeruginosa*. El resto de los cultivos (96,5 %) presentaban un único pulsotipo. Por otra parte, 40 (64,5 %) de los 62 cultivos con distinta morfología colonial mostraron pulsotipos diferentes de *P.aeruginosa*. Los 22 cultivos restantes presentaban un solo pulsotipo

Tabla 28. Correspondencia de la morfología de las colonias con el PFGE en la totalidad de cultivos estudiados.

Nº de cultivos	403 ^a
<i>Nº de cultivos con igual morfología de las colonias</i>	341 (84,6 %)
- Un pulsotipo	329 (96,5 %)
- Diferentes pulsotipos	12 (3,5 %)
<i>Nº de cultivos con diferente morfología de las colonias</i>	62 (15,4 %)
- Un pulsotipo	22 (35,5 %)
- Diferentes pulsotipos	40 (64,5 %)

^a Cultivos con un mínimo de 2 colonias estudiadas.

En la tabla 29 se reflejan los distintos resultados obtenidos, desglosados en función de la procedencia de los cultivos.

- a) Respecto a la morfología colonial, la mayoría de los cultivos obtenidos en los cortes ambientales (87,8 %) y de los pacientes colonizados (90,1 %) mostraban colonias con la misma apariencia morfológica. Dicho porcentaje fue inferior en los cultivos procedentes de los grifos de los *boxes* (66 %). Como característica común, en la mayoría de dichos cultivos (93 % - 97,6 %) se detectó un único pulsotipo. No obstante, un porcentaje de dichos cultivos con una sola morfología de las colonias y que oscilaba entre un 2,4 % de los procedentes de los pacientes y un 7 % de los obtenidos en los grifos de los *boxes*, mostraban pulsotipos diferentes.
- b) El número de cultivos con colonias de diferente apariencia morfológica fue del 34 % en los obtenidos de los grifos de los *boxes*. Dicho porcentaje fue inferior en los procedentes de los cortes ambientales (12,2 %) y en los pertenecientes al total de los pacientes colonizados (9,9 %). De la misma forma, en la mayoría de los

cultivos procedentes de los grifos (76,7 %), la variación morfológica se correspondió con la presencia de pulsotipos diferentes. Dicha correlación fue ligeramente inferior en los cultivos obtenidos en los cortes ambientales (60 %) y en los pertenecientes a los pacientes colonizados (51,8 %). Por otra parte, un porcentaje de cultivos que oscilaba entre un 23,3 % de los grifos de los *boxes* y un 48,2 % de los pacientes colonizados, a pesar de la variación morfológica de las colonias mostraban un único pulsotipo.

Tabla 29. Comparación de la morfología de las colonias con el PFGE en los cultivos procedentes de los cortes ambientales, grifos de los *boxes* y en los 39 pacientes colonizados.

	<i>Cortes ambientales</i>	<i>Grifos</i>	<i>Total pacientes</i>
Nº de cultivos	41	88 ^a	274 ^a
<i>Nº de cultivos con igual morfología de las colonias</i>	36 (87,8 %)	58 (66 %)	247 (90,1 %)
- Un pulsotipo	34 (94,4 %)	54 (93 %)	241 (97,6 %)
- Diferentes pulsotipos	2 (5,6 %)	4 (7 %)	6 (2,4 %)
<i>Nº de cultivos con diferente morfología de las colonias</i>	5 (12,2 %)	30 (34 %)	27 (9,9 %)
- Un pulsotipo	2	7 (23,3 %)	13 (48,2 %)
- Diferentes pulsotipos	3	23 (76,7 %)	14 (51,8 %)

^a Cultivos con un mínimo de 2 colonias estudiadas.

En la tabla 30 se reflejan, asimismo, los resultados obtenidos en las diferentes localizaciones anatómicas estudiadas. Para ello se han considerado de forma similar a la descrita en el apartado anterior (pág. 174), agrupándolas en: tracto gastrointestinal, tracto respiratorio superior, tracto respiratorio inferior y tubo endotraqueal.

- a) Respecto a la morfología de las colonias, la mayoría de los cultivos obtenidos en las distintas localizaciones anatómicas mostraban colonias con la misma apariencia morfológica (valores que oscilaban entre un 85,4 % y un 97,3 %). No obstante, el tracto gastrointestinal fue la localización con la mayor proporción de cultivos con colonias con diferente apariencia morfológica (14,6 %). La mayoría de estos cultivos se obtuvieron del estómago.

- b) En todas las localizaciones, la mayoría o la totalidad (tracto respiratorio inferior) de los cultivos con colonias de la misma morfología mostraban un único pulsotipo. No obstante, en un 5,3 % de los cultivos procedentes del tracto gastrointestinal se identificaron dos pulsotipos diferentes.

- c) Al analizar los 27 cultivos con aislamientos que presentaban diferente morfología, se observó que en el tracto gastrointestinal, en 12 de 13 cultivos (92,3 %) la diferente morfología de las colonias se correspondió con pulsotipos distintos. Por el contrario, en 7 de los 9 cultivos del tracto respiratorio superior y en los 4 del tracto respiratorio inferior o en el cultivo del tubo endotraqueal, a pesar de la variación morfológica, se identificó un único pulsotipo.

Tabla 30. Correspondencia de la morfología de las colonias con el PFGE en los cultivos procedentes de las distintas localizaciones anatómicas estudiadas en los pacientes colonizados.

Nº de cultivos	Tracto			Tubo	Total
	gastrointestinal	Tracto respiratorio superior	Tracto respiratorio inferior		
	89 ^a	100 ^a	48 ^a	37 ^a	274 ^a
<i>Nº de cultivos con igual morfología de las colonias</i>					
- Un pulsotipo	76 (85,4 %)	91 (91 %)	44 (91,7 %)	36 (97,3 %)	247 (90,1 %)
- Diferentes pulsotipos	72 (94,7 %)	90 (99%)	44 (100 %)	35 (97,2 %)	241 (97,6 %)
	4 (5,3 %)	1 (1 %)	-	1 (2,8 %)	6 (2,4 %)
<i>Nº de cultivos con diferente morfología de las colonias</i>					
- Un pulsotipo	13 (14,6 %)	9 (9 %)	4 (8,3 %)	1 (2,7 %)	27 (9,9 %)
- Diferentes pulsotipos	1 (7,7 %)	7	4	1	13 (48,2 %)
	12 (92,3 %)	2	-	-	14 (51,8 %)

Abreviaturas: PT, pulsotipo.

^a Cultivos con más de dos colonias estudiadas por cultivo.

4.5 Estudio de sensibilidad a los antimicrobianos

4.5.1 Evaluación de los patrones de sensibilidad por cultivo

Tal como se detalla en el apartado 2.4.3 del capítulo de *material y métodos*, en cada cultivo se estudiaron, siempre que fue posible, 4 colonias escogiendo, en principio, las que exhibían diferente apariencia morfológica. En el caso de que todas las colonias fueran iguales morfológicamente la elección se realizaba al azar.

A la hora de realizar un antibiograma deben considerarse ciertos factores que pueden influir en el resultado obtenido como son el medio de cultivo, el pH y la atmósfera de incubación, la concentración del inóculo o la temperatura y el tiempo de incubación. En el caso del método de difusión en agar con disco, además, debe tenerse en cuenta la concentración del antimicrobiano en el disco, la capacidad de difusión de los antimicrobianos en medios con agar, la altura de la capa del medio sólido, la concentración del agar en el medio de cultivo y la velocidad del crecimiento del microorganismo². Dado que el control absoluto de estas variables es difícil, sino imposible, la misma cepa puede presentar en distintos antibiogramas pequeñas oscilaciones en el halo de inhibición. En nuestro estudio se han seguido las recomendaciones del NCCLS que contemplan la categoría sensible, intermedia y resistente¹⁶⁷. A la hora de valorar, en un determinado cultivo, las variaciones en el perfil de sensibilidad dentro de un mismo pulstipo no hemos considerado aquellas variaciones que representaban un cambio de intermedio a sensible o de intermedio a resistente a fin de eliminar las interferencias debidas a los defectos de reproducibilidad de la técnica del antibiograma por disco-difusión.

❖ *Expresión, en un cultivo, de varios fenotipos de sensibilidad por un pulstipo*

En la tabla 31 se recogen las mediciones de los 56 cultivos que mostraban fenotipos de sensibilidad diferentes expresados por el mismo pulstipo. Puede

observarse como finalmente solo 40 (71,4 %) de estos 56 cultivos se han considerado como verdaderas diferencias en el patrón de sensibilidad. La frecuencia de los antimicrobianos responsables de la heterogeneidad de la sensibilidad se refleja a continuación.

<i>Fenotipo</i> ^a	<i>Frecuencia</i> ^b
IMP	16
AZT	10
GEN	10
TOB	2
CIP	1
AK	1
GEN AK	1
AZT IMP CIP	1

^a AZT: aztreonam; IMP: imipenem; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AK: amikacina; CIP: ciprofloxacino.

^b La suma de los valores es superior a 40 cultivos debido a que en 2 cultivos los diferentes fenotipos de sensibilidad eran debidos a la resistencia a más de un antimicrobiano.

Los 40 cultivos en los que un pulsotipo presentaba más de un antibiotipo procedían en 28 ocasiones (70 %) de 11 pacientes y en 12 (30 %) de 10 muestras ambientales (5 obtenidas de los grifos, 4 de las superficies húmedas y 1 procedente de las manos del personal sanitario).

Los 16 cultivos en los que no se valoraron diferencias menores en el halo de inhibición procedían en 4 ocasiones (25 %) del ambiente (obtenidos de los grifos de los *boxes*) y en las 12 ocasiones restantes (75 %) de 7 pacientes.

Tabla 31. Heterogeneidad de la sensibilidad a los antimicrobianos en cultivos con un único pulsotipo.

<i>Cultivos</i> ^a	<i>PT</i> ^b	<i>Morfología</i> ^c	<i>Sensibilidad</i> ^d	<i>Halo de inhibición</i> ^e	<i>Antibiotipo</i> ^f
Ambiente	2	1	S	S (29)	1
		1	S	S (28)	1
		1	S	S (28)	1
		1	IMP	R (6)	2
Ambiente	1	1	S	S (30)	1
		1	S	S (27)	1
		1	S	S (30)	1
		1	AZT	R (6)	2
Ambiente	8	1	IMP GEN TOB AK	S (>24)	1
		1	IMP GEN TOB AK	S (>24)	1
		1	AZT IMP GEN TOB AK	R (6)	2
		1	AZT IMP GEN TOB AK	R (6)	2
Ambiente	1	1	S	S (27)	1
		1	S	S (28)	1
		1	AZT	I (21)	1
		1	AZT	I (20)	1
Ambiente	2	1	S	S (>24)	1
		1	S	S (>24)	1
		1	S	S (>24)	1
		1	GEN	R (6)	2
Ambiente	2	1	S	S (>24)	1
		1	S	S (>24)	1
		2	S	S (>24)	1
		2	GEN	R (6)	2
Ambiente	2	1	S	S (16)	1
		1	S	S (16)	1
		2	GEN	R (10)	2
		2	GEN	R (10)	2
Ambiente	2	1	S	S (30)	1
		1	S	S (30)	1
		2	GEN	I (13)	1
		2	GEN	I (14)	1
Ambiente	1	1	S	S (17)	1
		1	S	S (17)	1
		2	GEN	I (13)	1
		2	GEN	I (14)	1
Ambiente	1	1	AZT	I (18) S (>24)	1
		1	AZT	I (17) S (>24)	1
		1	AZT	R (15) S (>24)	1
		1	AZT GEN	I (18) R (6)	2
Ambiente	1	1	S	S (26) S (31) S (22)	1
		1	S	S (27) S (31) S (23)	1
		1	S	S (27) S (30) S (22)	1
		1	AZT IMP GEN	I (19) I (15) R (6)	2
Ambiente	2	2	AZT	I (17) S (29) S (28)	1
		2	AZT	I (17) S (29) S (28)	1
		1	GEN AK	S (22) R (12) I (16)	2
		1	GEN AK	S (22) R (12) I (16)	2

Tabla 31. (continuación)

<i>Cultivos</i> ^a	<i>PT</i> ^b	<i>Morfología</i> ^c	<i>Sensibilidad</i> ^d	<i>Halo de inhibición</i> ^e	<i>Antibiotipo</i> ^f
Ambiente	2	1	AZT	I (18) S (15) S (17)	1
		1	GEN AK	S (24) R (12) I (16)	2
		1	GEN AK	S (24) R (12) I (16)	2
		1	GEN AK	S (24) R (12) I (16)	2
Ambiente	2	1	GEN	S (25) I (13) S (18)	1
		1	AZT GEN AK	I (18) R (12) I (16)	1
		1	AZT GEN AK	I (18) R (12) I (16)	1
		1	AZT GEN AK	I (18) R (12) I (16)	1
Ambiente	7	1	AZT GEN TOB AK	S (30)	1
		1	AZT GEN TOB AK	S (29)	1
		1	AZT GEN TOB AK	S (29)	1
		1	AZT GEN TOB AK CIP	R (6)	2
Ambiente	1	1	GEN TOB AK	S (>24) S (>24) S (>24)	1
		1	GEN TOB AK	S (>24) S (>24) S (>24)	1
		2	GEN TOB AK AZT IMP CIP	R (10) R (6) R (6)	2
Paciente 2	1	1	S	S (26)	1
		1	S	S (27)	1
		1	S	S (27)	1
		1	GEN	R (6)	2
	1	1	S	S (27)	1
		1	S	S (27)	1
		1	S	S (27)	1
		1	AK	R (6)	2
Paciente 4	3	1	GEN TOB AK CIP	R (6) I (16) I (17)	1
		1	GEN AK CIP	S (20) R (12) I (17)	2
		1	GEN AK	S (21) I (16) S (27)	2
		1	GEN AK	S (21) I (16) S (28)	2
Paciente 6	2	1	AZT GEN	I (17) I (14)	1
		1	AZT	I (20) S (19)	1
		1	AZT	I (19) S (19)	1
		1	GEN	S (22) I (14)	1
Paciente 8	6	1	IMP	S (>24) S (>24)	1
		1	IMP	S (>24) S (>24)	1
		1	AZT IMP	R (6) S (>24)	2
		1	IMP GEN	S (>24) R (10)	3
	6	1	IMP	S (>24)	1
		1	IMP	S (>24)	1
		1	IMP	S (>24)	1
		1	IMP TOB	R (6)	2
Paciente 11	1	1	AZT GEN AK CIP	I (20) S (>24) R (12) R (14)	1
		1	AZT GEN AK CIP	I (20) S (>24) R (12) R (14)	1
		1	AZT IMP CIP	I (19) R (13) S (>24) S (>24)	2
		2	AZT IMP CIP	R (14) R (13) S (>24) S (>24)	2
Paciente 13	1	1	AZT CIP	I (20) S (>24) S (>24)	1
		1	GEN AK CIP	S (>24) I (13) I (16)	1
		1	GEN AK CIP	S (>24) I (14) I (15)	1
		1	GEN AK CIP	S (>24) I (14) I (16)	1

Tabla 31. (continuación)

<i>Cultivos</i> ^a	<i>PT</i> ^b	<i>Morfología</i> ^c	<i>Sensibilidad</i> ^d	<i>Halo de inhibición</i> ^e	<i>Antibiotipo</i> ^f
Paciente 13	1	1	AZT IMP GEN AK CIP	R (6) R (12) R (14)	1
		1	AZT GEN AK CIP	S (>24) I (14) I (15)	2
		1	AZT GEN AK CIP	S (>24) I (13) I (15)	2
		1	AZT GEN AK CIP	S (>24) R (12) R (14)	2
	1	1	CIP	S (>24)	1
		1	CIP	S (>24)	1
		1	CIP	S (>24)	1
		1	AZT CIP	R (6)	2
Paciente 26	12	1	IMP	S (>24)	1
		1	IMP	S (>24)	1
		1	IMP	S (>24)	1
		1	AZT IMP	R (6)	2
Paciente 36	2	1	AZT	S (>24)	1
		1	AZT	S (>24)	1
		1	AZT	S (>24)	1
		1	AZT IMP	R (6)	2
Paciente 43	15	1	S	S (25)	1
		1	S	S (25)	1
		1	S	S (25)	1
		1	IMP	R (11)	2
	15	1	S	S (25)	1
		1	S	S (25)	1
		1	S	S (25)	1
		1	IMP	R (12)	2
	15	1	S	S (25)	1
		1	S	S (25)	1
		1	IMP	R (11)	2
		1	IMP	R (11)	2
	15	1	S	S (25)	1
		1	S	S (25)	1
		1	IMP	R (11)	2
		1	IMP	R (11)	2
	15	1	S	S (25)	1
		1	S	S (25)	1
		1	IMP	R (11)	2
		1	IMP	R (11)	2
	15	1	S	S (25)	1
		1	S	S (25)	1
		1	IMP	R (11)	2
		1	IMP	R (11)	2
	15	1	S	S (25)	1
		1	S	S (25)	1
		1	S	S (25)	1
		1	IMP	R (11)	2
	15	1	S	S (25)	1
		1	S	S (25)	1
		1	IMP	R (11)	2
		1	IMP	R (11)	2

Tabla 31. (continuación)

<i>Cultivos</i> ^a	<i>PT</i> ^b	<i>Morfología</i> ^c	<i>Sensibilidad</i> ^d	<i>Halo de inhibición</i> ^e	<i>Antibiotipo</i> ^f	
Paciente-43	15	1	S	S (25)	1	
		1	S	S (25)	1	
		1	IMP	R (11)	2	
		1	IMP	R (11)	2	
	15	1	S	S (25)	1	
		1	S	S (25)	1	
		1	S	S (25)	1	
		1	IMP	R (11)	2	
	15	1	S	S (25)	1	
		1	S	S (25)	1	
		1	S	S (25)	1	
		1	IMP	R (10)	2	
Paciente 55	18	1	S	S (>24)	1	
		1	S	S (>24)	1	
		1	S	S (>24)	1	
		1	AZT	R (6)	2	
	18	1	S	S (>24)	1	
		1	S	S (>24)	1	
		1	S	S (>24)	1	
		1	AZT	R (6)	2	
	18	1	S	S (>24)	1	
		1	S	S (>24)	1	
		1	AZT	R (6)	2	
		1	AZT	R (6)	2	
	18	2	S	S (>24)	1	
		1	AZT	R (6)	2	
		1	AZT	R (6)	2	
		1	AZT	R (6)	2	
	Paciente 69	2	1	AZT GEN	S (>24) R (12)	1
			1	AZT GEN	S (>24) R (12)	1
			1	AZT GEN	S (>24) I (13)	1
			1	AZT IMP GEN	R (6) R (12)	2
2		1	AZT IMP GEN AK	I (14) I (16)	1	
		1	AZT IMP GEN AK	I (14) I (16)	1	
		2	AZT IMP	S (27) S (27)	1	
		2	AZT IMP	S (27) S (27)	1	
2		1	AZT IMP GEN AK	R (12) I (15)	1	
		1	AZT IMP GEN AK	R (12) I (15)	1	
		1	AZT IMP GEN AK	R (12) I (15)	1	
		2	AZT IMP	S (27) S (27)	2	
2	2	AZT IMP GEN	I (14)	1		
	2	AZT IMP	S (29)	1		
	1	AZT IMP	S (29)	1		
	1	AZT IMP	S (29)	1		
Paciente 71	1	1	S	S (22)	1	
		1	S	S (22)	1	
		1	S	S (22)	1	
		1	GEN	I (14)	1	

Tabla 31. (continuación)

Cultivos ^a	PT ^b	Morfología ^c	Sensibilidad ^d	Halo de inhibición ^e	Antibiotipo ^f
Paciente 75	22	1	S	S (15) S (20)	1
		1	S	S (15) S (20)	1
		1	GEN AK	I (13) I (16)	1
		1	GEN AK	I (13) I (16)	1
	22	1	S	S (16) S (21)	1
		1	S	S (16) S (21)	1
		1	GEN AK	I (13) I (16)	1
		1	GEN AK	I (13) I (16)	1
	22	1	S	S (16) S (21)	1
		1	S	S (16) S (21)	1
		1	S	S (16) S (21)	1
		1	GEN AK	I (13) I (16)	1
22	1	GEN AK	S (>24) I (13) I (16)	1	
	2	AZT	I (21) S (>24) S (>24)	1	
Paciente 76	2	1	GEN	S (>24)	1
		1	GEN	S (>24)	1
		1	AZT GEN	I (19)	1
		1	AZT GEN	I (20)	1
Paciente 88	34	1	S	S (22)	1
		1	AZT	R (14)	2
		1	AZT	R (14)	2
		1	AZT	R (14)	2
Paciente 94	6	1	IMP	S (24)	1
		1	AZT IMP	I (20)	1
		1	AZT IMP	I (20)	1
		1	AZT IMP	I (20)	1
	6	1	IMP	S (26)	1
		1	AZT IMP	I (19)	1
		1	AZT IMP	I (20)	1
		1	AZT IMP	I (20)	1

^a Procedencia de los cultivos analizados. Con el nombre de *ambiente* se designan los cultivos procedentes de los cortes ambientales y de los grifos de los *boxes*. Los cultivos procedentes de los pacientes colonizados se distinguen con el número de cada paciente.

^b Pulsotipo(s) (PT) presente en cada cultivo. La nomenclatura de los PTs es temporal respecto al total de los aislamientos del estudio.

^c 1: colonias iguales entre sí; 2: colonias iguales entre sí, pero diferentes de 1.

^d AZT: aztreonam; IMP: imipenem; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AK: amikacina; CIP: ciprofloxacino. En *negrita* se destaca el o los antibióticos diferenciales y en *gris* aquellos antibióticos con diferencias en el antibiotipo I:R o I:S que no se han considerado.

^e S: sensible; I: resistencia intermedia; R: resistente. Entre paréntesis se refleja el valor de la medida del halo de inhibición en mm. Solo se expresan los valores correspondientes a el o los antibióticos diferenciales (en *negrita* o *gris* se destacan los valores correspondientes a los antibióticos, en función de lo mencionado anteriormente).

^f 1: antibiotipos iguales entre sí; 2: antibiotipos iguales entre sí, pero diferentes de 1.

❖ **Expresión, en un cultivo, de varios fenotipos de sensibilidad por varios pulsotipos**

Por lo que hace referencia a los 33 cultivos que presentaban fenotipos de sensibilidad diferentes expresados por pulsotipos distintos, en esta ocasión finalmente se consideraron 16 (48,5 %) de estos cultivos como diferencias verdaderas en el patrón de sensibilidad (tabla 32). La frecuencia de los antimicrobianos responsables de la heterogeneidad de la sensibilidad se refleja a continuación.

<i>Fenotipo</i> ^a	<i>Frecuencia</i> ^b
GEN	5
CIP	5
IMP	3
AZT IMP	2
AZT AK	1
AZT IMP CIP	1
AZT IMP TOB AK	1
IMP TOB AK CIP	1

^a AZT: aztreonam; IMP: imipenem; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AK: amikacina; CIP: ciprofloxacino.

^b La suma de los valores es superior a 16 cultivos debido a que en 2 cultivos los diferentes fenotipos de sensibilidad eran debidos a la resistencia a más de un antimicrobiano.

