

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA

UTILIDAD DEL MÉTODO PASS PARA EL DIAGNÓSTICO
DE NEUMONÍA ASOCIADA A VENTILADOR A PARTIR
DE MUESTRAS OBTENIDAS CON TÉCNICAS
NO BRONCOSCÓPICAS

Por
Med Cir Hazael Jiménez Amador

Como requisito parcial para obtener el Grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA

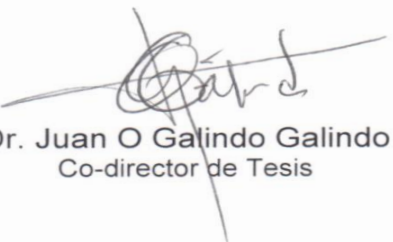
Agosto, 2007

UTILIDAD DEL MÉTODO PASS PARA EL DIAGNÓSTICO DE
NEUMONÍA ASOCIADA A VENTILADOR A PARTIR DE
MUESTRAS OBTENIDAS CON TÉCNICAS NO
BRONCOSCÓPICAS

Aprobación de la tesis



Dra. Elvira Garza González
Directora de Tesis



Dr. Juan O Galindo Galindo
Co-director de Tesis



Dr. Francisco Javier Bosques Padilla
Co-director de Tesis



Dr. Dionicio A. Galarza Delgado
Subdirector de Estudios de Posgrado

SITIO DE ESTUDIO

El presente trabajo se llevó a cabo en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Servicio de Neumología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Director de tesis: Dra. Elvira Garza González

Co-director de tesis: Dr. Juan O Galindo Galindo

Co-director de tesis: Dr. Francisco Javier Bosques Padilla

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN

1.1.	Definición de neumonía.....	13
1.2.	Clasificación de la neumonía.....	13
1.3.	Clasificación de la NAV.....	14
1.4.	Incidencia de la NAV.....	14
1.5.	Factores de riesgo.....	15
1.5.1.	Dispositivos invasivos y NAV.....	16
1.5.2.	Administración empírica de antibióticos y NAV.....	16
1.6.	Mortalidad asociada a NAV.....	17
1.7.	Patogenia de la NAV.....	18
1.8.	Agentes causales de la NAV.....	18
1.9.	Características de patógenos frecuentes causantes de NAV.....	20
1.9.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	20
1.9.2.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
1.9.3.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	22
1.9.4.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	23
1.10.	Métodos de diagnóstico de NAV.....	24
1.10.1.	Diagnóstico microbiológico.....	25

1.10.2.	Obtención de muestras para el cultivo cuantitativo.....	26
1.10.3.	Técnicas broncoscópicas.....	26
1.10.4.	Técnicas no broncoscópicas.....	27
1.11.	Método molecular para el diagnóstico de NAV de inicio tardío.....	29
2.	JUSTIFICACIÓN.....	30
3.	OBJETIVO	
3.1.	Objetivo general.....	31
3.2.	Objetivos específicos.....	31
4.	MATERIAL Y MÉTODOS	
4.1.	Estrategia general.....	32
4.2.	Población de estudio.....	33
4.3.	Identificación bacteriana.....	33
4.3.1.	Cultivo cualitativo.....	33
4.3.2.	Cultivo cuantitativo.....	34
4.3.3.	Tinción de Gram.....	35
4.4.	Aplicación del método PASS.....	35
4.4.1.	Extracción de DNA de las muestras.....	35
4.4.2.	Análisis de las muestras por el método PASS.....	36
4.4.3.	Condiciones de la PCR.....	36
4.4.4.	Análisis cuantitativo.....	38

4.5.	Análisis estadístico.....	40
5. RESULTADOS		
5.1.	Características demográficas de la población de estudio.....	43
5.2.	Cultivo cualitativo de lavado bronquioalveolar.....	43
5.2.1.	Cultivo cualitativo de lavado bronquioalveolar obtenido con sonda nasogástrica.....	45
5.2.2.	Cultivo cualitativo de aspirado traqueobronquial.....	46
5.2.3.	Detección cualitativa con el método PASS en los tres tipos de muestras.....	47
5.3.	Cultivo cuantitativo de lavado bronquioalveolar con broncoscopio.....	48
5.4.	Correlación de los resultados en el cultivo cuantitativo y el método PASS.....	49
5.5.	Análisis estadístico.....	53
5.5.1.	Sensibilidad y especificidad.....	53
5.5.2.	Concordancia <i>kappa</i> entre 2 métodos.....	55
5.5.3.	Características operativas del receptor.....	56
6. DISCUSIÓN.....		58
7. CONCLUSIÓN.....		62
8. REFERENCIAS.....		63
9. APÉNDICES.....		74

- A Pruebas bioquímicas y sistemas de identificación
- B Tinciones
- C Preparación de reactivos y soluciones

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Factores independientes para el desarrollo de NAV

Tabla 2. Concentraciones de los componentes de reacción para el método PASS

Tabla 3. Clasificación de las características operativas del receptor

Tabla 4. Interpretación del índice *kappa* y la fuerza de la concordancia

Tabla 5. Características de la población estudiada

Tabla 6. Cultivos con cuenta positiva para cada una de las bacterias de interés

Tabla 7. Resultados obtenidos mediante cultivo y el método PASS de LBAB

Tabla 8. Resultados obtenidos mediante cultivo y el método PASS de LBAsn

Tabla 9. Resultados obtenidos mediante cultivo y el método PASS de AT

Tabla 10. Tabla de 2 x 2 para determinar la sensibilidad y especificidad del método PASS de lavado bronquioalveolar con broncoscopio

Tabla 11. Tabla de 2 x 2 para determinar la sensibilidad y especificidad del método PASS de lavado bronquioalveolar con sonda nasogástrica

Tabla 12. Tabla de 2 x 2 para determinar la sensibilidad y especificidad del método PASS de aspirado traqueobronquial

Tabla 13. Concordancia *kappa* entre 2 métodos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Agentes causales de NAV

Figura 2. Curva estándar para *P. aeruginosa*

Figura 3. Curva estándar para *A. baumannii*

Figura 4. Curva estándar para *S. aureus*

Figura 5. Curva estándar para *S. maltophilia*

Figura 6: Resultado de los cultivos cualitativos a partir de los LBAB

Figura 7. Resultado de los cultivos cualitativos a partir de los LBAsn

Figura 8. Resultados de los cultivos cualitativos a partir de los AT

Figura 9. Porcentaje de detección de cada bacteria con el método PASS

Figura 10. Curvas ROC

NOMENCLATURA

ABC	Área bajo la curva
AT	Aspirado traqueobronquial
BCP	Broncoscopía con cepillo protegido
CRCEI	Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas
Ct	Ciclo umbral
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleótidos
EDTA	Ácido etilen diamino tetracético
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
F-	Iniciador derecho
Fr	French
g	gramos
HCl	Ácido clorhídrico
IC	Intervalo de confianza
<i>k</i>	índice <i>kappa</i>
l	Litro
LBAB	Lavado bronquioalveolar con broncoscopio
LBAsn	Lavado bronquioalveolar con sonda nasogástrica
LD	Límite de detección
LPMN	Leucocitos polimorfonucleares
MDR	Multidrogorresistentes
mg	miligramos
min	minuto
mL	mililitros
mm ³	milímetro cúbico
mM	milimoles
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
n	número
NAV	Neumonía asociada a ventilador

NC	No cuantificable
ND	No detectable
nM	nanomoles
p	Valor de la P
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
R-	Iniciador reverso
R2	Coeficiente de correlación
ROC	Características operativas del receptor
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SDRA	Síndrome de distrés respiratorio agudo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
s	segundo
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
U	Unidad
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UFC	Unidades formadoras de colonia
μ L	microlitros
VM	ventilación mecánica
VPP	Valor predictivo positivo
$x g$	fuerza centrífuga relativa

RESUMEN

Med. Cir. Hazael Jiménez Amador

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título: Utilidad del método PASS para el diagnóstico de neumonía asociada a ventilador a partir de muestras obtenidas con técnicas no broncoscópicas

Área de Estudio: Microbiología Médica

Antecedentes. La neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV) tiene una incidencia del 10-20% entre los pacientes que se encuentran en la unidad de cuidados intensivos (UCI) y una mortalidad del 20-75%.

El diagnóstico clínico y radiológico de neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV) es inespecífico, por lo que es necesaria la confirmación microbiológica con cultivo cuantitativo de lavado bronquioalveolar con broncoscopio (LBAB). Con el cual se podrían causar eventos adversos graves para el paciente, además del tiempo necesario para obtener los resultados y la imposibilidad de determinar la cantidad relativa de cada especie bacteriana.

Por lo que se evaluó la utilidad de un método molecular diseñado para detectar y cuantificar a las 4 bacterias más frecuentes en la NAV de inicio tardío (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* y *Stenotrophomonas maltophilia*) a partir de muestras de lavado bronquioalveolar con sonda nasogástrica (LBA_{sn}) y aspirado traqueobronquial (AT). Debido a que la confirmación del diagnóstico se podría hacer en 6 h.

Material y métodos. Se incluyeron a 17 pacientes con diagnóstico clínico radiológico de NAV de inicio tardío, en la UCI del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González". Se determinó la sensibilidad, especificidad, exactitud diagnóstica (ED) y el valor predictivo positivo (VPP), utilizando como estándar al cultivo cuantitativo de LBAB. El análisis se hizo a partir de tablas de contingencia de 2 x 2 y con las características operativas del receptor (curvas ROC); también se determinó la concordancia *kappa* entre el cultivo cualitativo y el método PASS a partir de las muestras obtenidas con las distintas técnicas.

Resultados. La sensibilidad y especificidad del método PASS de LBAB fue de 12.5% y 60% respectivamente, la ED de 30% y el VPP de 33.3%. Del método PASS de lavado bronquioalveolar con sonda nasogástrica (LBA_{sn}) fue de 0 y 100% respectivamente y un 38% de ED. Con el método PASS de aspirado traqueobronquial (AT) un 87.5% y 100% respectivamente, la ED del 92% y un 100% de VPP. Con el análisis de las curvas ROC el área bajo la curva (ABC) del método PASS LBAB fue de 0.475 (IC 95% 0.113-0.837), para el método PASS LBA_{sn} el ABC fue de 0.4 (IC 95% 0.60-0.739) y para el método PASS AT el ABC que se obtuvo fue de 0.938 (IC 95% 0.793-1.082). La concordancia *kappa* entre el LBAB y el método PASS LBAB el índice *kappa* (*k*) fue 0.523, entre el LBAB y el método PASS LBA_{sn} el índice *k* obtenido fue -0.087 y para el LBAB comparado con el método PASS AT el índice *k* fue de 0.678.

Conclusiones. El método PASS aplicado a muestras de AT podría ser una alternativa rápida y de mínima invasión para confirmar el diagnóstico de NAV de inicio tardío. Es probable que con el método PASS de LBAB el punto de corte para la confirmación del diagnóstico requiera ser modificado, por lo que es necesario hacer más estudios.

El método PASS aplicado a muestras de LBA_{sn} no tiene utilidad diagnóstica.

Capítulo 1

Introducción

1.1. Definición de neumonía

La neumonía se define como un proceso inflamatorio en el parénquima pulmonar del hospedero en respuesta a la invasión de organismos patógenos tales como virus, bacterias, hongos y protozoarios en el tejido pulmonar estéril. Histológicamente, la reacción inflamatoria afecta al intersticio alveolar, causa la consolidación exudativa del alveolo y la alteración en el intercambio gaseoso a través de la membrana alveolar. La magnitud de esta respuesta depende del tamaño del inóculo, la virulencia de los organismos involucrados y la competencia del estado inmune del hospedero [1,2].

1.2. Clasificación de la neumonía

La neumonía se clasifica según el sitio donde se adquirió la infección, con dos principales vertientes: 1) neumonía adquirida en la comunidad; a comunidad se refiere como fuera del entorno hospitalario e instituciones de cuidado crónico y 2) neumonía nosocomial, la cual incluye cualquier caso de neumonía que inicie en un tiempo no menor de 48 horas posterior a la admisión hospitalaria. Por otro lado la neumonía que se presenta en individuos con 48 horas o más de haber sido intubados endotraquealmente y con ventilación mecánica (VM) se le conoce como neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV) [3].

1.3. Clasificación de la NAV

La NAV se clasifica según el tiempo de inicio de la infección posterior al inicio de la VM, debido a que es una variable epidemiológica y factor de riesgo para la selección de ciertos agentes patógenos, principalmente bacterianos. Langer y colaboradores describieron la clasificación y actualmente es avalada entre otras organizaciones por la American Thoracic Society, y se divide en: 1) NAV de inicio temprano, definida como la neumonía que ocurre dentro de los primeros cuatro días (≤ 96 horas) de VM y 2) NAV de inicio tardío, definida como la neumonía que ocurre a partir del quinto día (>96 horas) de VM [1,4, 5].