Los 16 cultivos en los que los diferentes pulsotipos expresaban más de un antibiograma procedían en 11 ocasiones (68,8 %) de 6 muestras ambientales (4 procedían de los grifos de los *boxes* y 2 de las superficies adyacentes a los mismos) y en 5 ocasiones (31,3 %) de 4 pacientes.

Los 17 cultivos en los que no se valoraron diferencias menores en el halo de inhibición procedían en 13 ocasiones de 6 muestras ambientales (todas ellas eran grifos de los *boxes*) y en 4 casos de 3 pacientes.

Tabla 32. Heterogeneidad de la sensibilidad a los antimicrobianos en cultivos con distintos pulsotipos.

<i>Cultivos</i> ^a	<i>PT</i> ^b	<i>Morfología</i> ^c	<i>Sensibilidad</i> ^d	<i>Halo de inhibición</i> ^e	<i>Antibiótipo</i> ^f
Ambiente	7	1	GEN TOB AK AZT IMP	R (6) R (6) R (6) R (6)	1
	7	1	GEN TOB AK AZT IMP	R (6) R (6) R (6) R (6)	1
	13c	2	GEN	S (>24) S (>24) S (>24) S (>24)	2
	13c	2	GEN	S (>24) S (>24) S (>24) S (>24)	2
Ambiente	13b	1	GEN TOB AK	S (>24) S (>24) S (>24)	1
	13b	1	GEN TOB AK	S (>24) S (>24) S (>24)	1
	7	2	GEN TOB AK AZT IMP	R (6) R (6) S (>24)	2
	8	2	GEN TOB AK AZT IMP CIP	R (6) R (6) R (6)	3
Ambiente	2	1	GEN	I (14)	1
	1	2	S	S (20)	1
	2	1	GEN	I (14)	1
Ambiente	2	1	GEN	I (14)	1
	1	2	S	S (20)	1
	2	1	GEN	I (14)	1
	2	1	GEN	I (13)	1
Ambiente	17a	2	S	S (17)	1
	2	1	GEN	I (13)	1
	2	1	GEN	I (13)	1
	2	1	GEN	I (13)	1
Ambiente	2	1	GEN	I (13)	1
	2	1	GEN	I (13)	1
	17b	1	S	S (17)	1
	17b	1	S	S (17)	1
Ambiente	2	2	AZT GEN	I (17) I (14)	1
	2	2	AZT GEN	I (17) I (14)	1
	23	1	S	S (33) S (17)	1
	23	1	S	S (>24) S (>24)	1
Ambiente	1	1	S	S (23) S (17)	1
	2	2	AZT GEN	I (17) I (14)	1
	2	2	AZT GEN	I (17) I (14)	1
	2	2	AZT GEN	I (17) I (14)	1
Ambiente	1	1	S	S (23) S (17)	1
	2	2	AZT GEN	I (17) I (14)	1
	2	2	AZT GEN	I (17) I (14)	1
	2	2	AZT GEN	I (17) I (14)	1
Ambiente	2	2	AZT GEN	I (17) I (14)	1
	2	2	AZT GEN	I (17) I (14)	1
	1	1	S	S (23) S (17)	1
	2	2	AZT GEN	I (17) I (14)	1
Ambiente	1	1	S	S (22) S (16)	1
	1	1	S	S (22) S (16)	1
	1	1	S	S (22) S (16)	1
	2	2	AZT GEN	I (16) I (13)	1
Ambiente	2	1	AZT	I (20)	1
	2	1	AZT	I (20)	1
	24	2	S	S (27)	1
	24	2	S	S (27)	1

Tabla 32. (continuación)

Cultivos ^a	PT ^b	Morfología ^c	Sensibilidad ^d	Halo de inhibición ^e	Antibiótico ^f
Ambiente	2	1	S	S (29)	1
	2	2	AZT	I (19)	1
	2	2	AZT	I (19)	1
	24	3	S	S (27)	1
Ambiente	1	1	S	S (17) S (22)	1
	1	1	S	S (17) S (22)	1
	1	1	S	S (17) S (22)	1
	2	2	GEN AK	R (12) I (16)	2
Ambiente	1	1	S	S (17) S (22)	1
	2	2	GEN AK	R (12) I (16)	2
	1	1	S	S (17) S (22)	1
	2	2	GEN AK	R (12) I (16)	2
Ambiente	2	2	GEN AK	S (32) R (12) I (16)	1
	2	2	AZT GEN AK	I (21) R (12) I (16)	1
	1	1	S	S (32) S (17) S (22)	2
	1	1	S	S (32) S (17) S (22)	2
Ambiente	2	1	AZT GEN AK	I (21) R (12) I (16)	1
	2	1	AZT GEN AK	I (21) R (12) I (16)	1
	1	2	S	S (32) S (17) S (22)	2
	1	2	S	S (32) S (17) S (22)	2
Ambiente	2	1	GEN	I (14) S (30)	1
	27a	2	CIP	S (25) R (12)	2
	27a	2	CIP	S (25) R (13)	2
Ambiente	27a	2	CIP	S (25) R (13)	1
	2	1	GEN	I (14) S (33)	2
	2	1	GEN	I (14) S (33)	2
	2	1	GEN	I (14) S (33)	2
Ambiente	1	1	IMP TOB AK CIP	R (10) S (>24) R (6) R (6) R (6)	1
	1	1	GEN AK CIP	S (>24) I (14) S (>24) I (16) R (6)	2
	1	1	GEN AK CIP	S (>24) I (14) S (>24) I (16) R (6)	2
	5	2	IMP	R (10) S (20) S (>24) S (26) S (>24)	3
Ambiente	2	1	S	S (35)	1
	2	1	S	S (35)	1
	27b	2	CIP	R (12)	2
	2	1	S	S (35)	1
Ambiente	2	1	S	S (33)	1
	27b	1	CIP	R (13)	2
	27b	1	CIP	R (13)	2
	27b	1	CIP	R (13)	2
Ambiente	24	2	S	S (23)	1
	24	2	S	S (23)	1
	2	1	GEN	I (14)	1
	2	1	GEN	I (14)	1
Ambiente	24	2	S	S (23)	1
	2	1	GEN	I (14)	1
	2	1	GEN	I (14)	1
	2	1	GEN	I (14)	1

Tabla 32. (continuación)

Cultivos ^a	PT ^b	Morfología ^c	Sensibilidad ^d	Halo de inhibición ^e	Antibiotipo ^f
Paciente 4	2	1	S	S (>24) S (>24)	1
	1	2	S	S (>24) S (>24)	1
	2	1	AZT IMP	R (6) R (6)	2
	2	1	S	S (>24) S (>24)	1
Paciente 6	2	1	AZT GEN	I (17) I (14)	1
	1	2	S	S (23) S (19)	1
	2	1	S	S (23) S (15)	1
	1	2	S	S (23) S (19)	1
Paciente 43	1	2	S	S (32)	1
	1	2	S	S (32)	1
	15	1	IMP	R (10)	2
	15	1	IMP	R (10)	2
Paciente 57	21	1	GEN	S (>24) S (>24) S (>24)	1
	21	1	GEN	S (>24) S (>24) S (>24)	1
	19	2	AZT GEN TOB AK	R (6) I (13) R (6)	2
	19	2	AZT GEN TOB AK	R (6) I (13) R (6)	2
	21	1	GEN	R (6)	1
	21	1	GEN	R (6)	1
	22a	1	S	S (17)	2
	21	1	GEN	R (6)	1
Paciente 68	2	2	AZT GEN	I (17) I (13)	1
	2	2	AZT GEN	I (17) I (13)	1
	1	1	S	S (23) S (17)	1
	1	1	S	S (23) S (17)	1
	1	1	S	S (23) S (17)	1
	2	2	AZT GEN	I (17) I (13)	1
	2	2	AZT GEN	I (17) I (13)	1
	2	2	AZT GEN	I (17) I (13)	1
Paciente 83	29a	1	S	S (25)	1
	29a	1	S	S (25)	1
	1	2	AZT	I (21)	1
	1	2	AZT	I (21)	1
Paciente 94	6	1	AZT IMP	I (21) R (6)	1
	6	1	AZT IMP	I (21) R (6)	1
	6	1	AZT IMP	I (21) R (6)	1
	1	1	S	S (23) S (34)	2

^a Procedencia de los cultivos analizados. Con el nombre de *ambiente* se designan los cultivos procedentes de los cortes ambientales y de los grifos de los *boxes*. Los cultivos procedentes de los pacientes colonizados se distinguen con el número de cada paciente.

^b Pulsotipo(s) (PT) presente en cada cultivo. La nomenclatura de los PTs es temporal respecto al total de los aislamientos del estudio.

^c I: colonias iguales entre sí; 2: colonias iguales entre sí, pero diferentes de 1.

^d AZT: aztreonam; IMP: imipenem; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AK: amikacina; CIP: ciprofloxacino. En *negrita* se destaca el o los antibióticos diferenciales y en *gris* aquellos antibióticos con diferencias en el antibiotipo I:R o I:S que no se han considerado.

^e S: sensible; I: resistencia intermedia; R: resistente. Entre paréntesis se refleja el valor de la medida del halo de inhibición en mm. Solo se expresan los valores correspondientes a el o los antibióticos diferenciales (en *negrita* o *gris* se destacan los valores correspondientes a los antibióticos, en función de lo mencionado anteriormente).

^f 1: antibiotipos iguales entre sí; 2: antibiotipos iguales entre sí, pero diferentes de 1.

❖ *Relación del patrón de sensibilidad con la morfología de las colonias y los pulsotipos*

En función de los resultados mencionados anteriormente y con referencia a la **totalidad de los cultivos** estudiados se observó que 341 cultivos (84,6 %) presentaban aislamientos con la misma morfología de las colonias, mientras que 62 cultivos (15,4 %) mostraban diferente apariencia morfológica. Treinta y seis (10,6%) de los 341 cultivos con colonias morfológicamente iguales presentaban diferentes patrones de resistencia, expresados en 33 de ellos por aislamientos que mostraban el mismo PT (tabla 33). Los otros 305 cultivos mostraban un único antibiotipo, observándose un solo pulsotipo en 296 cultivos y diferentes pulsotipos en 9 cultivos. Por otra parte, en 20 (32,3 %) de los 62 cultivos donde se apreció diferente apariencia morfológica se detectaron antibiotipos diferentes, correspondiéndose dichas variaciones con la presencia de PTs distintos en 13 cultivos, mientras que en los 7 cultivos restantes los aislamientos mostraban el mismo PT. En los 42 cultivos restantes, los aislamientos analizados expresaban el mismo antibiotipo. En 15 de estos cultivos mostraban el mismo PT, mientras que en los 27 cultivos restantes se identificó más de un PT.

Tabla 33. Comparación de la morfología de las colonias con el antibiotipo y el PFGE de los cultivos realizados.

<i>Nº de cultivos</i>	403^a
<i>Nº de cultivos con igual morfología de las colonias</i>	341 (84,6 %)
- Mismo antibiotipo	305 (89,4 %)
Un PT	296 (97 %)
Diferentes PTs	9 (3 %)
- Distinto antibiotipo	36 (10,6 %)
Un PT	33 (91,7 %)
Diferentes PTs	3 (8,3 %)
<i>Nº de cultivos con diferente morfología de las colonias</i>	62 (15,4 %)
- Mismo antibiotipo	42 (67,7 %)
Un PT	15 (35,7 %)
Diferentes PTs	27 (64,3 %)
- Distinto antibiotipo	20 (32,3 %)
Un PT	7 (35 %)
Diferentes PTs	13 (65 %)

^a Cultivos con más de dos colonias estudiadas por cultivo.

En resumen, el 10,6 % de los cultivos con una sola morfología de las colonias presentaron más de un antibiotipo. En el 91,7 % de las ocasiones los diferentes patrones de resistencia fueron expresados aislamientos que mostraban el mismo pulsotipo.

Por otra parte, en el 32,3 % de los cultivos en los que se observó distinta morfología de las colonias se obtuvieron antibiotipos diferentes, correspondiéndose con la presencia de PTs diferentes en 13 cultivos (65 %), mientras que en 7 (35 %) no se observaron diferencias genotípicas.

En la tabla 34 se reflejan los resultados obtenidos en cada uno de los estudios realizados (cortes ambientales, estudio de los grifos de los *boxes* y total de pacientes colonizados).

- a) El número de cultivos con igual morfología de las colonias osciló entre el 66 % de los grifos de los *boxes* y el 90,1 % del total de los pacientes colonizados. En la mayoría de los cultivos (83,3 % - 94,8 %) se detectó un único antibiotipo que en más del 93,3 % de los casos correspondía a un único pulsotipo. El porcentaje de cultivos donde se detectaron diferentes antibiotipos fue similar en los cultivos procedentes de los cortes ambientales (16,7 %) y de los 39 pacientes colonizados (11 %), mientras que en los procedentes de los grifos el porcentaje fue inferior (5,2 %). En prácticamente la mayoría (pacientes) o la totalidad de dichos cultivos (ambiente), los diferentes patrones de sensibilidad eran expresados por aislamientos que mostraban el mismo PT. En uno de los 3 cultivos procedentes de los grifos y en el 7,4 % de los pertenecientes a los pacientes, los distintos antibiotipos eran expresados por pulsotipos diferentes.
- b) El número de cultivos con colonias de diferente morfología fue del 34 % en los obtenidos de los grifos de los *boxes*, dicho porcentaje fue menor en los obtenidos en el estudio ambiental (12,2 %) y en los pertenecientes a los pacientes (9,9 %). En más de las tres cuartas de los cultivos obtenidos de los pacientes colonizados y en algo menos de las dos terceras partes de los procedentes de los grifos y de los

cortes ambientales se detectó un único antibiotipo. En el 79 % de los cultivos de los grifos el único patrón de resistencia era expresado por aislamientos que mostraban PTs diferentes. Dicho porcentaje era inferior en los cultivos obtenidos en el estudio ambiental (50 %) y en los procedentes de los pacientes (52,4 %).

- c) En los cultivos procedentes de los grifos, en la mayoría de los cultivos con colonias diferentes y más de un antibiotipo se detectó más de un pulsotipo (el 72,7 % de las ocasiones). Este hecho se producía con una frecuencia inferior en los cultivos procedentes de los cortes ambientales (dos de los 3 cultivos obtenidos) y en los obtenidos en los 39 pacientes colonizados (50 % de los cultivos).

Tabla 34. Comparación de la morfología de las colonias con el antibiograma y el PFGE en los cultivos procedentes de los cortes ambientales, grifos de los boxes y en los 39 pacientes colonizados.

	Cortes ambientales	Grifos	Total pacientes
Nº de cultivos	41	88 ^a	274 ^a
Nº de cultivos con igual morfología de las colonias			
- Mismo antibiograma	36 (87,8 %)	58 (66 %)	247 (90,1 %)
Un PT	30 (83,3 %)	55 (94,8 %)	220 (89,1 %)
Diferentes PTs	28 (93,3 %)	52 (94,5 %)	216 (98,2 %)
	2 (6,7 %)	3 (5,5 %)	4 (1,8 %)
Nº de cultivos con diferente morfología de las colonias			
- Distinto antibiograma	6 (16,7 %)	3 (5,2 %)	27 (11 %)
Un PT	6 (100 %)	2	25 (92,6 %)
Diferentes PTs	-	1	2 (7,4 %)
Nº de cultivos con diferente morfología de las colonias			
- Mismo antibiograma	5 (12,2 %)	30 (34 %)	27 (9,9 %)
Un PT	2	19 (63,3 %)	21 (77,8 %)
Diferentes PTs	1	4 (21 %)	10 (47,6 %)
	1	15 (79 %)	11 (52,4 %)
- Distinto antibiograma	3	11 (36,7 %)	6 (22,2 %)
Un PT	1	3 (27,3 %)	3
Diferentes PTs	2	8 (72,7 %)	3

Abreviaturas: PT, pulsotipo.

^a Cultivos con más de dos colonias estudiadas por cultivo.

Asimismo, en la tabla 35 se reflejan los resultados obtenidos en los cultivos de los pacientes en función de las distintas localizaciones anatómicas estudiadas. Para ello, se agruparon de forma similar a la mencionada en un apartado anterior (pág. 174), es decir, el tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio superior, el tracto respiratorio inferior y el tubo endotraqueal.

- a) El número de cultivos con igual morfología de las colonias osciló entre el 85,4 % del tracto gastrointestinal y el 97,3 % del tubo endotraqueal. En la mayoría de los cultivos (83,3 % - 91,2 %) se detectó un único antibiotipo que en más del 97 % de los casos correspondía a un único pulsotipo. El porcentaje de cultivos donde se detectaron diferentes antibiotipos fue similar en el tracto respiratorio superior (8,8 %) y en el tracto gastrointestinal (9,2 %) aunque con valores algo inferiores a los observados en el tracto respiratorio inferior (13,6 %) y el tubo endotraqueal (16,7 %). En todas las localizaciones excepto el tracto gastrointestinal, los diferentes patrones de resistencia eran expresados por aislamientos que mostraban el mismo PT. En el tracto gastrointestinal en el 28,6 % de las ocasiones, los distintos antibiotipos eran expresados por pulsotipos diferentes.
- b) El número de cultivos con colonias de diferente morfología fue del 14,6 % en el tracto gastrointestinal disminuyendo dicho porcentaje a medida que se progresaba hacia el tracto respiratorio inferior. En más de las dos terceras partes de estos cultivos se detectó un único antibiotipo. En todos los cultivos procedentes del tracto gastrointestinal el único patrón de resistencia era expresado por aislamientos que mostraban PTs diferentes. Todos los cultivos habían sido obtenidos del estómago. En cambio, en todos excepto 2 de los cultivos obtenidos del tracto respiratorio superior y en los cultivos procedentes del tracto respiratorio inferior, los aislamientos presentaban el mismo PT.
- c) La mayoría de los cultivos con colonias diferentes y más de un antibiotipo procedían del tracto gastrointestinal detectándose más de un pulsotipo en todos excepto uno de los cultivos. Cuando esta eventualidad se producía en el tracto respiratorio, los distintos antibiotipos se correspondían con un único pulsotipo.

Tabla 35. Comparación de la morfología de las colonias con el antibiograma y el PFGE en los cultivos procedentes de las distintas localizaciones anatómicas estudiadas en los pacientes colonizados.

Nº de cultivos	Tracto			Tubo	Total
	gastrointestinal	respiratorio superior	respiratorio inferior		
	89 ^a	100 ^a	48 ^a	37 ^a	274 ^a
Nº de cultivos con igual morfología de las colonias					
- Mismo antibiograma	76 (85,4 %)	91 (91 %)	44 (91,7 %)	36 (97,3 %)	247 (90,1 %)
Un PT	69 (90,8 %)	83 (91,2 %)	38 (86,4 %)	30 (83,3 %)	220 (89,1 %)
Diferentes PTs	67 (97 %)	82 (98,8 %)	38 (100 %)	29 (96,7 %)	216 (98,2 %)
	2 (3 %)	1 (1,2 %)	-	1 (3,3 %)	4 (1,8 %)
- Distinto antibiograma					
Un PT	7 (9,2 %)	8 (8,8 %)	6 (13,6 %)	6 (16,7 %)	27 (11 %)
Diferentes PTs	5	8	6	6	25 (92,6 %)
	2	-	-	-	2 (7,4 %)
Nº de cultivos con diferente morfología de las colonias					
- Mismo antibiograma	13 (14,6 %)	9 (9 %)	4 (8,3 %)	1 (2,7 %)	27 (9,9 %)
Un PT	9 (69 %)	8	3	1	21 (77,8 %)
Diferentes PTs	-	6	3	1	10 (47,6 %)
	9	2	-	-	11 (52,4 %)
- Distinto antibiograma					
Un PT	4 (31 %)	1	1	-	6 (22,2 %)
Diferentes PTs	1	1	1	-	3
	3	-	-	-	3

Abreviaturas: PT, pulstipo.

^a Cultivos con más de dos colonias estudiadas por cultivo.

4.5.2 Patrones de sensibilidad

❖ Cortes ambientales

Una vez realizado el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos en los aislamientos de *P. aeruginosa* pertenecientes a los 41 cultivos obtenidos, en 14 cultivos los aislamientos estudiados mostraron sensibilidad a todos los antibióticos estudiados. En los 27 cultivos restantes se obtuvieron 13 patrones de resistencia diferentes (tabla 36). En 18 de estos 27 cultivos, los aislamientos estudiados expresaron un único antibiotipo. Además, en 6 cultivos los aislamientos de *P. aeruginosa* mostraron dos patrones de resistencia distintos y en los 3 cultivos restantes, expresaron un fenotipo sensible y un fenotipo resistente. Respecto a los fenotipos de resistencia más frecuentes: la resistencia al aztreonam se expresó en 7 cultivos, en 6 cultivos los aislamientos estudiados expresaron resistencia a todos los antibióticos estudiados, en 4 cultivos expresaron resistencia a todos los antibióticos excepto a ciprofloxacino y en otros 4 cultivos fueron resistentes al imipenem.

Tabla 36. Frecuencia de la sensibilidad expresada por los aislamientos de *P. aeruginosa* obtenidos en los cortes ambientales.

<i>Fenotipo</i> ^a	<i>Frecuencia (%)</i> ^b
S	17 (41,5)
AZT	7 (17,1)
AZT IMP GEN TOB AK CIP	6 (14,6)
AZT IMP GEN TOB AK	4 (9,8)
IMP	4 (9,8)
CIP	2 (4,9)
GEN TOB AK	2 (4,9)
AZT GEN TOB AK	2 (4,9)
GEN	2 (4,9)
AZT IMP	1 (2,4)
AZT GEN	1 (2,4)
AZT GEN TOB	1 (2,4)
IMP GEN TOB AK	1 (2,4)
AZT GEN TOB AK CIP	1 (2,4)

^a AZT: aztreonam; IMP: imipenem; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AK: amikacina; CIP: ciprofloxacino.

^b La suma de los valores indicados es superior a 41 y 100 %, respectivamente, debido a que 9 cultivos mostraron más de un patrón de resistencia o un fenotipo sensible y resistente conjuntamente.

❖ *Grifos*

Tras el estudio de sensibilidad realizado en los aislamientos de *P. aeruginosa* procedentes en los 93 cultivos obtenidos, en 47 cultivos los aislamientos estudiados mostraron sensibilidad a todos los antibióticos estudiados. En los 43 cultivos restantes se obtuvieron 8 patrones de resistencia diferentes (tabla 37). Treinta y cuatro de estos cultivos mostraban un único antibiotipo. Además, en un cultivo los aislamientos de *P. aeruginosa* expresaban dos patrones de resistencia diferentes, mientras que en los 11 cultivos restantes, los aislamientos expresaron un fenotipo sensible y un fenotipo resistente. Respecto a los fenotipos de resistencia, los expresados con más frecuencia fueron: resistencia a gentamicina (23 cultivos), resistencia a aztreonam (10 cultivos), resistencia a ciprofloxacino (6 cultivos) y la resistencia a ambos antibióticos (5 cultivos).

Tabla 37. Frecuencia de la sensibilidad expresada por los aislamientos de *P. aeruginosa* obtenidos en los grifos.

<i>Fenotipo</i> ^a	<i>Frecuencia (%)</i> ^b
S	58 (62,4)
GEN	23 (24,7)
AZT	10 (10,8)
CIP	6 (6,5)
AZT GEN	5 (5,4)
GEN AK	2 (2,2)
IMP	1 (1,1)
IMP TOB AK CIP	1 (1,1)
AZT GEN TOB AK CIP	1 (1,1)

^a AZT: aztreonam; IMP: imipenem; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AK: amikacina; CIP: ciprofloxacino.

^b La suma de los valores indicados es superior a 93 y 100 %, respectivamente, debido a que 12 cultivos mostraron más de un patrón de resistencia o un fenotipo sensible y resistente conjuntamente.

❖ *Pacientes*

Con referencia a los 39 pacientes colonizados por *P. aeruginosa*, en 7 pacientes los aislamientos analizados expresaron sensibilidad a todos los antimicrobianos

estudiados, mientras que en el resto de los pacientes se obtuvieron un total de 18 patrones de resistencia (tabla 38). En 10 pacientes, todos los aislamientos expresaron un único antibiograma. Siete pacientes portaban aislamientos que mostraban más de un fenotipo de resistencia, mientras que en los 15 pacientes restantes, los aislamientos de *P. aeruginosa* expresaron un fenotipo sensible y uno o más de un fenotipo resistente. Entre los diferentes fenotipos de resistencia observados, los más frecuentes fueron la resistencia a aztreonam (9 pacientes), resistencia a gentamicina (9 pacientes), resistencia al aztreonam e imipenem (6 pacientes), resistencia al imipenem (5 pacientes) y la resistencia al aztreonam y gentamicina (5 pacientes).

Tabla 38. Frecuencia de la sensibilidad expresada por los aislamientos de *P. aeruginosa* procedentes de los pacientes colonizados.

<i>Fenotipo</i> ^a	<i>Frecuencia (%)</i> ^b
S	22 (56,4)
AZT	9 (23,1)
GEN	9 (23,1)
AZT IMP	6 (15,4)
IMP	5 (12,8)
AZT GEN	5 (12,8)
GEN AK	2 (5,1)
CIP	2 (5,1)
AZT GEN AK	2 (5,1)
AZT GEN AK CIP	2 (5,1)
AZT IMP GEN TOB AK	2 (5,1)
AK	1 (2,6)
IMP GEN	1 (2,6)
IMP TOB	1 (2,6)
AZT IMP GEN	1 (2,6)
AZT IMP CIP	1 (2,6)
GEN TOB AK	1 (2,6)
AZT IMP GEN AK	1 (2,6)
AZT IMP GEN AK CIP	1 (2,6)

^a AZT: aztreonam; IMP: imipenem; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AK: amikacina; CIP: ciprofloxacino.

^b La suma de los valores indicados es superior a 39 pacientes y 100 %, respectivamente, debido a que los aislamientos procedentes de 22 pacientes expresaron más de un patrón de resistencia o un fenotipo sensible y uno o más de un fenotipo resistente conjuntamente.

5 DISCUSIÓN

5.1 Caracterización molecular de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es uno de los microorganismos patógenos más frecuentemente aislados en el ámbito hospitalario y especialmente en las UCIs. El diseño de estrategias de seguimiento, control y prevención de las infecciones causadas por este microorganismo deberá apoyarse en estudios epidemiológicos apropiados que permitan el seguimiento de las cepas circulantes a fin de conocer los reservorios, vías de colonización de los enfermos y la patogenia de las infecciones. Para tal fin, es necesaria la aplicación de métodos de tipificación que cumplan ciertos criterios tales como la tipabilidad, la reproducibilidad, la estabilidad y el poder discriminativo²⁴⁶. Con referencia al estudio de la epidemiología de *P. aeruginosa*, clásicamente se han aplicado diversos *marcadores fenotípicos* como el serotipado^{20, 239}, el fagotipado^{20, 93, 189}, la producción de bacteriocinas^{189, 239} o el antibiotipado^{78, 253}. Sin embargo, diversos problemas asociados a estos métodos^{180, 189, 239} junto con los avances en el campo de la genética molecular estimularon el desarrollo de métodos de tipificación basados en el análisis de los ácidos nucleicos. Los distintos *métodos genotípicos* aplicados en el estudio de *P. aeruginosa* incluyen i) la digestión enzimática del DNA cromosómico y separación de los fragmentos obtenidos mediante electroforesis convencional^{80, 134, 136} o por PFGE^{21, 22, 37, 93, 240, 244, 251}; ii) la hibridación con sondas de secuencia conocida, p. ej. que incluyen genes de virulencia: el *toxA*^{65, 93, 239}, *algD* y *lasA*¹³⁴ o genes que codifican para las *pili*²³⁸, o con sondas de carácter universal: el ribotipado^{28, 30, 181} y, por último, iii) técnicas basadas en la amplificación: de secuencias repetidas¹²¹, amplificación arbitraria^{27, 98, 112, 219, 240} o la detección de dianas de restricción²⁴⁰. Aunque recientemente varios estudios abogan por la utilidad de los métodos basados en la técnica de amplificación (AP-PCR y AFLP)^{112, 240}, el PFGE es considerada todavía la técnica de elección¹¹ por lo que ha sido utilizada en nuestro estudio.

El método de PFGE permite resolver en un único perfil de restricción la totalidad del genoma del microorganismo al utilizar enzimas que detectan dianas de restricción distribuidas de forma infrecuente a lo largo del cromosoma. La obtención de perfiles

de macrorestricción diferentes se deberá a cambios en la distribución y en el número de las dianas de restricción en el cromosoma, así como a la variación en el número de nucleótidos existente entre secuencias diana que se hallen en el límite de resolución del gel. Además, en diversos trabajos dirigidos al estudio de *P. aeruginosa* se ha demostrado la alta capacidad discriminativa, la tipabilidad, la reproducibilidad y la estabilidad de este marcador ^{90, 93, 101, 244, 251}. En nuestro estudio se ha podido comprobar la alta tipabilidad del PFGE (solamente el 0,3 % de la totalidad de los aislamientos de *P. aeruginosa* no fueron tipables debido a repetidas lisis del DNA genómico), así como su reproducibilidad, gracias a la introducción de una cepa control en los diferentes geles realizados.

Por otra parte, en el caso del PFGE se han establecido una serie de criterios de interpretación ²⁵⁷ mediante los cuales se intenta correlacionar el nivel de la variación detectada entre los perfiles que se comparan con una estimación de la probable relación epidemiológica de los aislamientos. No obstante, estas pautas se consideran apropiadas para estudios de epidemias limitadas en el tiempo (1 a 3 meses). En estos casos se pretende determinar si las cepas analizadas pertenecen o no al tipo epidémico. De tal forma que, en estudios de endemia que comportan un gran número de aislamientos y se producen en períodos de tiempo superiores o iguales a un año, como es el caso de nuestro estudio, la interpretación de los resultados se complica. La inexistencia de una cepa epidémica plantea ciertas limitaciones a la hora de establecer una relación epidemiológica entre los distintos aislamientos. De forma natural, a lo largo del tiempo los microorganismos pueden acumular variaciones en su genoma favorecidas, en muchas ocasiones, por la presión selectiva a la que se ven sometidos. La variabilidad detectada puede reflejar alteraciones en cualquier punto del genoma debidas a duplicaciones, deleciones, inversiones, transposiciones o mutaciones puntuales ⁹, aunque este último evento parece no ocurrir con la misma frecuencia ⁹⁵. Esta variabilidad puede dificultar el establecimiento de una relación clonal entre los diferentes aislamientos. De tal forma, por ejemplo, en especies con una alta capacidad de variación se deberá suponer una “relación” epidemiológica reciente en aquellos aislamientos relacionados obtenidos en un período corto de tiempo o al contrario, si las especies poseen una baja capacidad de variación los

aislamientos relacionados es probable que posean una "relación" epidemiológica lejana ²⁹. Algo similar puede ocurrir dentro de una determinada especie, dado que diferentes clones o linajes pueden mostrar una menor capacidad de variación que se traduzca en una menor diversidad de los aislamientos. Por ello, la similitud genotípica no siempre es producto de una propagación reciente ²⁹. Como consecuencia de estas limitaciones, se suele recomendar la elección de un patrón "índice o tipo" respecto al cual realizar la comparación de los perfiles pertenecientes a los distintos aislamientos ^{11, 259}. Con este método es posible que los aislamientos que se hayan designado como subtipos de un determinado tipo difieran entre ellos lo suficiente como para poder ser considerados tipos distintos. No obstante, la comparación con el patrón índice los mantiene como subtipos de este patrón considerándose que forman parte de secuencias de diversificación distintas de dicho patrón "inicial".

En nuestro caso, en un principio se compararon todos los perfiles obtenidos entre sí. Posteriormente, se escogió entre los perfiles pertenecientes a los aislamientos relacionados el perfil obtenido con más frecuencia. Este perfil se consideró como "patrón tipo" a partir del cual se denominaron los distintos subtipos de un determinado pulsotipo. Los criterios aplicados fueron los ya mencionados y propuestos por Tenover y cols. ²⁵⁷. Dichos criterios se han considerado, además, adecuados para el estudio de *P. aeruginosa* incluso en estudios de colonización llevados a cabo durante largos períodos de tiempo (p. ej. en pacientes afectados de fibrosis quística) ^{90, 244}.

La caracterización de la población de *P. aeruginosa* obtenida del ambiente de la UCI y de los pacientes ingresados en la misma ha demostrado una importante heterogeneidad genética en las cepas analizadas. Dicha heterogeneidad se demostró en el ambiente de la UCI, identificándose 15 PTs diferentes en las superficies y manos del personal sanitario (2 de los PTs fueron identificados en ambas localizaciones) y 11 PTs en el estudio de seguimiento de los grifos de los *boxes*. Tres de los 11 PTs también fueron aislados en las superficies, por tanto, el número total de pulsotipos obtenidos del ambiente fue 23. En los 39 colonizados se obtuvieron 22

PTs diferentes, 10 de los cuales coincidían con los identificados en las diferentes localizaciones ambientales mencionadas. Por tanto, se identificaron un total de 35 pulsotipos. Al igual que en nuestro estudio, esta heterogeneidad genética ha sido demostrada mediante la aplicación del PFGE en el ambiente hospitalario^{31, 65, 75}, en estudios en los que se analiza la colonización causada por *P. aeruginosa* en los pacientes ingresados en la UCI y sometidos a ventilación mecánica^{37, 240} o, también, en pacientes colonizados de forma crónica (p. ej. pacientes afectados de fibrosis quística o bronquiectasia)^{101, 244}.

En nuestro estudio, 13 de los 35 pulsotipos identificados mostraron un total de 49 variantes o subtipos (considerados como tales todos aquellos perfiles que mostraran 6 o menos bandas de diferencia (atribuibles a dos eventos genéticos independientes)²⁵⁷. No obstante, no todos los pulsotipos mostraban el mismo número de variantes. Es decir, había pulsotipos que mostraban mayor capacidad de variación que otros. La existencia de una variación subclonal o la aparición de subtipos en los pulsotipos se ha descrito en la colonización crónica causada por *P. aeruginosa* en pacientes afectados de enfermedades como fibrosis quística o bronquiectasia^{90, 101, 224, 244}. Probablemente, este fenómeno se deba a la interacción de múltiples factores. Tal y como se comenta en el apartado 4.2.4 del capítulo de *Resultados*, el hecho de que algunos PTs mostraran una mayor capacidad de variación que otros podía deberse a una mayor oportunidad para divergir en función del mayor período de persistencia, a una mayor facilidad de detección de dicha variación en función de una mayor frecuencia de aislamiento, o a la existencia de determinados linajes o clones de una población que mostraran una menor o mayor capacidad de divergir²⁹. En nuestro trabajo, se ha podido determinar que el número de variantes o subtipos detectados podía estar relacionado, en cierta magnitud, de forma directa y creciente tanto con el período de tiempo de persistencia de los pulsotipos como con la mayor frecuencia de aislamiento de los pulsotipos. No obstante, el hecho de que el coeficiente utilizado no pueda cuantificar la magnitud de dicha relación supone una limitación de este cálculo. Por otra parte, el análisis para la valoración de la mayor o menor capacidad de variación de determinados clones o linajes dentro de una población, debe realizarse con individuos no relacionados de dicha población²⁹. En nuestro caso no

hemos podido analizar esta circunstancia ya que nuestra población de *P. aeruginosa* no cumple dicho requisito dado que los distintos pacientes, por el hecho de estar ingresados en la UCI, pueden considerarse como individuos relacionados tanto por el ambiente que comparten, como por los enfermos ingresados durante el período de estudio y que no fueron incluidos en el mismo.

5.2 La UCI, un importante reservorio de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es un microorganismo de distribución cosmopolita que manifiesta predilección por los ambientes húmedos. La humedad es un factor crítico en la contaminación causada por este microorganismo en el ambiente hospitalario, donde se le considera endémico dada su capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables y su resistencia intrínseca a los antibióticos y antisépticos. De tal forma, se ha detectado en una gran variedad de soluciones acuosas como desinfectantes, jabones, soluciones de irrigación y de diálisis, etc...¹⁶⁰. Asimismo, se han descrito otros posibles focos de contaminación como, por ejemplo, los grifos, los lavamanos, el equipamiento médico (ventilación mecánica, terapia respiratoria,...), etc...^{114, 196}. Por otra parte, el ambiente hospitalario puede constituir un importante reservorio para otros microorganismos como, otros bacilos gramnegativos (*Acinetobacter* sp., *Serratia marcescens*, etc..) y cocos grampositivos (por ejemplo, *S. aureus*, estafilococos coagulasa negativa, enterococos, etc...) ^{286, 287} que, junto con *P. aeruginosa*, estarían involucrados en un gran número de infecciones nosocomiales, de gran importancia especialmente en el ámbito de la UCI. En concreto, en EE.UU la neumonía nosocomial además de contribuir al aumento de la morbilidad y la mortalidad, tiene un importante impacto económico con unos costes adicionales estimados en alrededor de 1.500 millones de dólares ²⁸⁹.

En nuestro estudio, englobando los resultados obtenidos en los cinco cortes ambientales así como el estudio de seguimiento de los grifos de la unidad, se demostró que el ambiente de la UCI constituía un importante reservorio para la transmisión de microorganismos. Los microorganismos obtenidos con más frecuencia fueron estafilococos coagulasa negativa. En una proporción menor se aislaron *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Corynebacterium* spp. y *Bacillus* spp. Asimismo, se observaron diferencias respecto a la distribución de los microorganismos en las distintas localizaciones estudiadas. De tal forma que, los estafilococos coagulasa negativa, *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa* se aislaron preferentemente en las superficies adyacentes a los grifos. Los grifos de los *boxes*

fueron contaminados principalmente por *P. aeruginosa*. Otros microorganismos como estafilococos coagulasa negativa y *S. aureus* colonizaron con más frecuencia las manos del personal sanitario, así como otras superficies de frecuente contacto como los teléfonos, estetoscopios y la superficie del control de enfermería.

Con referencia a *P. aeruginosa*, manifestó preferencia por el ambiente húmedo (grifos y superficies adyacentes, tanto de los *boxes* como de la cocina), destacando su escasa presencia en los cultivos procedentes de las manos del personal sanitario. El porcentaje de cultivos positivos de las manos es similar al obtenido en un estudio reciente ⁷⁷. Además, después del análisis mediante la técnica de PFGE de los aislamientos ambientales se observó que, a pesar de la variabilidad genotípica demostrada (23 PTs diferentes), ciertos PTs colonizaban de forma frecuente y estable alguna de las localizaciones estudiadas. De tal forma, los grifos de más de la mitad de los *boxes* de la unidad estaban colonizados preferentemente por los PTs 1 y 2 aislándose, además, durante todo el período de estudio. Asimismo, las superficies húmedas de varios de los *boxes* estaban repetidamente contaminadas por otros 2 PTs (PTs 7 y 8). Aunque en menor frecuencia, en esta localización también se aisló el PT 1.

Otros trabajos, la mayoría estudios de brotes o estudios realizados en un período de tiempo inferior al nuestro, también han aislado *P. aeruginosa* preferentemente en el ambiente húmedo hospitalario como, los lavamanos ^{31, 65, 122, 260} y los grifos ^{25, 31, 75, 94, 117}. Asimismo, la aplicación de diversos métodos de tipificación ha permitido determinar la persistencia y propagación de determinados genotipos en algunas de las localizaciones mencionadas ^{25, 31, 65, 94}, pudiéndose establecer, en algunos casos, su implicación en la colonización de los pacientes ingresados. Sin embargo, en algunos de estos estudios se plantean dudas acerca de la dirección de dicha contaminación, es decir, si la existencia de un reservorio ambiental pudiera ser la causa o el resultado de la colonización de los pacientes. La contaminación de los lavamanos podría conllevar la contaminación de las manos del personal sanitario durante su lavado y, por consiguiente, la colonización de los pacientes ^{65, 260}. Alternativamente, los pacientes podrían comportarse como reservorio, transmitiéndose *P. aeruginosa* entre

ellos vía las manos del personal, sin la intervención aparente del ambiente ^{77, 178, 290}. Asimismo, ocasionarían la contaminación de las manos o del instrumental que podrían a su vez contaminar diferentes lavamanos ^{25, 260} o grifos (éstos de una forma retrógrada) ⁹⁴ posibilitando la propagación de *P. aeruginosa* (resultado de una transmisión horizontal) y convirtiéndolos así en reservorios estables durante largos períodos de tiempo.

En nuestro estudio, la contaminación ambiental constituyó, tal y como se comentará más adelante, un importante factor de riesgo de colonización para los pacientes ingresados en la UCI, que normalmente poseen mecanismos de defensa comprometidos y padecen enfermedades subyacentes graves. El hecho de que ciertos genotipos contaminaran de forma persistente los grifos de los diferentes *boxes* de la unidad, podría sugerir la existencia de un reservorio de este organismo en el sistema de abastecimiento general del hospital. No obstante, tal extremo no ha podido ser demostrado, debido a que no se tomaron muestras de otras salas del hospital o de las diferentes tuberías de conducción.

Asimismo, tampoco se ha podido encontrar la causa de la expansión de determinados PTs en las superficies adyacentes a los grifos en los distintos *boxes*. Se podría sugerir una transmisión horizontal a través de las manos u otros fomites. Sin embargo, dichos PTs no se encontraron en los cultivos de las manos.

Se deberían comentar ciertas limitaciones de nuestro estudio que podrían influir en la valoración del ambiente como reservorio para la colonización de los enfermos.

- Solo se han realizado cinco cortes durante los 35 meses que comprenden la totalidad del estudio. Si la contaminación del ambiente fuera transitoria, este hecho podría dificultar el análisis del origen de la colonización detectada en los pacientes ingresados.
- A pesar de que el estudio se realizó sin previo aviso, no fue posible controlar si el personal se había lavado las manos previamente a la recogida de las muestras, lo

que pudo influir en el bajo número de cultivos positivos obtenidos. Debe señalarse, asimismo, que el tiempo de supervivencia de *P. aeruginosa* en las manos y aerosoles es limitado ⁶⁵. Probablemente, los estudios de prevalencia subestiman la importancia de las manos del personal sanitario como vía de transmisión. Deberían realizarse estudios sistemáticos y simultáneos en los que se buscara los pulsotipos que colonizan a los enfermos en las manos del personal sanitario.

Sería recomendable considerar algunas estrategias encaminadas a controlar la contaminación ambiental, especialmente la procedente de los grifos y las superficies adyacentes. La contaminación del agua puede deberse a una contaminación del sistema general de abastecimiento o al arrastre de las pseudomonas acantonadas en las tuberías o los grifos de la UCI. En el Hospital Parc Taulí de Sabadell, el agua de la red general pasa por un depósito donde, además, se controla el nivel de cloración y desde aquí se distribuye a todo el hospital. Con respecto al agua caliente, sufre el mismo proceso y se calienta en una caldera antes de su distribución. Ya se ha comentado que, dadas las características de nuestro estudio no se pudo determinar el origen exacto de la contaminación. Tanto el control de la cloración del sistema de abastecimiento de agua como la sustitución de los grifos de la unidad, se han considerado medidas efectivas en algunos estudios ⁷⁵. Como medida de prevención sería aconsejable realizar un seguimiento de los grifos de la unidad junto con la implantación de ciertas medidas de desinfección y la utilización de agua estéril en el contacto con el paciente. Respecto a las superficies, la limpieza y desinfección de las mismas se realizaba con lejía o una asociación de aldehídos al 1 %, que se corresponden con las medidas recomendadas ⁸⁴. Si bien este procedimiento suele ser efectivo, en nuestro estudio no se pudo determinar la causa de la persistencia de *P. aeruginosa* en las superficies. Hay que señalar que la mayoría de estos pulsotipos no procedían del agua de los grifos.

5.3 El ambiente de la UCI, origen principal de la colonización

La importancia de determinar el origen o la procedencia de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas en los pacientes colonizados, radica en el futuro diseño de estrategias de control y prevención efectivas. A pesar de que se conoce la preferencia de *P. aeruginosa* por los ambientes húmedos, el reservorio de este microorganismo así como su modo de transmisión aún no se conocen con exactitud¹⁹⁶. Dentro del ambiente hospitalario se han sugerido diversos focos de contaminación. Sin embargo, no ha sido hasta la aplicación de diversos métodos de tipificación cuando se ha podido determinar el papel que puede jugar dicho ambiente en la colonización y/o infección de los diferentes pacientes ingresados. Diversos estudios han podido establecer la relación entre ciertas fuentes ambientales y la existencia de brotes epidémicos o colonizaciones causadas por *P. aeruginosa*^{25, 65, 75, 91, 117, 200}. Otros estudios, en cambio, no consideran importante la contribución de la contaminación ambiental a la colonización de los enfermos por *P. aeruginosa* y sugieren un origen “endógeno” para la colonización detectada^{30, 37, 118, 240}. En nuestro trabajo, la combinación de un estudio de seguimiento tanto del ambiente de la UCI como de los pacientes ingresados en la misma, junto con la aplicación de un método de tipificación como el PFGE han permitido esclarecer ciertos aspectos relacionados con la colonización causada por *P. aeruginosa* en los pacientes ingresados en la unidad.

En un principio, si nos referimos a la colonización detectada, algo más de la mitad de los pacientes incluidos en el estudio (54,2 %) mostraron colonización por *P. aeruginosa*. Solo 10 de estos pacientes estaban colonizados al inicio de la ventilación mecánica, por lo que la mayoría de los pacientes adquirió la colonización durante el desarrollo de la misma. Además, se evidenció que dos de los pacientes colonizados al inicio del estudio se colonizaron por cepa(s) diferente(s) durante la ventilación mecánica. En otros estudios, el porcentaje de pacientes colonizados por *P. aeruginosa* es inferior (entre un 23 % y un 37 %)^{21, 65, 176, 240}. En nuestro trabajo, el

hecho de que la mayoría de los pacientes se colonizaran durante el período de ventilación mecánica, sugeriría la existencia de una fuente exógena y/o la posible existencia de transmisión cruzada entre los pacientes como rutas de adquisición de *P. aeruginosa*.

Como se ha comentado en el apartado anterior, en el estudio ambiental se determinó que la UCI constituía un importante reservorio de *P. aeruginosa*, principalmente los grifos de los *boxes* y las superficies adyacentes a los mismos. En 26 de los 39 pacientes colonizados el origen de las cepas era exógeno o ambiental. En 6 pacientes el origen se consideró endógeno o propio del paciente y en 7 pacientes se aislaron cepas de origen ambiental y cepas propias del paciente colonizado.