1.4. Incidencia de la NAV

La incidencia de la NAV en la unidad de cuidados intensivos (UCI), varía según el sitio de estudio y los criterios utilizados para el diagnóstico, por ejemplo en el estudio EPIC (European Prevalence of Infection in Intensive Care) publicado en 1995, se midió la prevalencia de infecciones adquiridas en 1417 UCI, con 1 día de corte, resultando en un total de 10038 pacientes. El 20.6% (2064) presentaron alguna infección adquirida en la UCI, de los cuales el 46.9% (967) tenían neumonía, resultando en una prevalencia general del 10.3% [6], a diferencia del 24% reportado por Woske y colaboradores a partir de resultados de un estudio prospectivo de 1 año en una UCI en Alemania [7]. En Canadá, la incidencia reportada es del 18% [8] y en los Estados Unidos de Norteamérica la incidencia de NAV es del 11% según un análisis retrospectivo a partir de datos clínicos y de cultivo microbiológico realizado en 59 hospitales [9]. Sin embargo según datos

recolectados por el Nacional Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report entre 1992 y 1997, la incidencia de NAV fue del 23% y entre enero de 2002 y junio de 2004 la incidencia disminuyó a un 12-15% en UCI de neurocirugía, quemados y trauma [10, 11]. En México en un estudio realizado en 5 UCI la incidencia de NAV fue del 20.23% [12].

1.5. Factores de riesgo

Los factores de riesgo independientes para el desarrollo de NAV, se dividen en factores del hospedero, factores relacionados con la intervención médica y otros factores como se muestra en la tabla 1 [13].

Factores del hospedero	Factores de intervención	Otros factores
Albúmina sérica, <2.2 g/dL Edad ≥60 años SDRA EPOC Trauma, quemaduras Coma Gravedad de la enfermedad de base Colonización gástrica Colonización de la vía respiratoria superior Sinusitis Aspiración de contenido gástrico	Bloqueadores H ₂ , antiácidos Agentes paralizantes, sedación > 4 unidades de sangre Monitoreo de presión intracraneal VM por más de 48 horas Reintubación Sonda nasogástrica Posición en decúbito supino Transporte fuera de UCI Previo uso de antibióticos Cambios frecuentes del circuito del ventilador	Otoño, invierno

SDRA: síndrome de dificultad respiratoria aguda; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; VM: ventilación mecánica; UCI: unidad de cuidados intensivos. Referencia 13.

Tabla 1. Factores independientes para el desarrollo de NAV

1.5.1. Dispositivos invasivos y NAV

Uno de los principales factores de riesgo para desarrollar NAV es la intubación endotraqueal debido a que: 1) causa inflamación y trauma en la nasofaringe, 2) actúa como reservorio para la proliferación bacteriana, 3) incrementa la adherencia bacteriana y la colonización de las vías aéreas, 4) impide la depuración mucociliar y la tos y 5) incrementa la probabilidad de aspiración de patógenos nosocomiales [13, 14].

Se ha demostrado que el inicio de la colonización bacteriana en la superficie interna del tubo endotraqueal posterior a la intubación e inicio de la VM es escasa a las 48 horas, pero entre las 60 y 96 horas es significativamente mayor [15]. La duración de la VM esta asociada con el riesgo de presentar NAV, con un 3.3% por día de VM en la primera semana y un 2% por día en la segunda semana [8].

Por otro lado, en un modelo murino, se ha observado que la VM exacerba tanto la inflamación pulmonar como la sistémica en respuesta a la infección pulmonar con *Staphylococcus aureus* y contribuye a la patogénesis del daño pulmonar agudo y al síndrome de falla orgánica múltiple [16].

1.5.2. Administración empírica de antibióticos y NAV

Otro de los factores de riesgo para el desarrollo de NAV es la administración previa de antibióticos [13], y la profilaxis con antibióticos en los primeros 8 días de VM está asociada a un menor riesgo de presentar NAV de inicio temprano [17]. La administración prolongada de los mismos en la UCI favorece el aumento en la incidencia de NAV de inicio tardío, incrementando el riesgo de neumonía causada por bacterias multidrogosresistentes (MDR) [18, 19]. Debido a que el uso de

antibióticos ocasiona que se seleccionen los microorganismos MDR, que haya una supresión de la flora bacteriana normal y que emerjan microorganismos patógenos, en particular los bacilos Gram negativos [20, 21].

1.6. Mortalidad asociada a NAV

La mayoría de los pacientes que son admitidos a la UCI tienen un padecimiento de gravedad, de estos pacientes, aproximadamente el 10% requiere de VM, y los que requieren VM por 14 días o más tienen una mortalidad del 43% en comparación con el 33% de los que reciben VM por menos de 14 días ($p= 0.001$) [22]. Pero cuando coexiste NAV, la mortalidad atribuida se estima entre el 24-76%, especialmente en los pacientes con NAV de inicio tardío o en aquellos con NAV recurrente y es un factor independiente para mortalidad (*Razón de momios*= 2.1, $p=0.008$) [13, 23, 24]. La mortalidad también es afectada por el uso de empírico de antibióticos, debido a que el uso apropiado se asocia a una mortalidad del 38%, en comparación con los que tuvieron un uso inadecuado de antibióticos 91% ($p < 0.001$), sin embargo no hay diferencia entre el tiempo de tratamiento de 8 vs 15 días [25, 26]. Aunado a lo anterior, Kollef y colaboradores demostraron que los pacientes con NAV causada por patógenos de alto riesgo como lo son *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., y *Stenotrophomonas maltophilia* se asocian con una mortalidad del 65%, en comparación con el 37% de los pacientes con NAV causada por otras bacterias [27].

1.7. Patogenia de la NAV

La NAV usualmente surge como resultado de la aspiración de secreciones orofaríngeas contaminadas que se acumulan en la región subglótica alrededor del tubo endotraqueal, permitiendo que los microorganismos patógenos penetren al árbol traqueobronquial y a la vía respiratoria inferior o también puede ser secundario a la inoculación directa en la vía aérea a través del tubo endotraqueal. De tal manera que los mecanismos primarios de defensa que protegen al pulmón, han sido evadidos por los microorganismos patógenos y debido a que es un proceso dinámico, la inmunidad humoral, el sistema fagocítico dual que involucra a los macrófagos alveolares y a los neutrófilos, es sobrepasado por el tamaño del inóculo. Además, se ha sugerido que los pacientes con VM pasan por un periodo de inmunoparálisis [23, 28].

Otros factores importantes son la macroaspiración de contenido gástrico, el cual frecuentemente esta colonizado por bacilos Gram negativos, la diseminación hematogena desde otros focos de infección y contaminación cruzada a partir de objetos inanimados, así como de los profesionales de la salud [29].

1.8. Agentes causales de la NAV

La etiología de la NAV de origen bacteriano difiere según el tiempo transcurrido con VM, tipo de población, método diagnóstico utilizado y la enfermedad de base del paciente. Las bacterias patógenas más frecuentemente aisladas en la NAV de inicio temprano son: *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y algunas cepas susceptibles de la familia *Enterobacteriaceae* [28, 30, 31].

En la NAV de inicio tardío las bacterias aisladas tienden a ser MDR, como lo son *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *S. maltophilia* y en menor medida miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, y es importante señalar que aproximadamente el 40% de los casos de NAV son polimicrobianos [28, 32, 33, 34, 35].

Ríos-Licea y colaboradores aislaron los agentes causales más frecuentes en la UCI del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” a partir de muestras obtenidas por lavado bronquioalveolar de los pacientes con diagnóstico clínico de NAV y confirmación microbiológica con cultivo cuantitativo y cualitativo. Ellos encontraron que los agentes causales más comunes son por orden de frecuencia: *S. aureus*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*, y las enterobacterias representaron el 2.4% de los aislamientos [36].

Las infecciones por hongos en NAV especialmente por *Candida* spp. y NAV causada por virus ocurren con poca frecuencia, probablemente debido a las dificultades que representa establecer el diagnóstico [37, 38]. Chastre y Fagon recopilaron datos microbiológicos de 24 estudios publicados en los que se utilizó broncoscopia para la toma de la muestra. La frecuencia observada de cada bacteria se muestra en la figura 1.

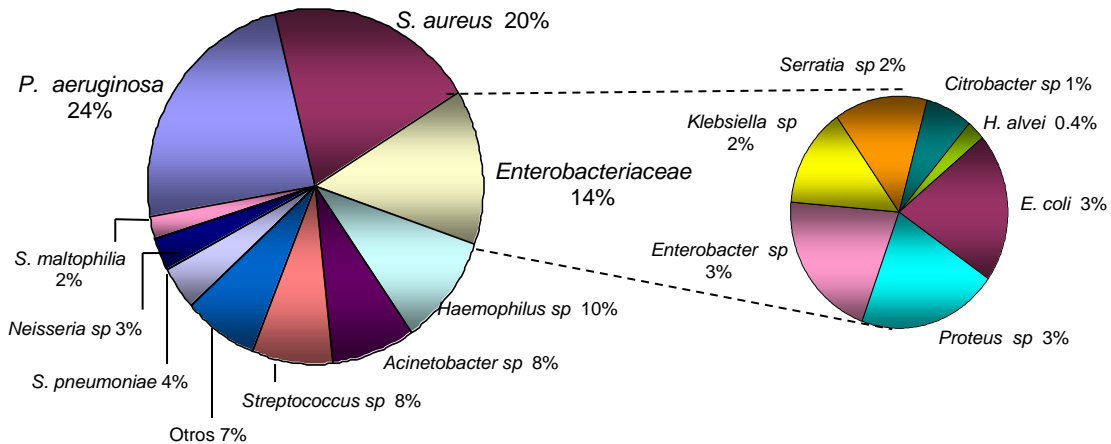


Figura 1. Agentes causales de NAV. La frecuencia de los agentes causales comunes de NAV. Este trabajo muestra el resultado de 1689 casos confirmados por métodos broncoscópicos, que involucraron 2490 aislamientos, en 24 estudios publicados.

1.9. Características de patógenos frecuentes causantes de NAV

1.9.1. *Staphylococcus aureus*

Son cocos Gram positivos, con un sitio primario de colonización en la región anterior de las fosas nasales en aproximadamente el 30% de la población sana. La colonización por *S. aureus* en la faringe se presenta en un 40-54% en individuos sanos y como parte de la flora normal en la piel de individuos sanos [39, 40, 41].

Los factores de patogenicidad de *S. aureus* incluyen, entre otros, adhesinas, polisacáridos capsulares, exoenzimas y exotoxinas. Los cuales le permiten adherirse a la membrana de las células eucariotas, lisis células eucariotas, resistir la opsonización y la fagocitosis, y estimular la producción de moléculas inmunomoduladoras del hospedero [42, 43]. Otro factor de patogenicidad clave

para la virulencia de *S. aureus* es la resistencia a los antibióticos β -lactámicos, especialmente a la meticilina (MRSA) desde la década de 1980.

Actualmente las cepas de *S. aureus* MRSA representan entre el 50-70% de las cepas en la UCI, por lo que se emplea la vancomicina como alternativa.

A finales de la década de 1990 se ha presentado emergencia de ciertas cepas resistentes [44, 45]. Los factores de riesgo asociados a infección por MRSA son: EPOC, terapia con esteroides, VM prolongada, terapia previa con antibióticos y broncoscopia previa [46].

La mortalidad atribuida a *S. aureus* sensible a meticilina (MSSA) y a MRSA en la NAV es del 29 y 36% respectivamente [30].

1.9.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Es un bacilo Gram negativo no fermentador de lactosa, es un patógeno frecuente en las infecciones de la vía respiratoria, el ambiente hospitalario, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, en portadores de sonda nasogástrica y es el patógeno de mayor importancia en los pacientes con fibrosis quística [47, 48]. Esta bacteria es parte de la flora del intestino humano y puede crecer en casi cualquier hábitat acuoso incluyendo en la tierra, superficies de agua, drenaje, plantas, alimentos, y puede encontrarse en los lavamanos y humidificadores hospitalarios [47, 49].

Los factores de patogenicidad de *P. aeruginosa* son variados, por mencionar uno de los principales, el sistema de secreción tipo III, asociado con infecciones invasivas agudas debido a que inyecta toxinas dentro de la célula del hospedero [50, 51]. *P. aeruginosa* posee una resistencia intrínseca a diferentes antibióticos y

puede adquirir fácil y rápidamente resistencia a otros antibióticos. Debido a los múltiples factores de resistencia que posee, especialmente las cepas que se encuentran en la UCI, y que afectan a los pacientes con NAV, los tratamientos deben emplear una combinación de antibióticos [52, 53].

Los factores de riesgo asociado a infección por *P. aeruginosa* son: EPOC, terapia con esteroides, SDRA, VM prolongada y terapia previa con antibióticos [46, 54, 55].

La infección por *P. aeruginosa* en la NAV es un factor de riesgo independiente asociado a mortalidad y esta asociado a un 70-80% de mortalidad [56, 13].

1.9.3. *Acinetobacter baumannii*

Es un bacilo Gram negativo no fermentador, que es considerado como un comensal, patógeno oportunista. Puede ser encontrado en distintas fuentes ambientales hospitalarias como en los humidificadores de ambiente, colchones, almohadas, plástico y frecuentemente en componentes del equipo de VM, debido a que puede soportar condiciones de desecación [57, 58]. Se ha descrito la colonización en piel y en faringe, principalmente en climas tropicales [59].