Origen de las cepas que colonizaron a los enfermos

Colonización de origen ambiental: Seis de los 10 pacientes (60 %) que mostraban colonización al inicio de la VM tenían una cepa de origen exógeno. En 3 ocasiones, la cepa procedía del grifo del *box* donde permanecía ingresado el paciente. El agua de los grifos se utiliza para el lavado de las manos del personal sanitario, el lavado del paciente, la administración de la medicación y el control de permeabilidad de la sonda nasogástrica. En un paciente la colonización inicial del tubo endotraqueal sugiere la inoculación directa de la cepa colonizadora por el personal sanitario. En los 2 pacientes restantes no pudimos establecer las vías de transmisión de las cepas de origen exógeno que los colonizaban. Una posible explicación para esta colonización inicial con cepas exógenas podría ser la demora en la toma de las muestras, que podía realizarse en las primeras 24 horas desde el ingreso e intubación del paciente. Este período de tiempo pudo ser suficiente para que *P. aeruginosa* colonizara a estos pacientes, particularmente en aquellos casos en los que la cepa colonizadora procedía del agua del grifo del *box* donde se encontraban ingresados los pacientes.

Por otro lado, 28 de los 31 pacientes (90,3 %) que se colonizaron durante el proceso de ventilación mecánica adquirirían *P. aeruginosa* del ambiente. Este valor es superior al obtenido en otros estudios, realizados en UCIs con las mismas características, que oscila entre un 33 % y un 60 %^{65, 176}. Los grifos de la unidad se podrían considerar, en nuestro trabajo, como los focos principales de contaminación. En la mayoría de los pacientes (78,6 %) alguno o todos los PTs identificados coincidían con los obtenidos en los grifos de sus propios *boxes*.

Colonización por cepas con origen en el propio enfermo: La colonización con cepas consideradas como propias del paciente colonizado se detectó, únicamente, en 4 de los 10 pacientes colonizados al inicio de la VM y en 3 de los 31 pacientes colonizados durante el desarrollo de la misma.

Colonización de las distintas localizaciones anatómicas

Durante el proceso de ventilación mecánica el comportamiento de las distintas localizaciones anatómicas fue diferente por lo que respecta a la cronología y frecuencia de colonización. Sin embargo, en cuanto al origen de la colonización, los resultados, aunque con ligeras variaciones, fueron similares. Así, el estómago fue la localización que menos tiempo tardó en colonizarse. El tracto respiratorio se colonizaba con posterioridad, siendo la tráquea la última localización colonizada. El tubo endotraqueal y el recto fueron las localizaciones que más tardaron en colonizarse. La misma tendencia se observaba respecto a la frecuencia de colonización. Durante el período de ventilación mecánica, la mayoría de los pacientes (84 %) mostraban colonización gástrica. El resto de las localizaciones anatómicas mostraron una menor frecuencia de colonización, siendo el recto la localización menos colonizada.

Por último, la influencia del ambiente y principalmente la implicación de los grifos queda igualmente constatada al examinar las distintas localizaciones anatómicas estudiadas. En todos excepto uno de los pacientes con colonización gástrica, *P. aeruginosa* procedía del ambiente y en un porcentaje considerable de

dichos pacientes (73 %), los PTs identificados coincidían con los obtenidos en los grifos de los *boxes* donde permanecían ingresados. Al igual que ocurría en el estómago, en el resto de las localizaciones la mayoría de los pulsotipos obtenidos eran similares a los obtenidos previamente en el ambiente y, aunque en un porcentaje superior procedían del grifo de su propio *box*, dicha tendencia fue disminuyendo (especialmente en la tráquea y en el recto). Además, se observó que la probabilidad de identificar pulsotipos propios del paciente aumentaba en las localizaciones respiratorias (en especial en la tráquea y el tubo endotraqueal) y fundamentalmente en el recto, donde 3 de los 9 de los PTs identificados eran propios del paciente colonizado.

Como resumen a los comentarios realizados, quedaría demostrado el papel que el ambiente de la UCI puede jugar en la colonización de los pacientes ingresados en la misma. En la literatura no existe consenso acerca de la importancia real de las fuentes exógenas frente al origen endógeno de la colonización. En diversos estudios en el ámbito hospitalario como las UCIs^{25, 65, 75, 91, 260} o las unidades de quemados^{117, 200}, por ejemplo, se ha podido evidenciar el papel de la contaminación ambiental en la colonización detectada en los pacientes. En ocasiones, se ha destacado la importancia de ciertas rutas de transmisión como el instrumental médico contaminado^{28, 245} o las manos del personal sanitario^{65, 77, 290}. Otros trabajos asumen la existencia de una transmisión cruzada entre los pacientes basándose en el aislamiento de la misma cepa, la coincidencia de la estancia de los enfermos en el espacio y en el tiempo, sin poderse determinar la fuente ambiental o el modo de transmisión^{21, 176, 178}. Por último, otros estudios abogarían por un origen "endógeno" de la colonización^{30, 37, 118, 240, 252}. Tales argumentos se basarían, en la mayoría de los casos, en la identificación de genotipos únicos en los pacientes colonizados junto con la detección de una baja tasa de transmisión de paciente a paciente durante su estancia en la UCI^{30, 37, 240} o la existencia de una reducida contaminación ambiental en dichas unidades^{30, 118, 252}. No obstante, en algunos de estos estudios no se realizaban estudios de seguimiento ambiental que pudieran apoyar tales consideraciones^{37, 240}. En nuestro estudio, no se ha podido valorar la contaminación cruzada entre los pacientes debido a los criterios de inclusión de los pacientes

mencionados en el apartado 2.3.1. (capítulo *material y métodos*). A pesar de ello, 9 pares de pacientes entre los 39 pacientes colonizados coincidieron en su estancia en la UCI. De ellos, 4 pares de pacientes no compartían los pulsotipos de *P. aeruginosa*. Los 5 pares de pacientes restantes mostraban pulsotipos comunes. Sin embargo, en 4 ocasiones los pulsotipos identificados coincidían con los obtenidos en el grifo de los *boxes* donde permanecían ingresados. En el par restante, uno de los pacientes mostraba un PT común con el otro paciente, no coincidente con el obtenido en el grifo de su propio *box* y del que no pudo demostrarse su forma de adquisición.

Como se ha comentado en el apartado anterior, una limitación del estudio es el reducido número de cortes ambientales realizados (n= 5) durante los 35 meses de estudio y el período de tiempo transcurrido entre los mismos (entre 3 y 9 meses) pudo dificultar, en algunos casos, la identificación de la vía de adquisición de la colonización. Este problema se planteó en aquellos pacientes colonizados por aislamientos que mostraban PTs similares a los encontrados en superficies, manos del personal sanitario o los grifos de otros *boxes* de la unidad y que no coincidían ni en el espacio ni en el tiempo. El origen de dicha colonización se determinó en función de las definiciones establecidas (apartado 2.6, capítulo *material y método*).

Por último, en vista de los resultados obtenidos debería plantearse la necesidad de establecer ciertas estrategias para prevenir la colonización por *P. aeruginosa*. El agua procedente de los grifos de la unidad y utilizada para la comprobación de la permeabilidad de la sonda nasogástrica, la administración del tratamiento, el lavado de los pacientes y de las manos del personal sanitario, constituye en nuestro estudio un importante reservorio de *P. aeruginosa*. Dada su importante implicación en la colonización de los pacientes (especialmente en la colonización gástrica) debiera valorarse la utilización de soluciones estériles, al menos en la administración del tratamiento y en el control de la permeabilidad de la sonda nasogástrica. Esta política debería mantenerse hasta que se haya eliminado este reservorio. Por otra parte, el reducido porcentaje de contaminación detectado en las manos del personal sanitario y su escaso papel, en principio, en la colonización de los pacientes tratados, no puede llevar, a ignorar esta vía de transmisión, tal y como se ha demostrado en otros

trabajos ^{65, 77, 290}. La misma consideración debería realizarse con respecto a la contaminación de las superficies húmedas de los *boxes*. Aunque no se ha podido determinar su relación directa en la colonización, se han detectado algunos casos de colonización en los que los pulsotipos implicados contaminaban las superficies de forma persistente. Las soluciones antisépticas utilizadas para la limpieza de estas superficies están de acuerdo con la normativa establecida ⁸⁴, por ello, debería supervisarse su correcta utilización.

5.4 Colonización respiratoria por *P. aeruginosa* durante el período de ventilación mecánica

El conocimiento de la secuencia de colonización que precede al desarrollo de la NAV es importante para el posterior desarrollo de medidas de prevención. Sin embargo, no existe consenso sobre las vías o rutas a través de las cuales *P. aeruginosa* llega al tracto respiratorio inferior dando lugar a una neumonía. La colonización del tracto respiratorio se ha considerado un importante factor de riesgo para el desarrollo de la NAV causada por *P. aeruginosa*, sugiriéndose la importancia 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, como posible explicación un origen exógeno de *P. aeruginosa* ^{62, 252}. Todos los estudios mencionados anteriormente, cuestionan el papel del estómago como lugar inicial de colonización previa a la colonización del tracto respiratorio o al desarrollo de NAV. No obstante, existen trabajos que defenderían la tesis contraria ^{99, 105}, por lo que la importancia del estómago como reservorio es aún objeto de controversia ^{35, 171}. En algunos estudios, se ha concedido cierta importancia al recto como posible reservorio potencial ^{118, 164} o como origen probado de la colonización del tracto respiratorio ³⁷. Sin embargo, las diferencias metodológicas en relación con las poblaciones objeto de estudio, las localizaciones anatómicas analizadas (en muchos casos, sin estudios de seguimiento) y, a que en muchos casos, no se haya aplicado métodos de tipificación, han dificultado el establecimiento de tesis claras a este respecto.

Trece pacientes (42 %) mostraron colonización del tracto respiratorio inferior durante su permanencia en la UCI. Únicamente se pudo determinar el lugar inicial de colonización en 5 de estos pacientes: el estómago en 3 pacientes y el tracto respiratorio superior (faringe y/o secreciones subglóticas) en 2 pacientes. En los 8 pacientes restantes la simultaneidad de la colonización en las distintas localizaciones

incluida la tráquea no permitió discernir el lugar inicial de la colonización. En ningún caso el recto fue el lugar colonizado inicialmente.

No obstante, la colonización respiratoria (tráquea) detectada en nuestros pacientes se caracterizaba principalmente por el origen exógeno de la mayoría de las cepas causantes de la colonización, ya que en 10 de los 13 pacientes (77 %) los pulsotipos obtenidos se habían identificado en el ambiente de la UCI. En los 3 pacientes restantes (23 %), se consideraron como propios del paciente colonizado. En cinco de los 10 pacientes con colonización respiratoria de origen exógeno, los pulsotipos aislados fueron el PT 1 y el PT 2 (obtenidos de forma persistente en los grifos de la unidad). En los 5 pacientes restantes se obtuvieron pulsotipos distintos en cada uno de ellos pero que coincidían con los identificados en los distintos reservorios ambientales. Sin un estudio ambiental como el realizado en esta tesis, es probable que a estos pacientes se les hubiera atribuido un origen "endógeno". De hecho, en este sentido cabría cuestionar los resultados del estudio de Bonten y cols.³⁷ en el que 24 pacientes mostraban colonización del tracto respiratorio adquirida durante su estancia en la UCI, identificándose un total de 25 genotipos. Dada la importante heterogeneidad genética detectada concluyen que sus resultados no apoyan un papel del ambiente como origen de la colonización respiratoria. Sin embargo, no realizaron estudios de seguimiento ambientales que quizá podrían haber modificado los resultados obtenidos, tal y como se ha evidenciado en este trabajo.

Con referencia a los casos de neumonía, en nuestro estudio el 11 % de los 72 pacientes incluidos desarrollaron NAV causada por *P. aeruginosa*. Dado que los pacientes incluidos en el estudio no se corresponden con el total de enfermos sometidos a ventilación mecánica ingresados, el porcentaje obtenido no se puede considerar como la incidencia de neumonía en esta UCI que oscila entre 16 y 18 episodios por cada 1.000 días de ventilación mecánica. Los pacientes que desarrollan NAV causada por *P. aeruginosa* pueden estar colonizados por múltiples pulsotipos (en nuestro estudio, 5 de los 8 pacientes). Este hecho también ha sido comentado por otros autores²². No obstante, a pesar de que en nuestro caso los pacientes estaban colonizados por varias cepas, sólo una de ellas era la causante de la infección.

En 7 de los 8 pacientes con NAV se demostró colonización en el tracto respiratorio superior e inferior previa al diagnóstico de neumonía. En 2 pacientes las vías respiratorias altas fueron el lugar inicial de colonización. En otro paciente el origen de la colonización fue el tubo endotraqueal. En los 4 pacientes restantes se produjo la colonización simultánea del tracto respiratorio y el estómago por lo que no fue posible determinar el lugar inicial de colonización.

No obstante, sí se pudo determinar la importancia de la contaminación ambiental, de tal forma que en 4 de los 8 episodios de NAV, *P. aeruginosa* presentaba un origen exógeno. Los otros 4 casos de neumonía se produjeron por cepas propias de los enfermos. De las 4 cepas de origen exógeno, una tenía su reservorio en el grifo del *box* donde se encontraba ingresado el paciente; 2 cepas mostraban el mismo PT identificado en las superficies húmedas. Respecto a la cuarta cepa, a pesar de no haberse aislado de ambiente de la UCI, presentaba el mismo PT identificado en un paciente anterior. Es posible que dicha cepa persistiera en un nicho ecológico ambiental no pudiendo ser detectada en los cortes ambientales realizados.

En todos los enfermos en los que se pudo determinar el lugar inicial de colonización, las cepas aisladas eran de origen exógeno. En nuestro estudio, la colonización de origen "endógeno" o propio del paciente afectó siempre a varios territorios simultáneamente, no siendo posible determinar la secuencia que conducía a la colonización del tracto respiratorio inferior.

Hasta el momento, no hemos encontrado estudios similares (un estudio ambiental y un seguimiento de los pacientes y los grifos de los *boxes* donde permanecían ingresado), donde se haya demostrado la vinculación de la contaminación ambiental en la colonización del tracto respiratorio inferior de los pacientes. Algunos trabajos ^{21, 22, 252} destacan la transmisión cruzada entre los pacientes como causante de la colonización respiratoria o la infección detectadas. No obstante, en ningún caso han podido identificar la vía de transmisión.

En nuestro estudio, el estómago tuvo una cierta importancia como reservorio inicial en la colonización respiratoria aunque en ninguno de los casos de NAV pudo demostrarse que fuera el lugar inicial de colonización. Bergmans DCJJ y cols.²² destacan la escasa participación de la colonización gástrica en el posterior desarrollo de neumonía. No obstante su importancia sigue siendo motivo de controversia^{35, 171}. Con referencia al tracto respiratorio superior, pudo determinarse como el lugar inicial de colonización en 2 de los pacientes con colonización traqueal y en 2 de los pacientes con NAV. Por otro lado, se ha podido evidenciar la colonización de esta localización y de la tráquea previa al diagnóstico de neumonía. Otros estudios, también destacan la importancia del tracto respiratorio (faringe y tráquea) como lugar de colonización inicial y previa al diagnóstico de neumonía²². Por último, nuestro estudio pone en evidencia el nulo papel que ejerce el recto como reservorio tanto en la colonización respiratoria como en la infección. En algunos trabajos se destaca el escaso papel del recto como reservorio inicial de la NAV (en 1 de 10 casos de NAV)²². Otros trabajos destacan su papel en la colonización respiratoria adquirida durante la estancia de los pacientes en la UCI³⁷ o le identifican como un importante lugar inicial de colonización de *P. aeruginosa*^{118, 164}. No obstante, las diferencias en la población estudiada y los métodos aplicados, así como la ausencia del estudio de algunas localizaciones anatómicas (estómago y tráquea¹⁶⁴ y estómago y orofaringe¹¹⁸, dificultarían la comparación de los resultados.

Debe señalarse que, probablemente, la frecuencia de la recogida de las muestras en nuestro estudio (cada 3 días) constituyera una limitación a la hora de valorar la ruta de la colonización y/o la infección, siendo necesario quizá realizar muestreos diarios o varios muestreos durante el día^{32, 170}. En este mismo sentido se ha sugerido como otra limitación la posibilidad de obtener falsos cultivos negativos que mostrarían un número de microorganismos inferior al umbral de detección^{32, 170}.

Finalmente, nuestros resultados remarcan la necesidad de realizar cultivos de seguimiento de diferentes localizaciones utilizando, además, métodos de tipificación, como el PFGE, a la hora de realizar estudios enfocados a estudiar la epidemiología de la colonización o la infección causada por *P. aeruginosa*.

5.5 Implicaciones del hallazgo de cultivos policlonales.

5.5.1 Estudios epidemiológicos

La existencia de colonizaciones o infecciones policlonales, es decir, la presencia simultánea de dos o más cepas de un microorganismo en la misma o en distintas localizaciones anatómicas de un paciente, presenta relevancia tanto en el ámbito clínico como epidemiológico. Este hecho puede demostrarse por medio de cultivos de seguimiento de las diferentes localizaciones y, especialmente, por el estudio de múltiples colonias en cada uno de los cultivos obtenidos. La presencia en un cultivo de varios pulsotipos de la misma especie puede detectarse por diferencias en la morfología colonial. Así, el estudio de los diferentes morfotipos de las colonias permitiría demostrar la policlonalidad del cultivo. No obstante, en ocasiones, distintos pulsotipos de la misma especie pueden dar lugar a colonias idénticas o de muy difícil diferenciación. En estos casos, solo es posible detectar la policlonalidad del cultivo estudiando varias colonias escogidas al azar. En nuestro estudio, el análisis de 4 aislamientos por cultivo permitió por un lado, determinar la existencia de cultivos policlonales tanto en el ambiente de la UCI como en los pacientes ingresados en la misma. Por otra parte, se evidenció no sólo la correlación existente entre dichas diferencias genotípicas y las variaciones morfológicas mostradas por los aislamientos analizados, sino que los aislamientos con el mismo morfotipo podían asimismo presentar diferentes pulsotipos.

Con referencia a la totalidad de los cultivos obtenidos, un 13 % fueron policlonales y aunque en más de la mitad de dichos cultivos policlonales (77 %) las diferencias genotípicas se correspondían con variaciones en la morfología de los aislamientos analizados, en un porcentaje notable (23 %) no pudieron identificarse las distintos pulsotipos presentes en el cultivo en función de la morfología de las colonias.

La importancia de la composición policlonal de las colonizaciones o infecciones se ha destacado en varios trabajos enfocados al estudio de diversos microorganismos, p. ej. *Mycobacterium avium*^{10, 233, 283}; *Staphylococcus aureus*¹⁴⁴ y estafilococos coagulasa negativa^{13, 81, 273}, analizando en la mayoría de los casos varias colonias de cada cultivo. Asimismo, en uno de estos estudios⁸¹ también se menciona que las diferencias genotípicas se producían no solo en los casos de variación morfológica de las colonias, sino que también se observaban en los aislamientos que mostraban el mismo morfotipo. Respecto a *P. aeruginosa*, no hemos encontrado en la bibliografía trabajos que se parezcan desde un punto de vista metodológico al nuestro. Se ha descrito la posibilidad de una colonización por varias cepas de *P. aeruginosa* durante el seguimiento efectuado a lo largo del tiempo en pacientes con una colonización crónica (p. ej. enfermos que presentan fibrosis quística)^{38, 90, 244} o la infección por cepas de *P. aeruginosa* diferentes a las identificadas en diversas localizaciones en pacientes con bacteriemia¹⁴⁶. En enfermos sometidos a ventilación mecánica también se ha demostrado la colonización por diferentes genotipos de *P. aeruginosa*, gracias al estudio de varias localizaciones y del seguimiento de las mismas en el tiempo²².

Analizando la procedencia de los cultivos estudiados, aproximadamente dos tercios de los cultivos policlonales procedían del ambiente de la UCI, mientras que el resto de los cultivos pertenecían a los pacientes colonizados. Respecto a la colonización policlonal ambiental, la mayoría de dichos cultivos (84,4 %) se obtuvieron de los grifos de los *boxes*. El resto de los cultivos policlonales ambientales provenían de las superficies húmedas adyacentes a los grifos. Todos los cultivos procedentes de las manos del personal fueron monoclonales. En el 85,2 % de los cultivos policlonales procedentes de los grifos, existía una correlación con la variación morfológica de los aislamientos analizados.

Respecto a los pacientes colonizados, en un 41 % se detectó la presencia de dos o más cepas de *P. aeruginosa* en la misma o diferentes localizaciones anatómicas. Dicha frecuencia era superior a la expresada en otros estudios similares (que oscilaba entre un 9,5 % y un 30 %)^{21, 22}. No obstante, la presencia de pulsotipos distintos no

fue uniforme en las diferentes localizaciones estudiadas. De tal forma que, la gran mayoría (80 %) de los cultivos policlonales detectados en los pacientes procedían del tracto gastrointestinal (que agrupaba los cultivos obtenidos del estómago y el recto), y en particular del estómago. En el tracto gastrointestinal, la presencia de varios pulsotipos pudo detectarse en un 75 % de los casos por la diferente morfología de las colonias analizadas. El resto de los cultivos policlonales se obtuvieron en el tracto respiratorio superior (que agrupaba los cultivos procedentes de la faringe y las secreciones subglóticas) y en el tubo endotraqueal. Dos de los 3 cultivos policlonales obtenidos en el tracto respiratorio superior manifestaban diferencias en la morfología de las colonias. Es destacable el hecho de que en los cultivos pertenecientes al tracto respiratorio inferior (tráquea y secreciones respiratorias obtenidas mediante cepillado bronquial), todos los aislamientos estudiados presentaban el mismo pulsotipo. Así, incluso a pesar de que un 8,3 % de dichos cultivos mostraban colonias con diferente apariencia morfológica, todos los aislamientos presentaban el mismo PT.

A la vista de los resultados obtenidos se podrían destacar varios aspectos,

- El estudio de varias colonias por cultivo ha permitido establecer la relación, ya descrita en un apartado anterior, entre la contaminación ambiental por *P. aeruginosa* y la colonización de origen exógeno detectada en la mayoría de los pacientes ingresados en dicha unidad. Probablemente, si solo se hubiera estudiado una colonia por cultivo difícilmente se podía haber determinado tal relación o al menos en tal alto porcentaje. Esta consideración también se ha puesto de manifiesto en un estudio referente a *Mycobacterium avium*, donde gracias al estudio de hasta 10 colonias en cada cultivo pudieron demostrar por un lado, la presencia de múltiples genotipos en una fuente ambiental y, en consecuencia, establecer el origen de la infección detectada en los pacientes estudiados²⁷⁹.
- La existencia de varios pulsotipos en los cultivos procedentes de los grifos de los *boxes* donde estaban ingresados los pacientes, se traduce en el hallazgo de los mismos pulsotipos en los cultivos obtenidos del estómago de los pacientes. Así, 9

de los 13 cultivos policlonales obtenidos en el estómago eran consecuencia de los cultivos policlonales detectados en los grifos.