A pesar de que se considera como un organismo de baja virulencia, se han registrado casos de neumonía adquirida en la comunidad fulminante, neumonía nosocomial, bacteriemia y choque séptico causados por *A. baumannii*. Actualmente, no se han descrito factores de virulencia que expliquen su patogenicidad, pero sin lugar a dudas, la resistencia a los antibióticos es un factor importante, ya que se ha descrito que produce β -lactamasas, metallo- β -lactamasas (carbapenemasas), enzimas modificadoras de aminoglucósidos y resistencia a quinolonas [60]. Ha presentado un aumento gradual a través del

tiempo en la resistencia a imipenem y meropenem, los cuales son los fármacos con mayor actividad frente a *A. baumannii* [61, 62].

Los factores de riesgo asociados a infección por *A. baumannii* son: neurocirugía, SDRA, traumatismo en cabeza, aspiración pulmonar abundante [63].

La infección por *A. baumannii* esta asociada a una mortalidad del 27% en pacientes con NAV [64].

1.9.4. *Stenotrophomonas maltophilia*

Es un bacilo Gram negativo no fermentador de lactosa, su hábitat es amplio y se puede encontrar en fuentes de agua incluyendo ríos, pozos, agua embotellada y drenaje. Se ha aislado de diferentes plantas e inclusive en alimentos vegetales prelavados para consumo humano, en el ambiente hospitalario se ha aislado de agua destilada, máquinas de diálisis, del equipo de VM, nebulizadores, espirómetros, soluciones desinfectantes, entre otros [65, 66, 67]. Puede causar bacteriemia, endocarditis, neumonía, infección de vías urinarias, en raras ocasiones causa meningitis, infección de heridas y celulitis [65]. Se considera como un patógeno oportunista de baja virulencia. Poco se sabe acerca de los factores de virulencia de *S. maltophilia*, se ha documentado la producción de proteasas como el mecanismo principal de patogenicidad [68], la formación de biopelículas y su adherencia a dispositivos plásticos como mecanismos de resistencia a los antibióticos [69, 70].

S. maltophilia produce carbapenemasas, β -lactamasas, tiene un alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos y puede desarrollar resistencia a las fluoroquinolonas rápidamente [67]. La mejor alternativa de tratamiento es el

trimetoprim-sulfametoxazol que presenta una eficacia in vitro aproximada del 90%, sin embargo existe un aumento en la resistencia contra esta combinación de antibióticos [67, 71, 72, 73, 74].

Los factores de riesgo principales asociados a infección por *S. maltophilia* son: terapia previa con antibióticos, EPOC, VM prolongada, inmunosuprimidos y malignidad hematológica [65, 75].

La infección con *S. maltophilia* en pacientes con neutropenia y neumonía tienen una mortalidad del 40%, y en pacientes con bacteriemia la mortalidad atribuida es del 26.7% [65, 76].

1.10. Métodos de diagnóstico de NAV

El diagnóstico de NAV se realiza a partir de criterios clínicos y radiológicos consensuados y avalados por la American Thoracic Society [5] y son:

1. Ventilación mecánica por 48 horas o más.
2. Infiltrados pulmonares nuevos o persistentes en una radiografía de tórax.
3. Dos de los siguientes criterios:
 - a. Temperatura mayor de 38.2° C
 - b. Leucocitosis (10,000 o leucopenia < 4000 células/mm³).
 - c. Secreciones respiratorias purulentas.

La presencia de infiltrados pulmonares en la radiografía de tórax, y 2 de los 3 criterios clínicos (leucocitosis, fiebre y secreciones purulentas) tiene una sensibilidad y especificidad del 69 y 75% respectivamente. Cuando se requiere de

los 3 criterios clínicos la sensibilidad se reduce a un 23% y el utilizar un sólo criterio clínico disminuye la especificidad a un 33% [77], esto debido a que múltiples procesos no infecciosos pueden ocasionar los signos y síntomas utilizados para el diagnóstico clínico de NAV [78].

1.10.1. Diagnóstico microbiológico

Además de la observación microscópica en busca de bacterias intra y extracelulares, una herramienta importante para la confirmación del diagnóstico clínico son el cultivo cualitativo y cuantitativo. Los cuales se realizan a partir de una muestra de la vía respiratoria inferior obtenida por broncoscopía.

El cultivo cuantitativo sirve para discriminar a los microorganismos patógenos de los comensales, ya que se ha demostrado que cuentas mayores de 10^5 - 10^6 UFC/mL en el exudado indican infección, y los comensales que colonizan la vía respiratoria superior se encuentran en concentraciones menores a 10^5 UFC/mL [79]. Estos puntos de corte fueron establecidos a partir de comparaciones de cultivos cuantitativos obtenidos de biopsias a pulmón abierto [79].

El cultivo cuantitativo presenta algunas desventajas importantes ya que requiere de 72 horas para obtener la cuenta en UFC/mL e identificar el (los) agentes etiológicos; los resultados son influenciados por el uso previo de antibióticos y no permite determinar las cantidades relativas de cada especie bacteriana cuando el (los) agentes etiológicos son más de una especie.

1.10.2. Obtención de muestras para el cultivo cuantitativo

1.10.3. Técnicas broncoscópicas

Existen dos técnicas principales para la toma de muestra de las vías respiratorias inferiores y a partir de las cuales existen distintas modificaciones, la primera es la broncoscopia con cepillo protegido (BCP), que muestrea 0.001 mL de secreciones, con una concentración de patógenos $\geq 10^3$ UFC/mL confirma el diagnóstico de neumonía. La otra técnica es el lavado bronquioalveolar con broncoscopio (LBAB), una cuenta de patógenos $\geq 10^4$ UFC/mL es diagnóstica para neumonía y tiene concordancia con los resultados obtenidos con BCP [79, 80].

El LBAB ofrece la ventaja de evitar la contaminación con flora normal de la vía respiratoria superior, toma muestra de la zona con sospecha radiológica de infección, muestrea aproximadamente 1 millón de alvéolos (1% de superficie pulmonar), y por lo tanto es de mayor utilidad cuando el paciente ha recibido terapia previa con antibióticos [33].

El LBAB tiene algunas desventajas de riesgo para el paciente tales como:

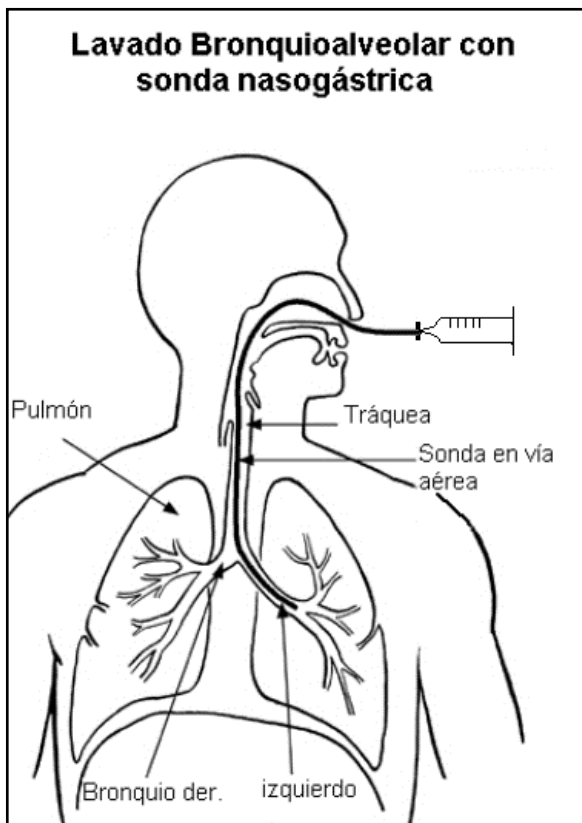
Aumento de la presión media y pulmonar, disminución en la tensión arterial de oxígeno, aumento de la tensión arterial de CO₂, arritmias cardiacas, translocación bacteriana a la circulación sistémica, neumotórax, entre otras [81, 82].

1.10.4. Técnicas no broncoscópicas

Las alternativas no broncoscópicas son el lavado bronquioalveolar con sonda nasogástrica (LBAsn) y el aspirado traqueobronquial (AT).

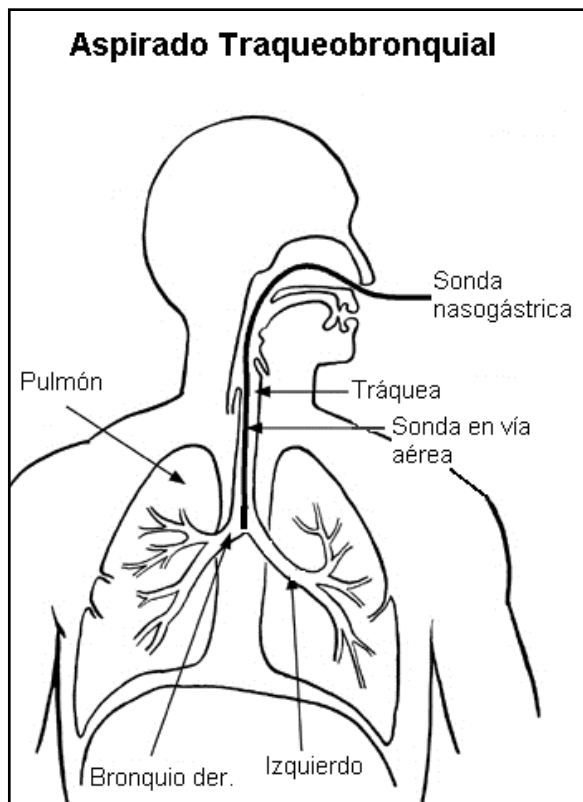
Lavado bronquioalveolar con sonda nasogástrica (LBAsn). Con el LBAsn el punto de corte es igual al establecido para el LBAB ($\geq 10^4$ UFC/mL), la sensibilidad y especificidad del LBAsn y el LBAB son similares. El LBAsn no requiere equipo de broncoscopía, se utiliza material estéril desechable, se utiliza una menor cantidad de sedantes debido a que se realiza en un menor tiempo y sobretodo durante y después del LBAsn se observan menores efectos adversos cardiorrespiratorios [82].

La técnica de toma de muestra con el LBAsn se describe a continuación:



1. Se utiliza una sonda tipo Levine de 14 fr cortada por el extremo distal. A la parte proximal de la sonda se le anexa una llave de 3 vías conectada a una jeringa de 50 mL.
2. Previa sedación del paciente, se introduce la sonda a través del tubo endotraqueal hasta que se acuña.
3. Se instila 3 alícuotas de 50 mL de solución salina estéril y se aspira. Se descarta el primer bolo recolectado y se envían 10 mL al laboratorio para su análisis.

Aspirado traqueobronquial (AT). El AT es la técnica más simple para obtener muestras de la vía respiratoria, el punto de corte en el cultivo cuantitativo para el diagnóstico de NAV se de $\geq 10^5$ o 10^6 UFC/mL [7, 83, 84], y al igual que el LBAsn, el AT no requiere equipo de broncoscopía, se utiliza material estéril desechable además de que la muestra puede ser obtenida por personal técnico entrenado. La técnica de toma de muestra con el AT se describe a continuación.



1. Se utiliza una sonda tipo Levine de 14-16 fr según la viscosidad de las secreciones bronquiales y cortada de su extremo distal. A la parte proximal de la sonda se le anexa una llave de 3 vías conectada a una jeringa de 10 mL.
2. Se introduce la sonda a través del tubo endotraqueal de 23-24 cm.
3. Se aspiran 5 mL de secreciones bronquiales y se envían para su análisis.

1.11. Método molecular para el diagnóstico de NAV de inicio tardío

En nuestro grupo de investigación, en la tesis de maestría de Ríos-Licea y colaboradores [36], se desarrolló un método molecular para detectar y cuantificar de manera simultánea a: *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus* y *S. maltophilia*, debido a que son las más frecuentes en la NAV de inicio tardío (por las siglas de las bacterias que detecta el método se denominó método PASS).

En este método se emplea la PCR en tiempo real (RT-PCR) con tecnología TaqMan®. La prueba fue diseñada para analizar muestras respiratorias obtenidas con LBAB y las ventajas obtenidas con este método es la rapidez ya que permite que se obtengan resultados en 6 horas, la cuantificación relativa de cada bacteria, además de evitar el efecto “swarming” de *Proteus* spp., que impide la cuenta bacteriana.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el método desarrollado es una excelente alternativa para el diagnóstico de NAV de inicio tardío. Sin embargo, requiere de una toma de muestra de LBAB por lo que su aplicación en muestras que se obtengan por métodos menos invasivos será de gran utilidad.

El límite de detección del sistema molecular para *P. aeruginosa* es de 10^4 copias del gen/mL, *A. baumannii* es de 10^3 copias del gen/mL, *S. aureus* 10^4 copias del gen/mL y para *S. maltophilia* de 10^4 copias del gen/mL.

Capítulo 2

Justificación

La incidencia de NAV en la UCI es alta y tiene una mortalidad entre el 20-75%. El diagnóstico clínico-radiológico de NAV es inespecífico, por lo que representa un reto diagnóstico con los métodos actuales.

Actualmente, ya se ha desarrollado un método molecular para el diagnóstico de NAV de inicio tardío (método PASS) sin embargo, requiere la obtención de muestra por la técnica de LBAB, la cual podría causar eventos adversos graves.