- Otra causa de policlonalidad en los pacientes ha sido la exposición a varias fuentes ambientales contaminadas por distintos pulsotipos. De tal forma, tres pacientes (pacientes 43, 73 y 86) mostraban distintos PTs en diferentes localizaciones o en la misma localización a lo largo del tiempo, habiéndose aislado los pulsotipos en fuentes ambientales diferentes.
- Es muy importante destacar que la colonización policlonal ha estado limitada al tracto gastrointestinal (en concreto al estómago) y, en menor grado, al tracto respiratorio superior. La investigación de las vías de colonización de los enfermos exige la detección de los distintos pulsotipos mediante el análisis de varias colonias por cultivo. La colonización de la tráquea siempre ha sido monoclonal, así como todos los casos de NAV.

Ante los resultados obtenidos sería recomendable la selección de varias colonias en cada cultivo (tanto de aislamientos que muestren diferencias morfológicas como de los que presenten el mismo morfotipo), no solamente para poder determinar con mayor seguridad el origen de las cepas que colonizan a los pacientes sino también para poder establecer las rutas de colonización de los mismos.

5.5.2 Heterogeneidad de los fenotipos de sensibilidad a los antimicrobianos

La policlonalidad existente en los cultivos no solo tiene importancia epidemiológica sino, además, importantes implicaciones clínicas, especialmente relacionadas con el tratamiento de las infecciones. La presencia de pulsotipos diferentes en un mismo cultivo puede traducirse en la expresión de diferentes fenotipos de sensibilidad a los antimicrobianos. En un cultivo, la detección de los

diferentes fenotipos de sensibilidad existentes es importante para una correcta orientación del tratamiento y, por tanto, para la supervivencia del paciente^{81,280}.

En nuestro estudio, tras las consideraciones ya especificadas en el correspondiente apartado del capítulo de *Resultados*, un 14 % del total de cultivos analizados mostraban diferentes fenotipos de sensibilidad a los antimicrobianos. Este hecho se dio con una frecuencia ligeramente superior en los cultivos que mostraban más de un morfotipo de colonia que en los que presentaban una única morfología. A pesar de ello, en 36 (10,6 %) de los 341 cultivos con una única morfología colonial se detectaron antibiotipos diferentes que no se hubieran detectado si el antibiograma se hubiera realizado a partir de una sola colonia de la placa de aislamiento. En la mayoría de estos cultivos (91,7 %) dichos antibiotipos eran expresados por aislamientos que mostraban el mismo pulsotipo. Por otra parte, 20 (32,3%) de los 62 cultivos con más de una morfología de las colonias mostraban diferente sensibilidad a los antimicrobianos. En esta ocasión, además, en 13 de esos cultivos (65 %) los diferentes antibiotipos eran expresados por aislamientos que presentaban diferentes pulsotipos.

Si se analizan estos resultados en función de la procedencia de las muestras se observa que, en los cultivos con un único tipo de colonia el porcentaje de cultivos con diferentes antibiotipos y un único pulsotipo fue similar en los cultivos ambientales (8,5 %) y en los procedentes de los pacientes (10,1 %).

En cambio, en los 62 cultivos con más de un morfotipo de colonia se observaron diferencias. Tanto la presencia de más de un antibiotipo como de más de un pulsotipo se dio con una frecuencia mayor en las muestras ambientales que en los pacientes. Así, en el 40 % de los cultivos ambientales con diferente morfología de las colonias se detectó más de un antibiotipo que se correspondían con diferentes pulsotipos en la mayoría de ellos (71,4 %). Por otra parte, solo un 22,2 % de los cultivos con más de un morfotipo de colonia procedentes de los pacientes mostraban más de un antibiotipo y en la mitad de ellos se correspondían con diferentes pulsotipos. La presencia de más de un antibiotipo se dio con una frecuencia superior en las muestras

procedentes del tracto gastrointestinal. Además, en la mayoría de dichos cultivos (2 de 3) los distintos antibiotipos se correspondían con pulsotipos diferentes. En el resto de los territorios analizados (tracto respiratorio superior e inferior) sólo un cultivo mostraba diferentes perfiles de sensibilidad y dichos cultivos siempre presentaban un único pulsotipo. Estos resultados están en consonancia con la mayor policlonalidad de las colonizaciones del tracto gastrointestinal discutidas en el apartado anterior.

En resumen, en los cultivos con idéntica morfología de las colonias, la expresión de más de un antibiotipo por un pulsotipo se da por igual en los cultivos ambientales y en las distintas localizaciones anatómicas de los pacientes, mientras que en los cultivos con varios tipos de colonia, la presencia de más de un antibiotipo en los cultivos ambientales, suele deberse a cultivos policlonales. En los pacientes, debe distinguirse entre el tracto gastrointestinal y el tracto respiratorio. En el tracto gastrointestinal, la presencia de más de un antibiotipo también suele ser debida a la policlonalidad del cultivo. En cambio, en el tracto respiratorio, por una parte este hecho se da con menor frecuencia y por otra parte, los diferentes antibiotipos, que se corresponden con colonias distintas, suelen deberse a un único pulsotipo.

En nuestro estudio, además, un mismo antibiotipo era expresado por aislamientos con pulsotipos diferentes. La probabilidad de observar este hecho era mayor en los cultivos con más de un morfotipo de colonia. Así, solo un 3 % de los 305 cultivos con idéntica morfología de las colonias y un único antibiotipo, mostraban diferentes pulsotipos. En cambio, el 64,3 % de los 42 cultivos con diferente morfología colonial y un antibiotipo, mostraban diferentes pulsotipos. Dieciséis de estos 27 cultivos eran ambientales y 11 procedían de las muestras recogidas de los pacientes. En concreto, 9 cultivos provenían del estómago y 2 del tracto respiratorio superior. Así, en el ambiente y en el tracto gastrointestinal el 59,5 % de los cultivos con más de un tipo de colonia y el mismo antibiotipo eran policlonales, mientras que en el tracto respiratorio prácticamente todos ellos presentaban un único pulsotipo. La existencia de cultivos policlonales con único antibiotipo se debería a un bajo poder discriminativo del antibiograma cuando se utiliza como marcador epidemiológico.

No sorprende el hecho que distintos pulsotipos presenten diferentes fenotipos de sensibilidad, ni que un patrón de sensibilidad sea compartido por varios pulsotipos. Por ello, centraremos la discusión en aquellos casos en los que un pulsotipo expresaba más de un patrón de sensibilidad.

La heterogeneidad con respecto a la sensibilidad detectada puede deberse, por un lado a que el mecanismo de resistencia en esta población sea de aparición reciente y coexistan las células sensibles y resistentes. Si existe la presión selectiva adecuada probablemente se seleccionarán las células resistentes y rápidamente se obtendrá una población homogénea. En definitiva, estaríamos hablando de deficiencias en la estabilidad del antibiotipo como marcador epidemiológico ^{11, 256}.

La correlación entre las diferencias obtenidas tras la aplicación de una técnica molecular y la expresión de diferente sensibilidad a los antimicrobianos, ha sido observada en varios trabajos, ya mencionados, relativos a la colonización de catéteres por estafilococos coagulasa negativa ⁸¹ o al desarrollo de infecciones causadas por éstos últimos ²⁷³ o por *Mycobacterium avium* ²⁸⁰.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto las limitaciones de realizar estudios de sensibilidad a partir de una sola colonia ante la posible existencia de cultivos policlonales ^{10, 81, 273}. Además, debería tenerse en cuenta la posibilidad de que aunque los cultivos sean monoclonales los aislamientos pueden expresar antibiotipos diferentes, tal y como se ha evidenciado en este estudio. El estudio de la sensibilidad a partir de varias colonias permitiría detectar poblaciones mixtas, siendo necesario un estudio posterior para identificar los distintos fenotipos de sensibilidad coexistentes.

En conclusión, aproximadamente en un 10 % de los cultivos con una única morfología de las colonias y con un único pulsotipo se identificaron diferentes antibiotipos. Este hecho se producía con mayor frecuencia en las muestras del tracto respiratorio de los pacientes colonizados y podría deberse a una falta de estabilidad de este marcador.

Por otra parte, en un 32,5 % de los cultivos con diferente morfología de las colonias y con pulsotipos distintos se identificaron antibiotipos diferentes. A pesar de ello en 67,5 % de dichos cultivos con colonias de diferente apariencia morfológica y que mostraban diferentes PTs se detectó un único antibiotipo lo que podría significar un bajo poder discriminativo de dicho marcador epidemiológico.

6 CONCLUSIONES

1. Se ha demostrado una importante heterogeneidad genética en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en una Unidad de Cuidados Intensivos al tipificarlas mediante macrorestricción genómica. La existencia de variaciones subclonales en algunos de los pulsotipos obtenidos se ha asociado a la persistencia de los pulsotipos y a la frecuencia de su aislamiento.
2. *P. aeruginosa* ha mostrado especial predilección por las localizaciones húmedas tales como, los grifos de los *boxes* de la unidad y las superficies adyacentes a los mismos, que han sido un reservorio estable de este microorganismo. Por el contrario, su aislamiento en las manos del personal sanitario fue infrecuente.
3. La colonización de los pacientes ha sido, mayoritariamente, de origen exógeno o ambiental.
4. En la mitad de los episodios de neumonía asociada a la ventilación mecánica las cepas responsables eran propias de los pacientes, por lo que no se verían influidas por las medidas encaminadas a eliminar el reservorio ambiental.
5. Los grifos de los *boxes* donde permanecían ingresados los pacientes se han identificado como el reservorio principal para la colonización de origen exógeno por *P. aeruginosa* durante el período de ventilación. Sin embargo, tan solo 1 de las 8 cepas asociadas a neumonía procedía del grifo.
6. El lugar inicial de colonización solo pudo identificarse en una tercera parte de los pacientes con colonización del tracto respiratorio inferior adquirida durante la ventilación mecánica, en estos casos, tanto el estómago como el tracto respiratorio superior tuvieron una importancia equivalente. Por otra parte, en los episodios de neumonía asociada a la ventilación mecánica en los que pudo determinarse el lugar inicial de colonización, el estómago no fue el origen.

7. El 13% de los cultivos fueron policlonales. En el 23% de los cultivos policlonales no pudieron identificarse los distintos pulsotipos presentes en función de la morfología de las colonias.
8. Los cultivos policlonales han sido un hecho frecuente en los cultivos obtenidos de los grifos de los *boxes* y, en consecuencia, en los procedentes del tracto gastrointestinal de los enfermos, especialmente los del estómago. En contraste con este hecho, es importante resaltar que los cultivos provenientes del tracto respiratorio y de las muestras diagnósticas de neumonía, con independencia de la morfología de las colonias, han mostrado un único pulsotipo.
9. En el 10,6 % de los 341 cultivos con una única morfología de colonia se detectó más de un antibiotipo. El estudio de la sensibilidad a partir de varias colonias permitiría detectar poblaciones mixtas, siendo necesario un estudio posterior para identificar los distintos fenotipos de sensibilidad coexistentes.
10. Se ha detectado una cierta falta de estabilidad en el antibiotipo ya que el 11,4 % de los cultivos con un único pulsotipo mostraban más de un antibiotipo. Por otra parte, también se ha puesto de manifiesto la falta de poder discriminativo del antibiotipo ya que en el 69% de los cultivos con más de un pulsotipo solo se observó un antibiotipo.
11. Para determinar el origen de las cepas de *P. aeruginosa* y las vías de colonización de los enfermos sometidos a ventilación mecánica, es necesario realizar un seguimiento de las distintas localizaciones anatómicas y del ambiente junto con la aplicación de un método de tipificación como la electroforesis en campo pulsante. Asimismo, es necesario analizar varias colonias por cultivo.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Abele-Horn M, Dauber A, Bauernfeind A, Russwurm W, Seyfarth-Metzger I, Gleich P, Ruckdeschel G. 1997. Decrease of nosocomial pneumonia in ventilated patients by selective oropharyngeal decontamination. *Intensive Care Med*, 23: 187-195.
2. Acar JF, Goldstein FW. 1996. Disk Susceptibility test. En: Lorian V, ed. *Antibiotics in laboratory medicine*. 4ª ed. William & Wilkins, p. 1-51.
3. A'Court C, Garrard CS. 1992. Nosocomial pneumonia in the intensive care unit: mechanisms and significance. *Thorax*, 47: 465-473.
4. Allardet-Servent A, Bouziges N, Carles-Nurit MJ, Bourg G, Gouby A, Ramuz M. 1989. Use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases for DNA analysis in epidemiological investigations of nosocomial bacterial infections. *J Clin Microbiol*, 27: 2057-2061
5. Álvarez Lerma F, de la Cal MA, Palomar M, Insausti J, Olaechea P and Study Group of ICU-Acquired Infection Surveillance. 1998. Time trends of indicators of ICU-acquired infections from 1994 to 1997. A Spanish multicenter study. *Intensive Care Med*, 23 (Supl. 1): 57S (Abstract 174). 11th Annual Congress of the European Society of Intensive Care Medicine. Estocolmo. Septiembre, 1998.
6. Álvarez Lerma F. 2000. Epidemiología de la neumonía nosocomial grave. En: Rello J, Gállego M, eds. *Infecciones graves. Implicaciones terapéuticas de la neumonía nosocomial grave*. Edika Med, Barcelona, p. 1-16.
7. American Thoracic Society. 1996. Hospital-acquired pneumonia in adults: diagnosis, assesment of severity, initial antimicrobial therapy, and preventive strategies. *Am J Resp Crit Care Med*, 153: 1711-1725.
8. Andrews CP, Coalson JJ, Smith JD, Johanson W. 1981. Diagnosis of acute bacterial pneumonia in acute lung injury. *Chest*, 80: 254-258.
9. Arbeit RD, Arthur M, Dunn R, Kim C, Selander RK, Goldstein R. 1990. Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology. *J Infect Dis*, 161: 230-235.
10. Arbeit RD, Slutsky A, Barber TW, Maslow JN, Niemczyk S, Falkinham II JO, O'Connor GT, von Reyn CF. 1993. Genetic diversity among strains of *Mycobacterium avium* causing monoclonal and polyclonal bacteremia in patients with AIDS. *J Infect Dis*, 167: 1384-1390.
11. Arbeit RD. 1999. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7ª ed. Washington DC: American Society for Microbiology, p.116-137.
12. Archer GI, Mayhall CG. 1983. Comparison of epidemiological markers used in the investigation of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 18: 395-399.

13. Atela I, Coll P, Rello J, Quintana E, Barrio J, March F, Sánchez F, Barraquer P, Ballús J, Cotura A, Prats G. 1997. Serial surveillance cultures of skin and catheter hub specimens from critically ill patients with central venous catheters: molecular epidemiology of infection and implications for clinical management and research. *J Clin Microbiol*, 35: 1784-1790.
14. Ausubel FM, Brent R, Kingston E, Moore DD, Smith JA, Seidman JG, Struhl K (eds). 1992. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York:
15. Baker NR, Minor V, Deal C, Shahrabach MS, Simpson DA, Woods DE. 1991. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is an adhesin. *Infect Immun*, 59: 2859-2863.
16. Barenkamp SJ, Munson RS, Granoff DM. 1981. Subtyping isolates of *Haemophilus influenzae* type b by outer-membrane protein profiles. *J Infect Dis*, 143: 668-676.
17. Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. 1992. DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*; 38:70-6
18. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, 45: 493-496.
19. Bergan T. 1978. Phage typing of *Pseudomonas aeruginosa*. En: Bergan T, Norris JR, eds. *Methods in Microbiology*. Vol 10. London: Academic Press, Inc., p.169-199.
20. Bergmans D, Bonten M, van Tiel F, Gaillard C, London N, van der Geest S, de Leeuw P, Stobberingh E. 1997. Value of phenotyping methods as an initial screening of *Pseudomonas aeruginosa* in epidemiologic studies. *Infections*, 6: 350-354.
21. Bergmans DCJJ, Bonten MJM, van Tiel F, Gaillard CA, van der Geest S, Wilting RM, de Leeuw PW, Stobberingh E. 1998a. Cross-colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. *Thorax*, 53: 1053-1058.
22. Bergmans DCJJ, Bonten MJM, Stobberingh E, van Tiel F, van der Geest S, de Leeuw PW, Gaillard CA. 1998b. Colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in patients developing ventilator-associated pneumonia. *Infect Control Hosp Infect*, 19: 853-855.
23. Bergogne-Bérézin E. 1999. Pseudomonads and miscellaneous gram-negative bacilli. En Armstrong D, Cohen J (eds). *Infectious Diseases*. Harcourt Publishers Ltd. London NW1 7DX. Vol.2. Sección 8. Cap. 18: 18.1-18.22.
24. Berka RM, Vasil ML. 1981. Phospholipase c (heat-labile hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa*: Purification and preliminary characterization. *J Bacteriol*, 152: 239-245.
25. Bert F, Maubec E, Bruneau B, Berry P, Lambert-Zechovsky N. 1998. Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit. *J Hosp Infect*, 39: 53-62.
26. Bert F, Lambert-Zechovsky N. 1999. Résistance aux antibiotiques et problèmes thérapeutiques posés par *Pseudomonas aeruginosa*. *Press Med*, 28: 451-458.

27. Bingen E, Bonacorsi S, Rohrlich P, Duval M, LHopital S, Brahimi N, Vilmer E, Goering RV. 1996. Molecular epidemiology provides evidence of genotypic heterogeneity of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* serotype O:12 outbreak isolates from a pediatric hospital. *J Clin Microbiol*, 34: 3226-3229.
28. Blanc DS, Parret T, Janin B, Raselli P, Francioli P. 1997. Nosocomial infections and pseudoinfections from contaminated bronchoscopes: two-year follow up using molecular markers. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 18: 134-136.
29. Blanc DS, Hauser PM, Francioli P, Bille J. 1998. Molecular typing methods and their discriminatory power. *Clin Microbiol Infect*, 4: 61-63.
30. Blanc DS, Petignat C, Janin B, Bille J, Francioli P. 1998. Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. *Clin Microbiol Infect*, 4: 242-247.
31. Boßhammer J, B Fiedler, P Gudowius, H von der Hardt, U Römling, B Tümmler. 1995. Comparative hygienic surveillance of contamination with pseudomonads in a cystic fibrosis ward over a 4-year period. *J Hops Infect*, 31: 261-274
32. Bonten MJM, Gaillard CA, van Tiel FH, Smeets HG, van der Geest S, Stobberingh EE. 1994. The stomach is not a source for colonization of the upper respiratory tract and pneumonia in ICU patients. *Chest*, 105: 878-884.
33. Bonten MJ, Gaillard CA, van der Geest S, van Tiel FH, Beysens JJ, Smeets HG, Stobberingh EE. 1995. The role of intragastric acidity and stress ulcer prophylaxis on colonization and infection in mechanically ventilated ICU patients. A stratified, randomized, double-blind study. *Am J Respir Crit Care Med*, 152: 1825-1834.
34. Bonten MJM, Bergmans DCJJ, Ambergen AW, de Leeuw PW, van der Geest S, Stobberingh EE, Gaillard CA. 1996. Risk factors for pneumonia, and colonization of respiratory tract and stomach in mechanically ventilated ICU patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 154: 1339-1346.
35. Bonten MJM, Gaillard CA, de Leeuw PW, Stobberingh EE. 1997. Role of colonization of the upper intestinal tract in the pathogenesis of ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis*, 24: 309-319.
36. Bonten MJM, Slaughter S, Ambergen AW, Hayden MK, van Voorhis J, Nathan C, Weinstein RA. 1998. The role of "colonization pressure" in the spread of vancomycin-resistant enterococci. *Arch Intern Med*, 158: 1127-1132.
37. Bonten MJM, Bergmans DCJJ, Speijer H, Stobberingh E. 1999. Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. Implications for infection control. *Am J Respir Crit Care Med*, 160: 1212-1219.
38. Boukadida J, De Montalembert M, Lenoir G, Scheinmann P, Véron M, Berche P. 1993. Molecular epidemiology of chronic pulmonary colonisation by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Med Microbiol*, 38: 29-33.

39. Brewer SC, Wunderink RG, Jones CB, Leeper KV. 1996. Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. Chest, 109: 1019-1029.
40. Britigan BE, Roeder TL, Rasmussen GT, Shasby DM, McCormick ML, Cox CD. 1992. Interaction of the *Pseudomonas aeruginosa* secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage to endothelial cells. Implications for *Pseudomonas*-associated tissue injury. J Clin Invest, 90: 2187-96.
41. Bush K, Jacoby G, Medeiros AA. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother, 39: 1211-1233.
42. Bustamante C, Gurrieri S, Smith SB. 1993. Towards a molecular description of pulsed-field gel electrophoresis. Tib Tech, 11: 23-30.
43. Cardenosa JA, Solé-Violán J, Bordes A, Noquera J, Arroyo J, Saavedra P, Rodríguez de Castro F. 1999. Role of different routes of tracheal colonization in the development of pneumonia in patients receiving mechanical ventilation. Chest, 116: 462-470.
44. Carle GF, Olson MV. 1984. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. Nucleic Acids Res, 12: 5647-5664.
45. Carle GF, Frank M, Olson MV. 1986. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. Science, 232: 65-68.
46. CDC. 1997. Guidelines for prevention of nosocomial pneumonia. MMWR, 46 (No. RR-1).
47. Cercenado E, García F. 1998. Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Clin Esp, 198: 10-16.
48. Chastre J, Fagon JY, Trouillet J. 1995. Diagnosis and treatment of nosocomial pneumonia in patients in intensive care units. Clin Infect Dis, 21 (Supl 3): 226-237.
49. Chevret S, Hemmer M, Carlet J, Langer M, and the European Cooperative Group on Nosocomial Pneumonia. 1993. Incidence and risk factors of pneumonia acquired in intensive care units: results from a multicenter prospective study on 996 patients. Intensive Care Med, 19: 256-264.
50. Chu G, Vollrath D, Davis RW. 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric field. Science, 234: 1582-1585.
51. Cíćmanec JF, Holder IA. 1979. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in normal and burned skin extract: role of extracellular proteases. Infect Immun, 25: 477-483.
52. Coll P. 1993. Neumonía en el paciente intubado: aspectos diagnósticos. En: Picazo de la Garza JJ, Romero Vivas J, eds. Infección en unidades de cuidados intensivos. Ediciones Doyma, S.A., p. 39-48.