El método PASS, podría aplicarse a otras muestras respiratorias obtenidas por técnicas no broncoscópicas, por lo que es conveniente evaluar su utilidad con este tipo de muestras.

Capítulo 3

Objetivos

3.1. Objetivo general

Determinar la utilidad del método PASS a partir de LBAsn y AT para el diagnóstico de NAV de inicio tardío.

3.2. Objetivos específicos

1. Obtener muestras respiratorias de individuos con diagnóstico clínico de NAV de inicio tardío por LBAB, LBAsn y AT.
2. Realizar el cultivo cuantitativo y aplicar el método PASS a cada una de las muestras obtenidas.
3. Comparar los resultados obtenidos en el cultivo cuantitativo y el método PASS.

Capítulo 4

Material y métodos

4.1. Estrategia general

La obtención de las muestras fue realizado por el servicio de Neumología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, a partir de pacientes con diagnóstico clínico de neumonía asociada a ventilador en la unidad de cuidados intensivos y que tuvieran 5 días o más de ventilación mecánica. A los pacientes, se les tomaron muestras con 3 técnicas diferentes, 1 muestra obtenida con LBAB, otra con LBAsn y otra con AT.

Las muestras fueron procesadas en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI). Se realizó cultivo cuantitativo, cualitativo y tinción de Gram a la muestra obtenida con LBAB, y cultivo cualitativo y tinción de Gram al LBAsn y AT.

El método PASS se aplicó a las 3 muestras previa extracción de DNA, y se compararon los resultados obtenidos con cada técnica.

4.2. Población de estudio

Se incluyeron pacientes de la UCI, con diagnóstico clínico de NAV.

Se solicitó consentimiento informado a los familiares y se obtuvieron 2 lavados bronquioalveolares, uno con broncoscopia y otro con sonda nasogástrica, y 1 aspirado traqueobronquial, llevado a cabo por el personal del servicio de neumología del Hospital Universitario.

4.3. Identificación bacteriana

4.3.1. Cultivo cualitativo

Las muestras directas se sembraron en agar sangre, agar azida de sodio, agar S110 y agar EMB, se incubaron de 24-48 horas a 37° C en una incubadora (modelo Napco 322-10, Heinicke Company Industrial and Laboratory Heater, Portland, Oregon, EE.UU.).

A partir de los aislamientos obtenidos, se realizaron las pruebas bioquímicas primarias (catalasa, oxidasa y coagulasa) y el perfil bioquímico para la identificación bacteriana, empleando el sistema API (BioMérieux Inc Box 15969, Durham, NC 27704-0969, EE.UU.), el cual incluye una serie de microtubos que contienen sustratos deshidratados.

Los ensayos se realizaron a partir de un cultivo puro de 18-24 h para lo cual se preparó una suspensión bacteriana.

Con un hisopo, se tomaron de 1 a 4 colonias de morfología idéntica, y se resuspendieron en un tubo con solución salina. Se ajustó la turbidez al 0.5 de McFarland y a partir de la suspensión bacteriana se reconstituyeron los medios de

la galería API. Se utilizaron inmediatamente después de prepararse y se incubó de 24-48 h a 37° C. Las reacciones producidas durante la incubación se tradujeron en cambios de color, espontáneos o provocados mediante la adición de reactivos. Los ensayos de asimilación de azúcares se inocularon con un medio mínimo y las bacterias crecieron solamente si eran capaces de utilizar el correspondiente sustrato. La lectura de las reacciones se hizo con la ayuda de tablas de identificación, y el reconocimiento se realizó mediante catálogos analíticos o con ayuda de un software de identificación (API Lab Plus, BioMérieux, 1990).

4.3.2. Cultivo cuantitativo

Para obtener el cultivo cuantitativo, se realizó el método estandarizado de dilución seriada a partir de la muestra con algunas variantes [79]. Cada LBAB se pasó a un tubo cónico, y se agitó en vortex por 30-60 s. A partir de la muestra directa, se sembraron 0.1, 0.01, y 0.001 mL en agar chocolate, que corresponden a las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} respectivamente. Para obtener la dilución 10^{-4} , se tomó 0.1 mL de la muestra directa y se resuspendió en 0.9 mL de solución salina, se agitó en vortex por 30-60 s. A partir de esta solución se tomó 1 μ L y se sembró en agar chocolate en las condiciones ya mencionadas.

Las placas se incubaron de 24-48 h a 37° C en CO₂ al 5%, en una incubadora (Water Jacketed Incubator CI-46, Model 3546 S/N, American Scientific Products, EE.UU..) para obtener la cuenta total de bacterias (UFC/mL). Las placas se revisaron a las 24 h para observar el crecimiento bacteriano. Se seleccionó la dilución estadísticamente apropiada para la cuenta de bacterias y se reportó en UFC/mL.

4.3.3. Tinción de Gram

Las muestras fueron centrifugadas a 2800 x *g* por 15 min. Cuidadosamente, se obtuvo una muestra del sedimento y a partir de él se realizó la tinción de Gram. Se hicieron extensiones en portaobjeto y se examinaron al microscopio de luz con objetivo 100X.

La evaluación microscópica se centró en la búsqueda de factores sugerentes de infección como la presencia de leucocitos polimorfonucleares, la presencia de bacterias intracelulares y extracelulares, además de la observación de células epiteliales para evaluar la calidad de la muestra.

4.4. Aplicación del método PASS

4.4.1. Extracción de DNA de las muestras

Las muestras obtenidas con las 3 técnicas fueron tratadas de igual manera. Posterior a la toma de muestra para la tinción de Gram, se resuspendió el sedimento y se mezcló con un volumen igual de solución 2% *N*-acetil-L-cisteína-2% NaOH y se dejó reposar a temperatura ambiente hasta lograr licuar la muestra por 10 min. Se centrifugó a 2800 x *g* por 15 min, se extrajo el sobrenadante hasta dejar aproximadamente 1.5 mL junto con el sedimento, el cual se resuspendió cuidadosamente, se transfirió a un tubo de 2 mL y se centrifugó a 16000 x *g* por 10 min. Se desechó el sedimento, se resuspendió en 100 µL de Tris-HCl 100 mM pH 8 y se incubó por 1 h a 37° C con 150 µg de lisozima. Posteriormente se incubó por 1 h a 55° C con 100 µL de Tris-EDTA pH 8 con SDS 1% y 200 µg de proteinasa K. El DNA se extrajo utilizando fenol-cloroformo-alcohol isoamílico con

TE1X, precipitando con etanol absoluto frío y posterior a un paso de centrifugación a 16000 x g por 8 min se desechó el sobrenadante y se secó por 30 min a 45° C en un desecador (DyNA Vap, Labnet internacional Inc. Woodbridge, NJ, EE.UU.). El sedimento seco se resuspendió en 15 µL de TE 1X a 65° C por 10 min e inmediatamente se procedió a su análisis.

4.4.2. Análisis de las muestras por el método PASS

Para el análisis por RT-PCR se utilizó un termociclador SmartCycler II (Cepheid, Sunnyvale, CA, EE.UU.), con tecnología TaqMan®.

4.4.3. Condiciones de la PCR

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25 µL, utilizando Hot Start Taq DNA polimerasa Platinum® (invitrogen).

Componentes	Concentración
MgCl ₂	8 mM
dNTPs	100 mM
Buffer	10X
TaqMan- <i>S. maltophilia</i>	0.2 nM
F- <i>S. maltophilia</i>	0.2 nM
R- <i>S. maltophilia</i>	0.2 nM
TaqMan- <i>A. baumannii</i>	0.05 nM
F- <i>A. baumannii</i>	0.1 nM
R- <i>A. baumannii</i>	0.1 nM
TaqMan- <i>P. aeruginosa</i>	1.5 nM
F- <i>P. aeruginosa</i>	0.3 nM
R- <i>P. aeruginosa</i>	0.3 nM
TaqMan- <i>S. aureus</i>	0.5 nM
F- <i>S. aureus</i>	0.3 nM
R- <i>S. aureus</i>	0.3 nM
DNA genómico	-- (4 µL)
DNA Taq polimerasa	1.25 U

Tabla 2. Concentraciones de los componentes de reacción para el método PASS

El programa consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94° C por 2 minutos, seguido por los pasos de desnaturalización a 94° C por 15 segundos e inmediatamente después por un paso combinado de alineamiento-extensión a 63° C por 30 segundos por 35 ciclos.

4.4.4. Análisis cuantitativo

La cuantificación de cada bacteria se realizó al interpolar el C_t (primer ciclo con un incremento significativo de la fluorescencia, por encima de un umbral especificado) de la muestra en una curva estándar construida a partir de concentraciones conocidas de las copias del gen específico de cada bacteria, mostrado en las figuras 2- 5.

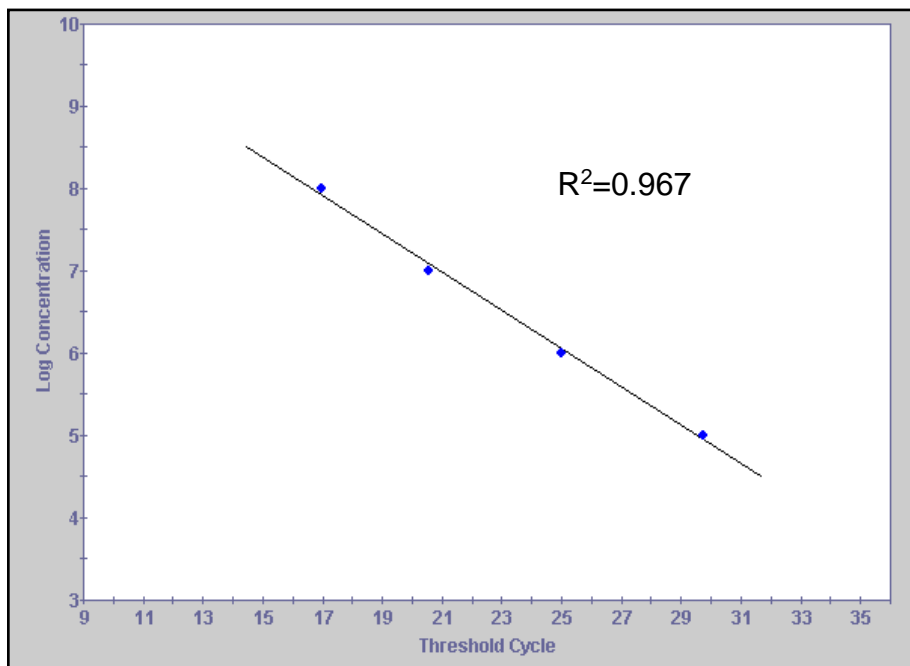


Figura 2. Curva estándar para *P. aeruginosa*

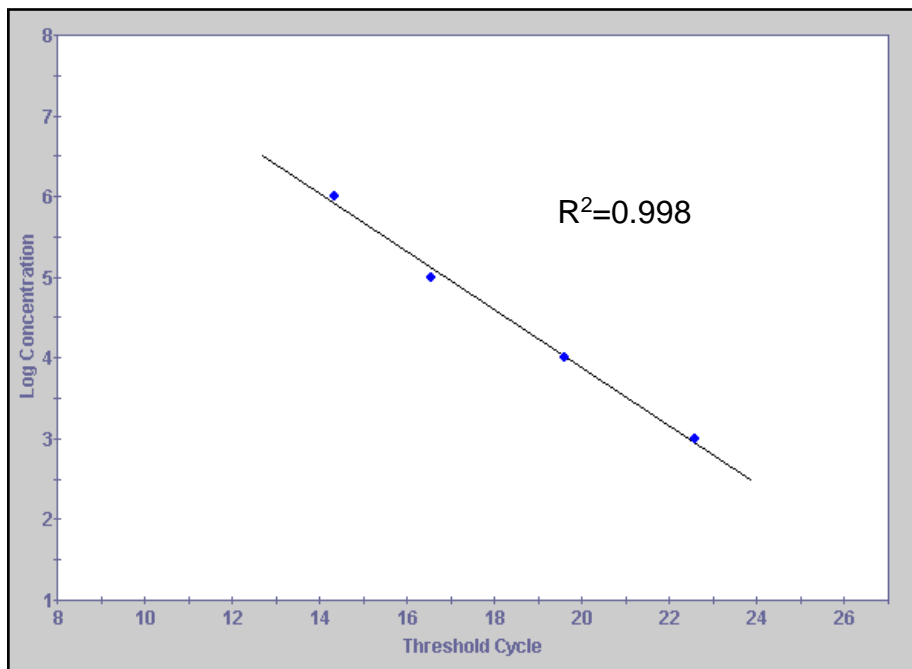


Figura 3. Curva estándar para *A. baumannii*

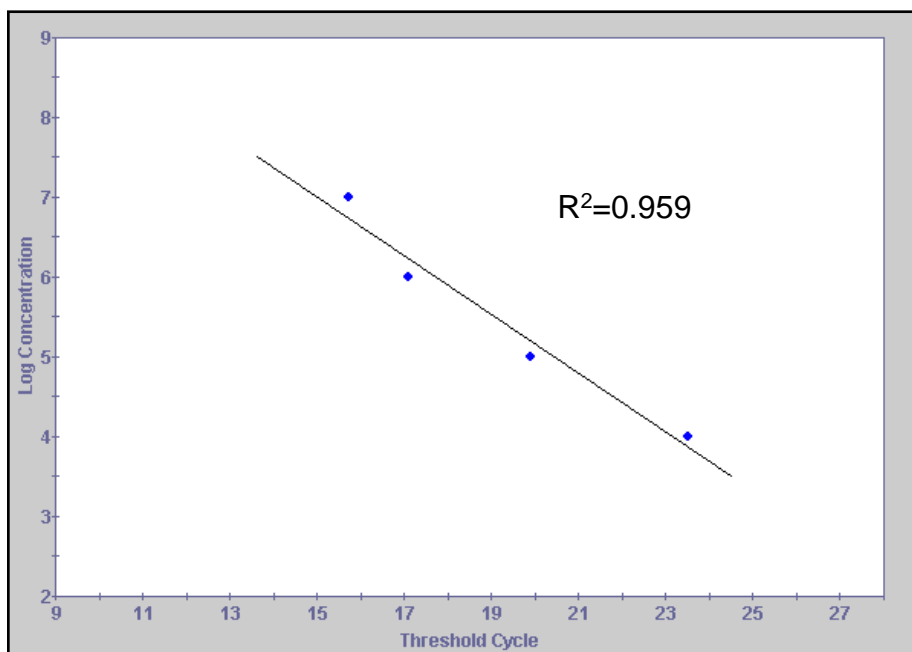


Figura 4. Curva estándar para *S. aureus*

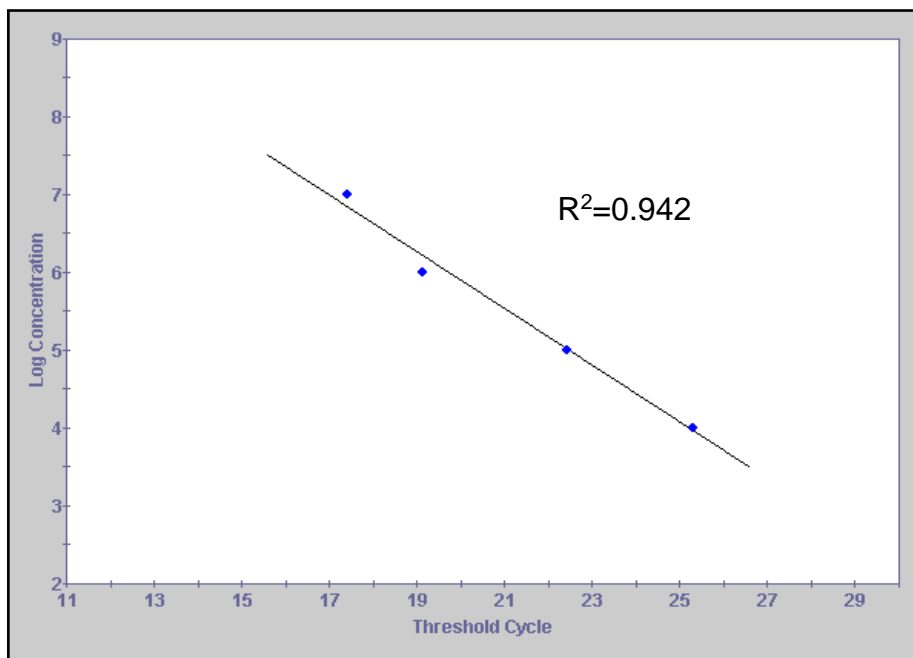


Figura 5. Curva estándar para *S. maltophilia*

4.5. Análisis estadístico

Se determinó la sensibilidad y especificidad del método PASS a partir de las distintas muestras respiratorias con una tabla de contingencia de 2 x 2 y con las características operativas del receptor o curvas ROC. Se utilizó la escala mostrada en la tabla 3, para establecer el punto de corte más apropiado. Los datos fueron procesados mediante el programa informático SPSS 11.0.

Escala	Categoría	LBAB y LBAsn copias/mL	AT copias/mL
1	Definitivamente negativo	$\leq 10^3$	$< 10^5$
2	Probablemente negativo	$< 10^4$	10^6
3	Probablemente positivo	$> 10^4$	$\geq 10^6$
4	Definitivamente positivo	$\geq 10^5$	$\geq 10^7$

Tabla 3. Clasificación de las características operativas del receptor

La concordancia *kappa* entre el cultivo cualitativo y el método PASS a partir de las muestras obtenidas con las distintas técnicas. Se obtuvo según el índice *kappa* (*k*) y la interpretación correspondiente como se expone en la tabla 4 [85].

(<i>k</i>)	Fuerza de la concordancia
< 0.20	Pobre
0.21- 0.40	Débil
0.41- 0.60	Moderada
0.61- 0.80	Buena
0.81- 1.00	Muy buena

Tabla 4. Interpretación del índice *kappa* y la fuerza de la concordancia

El método PASS se interpretó como positivo cuando la cuantificación fue $\geq 10^4$ copias del gen/mL a partir de muestras obtenidas por LBAB y LBAsn y $\geq 10^6$ copias del gen/mL de AT, para por lo menos una de las cuatro bacterias.

Capítulo 5

Resultados

5.1. Características demográficas de la población de estudio

Se incluyeron 17 pacientes de los que se obtuvieron LBAB, LBA_{sn} y AT.

Dentro de la población estudiada, el género masculino representó el 76.5%. El 88% de los pacientes habían estado bajo tratamiento con antibióticos previo a la toma de las muestras.

Las características de la población de estudio se muestran en la tabla 5.

Pacientes N	17
Masculino n (%)	13 (76.5)
Media de edad (IC 95%)	48.3 (38.7- 57.8)
Rango de edad (años)	17- 82
Antibióticos previos n (%)	15 (88)

Tabla 5. Características de la población estudiada

5.2. Cultivo cualitativo de lavado bronquioalveolar

A todos los pacientes incluidos, se les llevó a cabo la broncoscopia y se obtuvo una muestra de lavado bronquioalveolar, a los cuales se les realizó cultivo cuantitativo y cualitativo. En las muestras analizadas, se aislaron 15 especies de

bacterias, 36 cepas en total, de las cuales *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus* y *S. maltophilia* representaron el 58.3 % del total de aislamientos clínicos.

Las bacterias que se aislaron con menor frecuencia se muestran en la figura 6. *E. cloacae*, *P. putida* y *Pantoea* spp. se aislaron en un 5.5% cada una, y otras bacterias como: *E. coli*, *C. freundii*, *Proteus* spp., *K. pneumoniae*, *B. cepacia* y *S. sciuri* se aislaron en el 2.5% del total de cepas aisladas.

En 2 de los 17 pacientes incluidos se aisló flora normal del árbol respiratorio superior, en 2 pacientes se aislaron bacterias potencialmente patógenas diferentes a las del objetivo del estudio; mientras que en 6 pacientes se aisló al menos 1 de las bacterias de interés. En 6 pacientes se aislaron por lo menos 2 de las bacterias de interés y en 1 paciente se aislaron 3 de las bacterias de interés.

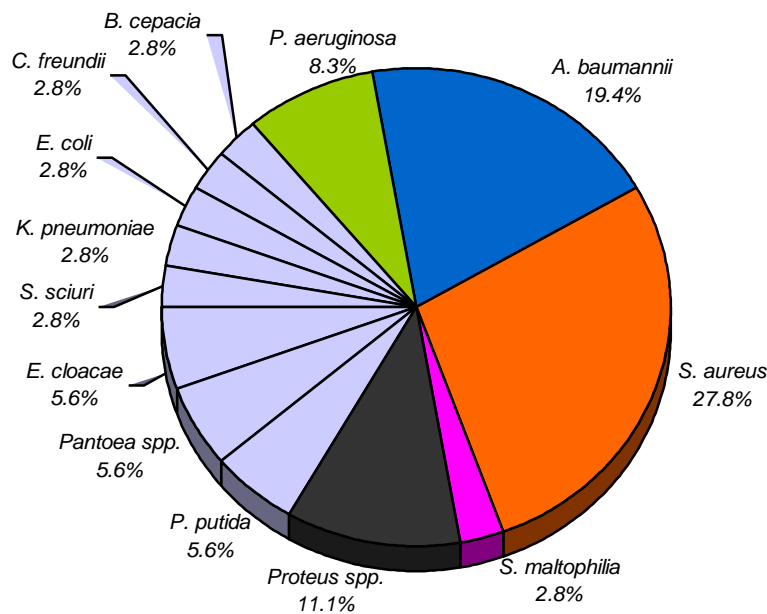


Figura 6: Resultado de los cultivos cualitativos a partir de los LBAB

5.2.1. Cultivo cualitativo de lavado bronquioalveolar obtenido con sonda nasogástrica

De los LBAsn tomados a los pacientes de estudio, se aislaron 13 especies de bacterias, 29 cepas en total, de los cuales *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus* y *S. maltophilia* representaron el 62%. *S. maltophilia* no se aisló en ninguna de las 17 muestras.

Las bacterias que se aislaron con menor frecuencia se muestran en la figura 7.

Pantoea spp. se aisló en un 6.8% y otras bacterias como: *E. cloacae*, *C. freundii*, *P. penneri*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *B. cepacia*, *P. putida* y *S. sciuri* representaron el 31% del total de las cepas aisladas.

En dos de los 17 pacientes incluidos, se aisló flora normal de vías respiratorias superiores, y en 2 pacientes se aislaron bacterias potencialmente patógenas diferentes a las del objetivo del estudio.

Mientras que en 8 pacientes se aisló al menos 1 de las bacterias de interés, en 5 pacientes se aislaron por lo menos 2 de las bacterias de interés. En ningún cultivo a partir de LBAsn se aislaron 3 o más de las bacterias de estudio.

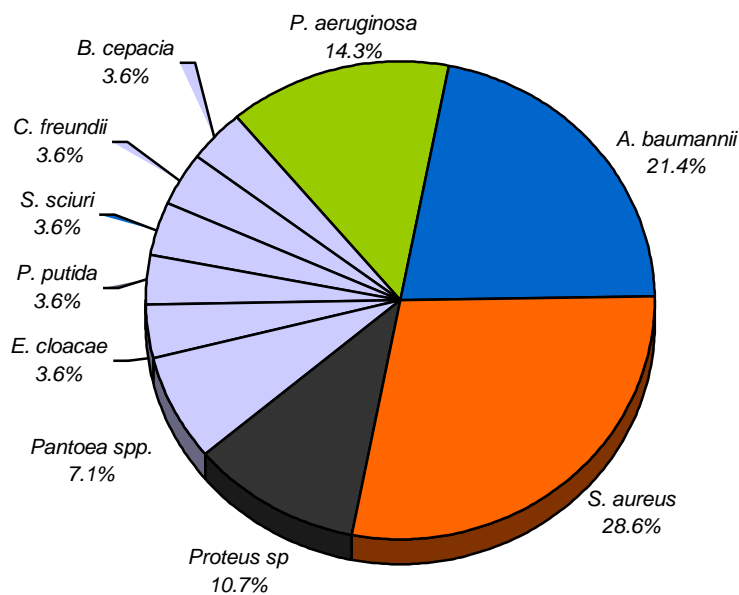


Figura 7. Resultado de los cultivos cualitativos a partir de los LBAsn

5.2.2. Cultivo cualitativo de aspirado traqueobronquial

De los AT tomados de los pacientes de estudio se aislaron 14 especies de bacterias, 31 cepas en total, de los cuales *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus* y *S. maltophilia* representaron el 64.5% del total de los aislamientos.

Las bacterias que se aislaron con menor frecuencia se observan en la figura 8. *Pantoea spp.* se aisló en un 6.4% y otras otras bacterias como: *E. cloacae*, *C. freundii*, *C. koseri*, *P. penneri*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *B. cepacia* y *S. sciuri* representaron el 29%.

En 3 de los 17 pacientes incluidos se aisló flora normal de vías respiratorias superiores, en 1 paciente se aislaron bacterias potencialmente patógenas diferentes a las del objeto del estudio; mientras que en 6 pacientes se aisló al menos 1 de las bacterias de interés, en 7 pacientes se aislaron por lo menos 2 de

las bacterias de interés. En ningún cultivo cualitativo a partir del AT se aislaron 3 o más de las bacterias de estudio.