53. Cook DJ, Reeve BK, Guyatt GH, Heyland DK, Griffith LE, Buckingham L, Tryba M. 1996. Stress ulcer prophylaxis in critically ill patients. *JAMA*, 275: 308-314.
54. Cook DJ, Walter SD, Cook RJ, Griffith LE, Guyatt GH, Leasa D, Jaeschke RZ, Brun-Buisson. 1998. Incidence of and risk factors for ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. *Ann Intern Med*, 129: 433-440.
55. Correa H, Rello J. 1997. Diagnóstico de neumonía en pacientes intubados: ¿una controversia sin salida?. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 15 (Supl 3): 2-7.
56. Costerton JW, Brown MRW, Sturgess JM. 1979. The cell envelope: its role in infection. En: Doggett RG, ed. *Pseudomonas aeruginosa: clinical manifestations of infection and current therapy*. New York: Academic Press, p. 41-62.
57. Craven DE, Kunches LM, Kilinsky V, Lichtemberg DA, Make BJ, Mac Cabe WR. 1986. Risk factors for pneumonia and fatality in patients receiving continuous mechanical ventilation. *Am Rev Respir Dis*, 133: 792-796
58. Craven DE, Steger KA. 1998. Ventilator-associated bacterial pneumonia: challenges in diagnosis, treatment, and prevention. *New Horizons*, 6 (Supl): S30-S45.
59. Craven DE. 2000. Epidemiology of ventilator-associated pneumonia. *Chest*, 117 (Supl 4): S186-S187.
60. Cross AS, Sadoff JC, Iglewski BH, Sokol PA. 1980. Evidence for the role of toxin A in the pathogenesis of infection with *Pseudomonas aeruginosa* in humans. *J Infect Dis*, 142: 538-546.
61. Davies J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 264: 375-382.
62. de Latorre FJ, Pont T, Ferre A, Rosselló J, Palomar M, Planas M. 1995. Pattern of tracheal colonization during mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*, 152: 1028-1033.
63. De Vos D, Lim Jr. A, Pirnay JP, Struelens M, Vandenvelde C, Duinslaeger L, Vanderkelen A, Cornelis P. 1997. Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, *oprI* and *oprL*. *J Clin Microbiol*, 35: 1295-1299
64. Doebbeling BN, Stanley GL, Sheetz CT, Pfaller MA, Houston AK, Annis L, Li N, Wenzel RP. 1992. Comparative efficacy of alternative hand-washing agents in reducing noscomial infections in intensive care unit. *N Engl J Med*, 327: 88-93.
65. Döring G, Hörz M, Ortelt J, Grupp H, Wolz C. 1993. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *Epidemiol Infect*, 110: 427-436.

66. Dreyfuss D, Djedaini K, Weber P, Brun P, Lanore JJ, Rahmani J, Boussougant Y, Coste F. 1991. Prospective study of nosocomial pneumonia and of patient and circuit colonization during mechanical ventilation with circuit changes every 48 hours versus no change. *Am Rev Respir Dis*, 143: 738-743.
67. Dunn M, Wunderink RG. 1995. Ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas* infection. *Clinics in Chest Med*, 16: 95-109.
68. Eisenstein BI. 1990. New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. *J Infect Dis*, 161:595-602.
69. Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 38: 1008-1015.
70. Fagon JJ, Chastre J, Hance AJ, Guiguet M, Trouillet JL, Domart Y, Pierre J, Gibert C. 1988. Detection of nosocomial lung infection in ventilated patients. Use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques in 147 patients. *Am Rev Respir Dis*, 138: 110-116.
71. Fagon J, Chastre J, Domart Y, Trouillet JL, Pierre J, Darne C, Gibert C. 1989. Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation: prospective analysis of 52 episodes with use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques. *Am Rev Respir Dis*, 139: 877-884.
72. Fagon JY, Chastre J, Hance AJ, Montravers P, Novara A, Gibert C. 1993. Nosocomial pneumonia in ventilated patients: a cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay. *Am J Med*, 94: 281-288.
73. Farmer JJ. 1988. Conventional typing methods. *J Hosp Infect*, 11 (Supl A): 309-14.
74. Feavers IM, Gray SJ, Urwin R, Russell JE, Bygraves JA, Kaczmarski EB, Maiden MCJ. 1999. Multilocus sequence typing and antigen gene sequencing in the investigation of a meningococcal disease outbreak. *J Clin Microbiol*, 37: 3883-3887.
75. Ferroni A, Nguyen L, Pron B, Quesne G, Brusset MC, Berche P. 1998. Outbreak of nosocomial urinary tract infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in a paediatric surgical unit associated with tap-water contamination. *J Hosp Infect*, 39: 301-307.
76. Flournoy DJ. 1982. Quantitative antibiogram as a potential tool for epidemiological typing. *Infect Control*, 3: 384-387.
77. Foca M, Jakob K, Whittier S, Della Latta P, Factor S, Rubenstein D, Saiman L. 2000. Endemic *Pseudomonas aeruginosa* infection in a neonatal intensive care unit. *N Engl J Med*, 343: 695-700.
78. Foissaud V, Perrier-Gros-Claude JD, Rouby Y, Clavier B, Dusseau JY, Thierry J. 1998. L'antibiogramme quantitatif est-il un marqueur épidémiologique fiable des infections à *Pseudomonas aeruginosa*?. Comparaison à l'électrophorèse en champ pulsé. *Path Biol*, 46: 452-458.

79. Fyfe JAM, Harris G, Govan JRW. 1984. Revised pyocin typing method for *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol, 20: 47-50.
80. Garaizar J, Latorre M, López-Molina N, Laconcha I, Alberdi L, Rementeria A, Audicana A, Uliarte R, Cisterna R. 1997. Computerized restriction endonuclease analysis compared with O-serotype and phage type in the epidemiologic fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* strains. Clin Microbiol Infect, 3: 222-228.
81. García de Viedma D, Martín Rabadán P, Díaz M, Cercenado E, Bouza E. 2000. Heterogeneous antimicrobial resistance patterns in polyclonal populations of coagulase-negative staphylococci isolated from catheters. J Clin Microbiol, 38: 1359-1363.
82. Gardiner K. 1991. Pulsed field gel electrophoresis. Analytical Chemistry, 63: 658-665.
83. Gauton RK. 1997. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram negative organisms in 1 day. J Clin Microbiol, 35: 2977-2980.
84. Generalitat de Catalunya. 1998. Precaucions i mesures d'aïllament per evitar la transmissió de les infeccions als Centres Sanitaris. Direcció General de Salut Pública. 1ª ed. Barcelona.
85. George DL, Falk PS, Wunderink RG, Leeper KV Jr., Meduri GU, Steere EL, Corbett CE, Mayhall CG. 1998. Epidemiology of ventilator-acquired pneumonia based on protected bronchoscopic sampling. Am J Respir Crit Care Med, 158: 1839-1847.
86. Gilchrist MJR. 1992. Epidemiologic and Infection Control Microbiology. En: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Vol. 2. American Society for Microbiology, Washington, D.C., Sección. 11.
87. Gilligan PH. *Pseudomonas* and *Burkholderia*. 1995. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. American Society of Microbiology, Washington DC, p. 509-519.
88. Goswitz JJ, Willard KE, Fashing CE, Peterson LR. 1992. Detection of gyrA gene mutations associated with ciprofloxacin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: analysis by polymerase chain reaction and automated direct DNA sequencing. Antimicrob Agents Chemother, 36: 1166-1169.
89. Griffith SJ, Nathan C, Selander RK, Chamberlain W, Gordin S, Kabin S, Weinstein RA. 1989. The epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in oncology patients in a general hospital. J Infect Dis, 160: 1030-1036.
90. Grothues D, Koopmann U, Hardt H, Tümmler B. 1988. Genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* indicates colonization of cystic fibrosis siblings with closely related strains. J Clin Microbiol, 26: 1973-1977.

91. Grundmann H, Kropec A, Hartung D, Berner R, Daschner F. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: reservoirs and ecology of the nosocomial pathogen. *J Infect Dis*, 168: 943-947.
92. Grundmann H, Schneider C, Daschner FD. 1995a. Fluorescence-based DNA fingerprinting elucidates nosocomial transmission of phenotypically variable *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 14: 1057-1062.
93. Grundmann H, Schneider C, Hartung D, Daschner FD, Pitt TL. 1995b. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*, 33: 528-534.
94. Grundmann H, Hahn A, Ehrenstein B, Geiger K, Just J, Daschner FD. 1999. Detection of cross-transmission of multiresistant gram-negative bacilli and *Staphylococcus aureus* in adult intensive care units by routine typing of clinical isolates. *Clin Microbiol Infect*, 5: 355-363.
95. Hall LMC. 1994. Are point mutations or DNA rearrangements responsible for the restriction fragment length polymorphisms that are used to type bacteria?. *Microbiology*, 140: 197-204.
96. Hancock REW, Mutharia LM, Chan L, Darveau RP, Speert DP, Pier GB. 1983. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, non typable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect Immun*, 42: 170-177.
97. Hancock REW. 1998. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis*, 27 (Supl. 1): S93-S99.
98. Hernández J, Ferrús MA, Hernández M, Owen RJ. 1997. Arbitrary primed PCR fingerprinting and serotyping of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 17: 37-47.
99. Heyland D, Mandell LA. 1992. Gastric colonization by gram-negative bacilli and nosocomial pneumonia in the intensive care unit patient. Evidence of causation. *Chest*, 101: 187-193.
100. Hickman-Brenner FW, Stubbs AD, Farmer III JJ. 1991. Phage typing of *Salmonella enteritidis* in the United States. *J Clin Microbiol*, 29: 2817-2823.
101. Hla SW, Hui KP, Tan WC, Ho B. 1996. Genome macrorestriction analysis of sequential *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bronchiectasis patients without cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 34: 575-578.
102. Holzapfel L, Chevret S, Madinier G, Ohen F, Demigeon G, Couptry A, Chaudet M. 1993. Influence of long-term oro- or nasotracheal intubation on nosocomial maxillary sinusitis and pneumonia: results of a prospective, randomized, clinical trial. *Crit Care Med*, 21: 1132-1138.

103. Hulton CS, Higgins CF, Sharp PM. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol*, 5:825-834.
104. Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*, 26: 2465-2466.
105. InglisTJJ, Sherratt MJ, Sproat LJ, Gibson JS, Hawkey PM. 1993. Gastroduodenal dysfunction and bacterial colonisation of the ventilated lung. *Lancet*, 341: 911-913.
106. Johanson WG, Pierce AK, Sanford JP, Thomas GD. 1972. Nosocomial respiratory infections with gramnegative bacilli: the significance of colonization of the respiratory tract. *Ann Intern Med*, 77: 701-706.
107. John JF Jr, Twitty JA. 1986. Plasmids as epidemiologic markers in nosocomial gram-negative bacilli: experience at a university and review of the literature. *Rev Infect Dis*, 8: 693-704.
108. Johnson MK, Boese-Marrazzo D. 1980. Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 29: 1028-1033.
109. Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfret CM, eds. 1994. *Pseudomonas*. Cap.37. *Zinsser Microbiología*. 20ª ed. Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires, Argentina. p. 785-794.
110. Jones RN. 1982. The antimicrobial susceptibility test: rapid and overnight, agar and broth, automated and conventional, interpretation and trend analysis. En: Lorian V, ed. *Significance of medical microbiology in the care of patients*. 2ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins Co., p. 341-369.
111. Kersters K, Ludwig W, Vancanneyt M, De Vos P, Guillis M, Schleifer KH. 1996. Recent changes in the classification of the pseudomonads: an overview. *Syst Appl Microbiol*, 19: 465-477.
112. Kersulyte D, Struelens MJ, Deplano A, Berg DE. 1995. Comparison of arbitrarily primed PCR and macrorestriction (pulsed-field gel electrophoresis) typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, 33: 2216-2219.
113. Kirton OC, DeHaven BMJ, Morejon O, Civetta J. 1997. A prospective, randomized comparison of an in-line heat moisture exchange filter and heated wire humidifiers: rates of ventilator-associated early onset (community acquired) or late-onset (hospital-acquired) pneumonia and incidence of endotracheal tube occlusion. *Chest*, 112: 1055-1059.
114. Kiska DL, Gilligan PH. 1999. *Pseudomonas*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7ª ed. American Society of Microbiology, Washington DC., p. 517-525.

115. Knaus WA, Traper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. 1985. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*, 13: 818-829.
116. Kollef MH. 1999. The prevention of ventilator-associated pneumonia. *N Engl J Med*, 340: 627-634.
117. Kolmos HJ, Thuesen B, Nielsen SV, Lohmann M, Kristoffersen K, Rosdahl VT. 1993. Outbreak of infection in a burns unit due to *Pseudomonas aeruginosa* originating from contaminating tubing used for irrigation of patients. *J Hosp Infect*, 24: 11-21.
118. Kropec A, Huebner J, Riffel M, Bayer U, Benzing A, Geiger K, Daschner FD. 1993. Exogenous or endogenous reservoirs of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* infections in a surgical intensive care unit. *Intensive Care Med*, 19: 161-165.
119. Lai E, Birren BW, Clark SM, Simon MI, Hood L. 1989. Pulsed field gel electrophoresis. *Biotechniques*, 7: 34-42.
120. Lányi B. 1970. Serological properties of *Pseudomonas aeruginosa*. II. Type-specific thermolabile (flagellar) antigens. *Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 17: 35-48.
121. Lau YJ, Liu PYF, Hu BS, Shyr JM, Shi ZY, Tsai WS, Lin YH, Tseng CY. 1995. DNA fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 by enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction and pulsed-field gel electrophoresis. *J Hosp Infect*, 31: 61-66.
122. Levin MH, Olson B, Nathan C, Kabins SA, Weinstein RA. 1984. *Pseudomonas* in the sinks in an intensive care unit: relation to patients. *J Clin Pathol*, 37: 424-427.
123. Leying HJ, Büscher KH, Cullmann W, Then RL. 1992. Lypopolysaccharide alterations responsible for combined quinolone and β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemother*, 38: 82-91.
124. Li WH. 1981. Simple method for constructing phylogenetic trees from distance matrices. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:1085-1089.
125. Li X-Z, Ma D, Livermore DM, Nikaido H. 1994. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to β -lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 38: 1742-1752.
126. Li X-Z, Nikaido H, Poole K. 1995. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 39: 1948-1953.
127. Liao X, Hancock REW. 1997. Susceptibility to β -lactam antibiotics of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing penicillin-binding protein 3. *Antimicrob Agents Chemother*, 41: 1158-1161.
128. Liu PV, Matsumoto H, Kusama K, Bergan T. 1983. Survey of heat-stable, major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Syst Bacteriol*, 33: 256-264.

129. Liu PV, Wang S. 1990. Three major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol, 28: 922-925.
130. Livermore DM. 1987. Clinical significance of β -lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. Eur J Clin Microbiol, 6: 439-445.
131. Livermore DM. 1992. Interplay of impermeability and chromosomal β -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 36: 2046-2048.
132. Livermore DM. 1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev, 8: 557-584.
133. Livingstone D, Gill MJ, Wise R. 1995. Mechanisms of resistance to the carbapenems. J Antimicrob Chemother, 35: 1-5.
134. Loutit JS, Tompkins LS. 1991. Restriction enzyme and southern hybridization analyses of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol, 29: 2897-2900.
135. Lupski JR, Weinstock GM. 1992. Short interspersed repetitive DNA sequences in procaryotic genomes. J Bacteriol, 174:4525-4529.
136. Maher WE, Kobe M, Fass RJ. 1993. Restriction endonuclease analysis of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains: useful epidemiologic data from a simple and rapid method. J Clin Microbiol, 31: 1426-1429.
137. Maiden MCI, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 95:3140-3145.
138. Maloney J, Rimland D, Stephens DS, Terry P, Whitney AM. 1989. Analysis of amikacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* developing in patient receiving amikacin. Arch Intern Med, 149: 630-634.
139. Maloney SA, Jarvis WR. 1995. Epidemic nosocomial pneumonia in the intensive care unit. Clin Chest Med, 16: 209-227.
140. Marquette CHH, Copin MC, Wallet F, Naviere R, Saulnier F, Mathieu D, Durocher A, Ramon P, Tonnel AB. 1995. Diagnostic test for pneumonia in ventilated patients: prospective evaluation of diagnostic accuracy using histology as a diagnostic gold standard. Am J Respir Crit Care Med, 151: 1878-1888.
141. Martin C, Ichou MA, Massicot P, Goudeau A, Quentin R. 1995. Genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis revealed by restriction fragment length polymorphism of the rRNA gene region. J Clin Microbiol, 33: 1461-1466.

142. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. 1993a. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis*, 17: 153-164.
143. Maslow JN, Slutsky AM, Arbeit RD. 1993b. The application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology. En Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (ed). *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. American Society for Microbiology, Washington, DC., p. 563-572.
144. Maslow JN, Brecher S, Gunn J, Durbin A, Barlow MA, Arbeit RD. 1995. Variation and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains among individual patients over extended periods of time. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 14: 282-290.
145. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S. 1995. Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 39: 645-649
146. Matsuda J, Hirakata Y, Iori F, Mochida C, Ozaki Y, Nakano M, Izumikawa K, Yamaguchi T, Yoshida R, Miyazaki Y, Maesaki S, Tomono K, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S. 1998. Genetic relationship between blood and nonblood isolates from bacteremic patients determined by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 36: 3081-3084.
147. Matushek MG, Bonten MJM, Hayden M.K. 1996. Rapid preparación of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 34: 2598-2600.
148. Mayer LW. 1988. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. *Clin Microbio Rev*, 1: 228-243.
149. Mazurek GH, Reddy V, Marston BJ, Haas WH, Crawford JT. 1996. DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. *J Clin Microbiol*, 34: 2386-2390.
150. McClelland M, Jones R, Patel Y, Nelson M. 1987. Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genome. *Nucleic Acids Res*, 15: 5985-6005.
151. Meduri GU, Chastre J. 1992a. The standardization of bronchoscopic techniques for ventilator-associated pneumonia. *Chest*, 102 (Supl.): S557-S564.
152. Meduri GU, Wunderink RG, Lepper K, Beals DH. 1992b. Management of bacterial pneumonia in ventilated patients. Protected bronchoalveolar lavage as a diagnostic tool. *Chest*, 101: 500-508.
153. Meduri GU. 1995. Diagnosis and differential diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Clin Chest Med*, 16: 61-93
154. Meyers JA, Sánchez D, Elwell LP, Falkow S. 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol*, 127:1529-1537.

155. Michéa-Hamzehpour M, Furet YX, Pechère JC. 1991. Role of the protein D2 and lipopolysaccharide in diffusion of quinolones through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 35: 2091-2097.
156. Mickelsen PA, Plorde JJ, Gordon KP, Hargiss C, McClare J, Schoenknecht FD, Condi F, Tenover FC, Tompkins LS. 1985. Instability of antibiotic resistance in a strain of *Staphylococcus epidermidis* isolated from an outbreak of prosthetic valve endocarditis. *J Infect Dis*; 152:50-58.
157. Miller GH, Sabatelli FJ, Glupczynski Y, Mackey P, Shlaes D, Shimizu K, Shaw KJ and the Aminoglycoside Resistance Study Groups. 1997. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms-changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns. *Clin Infect Dis*, 24 (Supl. 1): S46-S62.
158. Miller MJ, Holmes HT. 1999. Specimen collection, transport, and storage. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. American Society of Microbiology, Washington DC., p. 33-63.
159. Motta LF, Frasch CE. 1982. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel typing system for characterization of *Neisseria meningitidis* isolates. *J Clin Microbiol*, 16: 240-244.
160. Morrison AJ Jr., Wenzel RP. 1984. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis*, 6 (Supl.3): S627-S642.
161. Mulligan ME, Kwok RYY, Citron DM, John JF, Smith PB. 1988. Immunoblots, antimicrobial resistance and bacteriophage typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 26:2395-2401.
162. Murphy RW, Sites JW, Buth DG, Haufler CH. 1990. Proteins I: isoenzyme electrophoresis in "Molecular systematics". En: Hillis DM, Moritz C, eds. *Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.*, p. 45-126.
163. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. 1999. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. American Society for Microbiology, Washington DC.
164. Murthy SK, Baltch AL, Smith RP, Desjardin EK, Hammer MC, Conroy JV, Michelsen PB. 1989. Oropharyngeal and fecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital patients. *J Clin Microbiol*, 27: 35-40.
165. Nakae T. 1995. Role of membrane permeability in determining antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Immunol*, 39: 221-229.
166. Nakano M, Deguchi T, Kavamura T, Yasuda M, Kimura M, Okano Y, Kawada Y. 1997. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes in fluoroquinolone-resistant clinically isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 41: 2289-2291.
167. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Sixth ed. Approved Standard. NCCLS documente M2-A6, Vol. 17, No 1. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

168. Niederman MS, Rafferty TD, Sasaki CT, Merrill WW, Matthay RA, Reynolds HY. 1983. Comparison of bacterial adherence to ciliated and squamous epithelial cells obtained from the human respiratory tract. *Am Rev Respir Dis*, 127: 85-90.
169. Niederman MS, Merrill WW, Ferranti RD, Pagano KM, Palmer LB, Reynolds HY. 1984. Nutritional status and bacterial binding in the lower respiratory tract in patients with chronic tracheostomy. *Ann Intern Med*, 100: 795-800.
170. Niederman MS, Mantovani R, Schoch P, Papas J, Fein AM. 1989. Patterns and routes of tracheobronchial colonization in mechanically ventilated patients. The role of nutritional status in colonization of the lower airway by *Pseudomonas* species. *Chest*, 95: 155-161.
171. Niederman SM, Craven DE. 1997. Editorial response: devising strategies for preventing nosocomial pneumonia, should we ignore the stomach?. *Clin Infect Dis*, 24: 320-323.
172. Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. 1993. Characterization of a novel extended β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 37: 962-969.
173. Nordmann P, Guibert M. 1998. Extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*, 42: 128-131.
174. Odds FC, Abbott AB. 1980. A simple system for the presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. *Sabouraudia*, 18:301-17.
175. Olive MD, Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol*, 37: 1661-1669.
176. Olson B, Weinstein RA, Nathan C, Chamberlin W, Kabins SA. 1984. Epidemiology of endemic *Pseudomonas aeruginosa*: why infection control efforts have failed. *J Infect Dis*, 150: 808-816.
177. Orozco-Levi M, Torres A, Ferrer M, Piera C, El-Elbiary M, Puig de la Bellacasa, Rodríguez-Roisín R. 1995. Semirecumbent position protects from pulmonary aspiration but not completely from gastroesophageal reflux in mechanical ventilated patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 152: 1387-1390.
178. Orsi GB, Mansi A, Tomao P, Chiarini F, Visca P. 1994. Lack of association between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital wards. *J Hosp Infect*, 27: 49-60.
179. Ørskov F, Ørskov I. 1983. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the *enterobacteriaceae* and other bacteria. *J Infect Dis*, 148:346-57.
180. Oyeniya B, Wolz G, Döring G, Lam JS, Rosdahl VT, Høiby N. 1990. Typing of polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *APMIS*, 48: 423-431.