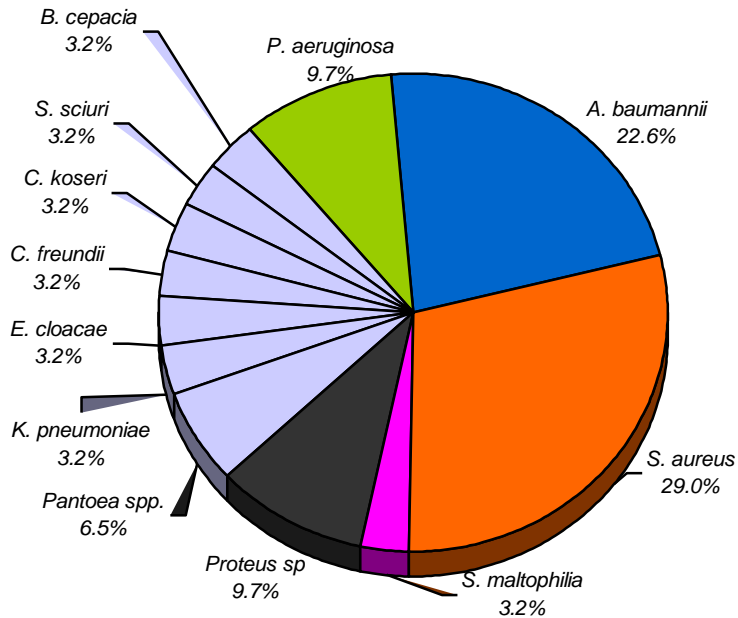


Figura 8. Resultados de los cultivos cualitativos a partir de los AT

5.2.3. Detección cualitativa con el método PASS en los tres tipos de muestras

Las especies bacterianas que se detectaron con mayor frecuencia con el método PASS, fueron, en orden de frecuencia, *A. baumannii*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*. En las 3 muestras se detectaron las bacterias en el mismo orden de frecuencia

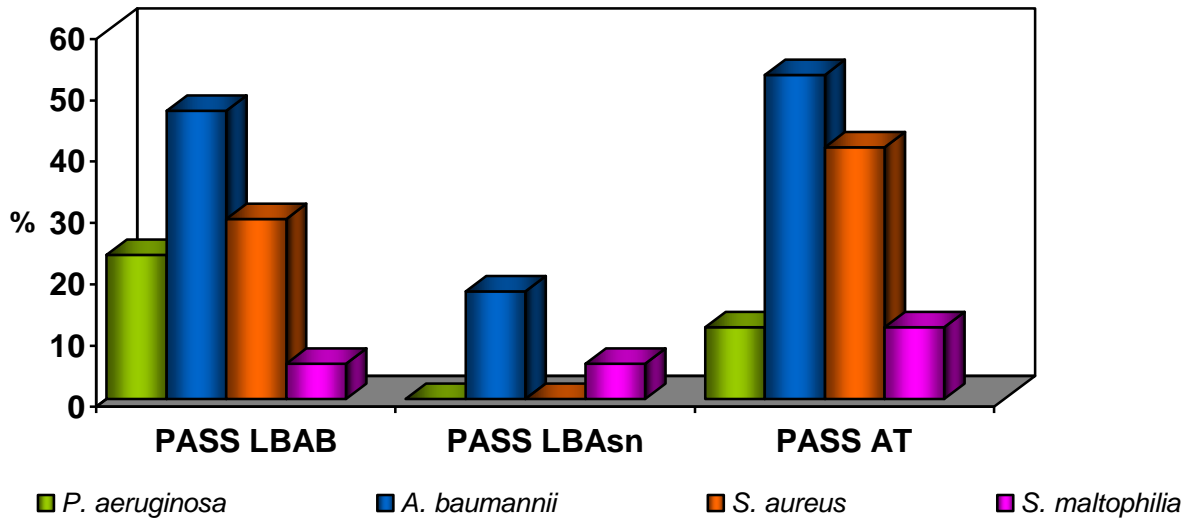


Figura 9. Porcentaje de detección de cada bacteria con el método PASS

5.3. Cultivo cuantitativo de lavado bronquioalveolar con broncoscopio

Los LBAB que tuvieron cuentas $\geq 10^4$ UFC/mL se consideraron positivos. El 47% (n=8) fueron positivos, el 29.4% (n=5) fueron negativos y en el 23.5% (n=4) no fue posible realizar la cuenta de bacterias debido a la presencia de especies de *Proteus*, causantes del efecto “swarming” que se observa sobre la superficie del agar, por lo que se consideraron indeterminados.

De los cultivos cuantitativos con cuenta positiva (n=8), en el 25% se aisló *P. aeruginosa*, *A. baumannii* en el 50%, *S. aureus* en el 75% y *S. maltophilia* en el 12.5%.

Los cultivos positivos para cada una de las bacterias se muestran en la tabla 6.

Bacterias de interés aisladas de los cultivos cuantitativos positivos	n (%)
<i>S. aureus</i>	6 (75%)
<i>A. baumannii</i>	4 (50%)
<i>P. aeruginosa</i>	2 (25%)
<i>S. maltophilia</i>	1 (12.5%)

Tabla 6. Cultivos con cuenta positiva para cada una de las bacterias de interés

5.4. Correlación de los resultados en el cultivo cuantitativo y el método PASS

En las tablas 7-9 se muestra el comparativo entre los resultados obtenidos con los cultivos cuantitativos y el método PASS realizado a partir de cada tipo de muestra.

Paciente	Cultivo LBAB		PASS LBAB	
	Bacteria (s)	(UFC/mL)	Bacteria (s)	(copias/mL)
1	<i>P. putida</i> <i>E. cloacae</i>	4.3 x 10 ³	<i>A. baumannii</i>	1.09 x 10 ⁵
2	<i>P. putida</i> <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	6.5 x 10 ³	<i>A. baumannii</i>	1.13 x 10 ⁴
3	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>S. maltophilia</i>	8.6 x 10 ⁶	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>S. maltophilia</i>	<1 x 10 ⁴ <1 x 10 ⁴ <1 x 10 ⁴
4	<i>A. baumannii</i> <i>S. sciuri</i>	>1 x 10 ⁵	<i>P. aeruginosa</i>	1.3 x 10 ⁷
5	<i>A. baumannii</i> <i>C. freundii</i>	5.2 x 10 ⁵	<i>A. baumannii</i>	1.9 x 10 ³
6	<i>A. baumannii</i> <i>S. aureus</i>	1.2 x 10 ⁵	<i>A. baumannii</i>	9.7 x 10 ³
7	<i>A. baumannii</i> <i>S. aureus</i>	1.1 x 10 ⁵	<i>A. baumannii</i>	<1 x 10 ³
8	Negativo	1 x 10 ³	ND	ND
9	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	2.3 x 10 ⁵	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	<1 x 10 ⁴
10	Negativo	7.5 x 10 ²	ND	ND
11	<i>A. baumannii</i> <i>S. aureus</i> <i>Pantoea</i> spp. <i>P. penneri</i>	NC	<i>A. baumannii</i>	2.4 x 10 ⁴
12	<i>A. baumannii</i> <i>Pantoea</i> spp. <i>P. vulgaris</i>	NC	ND	ND
13	<i>B. cepacia</i> <i>P. mirabilis</i>	NC	<i>A. baumannii</i>	3.7 x 10 ⁴
14	<i>S. aureus</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>A. baumannii</i>	5.4 x 10 ³	<i>S. aureus</i>	<1 x 10 ⁴
15	<i>S. aureus</i>	1 x 10 ⁶	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	<1 x 10 ⁴ <1 x 10 ⁴
16	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	1 x 10 ⁵	<i>S. aureus</i>	<1 x 10 ⁴
17	<i>S. aureus</i> <i>E. cloacae</i> <i>Proteus</i> spp.	NC	<i>A. baumannii</i>	1.5 x 10 ³

Negativo= flora normal, NC= no cuantificable, ND= no detectable

Tabla 7. Resultados obtenidos mediante cultivo y el método PASS de LBAB

Paciente	Cultivo LBAB		PASS LBAsn	
	Bacteria (s)	(UFC/mL)	Bacteria (s)	(copias/mL)
1	<i>P. putida</i> <i>E. cloacae</i>	4.3 x 10 ³	<i>S. maltophilia</i>	5.1 x 10 ³
2	<i>P. putida</i> <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	6.5 x 10 ³	ND	ND
3	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>S. maltophilia</i>	8.6 x 10 ⁶	ND	ND
4	<i>A. baumannii</i> <i>S. sciuri</i>	>1 x 10 ⁵	ND	ND
5	<i>A. baumannii</i> <i>C. freundii</i>	5.2 x 10 ⁵	ND	ND
6	<i>A. baumannii</i> <i>S. aureus</i>	1.2 x 10 ⁵	ND	ND
7	<i>A. baumannii</i> <i>S. aureus</i>	1.1 x 10 ⁵	ND	ND
8	Negativo	1 x 10 ³	ND	ND
9	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	2.3 x 10 ⁵	ND	ND
10	Negativo	7.5 x 10 ²	<i>A. baumannii</i>	9 x 10 ²
11	<i>A. baumannii</i> <i>S. aureus</i> <i>Pantoea</i> spp. <i>P. penneri</i>	NC	<i>A. baumannii</i>	7.7 x 10 ³
12	<i>A. baumannii</i> <i>Pantoea</i> spp. <i>P. vulgaris</i>	NC	ND	ND
13	<i>B. cepacia</i> <i>P. mirabilis</i>	NC	ND	ND
14	<i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> <i>A. baumannii</i>	5.4 x 10 ³	ND	ND
15	<i>S. aureus</i>	1 x 10 ⁶	ND	ND
16	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	1 x 10 ⁵	ND	ND
17	<i>S. aureus</i> <i>E. cloacae</i> <i>Proteus</i> spp.	NC	<i>A. baumannii</i>	1.9 x 10 ⁴

Negativo= flora normal, NC= no cuantificable, ND= no detectable

Tabla 8. Resultados obtenidos mediante cultivo y el método PASS de LBAsn

Paciente	Cultivo LBAB		PASS AT	
	Bacteria (s)	(UFC/mL)	Bacteria (s)	(copias/mL)
1	<i>P. putida</i> <i>E. cloacae</i>	4.3 x 10 ³	<i>A. baumannii</i>	<1 x 10 ³
2	<i>P. putida</i> <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	6.5 x 10 ³	<i>P. aeruginosa</i> <i>A. baumannii</i> <i>S. maltophilia</i>	3.6 x 10 ⁴ 3.3 x 10 ² <1 x 10 ⁴
3	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>S. maltophilia</i>	8.6 x 10 ⁶	<i>S. aureus</i> <i>S. maltophilia</i>	>1 x 10 ⁷ >1 x 10 ⁷
4	<i>A. baumannii</i> <i>S. sciuri</i>	>1 x 10 ⁵	<i>A. baumannii</i> <i>S. aureus</i>	6.4 x 10 ³ >1 x 10 ⁷
5	<i>A. baumannii</i> <i>C. freundii</i>	5.2 x 10 ⁵	<i>P. aeruginosa</i> <i>A. baumannii</i>	>1 x 10 ⁸ >1 x 10 ⁶
6	<i>A. baumannii</i> <i>S. aureus</i>	1.2 x 10 ⁵	ND	ND
7	<i>A. baumannii</i> <i>S. aureus</i>	1.1 x 10 ⁵	<i>A. baumannii</i> <i>S. aureus</i>	7.7 x 10 ³ >1 x 10 ⁷
8	Negativo	1 x 10 ³	<i>A. baumannii</i>	4 x 10 ²
9	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	2.3 x 10 ⁵	<i>A. baumannii</i> <i>S. aureus</i>	1.7 x 10 ³ 1.3 x 10 ⁷
10	Negativo	7.5 x 10 ²	ND	ND
11	<i>A. baumannii</i> <i>S. aureus</i> <i>Pantoea</i> spp. <i>P. penneri</i>	NC	<i>A. baumannii</i>	7.7 x 10 ³
12	<i>A. baumannii</i> <i>Pantoea</i> spp. <i>P. vulgaris</i>	NC	ND	ND
13	<i>B. cepacia</i> <i>P. mirabilis</i>	NC	ND	ND
14	<i>S. aureus</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>A. baumannii</i>	5.4 x 10 ³	<i>S. aureus</i>	<1 x 10 ⁴
15	<i>S. aureus</i>	1 x 10 ⁶	<i>S. aureus</i>	>1 x 10 ⁷
16	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	1 x 10 ⁵	<i>S. aureus</i>	2 x 10 ⁷
17	<i>S. aureus</i> <i>E. cloacae</i> <i>Proteus</i> spp.	NC	<i>A. baumannii</i>	8.7 x 10 ³

Negativo= flora normal, NC= no cuantificable, ND= no detectable

Tabla 9. Resultados obtenidos mediante cultivo y el método PASS de AT

5.5. Análisis estadístico

5.5.1. Sensibilidad y especificidad

Tomando en cuenta el cultivo cuantitativo como estándar de oro, y sin tomar en cuenta los cultivos en los cuales no se pudo realizar la cuenta por el crecimiento de especies de *Proteus*, se calculó la utilidad diagnóstica del método PASS para el diagnóstico de neumonía asociada a ventilador de inicio tardío en cada una de las muestras obtenidas de cada paciente. Para las muestras de LBA obtenidas con broncoscopio, se obtuvo la sensibilidad y especificidad del método PASS, a partir de los datos mostrados en la tabla 10. La sensibilidad y especificidad fueron del 12.5% y 60% respectivamente, la exactitud diagnóstica del 30% y el valor predictivo positivo (VPP) de 33.3%.

		Cultivo cuantitativo	
		Positivo ($\geq 10^4$ UFC/mL)	Negativo ($< 10^4$ UFC/mL)
Método PASS de LBAB	Positivo ($\geq 10^4$ copias/mL)	1	2
	Negativo ($< 10^4$ copias/mL)	7	3

Tabla 10. Tabla de 2 x 2 para determinar la sensibilidad y especificidad del método PASS de lavado bronquioalveolar con broncoscopio

A partir de muestras de LBA obtenidas con sonda nasogástrica la sensibilidad y especificidad del método PASS fue de 0 y 100% respectivamente y un 38% de exactitud diagnóstica. Los datos se muestran en la tabla 11.

		Cultivo cuantitativo	
		Positivo ($\geq 10^4$ UFC/mL)	Negativo ($< 10^4$ UFC/mL)
Método PASS de LBAsn	Positivo ($\geq 10^4$ copias/mL)	0	0
	Negativo ($< 10^4$ copias/mL)	8	5

Tabla 11. Tabla de 2 x 2 para determinar la sensibilidad y especificidad del método PASS de lavado bronquioalveolar con sonda nasogástrica

A partir de muestras de AT la sensibilidad y especificidad fueron de 87.5% y 100% respectivamente, la exactitud diagnóstica de 92% y el VPP de 100%. Datos mostrados en la tabla 12.

		Cultivo cuantitativo	
		Positivo ($\geq 10^4$ UFC/mL)	Negativo ($< 10^4$ UFC/mL)
Método PASS de AT	Positivo ($\geq 10^6$ copias/mL)	7	0
	Negativo ($< 10^6$ copias/mL)	1	5

Tabla 12. Tabla de 2 x 2 para determinar la sensibilidad y especificidad del método PASS de aspirado traqueobronquial

5.5.2. Concordancia *kappa* entre 2 métodos

La evaluación de la concordancia entre realizar cultivo cuantitativo del LBAB y la cuantificación de las copias del gen con el método PASS, no se hizo debido a la evidente diferencia entre las cuentas obtenidas con cada método.

En base a los resultados, se llevó a cabo el análisis de concordancia *kappa* entre los resultados obtenidos con el cultivo cualitativo del LBAB y el método PASS según la muestra utilizada.

Para el LBAB comparado con el método PASS LBAB el índice *kappa* (*k*) fue 0.523, para LBAB comparado con el método PASS LBAsn el índice *k* obtenido fue -0.087 y para el LBAB comparado con el método PASS AT el índice *k* fue de 0.678.

Concordancia entre métodos	Índice <i>k</i>	IC 95%
LBAB vs PASS LBAB	0.523	0.217- 0.830
LBAB vs PASS LBAsn	-0.087	-0.326- 0.152
LBAB vs PASS AT	0.678	0.402- 0.954

Tabla 13. Concordancia *kappa* entre 2 métodos

5.5.3. Características operativas del receptor

El análisis de las características operativas del receptor o curvas ROC se hizo a partir de los puntos de corte previamente descritos para cada método PASS. El área bajo la curva (ABC) del método PASS LBAB fue de 0.475 (IC 95% 0.113-0.837), para el método PASS LBAsn el ABC fue de 0.4 (IC 95% 0.60-0.739) y para el método PASS AT el ABC que se obtuvo fue de 0.938 (IC 95% 0.793-1.082), mostrado en la figura 10.

Capítulo 6

Discusión

La NAV en las UCI es una infección frecuente y grave, además de que el diagnóstico utilizando criterios clínicos y radiológicos carece de especificidad, debido a las múltiples condiciones clínicas que asemejan una infección pulmonar [1, 14].

Las características de la población observada en nuestro estudio corresponden a la reportada en la literatura con respecto a la edad y que los pacientes del género masculino son los mayormente afectados [7, 22, 64, 77, 83].

Los agentes causales aislados de los cultivos cuantitativos positivos de muestras de pacientes con diagnóstico de NAV de inicio tardío corresponden a las reportadas en la literatura [32, 86, 87]. El hecho de que la incidencia de infecciones causadas por *A. baumannii* hayan aumentado a nivel internacional y que en la UCI del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” sea el segundo en frecuencia entre los pacientes con NAV de inicio tardío, indica que no debería seguir siendo considerada como una bacteria de baja patogenicidad como es sugerido por Smith M. G. y colaboradores [88].

Las cuentas obtenidas con el cultivo cuantitativo y el método PASS, no coincidió en ninguno de las muestras analizadas, tal hecho se podría entender considerando que: a) Las copias de genes cuantificadas no corresponden necesariamente a bacterias vivas; b) Una copia del gen blanco corresponde a una

bacteria y una UFC corresponde a varias bacterias; c) En un cultivo se detectan bacterias vivas cultivables y en el método PASS se detectan bacterias vivas junto con bacterias muertas y también bacterias viables no cultivables, pero no significa que se deba a una acumulación de bacterias muertas, debido a que éstas son eliminadas por el sistema inmune; y d) El cultivo cuantitativo no discrimina entre los microorganismos desarrollados, incluyendo a bacterias de la flora normal. Debido a que en la mayoría de los cultivos de muestras de AT y LBAB coincidieron en las especies bacterianas identificadas, como también entre los cultivos de LBAB y el método PASS AT, es probable que las bacterias encontradas en el tubo traqueobronquial participen en el desarrollo de la NAV, debido a que pueden diseminarse hacia el parénquima pulmonar, proliferar y causar infección.

El cultivo cuantitativo de muestras de lavado bronquioalveolar con broncoscopio tiene una sensibilidad del 73% y una especificidad del 82% [77], por lo que la sensibilidad y especificidad del método PASS de muestras de aspirado traqueobronquial son comparables con el método estándar de confirmación diagnóstica. Además de ser una prueba relativamente rápida. Con el método PASS fue posible realizar la detección y cuantificación de bacterias en los tres tipos de muestras respiratorias (LBAB, LBAsn y AT), sin el inconveniente del efecto “swarming” de *Proteus* spp.

Como se mostró en los resultados el 88% de los pacientes con diagnóstico clínico de NAV habían recibido terapia con antibióticos previo a la toma de muestras, por lo tanto la interpretación de los cultivos se hizo a pesar de tal inconveniente.

La limitante del método estándar para la confirmación del diagnóstico, es el efecto “swarming” de *Proteus* spp. sobre el agar del medio de cultivo, lo cual impide que el cultivo cuantitativo sea interpretado correctamente, por tal motivo en las muestras de 4 pacientes, no se realizó la confirmación del diagnóstico y por lo tanto se excluyeron del análisis de sensibilidad y especificidad.

El tipo de muestra ampliamente aceptado como método estándar para la confirmación microbiológica del diagnóstico de NAV es el LBAB, debido a que es recolectado del sitio con sospecha de infección. Además permite discriminar entre bacterias que se encuentran en concentraciones suficientes para ser las causantes de infección de las bacterias que se encuentran en concentraciones bajas lo cual es indicativo de contaminación proveniente de la flora normal de las vías aéreas superiores. Al aplicar el método PASS a las muestras de LBAB se observaron limitaciones en la detección y cuantificación de las 4 bacterias de interés, que podrían deberse a que en el diseño del método PASS se requiere de cantidades relativamente altas de DNA genómico de estas especies bacterianas para ser detectadas, por lo que el límite de detección es alto. Es por esto que en la mayoría de las muestras de LBAB se obtuvieron cuentas no significativas, indicando la probabilidad de que las 4 bacterias de estudio se encuentren de manera individual en concentraciones bajas. Esto también aclara el por que al utilizar una muestra menos específica como lo es el AT, pero que contiene una cantidad mucho más alta de bacterias por mL, las cuentas fueron significativas en la mayoría de las muestras y con un rendimiento diagnóstico apropiado.

Debido al bajo rendimiento diagnóstico del método PASS al utilizar las muestras de LBAB, se optimizó la RT-PCR múltiplex modificando el diseño teórico y concentraciones de los iniciadores y sondas. Se continuará sometiendo el método a análisis de utilidad diagnóstica en el futuro mediato.

Capítulo 7

Conclusión

El método PASS aplicado a muestras de aspirado traqueobronquial podría ser una alternativa rápida y de mínima invasión para confirmar el diagnóstico de NAV de inicio tardío.

Es probable que con el método PASS de muestras de lavado bronquioalveolar con broncoscopio el punto de corte para la confirmación del diagnóstico requiera ser modificado, por lo que es necesario hacer más estudios.

El método PASS aplicado a muestras de lavado bronquioalveolar con sonda nasogástrica no tiene utilidad diagnóstica.

Los puntos de corte para la confirmación diagnóstica más apropiados con el método PASS son: PASS AT: $\geq 10^6$ copias del gen/mL; y para PASS LBAB: $\geq 10^4$ copias del gen/mL. Sin embargo se requieren de estudios complementarios para corroborar estos resultados

Capítulo 8

Referencias

1. Hunter JD. Ventilator associated pneumonia. *Postgrad Med J* 2006; 82: 172-178.
2. Lee BW, Hsu SI, Stasiar DS. Medicina basada en la evidencia. Madrid España, *Marbán* 2000: 577.
3. Kollef MH. Prevention of hospital-associated pneumonia and ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med* 2004; 32: 1396-1404.
4. Langer M, Cigada M, Mandelli M, Mosconi P, Tagnoni G. Early onset pneumonia: a multicenter study in intensive care units. *Intensive Care Med* 1987; 13: 342-346.
5. American Thoracic Society Documents: Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 388-416.
6. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, et al: The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe: Results of the European prevalence of infection in intensive Care (EPIC) study. *JAMA* 1995; 274: 639-644.
7. Woske HJ, Röding T, Schulz I, Lode H. Ventilator-associated pneumonia in a surgical intensive care unit: epidemiology, etiology and comparison of three bronchoscopic methods for microbiological specimen sampling. *Crit Care* 2001; 5: 167-173.

8. Cook DJ, Walter SD, Cook RJ, Griffith LE, et al. Incidence of and risk factors for ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. *Ann Intern Med* 1998; 129: 433-440.
9. Kollef MH, Shorr A, Tabak YP, Gupta V, et al. Epidemiology and outcomes of health-care-associated pneumonia: Results from a large US database of culture-positive pneumonia. *Chest* 2005; 128: 3854-3862.
10. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. *Crit Care Med* 1999; 27: 887-892.
11. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004. *Am J Infect Control* 2004; 32: 470-485.
12. Ramirez-Barba EJ, Rosenthal VD, Higuera F, Sobreyra-Oropeza M, et al. Device-associated nosocomial infection rates in intensive care units in four Mexican public hospitals. *Am J Infect Control* 2006; 34: 244-247.
13. Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 867-903.
14. Alp E, Voss A. Ventilator associated pneumonia and infection control. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006; 5: 7-17.
15. Feldman C, Kassel M, Cantrell J, Kaka S, et al. The presence and sequence of endotracheal tube colonization in patients undergoing mechanical ventilation. *Eur Respir J* 1999; 13: 546-551.

16. Dhanireddy S, Altemeier WA, Matute-Bello G, O'Mahony DS, et al. Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury, and extra-pulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia. *Lab Invest* 2006; 86: 790-799.
17. Rello J, Diaz E, Roque M, Vallés J. Risk factors for developing pneumonia within 48 hours of intubation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1742-1746.
18. Hoth JJ, Franklin GA, Stassen NA, Girard SM, et al. Prophylactic antibiotics adversely affect nosocomial pneumonia in trauma patients. *J Trauma* 2003; 55: 249-254.
19. Sandiumenge A, Diaz E, Rodriguez A, Vidaur L, et al. Impact of diversity of antibiotic use on the development of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 1197-1204.
20. Akça O, Koltka K, Uzel S, Çakar N, et al. *Anesthesiology* 2000; 93: 638-645.
21. Bochicchio GV, Joshi M, Bochicchio K, Tracy K, Scalea TM. A time-dependent analysis of intensive care unit pneumonia in trauma patients. *J Trauma* 2004; 56: 296-303.
22. Combes A, Costa MA, Trouillet JL, Baudot J, et al. Morbidity, mortality, and quality-of-life outcomes of patients requiring ≥ 14 days of mechanical ventilation. *Crit Care Med* 2003; 31: 1373-1381.
23. Wunderink RG. Nosocomial pneumonia, including ventilator-associated pneumonia. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 440-444.
24. Bercault N, Boulain T. Mortality rate attributable to ventilator-associated nosocomial pneumonia in an adult intensive care unit: A prospective case-control study. *Crit Care Med* 2001; 29: 2303-2309.

25. Luna CM, Vujacich P, Niederman MS, Vay C, et al. Impact of BAL data on the therapy and outcome of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1997; 111: 676-685.
26. Combes A, Luyt CE, Fagon JY, Wolff M, et al. Early predictors for infection recurrence and death in patients with ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med* 2007; 35: 146-154.
27. Kollef MH, Silver P, Murphy DM, Trovillion E. The effect of late-onset ventilator-associated pneumonia in determining patient mortality. *Chest* 1995; 108: 1655-1662.
28. Park DR. The microbiology of ventilator-associated pneumonia. *Respir Care* 2005; 50: 742-763.
29. Crnich CJ, Safdar N, Maki DG. The role of the intensive care unit environment in the pathogenesis and prevention of ventilator-associated pneumonia. *Respir Care* 2005; 50: 813-836.
30. Shorr AF, Tabak YP, Gupta V, Johannes RS, et al. Morbidity and cost burden of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in early onset ventilator-associated pneumonia. *Crit Care* 2006; 10: R97.
31. George DL, Falk PS, Wunderink RG, Leeper KV, et al. Epidemiology of ventilator-acquired pneumonia based on protected bronchoscopic sampling. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1839-1847.
32. Afessa B, Hubmayr RD, Vetter EA, Keegan MT, et al. Bronchoscopy in ventilator-associated pneumonia: Agreement of calibrated loop and serial dilution. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 1229-1232.