181. Palioianni FA, Christofidou M, Spiliopoulou I, Anastassiou ED, Dimitracopoulos G. 1998. Epidemiologic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in a university hospital of southwestern Greece. *Clin Microbiol Infect*, 4: 466-468.
182. Palleroni NJ, R Kunisawa, R Contopoulou, M Doudoroff. 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int J Syst Bacteriol*, 23: 333-339.
183. Palleroni NJ. 1984. Section 4. Gram-negative aerobic rods and cocci. Family I. *Pseudomonadaceae*. Genus I. *Pseudomonas*. En: Bergey's manual of systematic bacteriology. NR Krieg and JG Holt, eds, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, p. 141-199.
184. Parisi JT. 1985. Coagulase-negative staphylococci and the epidemiological typing of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol Rev*, 49:126-39.
185. Parmely M, Gale A, Clabaugh M, Clabaugh M, Horvat R, Zhou WW. 1990. Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 58: 3009-3014.
186. Pfaller MA. 1991. Typing methods for epidemiologic investigation. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology, p.171-82.
187. Piédrola- Angulo G. 1987. *Pseudomonas* y bacilos gramnegativos no fermentadores. En Pumarola A, Rodríguez-Torres A, García-Rodríguez JA, Piédrola-Angulo G (eds). *Microbiología y Parasitología Médica*. 2a ed. Salvat Editores S.A., p.478-485.
188. Pierce AK, Sandford JP. 1974. Aerobic gram-negative bacillary pneumonias. *Am Rev Respir Dis*, 110: 647-656.
189. Pitt TL. 1988. Epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 7: 238-247.
190. Pitt TL, Livermore DM, Pitcher D, Vatopoulos AC, Legakis NJ. 1989. Multiresistant serotype O12 *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a common strain in Europe. *Epidemiol Infect*, 103: 565-576.
191. Plesiat P, Alkhalaf B, Michel-Briand Y. 1988. Prevalence and profiles of plasmids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 7: 261-284.
192. Poh CL, Yeo CC. 1993: Recent advances in typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hosp Infect*, 24: 175-181.
193. Pollack M. 1983. The role of exotoxin A in *Pseudomonas* disease and immunity. *Rev Infect Dis*, 5 (Supl 5): S979-S984.
194. Pollack M. 1984. The virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis*, 6 (Supl 3): S617-S626.

195. Pollack M. 1992. *Pseudomonas*. En: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, eds. Infectious Diseases. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pensilvania. p. 1502-1513.
196. Pollack M. 2000. *Pseudomonas aeruginosa*. En: Mandell GL, Bennett JE and Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5ª ed. Churchill Livingstone, Inc, New York,. Vol.2, p. 2310-2335.
197. Poole K, Krebers K, McNally C, Neshat S. 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. J Bacteriol, 175: 7363-7372.
198. Poole K. 1994. Bacterial multidrug resistance-emphasis on efflux mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother, 23: 453-456.
199. Popovic T, Bopp ChA, Ørjan O, Kiehlauch JA. 1993. Ribotyping in molecular epidemiology. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, eds. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. p. 573-583.
200. Pradella S, Pletschette M, Mantey-Stiers F, Bautsch W. 1994. Macrorestriction analysis of *Pseudomonas aeruginosa* in colonized burn patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 13: 122-128.
201. Prod'hom G, Leuenberger P, Koerfer J, Blum A, Chiolero R, Schaller MD, Perret C, Spinnler O, Blondel J, Siegrist H, Saghafi L, Blanc D, Francioli P. 1994. Nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients receiving antacid, ranitidine or sucralfate as prophylaxis for stress ulcer: a randomized controlled trial. Ann Inter Med, 120: 653-662.
202. Ramphal R, Small PM, Shands JW Jr, Fischlschweiger W, Small PA Jr. 1980. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to tracheal cells injured by influenza infection or by endotracheal intubation. Infect Immun, 27: 614-619.
203. Ramphal R, Pyle M. 1983. Evidence for mucins and sialic acid as receptors for *Pseudomonas aeruginosa* in the lower respiratory tract. Infect Immun, 41: 339-344.
204. Ramphal R, Sadoff JC, Pyle M, Silipigni JD. 1984 Role of pili in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to injured tracheal epithelium. Infect Immun, 44: 38-40.
205. Ramphal R, Guay C, Pier GB. 1987. *Pseudomonas aeruginosa* adhesions for tracheobronchial mucin. Infect Immun, 55: 600-603.
206. Read RC, Roberts P, Munro N, Rutman A, Hastie A, Shryock T, Hall R, McDonald-Gibson W, Lund V, Taylor G, y cols. 1992. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid on mucociliary transport and ciliary beating. J Appl Physiol, 72: 2271-2277.
207. Rello J, Quintana E, Ausina V, Castella J, Luquin M, Net A, Prats G. 1991. Incidence, etiology, and outcome of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. Chest, 100: 439-444.

208. Rello J, Ausina V, Ricart M, Castella J, Prats G. 1993. Impact of previous antimicrobial therapy on the etiology and outcome of ventilator associated pneumonia. *Chest*, 104: 1230-1235.
209. Rello J, Torres A, Ricart M, Vallés J, González A, Artigas A, Rodríguez-Roisín R. 1994a. Ventilator-associated pneumonia by *Staphylococcus aureus*. Comparison of methicillin-resistant and methicillin-sensitive episodes. *Am J Respir Crit Care Med*, 150: 1545-1549.
210. Rello J, Ausina V, Ricart M, Puzo C, Quintana E, Net A, Prats G. 1994b. Risk factors for infection by *Pseudomonas aeruginosa* in patients with ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med*, 20: 193-198.
211. Rello J, Torres A. 1996a. Microbial causes of ventilator-associated pneumonia. *Semin Respir Infect*, 11: 24-31.
212. Rello J, Soñora R, Jubert P, Artigas A, Rue M, Vallés J. 1996b. Pneumonia in intubated patients: role of respiratory airway care. *Am J Respir Crit Care Med*, 154: 111-115.
213. Rello J, Jubert P, Vallés J, Artigas A, Rué M, Niederman MS. 1996c. Evaluation and outcome for intubated patients with pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*, 23: 973-978.
214. Rello J, Rue M, Jubert P, Muses G, Soñora R, Vallés J, Niederman MS. 1997a. Survival in patients with nosocomial pneumonia: impact of the severity of illness and the etiology agent. *Crit Care Med*, 25: 1862-1867.
215. Rello J, Vallés J. 1997b. Hospital-acquired pneumonia in the ICU patient. *Sem Resp Crit Care Med*, 18: 133-140.
216. Rello J, Mariscal D, March F, Jubert P, Sánchez F, Vallés J, Coll P. 1998a. Recurrent *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in ventilated patients. Relapse o reinfection?. *Am J Respir Crit Care Med*, 157: 912-916.
217. Rello J, Ricart M. 1998b. Infecciones del tracto respiratorio en pacientes intubados causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Clin Esp*, 198: 17-20.
218. Rello J, Sa-Borges M, Correa H, Leal SR, Baraibar J. 1999. Variations in etiology of ventilator-associated pneumonia across four treatment sites. Implications for antimicrobial prescribing practices. *Am J Respir Crit Care Med*, 160: 608-613.
219. Renders N, Römling U, Verbrugh H, van Belkum. 1996. Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplification of polymorphic DNA or pulsed-field gel electrophoresis of DNA macrorestriction fragments. *J Clin Microbiol*, 34: 3190-3195.
220. Reynolds HY. 1987. Bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis*, 135: 250-263.

221. Richard P, Le Floch R, Chamoux C, Pannier M, Espaze E, Richert H. 1994. *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burn unit: role of antimicrobials in the emergence of multiply resistant strains. J Infect Dis, 170: 377-383.
222. Riffard S, Lo Presti F, Vandenesch F, Forey F, Reyrolle M, Etienne J. 1998. Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J Clin Microbiol, 36: 161-167.
223. Römling U, Grothues D, Heuer T, Tümmler B. 1992. Physical genome analysis of bacteria. Electrophoresis, 13:626-31
224. Römling U, Fielder B, Boßhammer J, Grothues D, Greipel J, von der Hart H, Tümmler B. 1994. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. J Infect Dis, 170: 1616-1621.
225. Savelkoul PHM, Aarts HJM, de Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, Rademaker JLW, Schouls L, Lenstra A. 1999. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. J Clin Microbiol, 37: 3083-3091.
226. Schaberg DR, Zervos M. 1986. Plasmid analysis in the study of the epidemiology of nosocomial gram-positive cocci. Rev Infect Dis, 8: 705-712.
227. Schwartz DC, Cantor CR. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell, 37: 67-75.
228. Seeger W, Walmrath D, Neuhofer H, Lutz F. 1986. Pulmonary microvascular injury induced by *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin in isolated rabbit lungs. Infect Immun, 52: 846-852.
229. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittan TS. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl Environ Microbiol, 51: 873-884.
230. Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K, Kato N, Ohta M. 1996. Multifocal outbreaks of metallo -producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams, including carbapenems. Antimicrob Agents Chemother, 40: 349-353.
231. Sifuentes-Osornio J, Ruíz-Palacios GM, Gröschel DHM. 1986. Analysis of epidemiologic markers of nosocomial *Serratia marcescens* isolates with special references to the Grimont biotyping systems. J Clin Microbiol, 23:230-4.
232. Silver RD, Cohen IL, Weinberg PF. 1992. Recurrent *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in an intensive care unit. Chest, 101: 194-198.
233. Slutsky A, Arbeit RD, Barber TW, Rich J, von Reyn CF, Pieciak W, Barlow MA, Maslow JN,. 1994. Polyclonal infections due to *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS detected by pulsed-field gel electrophoresis of sequential clinical isolates. J Clin Microbiol, 32: 1773-1778.

234. Smith CL, Klco SR, Cantor CR. 1988. Pulsed-field gel electrophoresis and the technology of large DNA molecules. In: Davies KE (ed), *Genome analysis: a practical approach*. Oxford, IRL Press, p. 41-72.
235. Sneath PHA, Sokal RR. 1973. *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. WH Freeman and Co., San Francisco.
236. Sokal RR, Michener CD. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Sci Bull*, 28:1409-38
237. Souther EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98: 503-517.
238. Speert DP, Campbell ME, Farmer SW, Volpel K, Joffe AM, Paranchych W. 1989. Use of a pilin gen to study molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*, 27: 2589-2593.
239. Speert DP, The International *Pseudomonas aeruginosa* Typing group. 1994. A multicenter comparison of methods for typing strains of *Pseudomonas aeruginosa* predominantly from patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis*, 169: 134-142.
240. Speijer H, Savelkoul PHM, Bonten MJM, Stobberingh E, Tjhie JHT. 1999. Application of different genotypic methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. *J Clin Microbiol*, 37: 3654-3661.
241. Spencer RC. 1996. Predominant pathogens found in the European prevalence of infection in intensive care study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 15: 281-285.
242. Stead DE. 1992. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. *Int J Syst Bacteriol*, 42: 281-295.
243. Stern MJ, Ames GFL, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major componente of the bacterial genome. *Cell*, 37:1015-1026.
244. Struelens MJ, Schwam V, Deplano A, Baran D. 1993a. Genome macrorestriction analysis of diversity and variability of *Pseudomonas aeruginosa* strains infecting cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, 31: 2320-2326.
245. Struelens MJ, Rost F, Deplano A, Maas A, Schwam V, Serruys E, Cremer M. 1993b. *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae* bacteremia after biliary endoscopy: an outbreak investigation using DNA macrorestriction analysis. *Am J Med*, 95: 489-498.
246. Struelens MJ and the Members of the European Study Group on Epidemiological Markers of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect*, 2: 2-11.
247. Stull TL, Li Puma JJ, Edlind TD. 1988. A broad spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. *J Infect Dis*, 157:280-286.

256 -Bibliografía-

248. Stull TL, Li Puma JJ. 1995. Method for ribotyping. En: Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology. Washington DC. Section 10: 10.5.1.
249. Swaminathan B, Matar GM. 1993. Molecular typing methods. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, eds. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. 5th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, Cap. 2: 26-50.
250. Talon D, Capellier G, Boillot A, Michel-Briand. 1995. Use of pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiologic tool during an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections in an intensive care unit. Intensive Care Med, 21: 99-1002.
251. Talon D, Cailleaux V, Thouverez M, Michel-Briand Y. 1996. Discriminatory power and usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological studies of *Pseudomonas aeruginosa*. J Hosp Infect, 32: 135-145.
252. Talon D, Mulin B, Rouget C, Bailly P, Thouverez M, Viel JF. 1998. Risks and routes for ventilator-associated pneumonia with *Pseudomonas aeruginosa*. Am J Respir Crit Care Med, 157: 978-984.
253. Tassios PT, Gennimata V, Spaliara-Kalogeropoulou L, Kairis D, Koutsia C, Vatopoulous AC, Legakis NJ. 1997. Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O:11 outbreak in an intensive care unit. Clin Microbiol Infect, 6: 621-628.
254. Tassios PT, Vassiliki G, Maniatis AN, Fock C, Legakis NJ, and the Greek *Pseudomonas aeruginosa* study group. 1998. Emergence of multidrug resistance in ubiquitous and dominant *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O:11. J Clin Microbiol, 36: 897-901.
255. Tenover FC. 1985. Plasmid fingerprinting. A tool for bacterial strain identification and surveillance of nosocomial and community-acquired infections. Clin Lab Med, 5: 413-436.
256. Tenover FC; Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hébert A, Hill B, Hollis R, Jarvis WR, Kreiswirht B, Eisner W, MaslowJ, McDougal LK, Miller JM, Mulligan M, Pfaller MA. 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 32: 407-415.
257. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995a. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol, 33: 2233-2239.
258. Tenover FC. 1995b. Introduction to Molecular Biology Techniques. En: Isenberg HD. Clinical Microbiology procedures Handbook. American Society for Microbiology. Section 10: 10.1.1.

259. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 18: 426-439.
260. Teres D, Schweers P, Bushnell LS, Hedley-Whyte J, Feingold DS. 1973. Sources of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a respiratory/surgical intensive-therapy unit. *Lancet*, i: 415-417.
261. Tillotson JR, Lerner Am. 1968. Characteristic of nonbacteriemic *Pseudomonas* pneumonia. *Ann Intern Med*, 68: 295-307.
262. Torres A, Puig de la Bellacasa J, Rodríguez Roisín R, Jiménez de Anta MT, Agustí Vidal A. 1988. Diagnostic value of telescoping plugged catheters in mechanically ventilated patients with bacterial pneumonia using the metras catheter. *Am Rev Respir Dis*, 138: 117-120.
263. Torres A, Aznar R, Gatell J, Jiménez P, González J, Ferrer A, Celis R, Rodríguez-Roisin R. 1990. Incidence, risk and prognosis factors of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. *Am Rev Respir Dis*, 142: 523-528.
264. Torres A, Serra-Batlles J, Ros E, Piera C, Puig de la Bellacasa J, Cobos A, Lomeña F, Rodríguez-Roisín R. 1992. Pulmonary aspiration of gastric contents in patients receiving mechanical ventilation: the effect of body position. *Ann Intern Med*, 116: 540-543.
265. Torres A, Gatell JM, Aznar E, El-Elbiary M, Puig de la Bellacasa J, González J, Ferrer M, Rodríguez-Roisín R. 1995. Re-intubation increases the risk of nosocomial pneumonia in patients needing mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*, 152: 137-141.
266. Torres A, El-Ebiary. 1997. Diagnostic and approaches and hospital-acquired pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med*, 18: 149-161.
267. Trouillet JL, Chastre J, Vuagnat A, Joly-Guillou ML, Combaut D, Combret MC, Gibert C. 1998. Ventilator-associated pneumonia caused by potentially drug-resistant bacteria. *Am J Respir Crit Care Med*, 157: 531-539.
268. Vallés J, Artigas A, Rello J, Bonsoms N, Fontanals D, Blanch LI, Baigorri F, Mestre J. 1995. Continuous aspiration of subglottic secretions in preventing ventilator-associated pneumonia. *Ann Intern Med*, 122: 179-186.
269. Vallés J, Rello J. 1997. Nonpharmacologic strategies for preventing nosocomial pneumonia. *Clin Pulmonary Med*, 4: 141-147.
270. van Belkum A, Verbrugh H. 1997. Molecular epidemiology: what the epidemiologist needs to know. *Curr Opin Infect Dis*, 10: 296-303.

271. van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, Small PM. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*, 31: 406-409.
272. van Saene HKF, Damjanovic V, Murray AE, de la Cal MA. 1996. How to classify infectious in intensive care units: the carrier state, a criterion whose time has come?. *J Hosp Infect*, 33: 1-12.
273. Van Wijngaerden E, Peetermans WE, Van Lierde S, Van Eldere J. 1997. Polyclonal *Staphylococcus* endocarditis. *Clin Infect Dis*, 25: 69-71.
274. Vasil ML, Graham LM, Ostroff RM, Shortridge VD, Vasil AI. 1991. Phospholipase C: molecular biology and contribution to the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother*, 44: 34-47.
275. Versalovic J, Koeuth T, Luski JR. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*, 19: 6823-6831.
276. Vincent JL, Bihari D, Suter PM, Braining HA, White J, Nicolas-Chanoih MH, Wolf M, Spencer RC, Hemmer H. 1995. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe: the results for the EPIC study. *JAMA*, 274: 639-644.
277. Vincent JL. 1999. Prevention of nosocomial pneumonia. *Thorax*. 54: 544-549.
278. Vishwanath S, Ramphal R. 1985. Tracheobronchial mucin receptor for *Pseudomonas aeruginosa*: predominance of amino sugars in binding sites. *Infect Immun*, 48: 331-335.
279. Von Reyn CF, Maslow JN, Barber TW, Falkinham JO III, Arbeit RD. 1994. Persistent colonisation of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infections in AIDS. *Lancet*, 343: 1137-1141.
280. Von Reyn CF, Jacobs NJ, Arbeit RD, Maslow JN, Niemczyk S. 1995. Polyclonal *Mycobacterium avium* infections in patients with AIDS: variations in antimicrobial susceptibilities of different strains of *M. avium* isolated from the same patient. *J Clin Microbiol*, 33: 1008-1010.
281. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman M, Kuiper M. 1995. AFLP: a new technique form DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23: 4407-4414.
282. Wachsmuth K. 1986. Molecular epidemiology of bacterial infections: examples of methodology and of investigations of outbreaks. *Rev Infect Dis*, 8:682-692.
283. Wallace RJ Jr., Zhang Y, Brown BA, Dawson D, Murphy DT, Wilson R, Griffith DE. 1998. Polyclonal *Mycobacterium avium* complex infections with nodular bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*, 158: 1235-1244.

284. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 35: 147-151.
285. Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Trüper HG. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol*, 37: 463-464.
286. Weber DJ, Rutala WA. 1997. Environmental issues and nosocomial infections. En: Wenzel RP, ed. *Prevention and control of nosocomial infections*. 3ª ed. Williams & Wilkins, p. 491-514.
287. Weinstein RA. 1991. Epidemiology and control of nosocomial infections in adult intensive care units. *Am J Med*, 91 (3B): 179S-184S.
288. Welsh J, McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*; 18:7213-7218.
289. Wiblin RT. 1997. Nosocomial pneumonia. En: Wenzel RP, ed. *Prevention and control of nosocomial infections*. 3ª ed. Williams & Wilkins, p. 807-819.
290. Widmer AF, Wenzel RP, Trilla A, Bale MJ, Jones RN, Doebbeling BN. 1993. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a surgical intensive care unit: probable transmission via hands of a health care worker. *Clin Infect Dis*, 16: 372-376.
291. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18: 6531-6535.
292. Wilson R, Tsang KWT. 1994. Antibiotics and the lung. En: Page CP, Metzger WJ , eds. *Drugs and the Lung*. New York, Raven Press. p. 347-381.
293. Wilson R, Dowling RB. 1998. *Pseudomonas aeruginosa* and related species. *Thorax*, 53: 213-219.
294. Winberley N, Falling LJ, Barlett JG. 1979. A fiberoptic bronchoscopy technique to obtain uncontaminated lower airway secretions for bacterial culture. *Am Rev Respir Dis*, 119: 337-343.
295. Woods DE, Straus DC, Johanson WG JR, Berry VK, Bass JA. 1980. Role of pili in adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mammalian buccal epithelial cells. *Infect Immun*, 29: 1146-1151.
296. Woods DE, Strauss DC, Johanson WG Jr, Bass JA. 1981. Role of salivary protease activity in adherence of gram-negative bacilli to mammalian buccal epithelial cells in vivo. *J Clin Invest*, 68: 1435-1440.
297. Wunderink RG. 1998. Mortality and the diagnosis of ventilator-associated pneumonia: a new direction. *Am J Respir Crit Care Med*, 157: 349-350.

260 -Bibliografia-

298. Yoshida H, Nakamura M, Bogaki M, Nakamura S. 1990. Proportion of DNA gyrase mutants among quinolone-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 34: 1273-1275.
299. Zhou J, Enright MC; Spratt BG. 2000. Identification of the major spanish clones of penicillin-resistant pneumococci via the internet using multilocus sequence typing . *J Clin Microbiol*, 38: 977-986.

8 APÉNDICE

Tabla 1. Morfología de las colonias, pulsotipos y antibiogramas de los aislamientos de *P. aeruginosa* obtenidos en los cortes ambientales.

Cortes ambientales	Localización	Origen ^a	Nº colonias ^b	Morfología ^c	PT ^d	Antibiograma ^e		
13/09/96	Box 4	S	2	1	7	AZT IMP GEN TOB AK	(2)	
			2	1	8	AZT IMP GEN TOB AK	(2)	
	Sala A	G	3	1	1	GEN TOB AK	(2)	
				2	1	AZT IMP GEN TOB AK CIP	(1)	
	Cocina	G	4	1	1	AZT	(3)	
1				1	AZT GEN	(1)		
Personal	M	4	1	9	AZT IMP			
17/04/97	Box 1	S	4	1	8	IMP		
	Box 3	S	4	1	1	S	(3)	
				1	1	AZT	(1)	
	Box 6	S	4	1	1	S		
	Box 9	S	4	1	7	AZT GEN TOB		
	Box 11	S	4	1	2	S	(3)	
				1	2	IMP	(1)	
	Box 14	S	4	1	13	S		
	Box 15	S	4	1	12	IMP		
	Box 16	S	3	1	1	1	S	(3)
				1	1	8	S	(1)
	Cocina	G	4	1	1	S		
	Cocina	S	3	1	1	S		
	Personal	M	4	1	1	S	(3)	
1				1	GEN	(1)		
Personal	M	4	1	1	S			
Personal	M	4	1	12	S			
18/11/97	Box 2	S	2	1	13	GEN TOB AK	(2)	
			1	2	7	AZT IMP GEN TOB AK	(1)	
			1	2	8	AZT IMP GEN TOB AK CIP	(1)	
	Box 5	S	4	1	11	AZT IMP GEN TOB AK CIP		
	Box 6	S	4	1	8	AZT IMP GEN TOB AK CIP		
	Box 7	S	4	1	8	IMP GEN TOB AK	(2)	
				1	8	AZT IMP GEN TOB AK	(2)	
	Box 9	S	2	1	15	AZT IMP GEN TOB AK CIP	(2)	
				2	2	7	AZT IMP GEN TOB AK CIP	(2)
	Box 15	S	4	1	12	IMP		
	Cocina	G	2	1	1	AZT		
Personal	M	4	1	15	AZT IMP GEN TOB AK CIP	(2)		
			2	15	AZT IMP GEN TOB AK CIP	(2)		
Personal	M	4	1	1	S			
23/02/98	Box 2	S	4	1	20	S		
	Box 5	S	2	1	7	AZT IMP GEN TOB AK	(2)	
			2	2	13	GEN	(2)	
	Box 7	S	4	1	7	AZT GEN TOB AK		
	Box 10	S	4	1	7	AZT GEN TOB AK	(3)	
				1	7	AZT GEN TOB AK CIP	(1)	
	Box 14	S	4	1	22	S		
Cocina	G	4	1	1	S			

Tabla 1. (continuación)

Cortes ambientales	Localización	Origen ^a	Nº colonias ^b	Morfología ^c	PT ^d	Antibiotipo ^e
24/11/98	Box 4	S	4	1	30	CIP
	Box 7	S	4	1	31	S
	Box 11	S	4	1	32	CIP
	Box 13	S	4	1	2	S
	Box 16	S	4	1	1	S
	Personal	M	4	1	33	AZT
	Personal	M	4	1	33	AZT
	Personal	M	4	1	33	AZT
Personal	M	4	1	33	AZT	

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

^b Nº de colonias de cada cultivo con un determinado patrón de PFGE.