33. Ioanas M, Ferrer R, Angrill J, Ferrer M, Torres A. Microbial investigation in ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J* 2001; 17: 791-801.
34. Trouillet JL, Chastre J, Vuagnat A, Joly-Guillou ML, et al. Ventilator-associated pneumonia caused by potentially drug-resistant bacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 531-539.
35. Combes A, Figliolini C, Trouillet JL, Kassis N, et al. Incidence and outcome of polymicrobial ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2002; 121: 1618-1623.
36. Ríos Licea Merab M. Desarrollo y estandarización de un método molecular para detección y cuantificación de las bacterias más frecuentes causantes de neumonía asociada a ventilador. Tesis de maestría 2006.
37. Rello J, Esandi ME, Diaz E, Mariscal D, Gallego M, Valles J. The role of *Candida* sp. Isolated from bronchoscopic samples in nonneutropenic patients. *Chest* 1998; 114: 146-149.
38. Daubin C, Vincent S, Vabret A, Cheyron D, et al. Nosocomial viral ventilator-associated pneumonia in the intensive care unit: a prospective cohort study. *Intensive Care Med* 2005; 31: 1116-1122.
39. Kluytmans JA, Belkum V, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 505-520.
40. Nilsson P, Ripa T. *Staphylococcus aureus* throat colonization is more frequent than colonization in the anterior nares. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3334-3339.
41. O'Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17:218-234.

42. Fournier B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* 2005;18: 521-540.
43. Fedtke I, Götz F, Peschel A. Bacterial evasion of innate host defenses- the *Staphylococcus aureus* lesson. *Int J Med Microbiol* 2004; 294, 2-3:189-194.
44. Shorr AF, Kollef MH. Ventilator-associated pneumonia: Insights from recent clinical trials. *Chest* 2005; 128: 583S-591S.
45. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *NEJM* 1999; 340: 493-501.
46. Diaz, E, Muñoz E, Agbaht K, Rello J. Management of ventilator-associated pneumonia caused by multiresistant bacteria. *Curr Opin Crit Care* 2007; 13: 45-50.
47. Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 1209-1223.
48. Leibovitz A, Dan M, Zinger J, Carmeli Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and the oropharyngeal ecosystem of tube-fed patients. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 956-959.
49. Bonten MJ, Bergmans DC, Speijer H, Stobberingh EE. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1212-1219.
50. Hauser AR, Cobb E, Bodi M, Mariscal D, Vallés J, et al. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med* 2002; 30: 521-528.

51. Hauser AR, Fleiszig S, Kang PJ, Mostov K, Engel JN. Defects in type III secretion correlate with internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells. *Infect Immun* 1998; 66: 1413-1420.
52. Trouillet JL, Chastre J. Multiresistant pseudomonal respiratory infection in intensive care unit patients. *Clin Pulm Med* 2005; 12: 7-15.
53. Raja NS, Singh NN. Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. *J Microbiol Immunol Infect* 2007; 40: 45-49.
54. Rello J, Allegri C, Rodriguez A, Vidaur L, et al. Risk factors for ventilator-associated pneumonia by *Pseudomonas aeruginosa* in presence of recent antibiotic exposure. *Anesthesiology* 2006; 105: 709-714.
55. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 43-48.
56. Scarsi KK, Feinglass JM, Scheetz MH, Postelnick MJ, et al. Impact of inactive empiric antimicrobial therapy on inpatient mortality and length of stay. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3355-3360.
57. Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 868-873.
58. Wendt C, Dietze B, Dietz E, Rüden H. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1394-1397.

59. Anstey NM, Currie BJ, Hassell M, Palmer D, et al. Community-acquired bacteremic *Acinetobacter* pneumonia in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 685-686.
60. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2006; 43: S49-56.
61. Simhon A, Rahav G, Shazberg G, Block C, et al. *Acinetobacter baumannii* at a tertiary-care teaching hospital in Jerusalem, Israel. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 389-391.
62. Canduela MJ, Gallego L, Sevillano E, Valderrey C, et al. Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from elderly patients with respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 1220-1222.
63. Baraibar J, Correa H, Mariscal D, Gallego M, et al. Risk factors for infection by *Acinetobacter baumannii* in intubated patients with nosocomial pneumonia. *Chest* 1997; 1050-1054.
64. Sanchez-Nieto JM, Torres A, García-Cordoba F, El-Ebiary M, et al. Impact of invasive and noninvasive quantitative culture sampling on outcome of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 371-376.
65. Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 57-80.
66. Qureshi A, Mooney L, Denton M, Kerr KG. *Stenotrophomonas maltophilia* in salads. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1157-1158.

67. Lopez Mendoza D, Darin M, Waterer GW, Wunderink RG. Update on *Stenotrophomonas maltophilia* infection in the ICU. *Clin Pulm Med* 2007; 14: 17-22.
68. Windhorst S, Frank E, Georgieva DN, Genov N, et al. The major extracellular protease of the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Biol Chem* 2002; 277: 11042-11049.
69. Di Bonaventura G, Spedicato I, D'Antonio D, Robuffo I, Piccolomini R. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: Modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 151-160.
70. Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M, Azzuz A, et al. Characterization of flagella produced by clinical strains of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 918-923.
71. Nord CE, Wadström T, Wretling B. Synergistic effect of combinations of sulfamethoxazole, trimethoprim, and colistin against *Pseudomonas maltophilia* and *Pseudomonas cepacia*. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; 6: 521-523.
72. Felegie TP, Yu VL, Rumans LW, Yee RB. Susceptibility of *Pseudomonas maltophilia* to antimicrobials agents, singly and in combination. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 16: 833-837.
73. Gales AC, Jones RN, Forward KR, Liñares J, et al. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: Geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-1999). *Clin Infect Dis* 2001; 32(suppl 2) 104-113.

74. Al-Jasser AM. *Stenotrophomonas maltophilia* resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole: an increasing problem. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006; 5: 23.
75. Nseir S, Di Pompeo C, Brisson H, Dewavrin F, et al. Intensive care unit-acquired *Stenotrophomonas maltophilia*: incidence, risk factors, and outcome. *Crit Care* 2006; 10: R143.
76. Senol E, DesJardin J, Stark PC, Barefoot L, Snyderman D. Attributable mortality of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1653-1656.
77. Fàbregas N, Ewing S, Torres A, El-Ebiary M, et al. Clinical diagnosis of ventilator associated pneumonia revisited: comparative validation using immediate post-mortem lung biopsies. *Thorax* 1999; 54: 867-873.
78. Koenig SM, Truitt JD. Ventilator-associated pneumonia: Diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 637-657.
79. Baselski VS, El-Torky M, Coalson JJ, Griffin JP. The standardization of criteria for processing and interpreting laboratory specimens in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1992; 102; 571S-579S.
80. Jourdain B, Joly-Guillou ML, Dombert MC, Calvat S, et al. Usefulness of quantitative cultures of BAL fluid for diagnosing nosocomial pneumonia in ventilated patients. *Chest* 1997; 111: 411-418.
81. Bauer TT, Torres A, Ewig S, Hernández C, et al. Effects of bronchoalveolar lavage volume on arterial oxygenation in mechanically ventilated patients with pneumonia. *Intensive Care Med* 2001; 27: 384-393.

82. Perkins GD, Chatterjee S, Giles S, McAuley DF. Safety and tolerability of nonbronchoscopic lavage in ARDS. *Chest* 2005; 127: 1358-1363.
83. Aranha Camargo LF, De Marco FV, Valente Barbas CS, Hoelz C, et al. Ventilator associated pneumonia: comparison between quantitative and qualitative cultures of tracheal aspirates. *Crit Care* 2004; 8: R422-R430.
84. Cook D, Mandell L. Endotracheal aspiration in the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2000; 117: 195-197.
85. Altman DG. Practical statistics for medical research. New York, *Chapman and Hall* 1991.
86. Rello J, Diaz E, Rodríguez A. Advances in the management of pneumonia in the intensive care unit: review of current thinking. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11 (suppl. 5): 30-38.
87. Ruiz M, Guerrero J, Romero C. Etiología de la neumonía asociada a ventilación mecánica en un hospital clínico. Asociación con co-morbilidad, uso previo de antimicrobianos y mortalidad. *Rev Chilena Infectol* 2007; 24: 131-136.
88. Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, et al. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev* 2007; 21: 601-614.

Capítulo 9

Apéndices

Apéndice A

Pruebas bioquímicas

Prueba de catalasa

- a) Tomar una asada de la cepa de estudio y sumergirla en 1 mL de H₂O₂ al 30%, observar e interpretar la prueba.

Interpretación: Positivo: Formación de burbujas
Negativo: No hay formación de burbujas

Prueba de oxidasa

- a) Impregnar un papel filtro con una gota de reactivo de oxidasa (cloruro de N,N, dimetil-p-fenildiamina al 1% en agua).
- b) Tomar una asada de la bacteria de estudio teniendo cuidado de no arrastrar medio de cultivo.
- c) Extender la colonia en el papel filtro empapando en el reactivo de oxidasa, observar e interpretar la prueba.

Interpretación: Positivo: Formación de color rosa-morado-negro
Negativo: No hay cambio de color

Prueba de coagulasa

- a) Tomar una asada de la cepa de estudio y sumergirla en 1 mL de suero humano, incubar 24 horas a 37 °C, revisando cada 2 horas para observar la formación del coágulo.

Interpretación: Positivo: Formación del coágulo
Negativo: No hay formación del coágulo

Perfil bioquímico de identificación

- a) Sistema API E: Sistema de identificación para enterobacterias
- b) Sistema API NE: Sistema de identificación para no enterobacterias
- c) Sistema API Sthap: Sistema de identificación para cocos Gram positivos

Apéndice B

Tinciones

Tinción de Gram

1. Teñir con cristal violeta 1 min.
2. Enjuagar con agua destilada.
3. Cubrir la preparación con solución de lugol y dejar actuar durante un min.
4. Enjuagar con agua destilada para eliminar el exceso de lugol.
5. Decolorar con alcohol al 70% durante 10 s.
6. Cubrir la preparación con safranina durante 30 s.
7. Enjuagar con agua destilada.
8. Dejar secar al aire y observar la preparación con objetivo de 100X.

Apéndice C

Preparación de reactivos y soluciones

EDTA 500 mM pH 8.0

Disolver 9.306 g de $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 40 mL de agua ultrapura, ajustar el pH a 8.0 con lentejas de NaOH y aforar a 50 mL.

Etanol al 70%

Mezclar 70 mL de etanol al 100% mas 30 mL de H_2O destilada estéril.

Fenol saturado

a) Destilación

Se funde el fenol a 68 °C. Se procede a destilarlo si su aspecto al estar fundido no es cristalino (el fenol destila a una temperatura de 180 °C, es recomendable no conectar agua circulante porque el fenol puede cristalizarse en el mismo refrigerante). El fenol que va destilando se puede recibir en un pequeño volumen de Tris-HCl 0.5 M para evitar su cristalización.

b) Saturación

Antes de comenzar la saturación, el fenol debe ser equilibrado a un pH mayor de 7.8 debido a que el DNA puede quedar dentro de la fase orgánica si el pH del fenol es ácido.

c) Agregar hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1% (función antioxidante).

d) Añadir un volumen de solución amortiguadora Tris-HCl 0.5 M pH 8.0 y mezclar con una barra magnética hasta que el pH de la fase fenólica sea mayor de 7.8 (medir con papel indicador).

e) Agitar durante 24 horas en un cuarto frío, dejar que se separen las fases y eliminar la fase acuosa utilizando una pipeta conectada a una línea de vacío con trampa o embudo de separación. Repetir la misma operación pero utilizando solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M pH 8.0.

f) Eliminar la fase acuosa final y añadir 0.1 volúmenes de Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 conteniendo 2-mercaptoetanol a una concentración 0.2%.

g) La solución de fenol puede ser almacenada de esta forma en un frasco oscuro a -20 °C, las alícuotas de fenol en uso se almacenan a 4 °C.

SEVAG (24:1)

Disolver 24 mL de cloroformo mas 1 mL de alcohol isoamílico.

Proteinasa K 10 mg/mL

Disolver 100 mg de Proteinasa K en 10 mL de Tris-HCl 10 mM pH 7.5.

SDS AL 10%

Disolver poco a poco 5 g de SDS en 50 mL de agua destilada.

SDS al 1%

Mezclar 5 mL de una solución de SDS al 10% en 50 mL de agua destilada.

TE 1X

Mezclar 500 mL de Tris-HCl 500 mM pH 8.0 y 50 mL de EDTA 500 mM en agua destilada, ajustar el pH a 8.0 y aforar a 25 mL.

TE 1X con SDS al 1%

Disolver 1 g de SDS en 100 mL de TE 1X.

Tris-HCl 500 mM pH 8 (Solución stock)

Disolver 30.3 g de trizma base en 300 mL de agua ultrapura, ajustar el pH con HCl concentrado y aforar a 500 mL.