^c 1: colonias iguales entre sí; 2: colonias iguales entre sí, pero diferentes de 1.

^d La nomenclatura de los pulsotipos (PTs) refleja el orden cronológico de obtención del total de los aislamientos del estudio. En color gris se destacan los cultivos policlonales.

^e AZT: aztreonam; IMP: imipenem; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AK: amikacina; CIP: ciprofloxacino. Entre paréntesis se indica el nº de colonias de cada cultivo con un antibiotipo determinado. Cuando no aparece el valor significa que todas las colonias del cultivo expresan la misma sensibilidad a los antimicrobianos estudiados.

Tabla 2. Morfología de las colonias, pulsotipos y antibiogramas de los aislamientos de *P. aeruginosa* obtenidos de los grifos de los boxes.

Box	Fecha ^a	Nº colonias ^b	Morfología ^c	PT ^d	Antibiótipo ^e
1	22/03/96	3	1	1 S	(3)
		1	1	2 S	(1)
	2/05/96	2	2	1 S	(2)
		2	1	2 S	(2)
2	25/06/96	4	1	2 S	(2)
			2	2 S	(1)
			2	2 GEN	(1)
	18/07/96	4	1	2 S	(3)
			1	2 GEN	(1)
3	12/04/96	2	1	1 S	(2)
		2	1	2 S	(2)
	29/08/96	4	1	2 AZT	
	11/10/96	4	1	2 GEN	
	18/05/98	4	1	2 AZT	
	21/05/98	2	1	2 S	(2)
		2	2	24 S	(2)
	24/05/98	3	1	2 S	(1)
				2	2 S
		1	3	24 S	(1)
	27/05/98	2	2	2 S	(2)
		2	1	25 S	(2)
	30/05/98	3	1	2 AZT	
	5/01/99	2	1	2 S	(2)
		2	2	24 S	(2)
	8/01/99	4	1	2 GEN	(3)
				2	2 GEN
	11/01/99	3	1	2 S	(3)
		1	2	24 S	(1)
	14/01/99	4	1	2 GEN	
4	22/04/96	4	1	2 GEN	
	10/05/96	4	1	2 S	
	26/07/96	4	1	2 AZT	
	4/10/96	4	1	2 GEN	
	9/01/98	1	2	1 S	(1)
		2	1	2 S	(2)
	13/01/98	1	2	1 S	(1)
		3	1	2 S	(3)
	8/04/98	2	2	2 S	(2)
		2	1	23 S	(2)
	11/04/98	1	1	1 S	(1)
		3	2	2 S	(3)
	14/04/98	1	1	1 S	(1)
		3	2	2 S	(3)
	17/04/98	4	1	2 AZT GEN	
	20/04/98	4	1	2 AZT GEN	
	23/04/98	4	1	2 AZT GEN	
	26/04/98	4	1	2 S	
	30/04/98	1	1	1 S	(1)
		3	2	2 S	(3)
	29/01/99	3	1	1 S	(3)
		1	2	2 S	(1)
	2/02/99	4	1	1 S	

Tabla 2. (continuación)

Box	Fecha ^a	Nº colonias ^b	Morfología ^c	PT ^d	Antibiotipo ^e
5	4/02/97	1	1	1	S
	6/02/97	4	1	1	S
	27/10/97	3	1	14	AZT GEN TOB AK CIP
	9/05/98	4	1	1	S
	12/05/98	2	1	1	S (2)
	15/05/98	1	1	1	S (1)
	18/05/98	4	1	1	S
	5/01/99	4	1	1	S
	7	26/09/96	4	1	1
24/04/98		4	1	1	S
27/04/98		3	1	1	S (3)
		1	2	2	S (1)
30/04/98		1	1	1	S
3/05/98		4	1	1	S
8	30/01/98	3	1	2	S (3)
		1	2	17	S (1)
	2/02/98	4	1	2	GEN
	5/02/98	2	1	2	S (2)
		2	1	17	S (2)
	8/02/98	4	1	2	GEN
	14/02/98	4	1	2	GEN
	17/02/98	4	1	2	GEN
	20/02/98	4	1	2	GEN (3)
			2	2	GEN (1)
	29/02/98	4	1	2	GEN
	8/12/98	4	1	2	S
	11/12/98	4	1	2	S
	14/12/98	4	1	2	S
10	28/05/98	4	1	2	GEN
	31/05/98	4	1	2	S (2)
			2	2	GEN (2)
	3/06/98	4	2	2	S (2)
			1	2	S (2)
	3/09/98	1	1	28	S
	6/09/98	1	1	28	S
	9/09/98	4	1	28	S
	12/09/98	4	1	28	S
11	18/04/97	4	1	2	AZT
	15/06/98	3	1	1	S (3)
		1	2	2	GEN (1)
	18/06/98	2	1	1	S (2)
		2	2	2	GEN (2)
	21/06/98	2	1	1	S (2)
		2	2	2	GEN (2)
	24/06/98	4	1	1	S (2)
			2	1	S (2)
	27/06/98	2	2	1	S (2)
	2	1	2	GEN (2)	
12	2/07/98	1	1	2	S (1)
		2	2	27	CIP (2)
	5/07/98	3	1	2	S (3)
		1	2	27	CIP (1)
	6/11/98	4	1	2	S
	9/11/98	4	1	2	S
	12/11/98	4	1	2	S
	16/11/98	4	1	27	CIP
	20/11/98	3	1	2	S (3)
		1	2	27	CIP (1)
	23/11/98	1	1	2	S (1)
	3	1	27	CIP (3)	

Tabla 2. (continuación)

Box	Fecha ^a	Nº colonias ^b	Morfología ^c	PT ^d	Antibiótipo ^e
12	5/01/99	4	1	2	AZT
	8/01/99	4	1	2	AZT
	11/01/99	4	1	2	AZT
	14/01/99	2	1	2	AZT
	20/01/99	4	1	2	AZT
13	6/04/98	2	1	2	AZT GEN
	15/04/98	4	1	2	AZT GEN
	3/11/98	4	1	2	GEN AK
	6/11/98	4	1	2	GEN AK
	9/11/98	4	2	2	S (2)
			1	2	GEN (2)
	12/11/98	4	1	2	S (1)
			1	2	GEN (3)
	16/11/98	4	1	2	GEN
14	23/02/98	4	1	22	S
16	6/02/99	4	1	1	S
	9/02/99	4	1	1	S
A	30/05/96	3	1	1	CIP (2)
			1	1	IMP TOB AK CIP (1)
			1	5	IMP (1)

^a Fecha de aislamiento 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 de seguimiento obtenidos durante el ingreso de un determinado paciente y la *línea -----* separa los ingresos de los diferentes pacientes.

^b Nº de colonias de cada cultivo con un determinado patrón de PFGE.

^c 1: colonias iguales entre sí; 2: colonias iguales entre sí, pero diferentes de 1; el 3, colonias diferentes de 1 y 2.

^d La nomenclatura de los pulsotipos (PTs) refleja el orden cronológico de obtención del total de los aislamientos del estudio. En color gris se destacan los cultivos policlonales.

^e AZT: aztreonam; IMP: imipenem; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AK: amikacina; CIP: ciprofloxacino. Entre paréntesis se indica el nº de colonias de cada cultivo con un antibiótipo determinado. Cuando no aparece el valor significa que todas las colonias del cultivo expresan la misma sensibilidad a los antimicrobianos estudiados.

Tabla 3. Morfología de las colonias, pulsotipos y antibiogramas de los aislamientos de *P. aeruginosa* procedentes de los 39 pacientes colonizados.

Paciente	Box	Muestra ^a	Día ^b	Nº colonias ^c	Morfología ^d	PT ^e	Antibiograma ^f	
2	1	E	3	3	1	1	S (3)	
				1	1	2	S (1)	
		F	3	3	1	1	S (3)	
				1	1	2	S (1)	
		TET	3	4	1	1	S (3)	
		T	3	4	1	1	AK (1)	
1	1				S (3)			
				1	1	GEN (1)		
4	3	E	6	1	2	1	S (1)	
				3	1	2	S (2)	
					1	2	AZT IMP (1)	
		CB	7	4	1	3	GEN AK (3)	
				1	3	GEN TOB AK (1)		
5	4	E	3	4	1	1	S	
		F	3	4	1	2	GEN	
		SG	3	4	1	2	GEN	
		R	3	4	1	4	S	
6	1	E	12	1	1	2	AZT GEN	
			15	1	1	1	S	
			18	2	2	1	S (2)	
				2	1	2	S (2)	
			21	4	1	2	AZT	
7	4	E	3	4	1	2	S	
8	A	E	1	4	1	6	IMP	
				1	4	1	6	IMP (2)
		SG	1	4	1	1	6	AZT IMP (1)
					1	1	6	IMP GEN (1)
		TET	1	1	1	6	IMP	
		T	1	4	1	6	IMP	
		CB	2	4	1	1	6	IMP (3)
1	1				6	IMP TOB (1)		
11	2	F	3	4	1	1	AZT GEN AK CIP (3)	
				2	1	1	AZT GEN AK CIP (1)	
		SG	3	4	1	1	1	AZT GEN AK CIP (2)
					1	1	1	AZT IMP CIP (1)
					2	1	1	AZT IMP CIP (1)
T	3	1	1	1	1	AZT GEN AK CIP (1)		
13	2	E	3	4	1	1	CIP	
				1	1	1	CIP (3)	
		F	3	4	1	1	1	AZT CIP (1)
					1	1	1	CIP
		SG	3	4	1	1	1	CIP
R	3	4	1	1	1	AZT GEN AK CIP (3)		
				1	1	1	AZT IMP GEN AK CIP (1)	
14	4	E	3	4	1	2	AZT	
16	3	F	6	4	1	2	AZT	
18	7	F	6	1	1	10	GEN	
				1	1	10	GEN	
		SG	6	1	1	1	10	GEN
					1	1	10	GEN
		R	9	4	1	10	GEN	
21	4	SG	9	4	1	11	AZT	
TET		9	4	1	11	AZT		
T		9	4	1	11	AZT		
22	3	E	3	4	1	2	GEN	
		F	3	4	1	2	GEN	
		SG	3	4	1	2	GEN	

Tabla 3. (continuación)

Paciente	Box	Muestra ^a	Día ^b	Nº colonias ^c	Morfología ^d	PT ^e	Antibiotipo ^f		
26	11	TET	9	4	1	12	IMP		
		T	9	4	1	12	IMP (3)		
						1	12	AZT IMP (1)	
31	5	E	1	4	1	1	S		
			3	4	1	1	S		
32	5	E	3	4	1	1	S		
			6	4	1	1	S		
36	11	E	6	4	1	2	AZT		
		F	6	4	1	2	AZT (3)		
						1	2	AZT IMP (1)	
43	5	E	3	4	1	15	S		
			6	4	1	15	S		
			9	4	1	15	S		
			12	2	2	1	S (2)		
				2	1	15	IMP (2)		
			15	1	2	1	S (1)		
				3	1	15	S (3)		
			18	3	2	1	S (3)		
				1	1	15	S (1)		
			F	9	4	1	15	S (3)	
							1	15	IMP (1)
				12	4	1	15	S	
		15		4	1	15	S		
		18		4	1	15	S (3)		
						1	15	IMP (1)	
		SG	9	4	1	15	S (3)		
						1	15	IMP (1)	
			12	4	1	15	S		
			15	4	1	15	S		
			18	4	1	15	S (2)		
						1	15	IMP (2)	
		TET	9	4	1	15	S (2)		
						1	15	IMP (2)	
			12	4	1	15	S (2)		
						1	15	IMP (2)	
			15	4	1	15	S (2)		
						1	15	IMP (2)	
		T	9	4	1	15	S (2)		
						1	15	IMP (2)	
			12	4	1	15	S (3)		
						1	15	IMP (1)	
			15	4	1	15	S		
						1	15	S	
		R	9	4	1	15	S (3)		
						1	15	IMP (1)	
		53	4	E	1	4	1	16	S
3	4				1	16	IMP		
F	1			4	1	16	S		
	3			4	1	16	S		
SG	1			4	1	16	S		
	3			4	1	16	S		
TET	1			4	1	16	S		
	3			4	1	16	S		
T	1			4	1	16	S		
	3			2	1	16	S		
CB	3			1	1	16	S		

Tabla 3. (continuación)

Paciente	Box	Muestra ^a	Día ^b	Nº colonias ^c	Morfología ^d	PT ^e	Antibiótipo ^f	
55	8	E	15	3	1	17 S	(3)	
				1	2	2 S	(1)	
			18	2	1	17 S	(2)	
				2	2	2 S	(2)	
			21	4	1	17 S		
				F	18	4	1	17 S
			21	4	1	17 S		
				SG	18	4	1	17 S
			21	4	1	17 S		
				TET	21	4	1	17 S
			21	4	1	17 S		
				T	21	4	1	17 S
			R	1	4	1	18 S	
				3	4	1	18 S	
			6	4	2	18 S	(1)	
				1	1	18 AZT	(3)	
			9	4	1	18 S	(3)	
				1	1	18 AZT	(1)	
			12	4	1	18 S	(3)	
				1	1	18 AZT	(1)	
	15	4	1	18 S	(2)			
		1	1	18 AZT	(2)			
	18	4	1	17 S				
		21	1	1	17 S	(1)		
	3	1	1	18 S	(3)			
		57	14	E	1	4	1	22 S
3	4	1		22 S				
14	F	1		4	1	22 S		
		3		4	1	22 S		
8		6		4	1	22 S	(2)	
		2		2	22 S	(2)		
14	SG	3		4	1	22 S		
		8		6	4	1	22 S	
14	TET	3		4	1	22 S		
		8		6	4	1	22 S	
14	T	3		4	1	22 S		
		8		6	4	1	22 S	
14	R	1		2	2	19 AZT GEN AK	(2)	
		2		1	21 GEN	(2)		
		3		3	1	21 GEN	(3)	
		1		1	22 S	(1)		
66	13	E		3	4	1	2 AZT GEN	
				12	4	1	2 AZT GEN	
68	4	E		3	4	1	1 S	
				6	2	1	1 S	(2)
			2	2	2 S	(2)		
			9	1	1	1 S	(1)	
			3	2	2 S	(3)		
			15	4	1	2 AZT GEN		
			18	4	1	1 AZT GEN		
			R	15	4	1	2 CIP	
18	4	1	2 CIP					

Tabla 3. (continuación)

Paciente	Box	Muestra ^a	Día ^b	Nº colonias ^c	Morfología ^d	PT ^e	Antibiotipo ^f		
69	7	E	6	4	1	2	AZT GEN		
			9	4	1	2	AZT IMP GEN		
			12	4	1	2	AZT IMP GEN AK		
			15	4	1	2	AZT IMP GEN AK		
		F	6	4	1	2	AZT GEN	(3)	
					1	2	AZT IMP GEN	(1)	
			9	4	1	2	AZT IMP GEN		
			12	4	1	2	AZT IMP GEN AK		
		SG	15	4	1	2	AZT IMP GEN AK		
			9	4	1	2	AZT IMP GEN		
			12	4	1	2	AZT IMP GEN AK		
		TET	15	4	1	2	AZT IMP		
			12	4	1	2	AZT IMP GEN AK		
			15	4	1	2	AZT IMP	(2)	
		T				2	2	AZT IMP	(2)
			6	4	1	2	AZT GEN		
			12	4	2	2	AZT IMP	(1)	
					1	2	AZT IMP GEN	(3)	
			15	4	1	2	AZT IMP	(3)	
					2	2	AZT IMP	(1)	
71	5	E	3	4	1	1	S		
			6	4	1	1	S		
			9	4	1	1	S		
		SG	3	4	1	1	S		
72	3	E	3	3	1	25	S	(3)	
				1	2	2	S	(1)	
			6	4	1	25	S		
			9	4	1	25	S		
			12	4	1	25	S		
		F	6	4	1	25	S		
			9	4	1	25	S		
			12	4	1	25	S		
			SG	3	1	1	25	AZT	
			6	1	1	25	S		
			9	4	1	25	S		
			12	4	1	25	S		
		TET	6	2	1	25	S		
			9	4	1	25	S		
			12	3	1	25	S	(3)	
				1	1	2	S	(1)	
		T	3	1	1	25	S		
			6	4	1	25	S		
			9	4	1	25	S		
			12	4	1	25	S		
73	10	E	3	4	1	1	AZT		
			6	4	1	2	GEN		
R	6	4	1	26	AZT IMP GEN TOB AK				
75	15	E	1	4	1	22	S		
			6	4	1	22	S		
			9	4	1	22	S		
		F	1	4	1	22	S		
			3	4	1	22	S		
			6	4	1	22	S		
			9	4	1	22	S		
12	4	1	22	S					

Tabla 3. (continuación)

Paciente	Box	Muestra ^a	Día ^b	Nº colonias ^c	Morfología ^d	PT ^e	Antibiotipo ^f	
75	SG	1	4	1	22	S		
		3	4	1	22	S	(3)	
				2	22	S	(1)	
		6	4	1	22	S		
		9	4	1	22	S		
		12	2	1	22	S	(1)	
				2	22	S	(1)	
		TET	3	3	1	22	S	
			6	4	1	22	S	
			9	4	1	22	S	
			12	4	1	22	S	
		T	1	4	1	22	S	
			3	4	1	22	S	
			6	4	1	22	S	
			9	4	1	22	S	
		12		4	1	22	S	
	4		1	22	S			
	4		1	22	S			
	4		1	22	S			
76	11	E	9	4	1	2	GEN	
			12	2	1	1	AZT GEN	(2)
				2	2	2	AZT GEN	(2)
77	12	E	6	4	1	1	GEN	
			3	1	1	1	GEN	
		F	6	4	1	2	GEN	
		SG	3	3	1	2	GEN	(3)
				1	2	1	GEN	(1)
			6	4	1	2	GEN	
		T	6	4	1	1	S	
78	10	E	3	1	1	28	S	
			6	4	1	28	S	
			9	4	1	28	AZT	
		F	6	4	1	28	S	
			9	4	1	28	S	
		SG	9	4	1	28	S	
		TET	9	4	1	28	AZT	
		T	9	4	1	28	S	
		R	6	4	1	28	S	
			9	4	1	28	AZT	
82	13	E	12	4	1	2	GEN AK	
83	12	E	3	4	1	29	S	
		F	3	2	1	29	S	(2)
				2	2	1	S	(2)
			6	4	1	29	S	
			9	4	1	29	S	
			12	4	1	29	S	
		15	4	1	29	S		
		SG	6	4	1	29	S	
			9	4	1	29	S	
			12	4	1	29	S	(3)
					2	29	S	(1)
			15	4	1	29	S	(2)
				2	29	S	(2)	
		TET	6	4	1	29	S	
9	4		1	29	S			
12	4		1	29	S			
15	4		1	29	S			

Tabla 3. (continuación)

Paciente	Box	Muestra ^a	Día ^b	Nº colonias ^c	Morfología ^d	PT ^e	Antibiotipo ^f	
83	12	T	6	4	1	29	S	
			9	4	1	29	S	
			12	4	1	29	S	
			15	4	1	29	S	
					2	29	S	
			CB	15	2	1	29	S
					2	29	S	
						(2)		
						(2)		
						(1)		
						(1)		
86	8	E	6	4	1	17	S	
			F	3	4	1	7	AZT GEN AK
				6	4	1	7	AZT GEN AK
			SG	3	4	1	7	AZT GEN AK
				6	4	1	7	AZT GEN AK
			TET	6	4	1	7	AZT GEN AK
				6	4	1	7	AZT GEN AK
			CB	8	4	1	7	AZT GEN AK
88	12	E	3	4	1	34	S	
			9	4	1	34	S	
			F	1	4	1	2	AZT
				3	4	1	34	S
				6	4	1	34	S
				9	4	1	34	S
			SG	1	4	1	34	S
				3	4	1	34	S
				6	4	1	2	AZT
				9	4	1	34	S
			TET	1	4	1	34	S
				3	4	1	34	S
				6	4	1	34	S
					1	34	AZT	
				9	1	1	34	AZT
			T	1	4	1	34	S
				3	4	1	34	S
				6	4	1	34	AZT
				9	4	1	2	AZT
				12	4	1	34	S
89	3	E	3	4	1	2	GEN	
			6	4	1	2	GEN	
			9	4	1	2	GEN	
			F	9	4	1	2	GEN
			SG	3	4	1	2	GEN
				6	4	1	2	GEN
				9	4	1	2	GEN
			TET	6	4	1	2	GEN
				9	4	1	2	GEN
			T	3	4	1	2	GEN
				6	4	1	2	GEN
90	5	E	1	4	1	35	S	
			3	4	1	35	S	
			F	1	4	1	35	S
				3	4	1	35	S
			SG	1	4	1	35	S
				3	4	1	35	S
			TET	1	4	1	35	S
				3	4	1	35	S
			T	1	4	1	35	S
				3	4	1	35	S

Tabla 3. (continuación).

Paciente	Box	Muestra ^a	Día ^b	Nº colonias ^c	Morfología ^d	PT ^e	Antibiótipo ^f
92	4	E	3	4	1	7	AZT IMP GEN TOB AK
		F	3	4	1	7	AZT IMP GEN TOB AK
		SG	3	4	1	7	AZT IMP GEN TOB AK
		TET	1	4	1	7	AZT IMP GEN TOB AK
			3	4	1	7	AZT IMP GEN TOB AK
		T	3	4	1	7	AZT IMP GEN TOB AK
		CB	3	4	1	7	AZT IMP GEN TOB AK
		R	3	4	1	7	AZT IMP GEN TOB AK
94	16	E	3	3	1	6	IMP (3)
				1	1	1	S (1)
		F	1	4	1	6	IMP
			3	4	1	6	AZT IMP
		SG	1	4	1	6	IMP
			3	4	1	6	AZT IMP
		TET	3	4	1	6	AZT IMP
		T	3	4	1	6	AZT IMP
		CB	3	4	1	6	AZT IMP
		R	3	4	1	1	S

^a E: estómago; F: faringe; SG: 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: muestra tomada en las primeras 24 horas tras el ingreso, el resto de las muestras se tomaron cada 3 días (3, 6,...).

^c Nº de colonias de cada cultivo con un determinado patrón de PFGE.

^d 1: colonias iguales entre sí; 2: colonias iguales entre sí, pero diferentes de 1.

^e La nomenclatura de los pulsotipos (PTs) refleja el orden cronológico de obtención del total de los aislamientos del estudio. En color gris se destacan los cultivos policlonales.

^f AZT: aztreonam; IMP: imipenem; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AK: amikacina; CIP: ciprofloxacino. Entre paréntesis se indica el nº de colonias de cada cultivo con un antibiótipo determinado. Cuando no aparece el valor significa que todas las colonias del cultivo expresan la misma sensibilidad a los antimicrobianos estudiados.





Servei de Biblioteques

Reg. 1500760038

Sig. TVAB/5522

Ref. 12500

